



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

202047

(11) (B2)

[51] Int. Cl.³
C 07 D 473/34

[22] Přihlášeno 15 07 76
[21] [PV 3667-79]
[32] [31] [33] Právo přednosti od 04 05 76
(22 958 A/76) Itálie

[40] Zveřejněno 31 03 80

[45] Vydáno 15 08 83

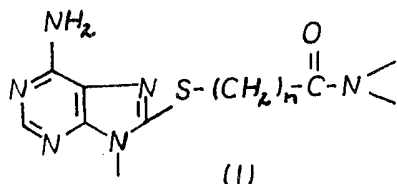
[72]
Autor vynálezu ZAFFELLI PIERGIORGIO, ROSSODIVITA ANTONIO,
PAPPA ROSARIO, MONTEROTONDO a RE LUCIANO, ŘÍM (Itálie)
[73]
Majitel patentu SNAMPROGEITI S. p. A, MILÁN (Itálie)

(54) Způsob přípravy makromolekularizovaných derivátů adeninu

1

Vynález se týká navazování funkcionalizovaných derivátů adeninu pomocí kovalentní vazby na makromolekulární sloučeniny. Funkcionalizované deriváty adeninu, popsané v čs. patentu č. 202 046 mají v poloze 8 ω -kraboxylový postranní řetězec a jsou odvozeny od sloučenin obsahujících adeninové jádro, například nikotinoylamidu, dinukleotidu adeninu (NAD⁺), fosfátu dinukleotidu nikotinoylamidadeninu (NADP⁺), adenosintrifosfátu (ATP), adenosindifosfátu (ADP), adenosinmonofosfátu (AMP), adenosinu nebo adeninu. Většina těchto sloučenin má velký význam v biochemii.

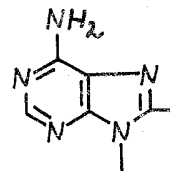
Předmětem vynálezu je způsob přípravy makromolekularizovaných derivátů adeninu, obsahujících alespoň jednu jednotku obecného vzorce I



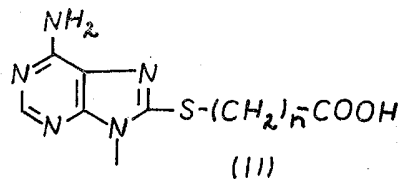
kde

n je celé číslo 2 až 4 a zbytek vzorce

2



je odvozen od sloučeniny vybrané z dinukleotidu nikotinoylamidadeninu, fosfátu dinukleotidu nikotinoylamidadeninu, adenosinmonofosfátu, cyklického adenosinmonofosfátu, adenosindifosfátu, adenosintrifosfátu, adenosinu a adeninu, který spočívá v tom, že se funkcionalizované deriváty adeninu obecného vzorce II



kde

n je celé číslo 2 až 4,

nechají reagovat při teplotě 5 až 50 °C v

prostředí vody, popřípadě ve směsi s organickým rozpouštědlem mísitelným s vodou, v přítomnosti vodorozpustného nebo nerozpustného karbodiimidu jako kondenzačního činidla, s polymerem, obsahujícím alespoň jednu primární nebo sekundární aminoskupinu, vybraným z polylysinu, ω -aminoalkylpolyanilamidů, polysacharidových esterů ω -aminoalkylkarbamových kyselin, polyvinylaminu, ω -aminoalkylesterů a ω -aminoalkylamidů polyglutamové kyseliny, aminoalkylsilanizovaných skleněných mikrokuliček a polyethyleniminu.

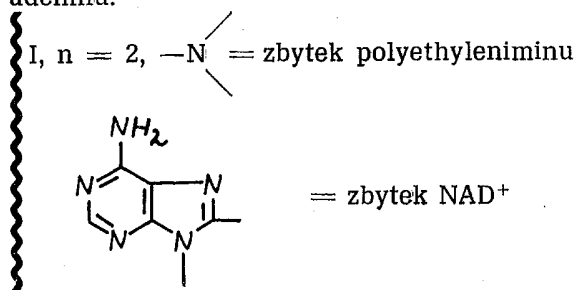
Příkladem vodorozpustného karbodiimidu je N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidhydrochlorid, jako nerozpustného karbodiimidu lze použít N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu. Jako rozpouštědel mísitelných s vodou lze použít například pyridinu, tetrahydrofuranu, dioxanu a dalších. Výhodné je pracovat při teplotě místnosti.

Funkcionalizovaných derivátů například NAD, ale i ostatních uvedených sloučenin lze po navázání na vodorozpustné nebo vodorozpustné makromolekulární látky použít jako nedifundovatelných koenzymů nebo v afinitní chromatografii.

