



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **219 490 A1**4(51) C 08 B 3/14
C 08 F 8/14
C 08 B 15/06**AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 08 B / 256 057 0	(22)	28.10.83	(44)	06.03.85
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD

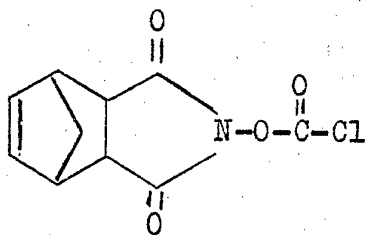
(72) Henklein, Peter, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Becker, Manfred, Dr. agr.; Büttner, Werner, Dr. rer. nat.; Rupprich, Christian, Dipl.-Ing.; Loth, Fritz, Dr. rer. nat.; Dautzenberg, Horst, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung aktivierter Träger

(57) Die Erfindung bezieht sich auf die Herstellung von aktivierten Trägern zur Bindung von nucleophilen Komponenten. Die neuen aktivierten Träger werden durch Umsetzung hydroxylgruppenhaltiger Polymere mit N-(Chlorcarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dicarboximid I erhalten. Anwendungsgebiete sind die Biotechnologie, die chemische und die pharmazeutische Industrie.

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung aktivierter Träger, **dadurch gekennzeichnet**, daß hydroxylgruppenhaltige Polymere mit N-(Chlorcarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dicarboximid I umgesetzt werden.



2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Umsetzung hydroxylgruppenhaltiger Träger, wie Cellulosen, z. B. Papier, Zellstoff, Cellulosepulver und -perlen, ferner Stärkehydrolyseprodukt, Polyvinylalkohol, Duolite, Fractogele oder Spherone mit der Verbindung I in wasserfreien organischen Lösungsmitteln erfolgt und durch Waschen des entstandenen aktivierten Trägers nichtumgesetzte Verbindung I und freigesetzter Chlorwasserstoff entfernt werden, wobei die Ersterlösung I mehrfach für Umsetzungen ohne erneute Reinigung eingesetzt werden kann.
3. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Umsetzung in Gegenwart von Basen vorgenommen werden kann.
4. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß der aktivierte Träger in wasserfreien Lösungsmitteln oder in lyophilisierter Form aufbewahrt wird.

Verfahren zur Herstellung aktivierter Träger

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Herstellung von aktivierten Trägern zur Bindung von nucleophilen Komponenten. Anwendungsgebiete sind die Biotechnologie, die chemische und die pharmazeutische Industrie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Trägerfixierte Reagenzien finden immer weitere Anwendung bei der Durchführung von Stoffwandlungen oder analytischen und präparativen Stofftrennungen [A. Wisemann (Edtr.), Handbook of Enzyme Chemistry, New York 1975, D. R. Lowe, An Introduction to Affinity Chromatography, Amsterdam 1979]. Das trägerfixierte System besteht aus der polymeren Matrix, dem Träger, an den durch kovalente oder adsorptive Bindung Stoffe mit der gewünschten spezifischen Wirkung (Liganden) gebunden sind. Als Liganden werden natürliche oder synthetische Verbindungen mit bestimmten chemischen oder biologischen Wirkungen verwendet, z. B. Enzyme als Katalysatoren für Stoffwandlungen, Proteine und Peptide mit der Wirkung von Lectinen, Inhibitoren, Antigenen oder Anti-Körpern, Nukleinsäuren, Polysaccharide, Zuckerderivate usw. Die für die Bindung der Liganden verwendeten Polymeren sind natürliche Polysaccharide, wie z. B. Cellulose, Stärke, Dextrane, Agarose und deren Derivate oder synthetische hydroxylgruppenhaltige Polymere, wie Mischpolymerisate des 2-Hydroxyethylmethacrylats (Spheron) oder Phenol-Formaldehydkondensate (Duolite) sowie aminogruppenhaltige Polymere, wie Polyacrylamid, modifizierte Polysaccharide (z. B. 1H-Sepharose) oder auch Proteine.