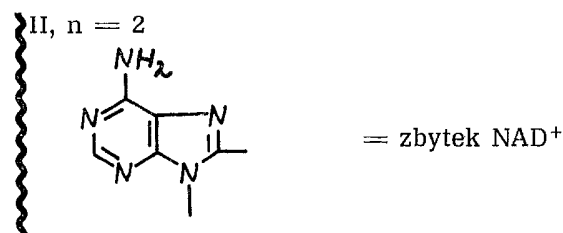
V případě navázání na vodorozpustné makromolekulární látky mohou být vzniklé produkty použity jako nedifundovatelné vodounerozpustné makromolekularizované koenzymy. Tyto látky rozšiřují možnosti použití známých enzymatických systémů, ve kterých je enzym fyzicky zabudován v nerozpustných porézních strukturách, jako jsou vlákna, polyakrylamidový gel, mikrokapsle apod., které jsou neprůchodné pro makromolekuly. Důsledkem fyzického zabudování vodorozpustného makromolekularizovaného koenzymu do enzymu nebo polyenzymatického systému je ve skutečnosti to, že jak enzym, tak koenzym zůstávají v těsném kontaktu a je znemožněno rozptýlení koenzymu ven z uzavřené struktury. Tento jev není u přírodního koenzymu možný vzhledem k jeho nízké molekulové hmotnosti. V případě navázání na vodounerozpustné makromolekulární sloučeniny lze produktů použít v afinitní chromatografii nebo pro enzymatické reakce v heterogenní fázi, přičemž je možno regenerovat koenzym.

Příklad 1

Příprava dinukleotidu nikotinoylamid-8-[(polyethylenimin-3-karbonylethylthio)-adeninu.



K 0,76 ml vodného roztoku polyethyleniminu (33 % hm./objem) upraveného na pH 5 konc. kyselinou chlorovodíkovou se přidá 39 mg dinukleotidu nikotinoylamid-8-[(karboxyethylthio)adeninu



rozpuštěného v 0,5 ml vody, a 40 miligramů hydrochloridu N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu rozpuštěného v 0,5 ml vody.

Reakční směs upravená na pH 4,8 přidávkem 2 M HCl se míchá při teplotě místnosti během 48 hodin za udržování pH 4,8 během prvních tří hodin přidávkem 0,1 M HCl. Reakční směs zředěná vodou na 20 ml se pak přemísť do centrifugační zkumavky a vysráží se 20 ml 1M fosfátového pufru při pH 6. Odstřeďuje se po 10 minut při 39 000 g a roztok se zbaví polymerní sraženiny dekantováním.

Aby se dále polymer vyčistil, rozpustí se v 4 ml 2 M roztoku chloridu sodného a 0,05 M acetátového pufru při pH 5,5 a takto získaný roztok se doplní 16 ml vody, znovu vysráží 20 ml 1 M fosfátového pufru při pH 6, odstředí během 10 minut při 39 000 g a polymer se oddělí dekantací.

Tento čistící postup se opakuje alespoň čtyřikrát.

Znova rozpuštěný produkt v 2 M roztoku chloridu sodného a 0,5 M acetátového pufru při pH 5,5 se dialyzuje oproti 1 l dávkám $1 \cdot 10^{-4}$ HCl během čtyř dnů, přičemž se roztok každého dne vyměňuje.

Mrazovým vysušením zbytku po dialýze se získá 223 mg polymerního derivátu NAD o hodnotě λ_{max} 276,5 nm.

Celkové množství NAD vázané na polymer se stanoví měřením absorbance při 276,5 nm za předpokladu, že extinkční koeficient je stejný jako u NAD derivátu II (ϵ 18 800 M⁻¹cm⁻¹).

Stanovení koenzymaticky aktivního NAD vázaného na polymer se provede kvantitativní enzymatickou redukcí alkohol-dehydrogenázou z kvasnic v 0,1 M tris pufru při pH 9 v přítomnosti 0,2 methanolu a 0,5 M semikarbazidhydrochloridu.

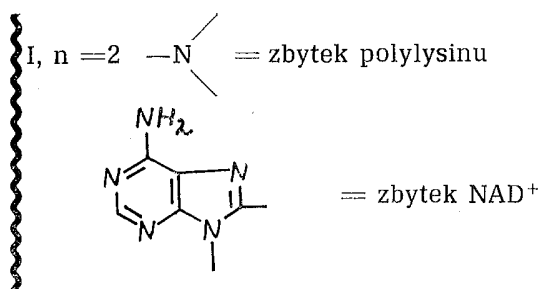
Ze spektrofotometrického měření při 340 nm u NADH derivátu, který vznikl, vyplývá, že na každý gram polymeru je vázáno 115 μmol enzymaticky redukovatelného NAD, což odpovídá tomu, že 90 % celkového NAD je vázáno na polymer.