Die Art der Verknüpfung kovalenter Bindungen zwischen Trägern und Liganden übt einen wesentlichen Einfluß auf die Eigenschaften des entstehenden Produktes aus und ist daher immer wieder Gegenstand erneuter Untersuchungen.

Am häufigsten erfolgt die Bindung peptidartiger Liganden über deren zugängliche α - und ϵ -Aminogruppen, obwohl auch die Möglichkeit zur Reaktion der Carboxylgruppe oder SH-Gruppen besteht. Voraussetzung für die Bindung der Liganden ist die Aktivierung der chemisch wenig reaktiven Hydroxylgruppen der Träger.

Von vielen möglichen Aktivierungsmethoden hat sich in der Praxis die Umsetzung der Polysaccharide zu Cyanaten oder Imidocarbonaten mittels Bromcyan am meisten durchgesetzt, obwohl ihr eine Reihe von Nachteilen anhaftet. Die Reaktion der CNBr-aktivierten Träger mit Aminogruppen führt zu Isoharnstoffderivaten, die eine positive Ladung tragen können und dem Angriff nucleophiler Reagenzien zugänglich sind. Die ligandierten Träger erhalten so den Charakter schwacher Ionenaustauscher, und die Spaltbarkeit der Isoharnstoffverbindung führt unter bestimmten Bedingungen zur fortlaufenden Abspaltung des Liganden vom Träger. Darüber hinaus ist für die praktische Arbeit die hohe Giftigkeit des Bromcyans und seiner Hydrolyseprodukte nachteilig, besonders bei Umsetzungen in größerem Maßstab. Die Haltbarkeit der BrCN-aktivierten Trägermasse ist gering und erfordert eine sofortige Umsetzung mit dem Liganden.

Weiterhin beschrieben wurden die Aktivierung der Hydroxylgruppen mit Benzochinon, Divinylsulfon, Diepoxiden, Trichlortriazin und anderen bifunktionellen Reagenzien, die Oxidation der Hydroxylgruppen zur Aldehydfunktion mittels Natriumperjodat. Eine aussichtsreiche Alternative zur Aktivierung mit Bromcyan ist in der Umsetzung von Polysacchariden mit Chlorameisensäureestern zu sehen.

Im Falle der Reaktion des Chlorameisensäureethylesters mit Cellulose [S. A. Barker, Carbohydr. Res. 17 (1971) 471] ist die Bildung von trans-2,3-cyclischem Carbonat und O-Ethoxycarbonylfunktionen beschrieben, die mit Aminogruppen reagieren. Die Bindung einiger Enzyme und die Darstellung von Immunoadsorbentien ist bekannt [C. J. Gray, Carbohydr. Res. 27 (1973) 235, J. F. Kennedy, J. Immunol. Meth. 50 (1982) 57].

Die hohe Giftigkeit und die extreme Hydrolyseempfindlichkeit des Chlorameisensäureethylesters sind die Hauptnachteile dieser Aktivierung. Als Vorteile gegenüber der Aktivierung mit Bromcyan ist die hohe Stabilität der durch Umsetzung mit Aminofunktionen entstehenden ungeladenen Urethanbindungen anzusehen. Durch Einsatz reaktionsfähiger und hydrolysebeständiger Chlorameisensäureester, die in der Peptidchemie eingesetzt werden, wurde die Anwendbarkeit der Methoden deutlich verbessert. Die mittels Chlorameisensäure-p-nitrophenylester, Chlorameisensäure-N-hydroxysuccinimidester bzw. Chlorameisensäure-trichlorphenylester aktivierten Sepharose-, Spheron- und Cellulose-träger sind in getrocknetem Zustand oder in wasserfreiem Dioxan beständig. [J. Drobniak, Biotechnol. Bioeng. 24 (1982) 487, M. Wilchek, T. Miron, Biochem. Internat. 4 (1982) 629].