Takto získaný makromolekulární NAD je koenzymaticky aktivní s mnohými dehydrogenázami. Například s alkohol-dehydrogenázou z kvasnic rychlost enzymatické re-

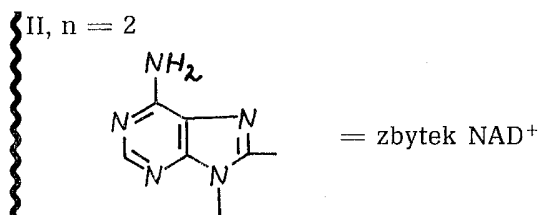
dukce makromolekulárního NAD činí 50 % ve srovnání s přirozeným koenzymem. Stanovení se provádí v této inkubační směsi (1,0 ml): tris.HCl 83 μ mol, ethanol 166 μ mol, semikarbazid.HCl 42 μ mol, koenzym 0,1 μ mol (vztaženo na vázaný a enzymaticky redukovatelný NAD), enzym 0,2 μ g, pH 9,0, inkubační teplota 25 °C. Rychlost redukce se stanoví přírůstkem absorpance při 340 nm.

Příklad 2

Příprava dinukleotidu nikotinoylamid-8-(polylysin-2-karbonylethylthio)adeninu



K 50 miligramům hydrobromidu polylysinu přibližně o molekulové hmotnosti 50 000 rozpuštěného v 0,5 ml vody se přidá 40 miligramů dinukleotidu nikotinoylamid-8-(karboxyethylthio)adeninu



rozpuštěného v 0,5 ml vody, a 40 miligramů N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimidhydrochloridu rozpuštěného v 0,5 ml vody.

Reakční směs se upraví na pH 4,7 0,1 M NaOH, míchá se během 24 hodin při teplotě místnosti za udržování pH při 4,7 během prvních tří hodin přidávkou 0,1 M HCl.

Za týchž podmínek se přidalo dalších 40 mg karbodiimidu v 0,5 ml vody a v míchání se pokračovalo dále po 24 hodin.

Reakční směs zředěná vodou na objem 15 ml se přenesla do centrifugační zkumavky a vysrážela 10 ml 0,15 M fosfátového pufru při pH 6.

Odstřeďovalo se po dobu 10 minut při 19 000 g a roztok se od polymerní sraženiny dekantoval.

K dalšímu vyčištění se polymer rozpustí v 1 ml 2 M roztoku NaCl a 0,05 M acetátového pufru při pH 5,5, takto získaný roztok se doplní 15 ml vody a znovu vysráží 10 ml 0,15 M pyrofosfátového pufru o pH 6, pak se během 10 minut odstředí při 39 000 g a polymer se izoluje dekantací.

Tento čistící postup se opakuje alespoň ještě čtyřikrát. Produkt rozpuštěný v 2 M

roztoku chloridu sodného a 0,05 M acetátového pufru o pH 5,5 se dialyzuje během 48 hodin oproti 500 ml 3 M roztoku chloridu sodného.

Dialyzuje se pak oproti 2 mol podílům $1 \cdot 10^{-4}$ M HCl po dobu čtyř dnů, přičemž se roztok denně mění.

Mrazovým vysušením dialyzačního zbytku se získá 34 mg polymerního derivátu NAD o hodnotě $\lambda_{\max}$ 276,5.

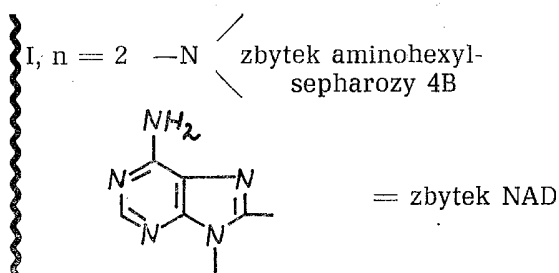
Celkové množství NAD vázaného na polymer se stanoví měřením absorpance při 276,5 nm za předpokladu, že extinkční koeficient je stejný jako u derivátu II NAD (ϵ 18 800 M⁻¹cm⁻¹). Koenzymaticky aktivní NAD vázaný na polymer se stanoví kvantitativní enzymatickou redukcí alkohol-dehydrogenázou z kvasnic v 0,1 M tris-pufu při pH 9 v přítomnosti 0,2 M ethanolu a 0,05 M hydrochloridu semikarbazidu.

Ze spektrofotometrického stanovení při 340 nm se jeví, že takto vytvořený derivát NADH obsahuje 157 μ mol enzymaticky redukovatelného NAD vázaného na gram polymeru, což odpovídá, že 90 % NAD je vázáno na polymer.

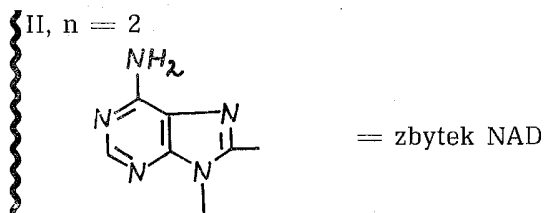
Takto získaný NAD převedený na makromolekulární látku je koenzymaticky účinný s řadou dehydrogenáz.

Příklad 3

Příprava dinukleotidu nikotinoylamid-8-(aminohexylsepharoso-2-karbonylethylthio)adeninu



500 mg aminoethylsepharózy 4B se ponechá botnat v 0,5 M NaCl, pak se promyje 200 ml 0,5 M NaCl a potom vodou. Získaný gel se rozmíchá v 2 ml vody, pak se přidá 40 mg dinukleotidu nikotinoylamid-8-(karboxyethylthio)adeninu



rozpuštěného v 0,5 ml vody a upraví se na pH 4,7 1 M NaOH. K suspenzi míchané mechanickým míchadlem za teploty místnosti se přidá 40 mg hydrochloridu N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu rozpuštěného v 0,2 ml vody a v míchání se po-

kračuje dalších 24 hodin, přičemž pH se během prvních tří hodin udržuje na 4,7 přidáváním 0,1 M HCl.

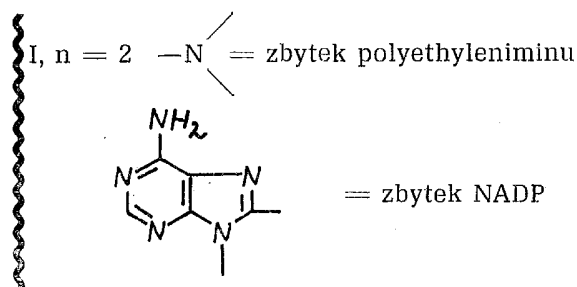
Za týchž podmínek se přidají ve 24 hodinových intervalech tři další podíly roztoku karbodiimidu (40 mg v 0,2 ml vody) při celkové reakční době 96 hodin. Gel se pak odfiltruje a promývá 1 M roztokem chloridu sodného a $1 \cdot 10^{-4}$ M HCl, až se zjistí úplné zmizení UF absorpce (NAD, který není vázán). Tímto způsobem se získá 1,8 ml polymerního derivátu NAD ve formě vlhkého gelu, $\lambda_{\max}$ 276,5 nm.

UF spektrum se získalo suspendováním gelů ve vodném 50% roztoku sacharózy (hm.), který zamezuje usazení gelu. Celkové množství vázaného NAD na polymer se stanoví měřením absorpance při 276,5 nm za předpokladu, že extinkční koeficient je stejný jako u NAD derivátu II (ϵ 18 800 $M^{-1} \text{cm}^{-1}$). Koenzymaticky účinný NAD vázaný na polymer se stanoví kvantitativní enzymatickou redukcí alkohol-dehydrogenázou z kvasnic suspendováním gelu v 50% vodném roztoku sacharózy (hm.) obsahujícím 0,1 M tris.HCl pufr, 0,2 M ethanol a 0,5 M semikarbazidhydrochlorid upraveném na pH 9.

Z fotometrického měření při 340 nm je zřejmé, že 21 μmol enzymaticky redukovatelného NAD je vázáno na každý gram suchého NADH derivátu, což odpovídá 80 % celkem vázaného NAD na polymer.

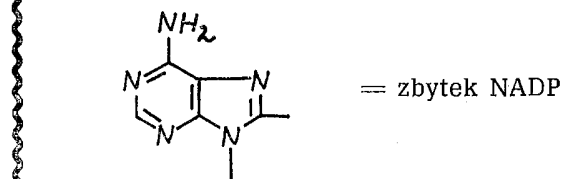
Příklad 4

Příprava fosfátu dinukleotidu nikotinoylamid-8-(polyethylenimin-2-karbonylethylthio)adeninu



K 0,38 ml 38% vodného roztoku polyethyleniminu (hm./objem) upraveného na pH koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou se přidá 20 mg fosfátu dinukleotidu nikotinoylamid-8-(karboxyethylthio)adeninu

II, $n = 2$



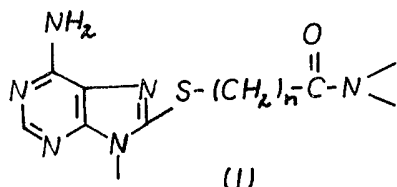
rozpuštěného v 0,5 ml vody, a 20 mg N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidhydrochloridu rozpuštěného v 0,2 ml vody. Reakční směs upravenou na pH 4,8 přidavkem 2 M HCl se míchá při teplotě místnosti během 24 hodin a během prvních tří hodin se pH udržuje přidavkem 0,1 M HCl. Za týchž podmínek se přidá dalších 20 mg karbodiimidu v 0,2 ml vody a v míchání se pokračuje 24 hodin. Reakční směs zředěná vodou na objem 10 ml se potom přenesse do centrifugační zkumavky a vysráží se 10 ml 1M fosfátového pufru při pH 6. Odstředí se během 10 minut při 39 000 g a roztok se oddělí od polymerního koagulátu dekantováním. Za účelem dalšího přečištění se polymer rozpustí v 2 ml 2 M roztoku NaCl a 0,05 acetátového pufru při pH 5,5, takto získaný roztok se doplní 8 ml vody a znovu vysráží 10 ml 1 M fosfátového pufru při pH 6, odstředí během 10 minut při 39 000 g a polymer se oddělí dekantací. Tento čistící postup se opakuje nejméně čtyřikrát. Produkt se znovu rozpustí v 2 M roztoku NaCl a 0,05 M acetátového pufru při pH 5,5, dialyzuje se oproti 1-litrovým podílům $1 \cdot 10^{-4}$ M HCl po dobu čtyř dnů, přičemž se roztok denně obnovuje. Mrazovým vysušením zbytku po dialýze se získá 83 mg polymerního derivátu NADP, $\lambda_{\max}$ 276,5 nm. Celkové množství NADP vázaného na polymer se stanoví absorpencí při 276,5 nm za předpokladu, že extinkční koeficient je stejný jako u derivátu NAD II (ϵ 18 800 $M^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Koenzymaticky aktivní NADP vázaný na polymer se stanoví kvantitativní enzymatickou redukcí dehydrogenázou glukózo-6-fosfátu z kvasnic v 86,3 mM triethanolaminovém pufru pH 7,6 obsahujícím 6,7 mM MgCl_2 a 1,2 mM glukózo-6-fosfátu. Ze spektrofotometrického stanovení vytvořeného NADP při 340 nm je zřejmé, že na každý jeden gram polymeru se nevázo 23 μmol enzymaticky redukovatelného NADP derivátu.

Takto získaný NADP přeměněný na makromolekulární látku je koenzymaticky účinný s četnými dehydrogenázami například s dehydrogenázou 6-fosfoglukonanu a dehydrogenázou L-glutamátu.

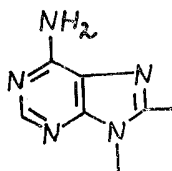
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy makromolekularizovaných derivátů adeninu, obsahujících alespoň jednu jednotku obecného vzorce I



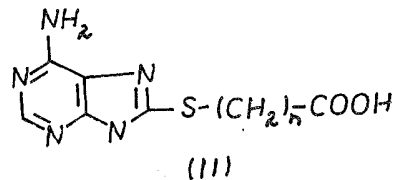
kde

n je celé číslo 2 až 4 a zbytek vzorce



je odvozen od sloučeniny vybrané z dinukleotidu nikotinoylamidadeninu, fosfátu dinukleotidu nikotinoylamidadeninu, adenosinmonofosfátu, cyklického adenosinmonofosfátu, adenosindifosfátu, adenosintrifosfátu,

adenosinu a adeninu, vyznačující se tím, že se funkcionalizované deriváty adeninu obecného vzorce II



kde

n je celé číslo 2 až 4, nechají reagovat při teplotě 5 až 50 °C v prostředí vody, popřípadě ve směsi s organickým rozpouštědlem mísitelným s vodou, v přítomnosti vodorozpustného nebo nerozpustného karbodiimidu jako kondenzačního činidla, s polymerem, obsahujícím alespoň jednu primární nebo sekundární aminoskupinu, vybraným z polylysinu, ω -aminoalkylpolyanilamidů, polysacharidových esterů ω -aminoalkylkarbamových kyselin, polyvinylaminu, ω -aminoalkylesterů a ω -aminoalkylamidů polyglutamové kyseliny, aminoalkylsilanizovaných skleněných mikrokuliček a polyethyleniminu.