Entscheidend für die praktische Anwendbarkeit ist die gute Stabilität und Lagerfähigkeit der aktivierten Träger und der für die Gewinnung eingesetzten Chlorameisensäureester. Während die Stabilität der bisher beschriebenen aktivierten Träger befriedigend ist, sind sowohl Chlorameisensäureethylester als auch Chlorameisensäure-N-hydroxysuccinimidester wegen ihrer hohen Hydrolyseempfindlichkeit schlecht handhabbar, insbesondere, wenn in größerem Maßstab gearbeitet werden soll.

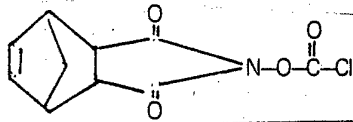
Nachteile der Chlorameisensäurephenylesterderivate bestehen darin, daß die Abtrennung der bei der Umsetzung mit Aminofunktionen entstehenden meist giftigen Phenole schwierig ist, andererseits aber sehr gründlich erfolgen muß, da sie die biologische Wirkung der untersuchten Systeme häufig stören. Langwieriges Waschen der hergestellten trägerfixierten Enzyme usw. ist deshalb erforderlich.

Ziel der Erfindung

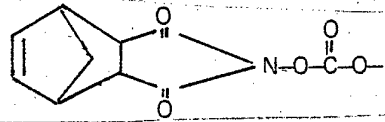
Ziel der Erfindung ist die einfache und ökonomische Herstellung aktivierter Träger zur Bindung nucleophiler Komponenten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung eines neuen aktivierten Trägers zu entwickeln. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß hydroxylgruppenhaltige Polymere mit N-(Chlorcarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dicarboximid I umgesetzt werden.



Die entstehenden aktivierten Träger sind dadurch gekennzeichnet, daß die zugänglichen Hydroxylgruppen in einem weit variierbaren Maße durch die



-Gruppierung ersetzt sind.

Die Umsetzung der polymeren Träger mit der Verbindung I erfolgt in wasserfreien organischen Lösungsmitteln, wie 1,4-Dioxan, Aceton, Pyridin, Ether usw. Durch Waschen des entstandenen Produktes mit Dioxan, Ether oder Aceton wird nichtumgesetztes N-(Chlorcarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dicarboximid I und freigesetzter Chlorwasserstoff entfernt. Im allgemeinen verläuft die Reaktion in gleicher Weise, wenn die Umsetzung in Gegenwart von tertiären Aminen zur Bindung des entstehenden Chlorwasserstoffs durchgeführt wird. Der Vorteil des Basenzusatzes ist darin zu sehen, daß die vom aktivierten Träger durch Filtration abgetrennte Lösung des Chlorameisensäureesters I erneut für die Umsetzung mit Polymeren verwendet werden kann, ohne daß die Aktivierungsrate herabgesetzt ist. Durch die wiederholte Verwendung der Lösung des Chlorameisensäureesters I wird die Ökonomie des Aktivierungsverfahrens erheblich verbessert. Die aktivierten Träger können nach Entfernen des Lösungsmittels in getrocknetem Zustand oder in einem wasserfreien Lösungsmittel, wie Dioxan, Ether, Chloroform etc. bei niedriger Temperatur über Monate ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

Auch in wäßrigen Lösungen sind die durch Umsatz mit I erhaltenen Träger weitgehend stabil.

Der Vorteil der erfindungsgemäß erhaltenen aktivierten Träger besteht in einer höheren Stabilität im alkalischen Milieu. Durch die geringe Hydrolysegeschwindigkeit der aktivierten Träger wird es möglich, die Kopplung mit nucleophilen Reagenzien bei vergleichsweise hohen pH-Werten vorzunehmen.

Als hydroxylgruppenhaltige Träger können natürliche Polysaccharide, wie Cellulose in den unterschiedlichsten Formen, Stärke, SHP (Stärkehydrolyseprodukt) und synthetischen Polymere, wie PVA (Polyvinylalkohol), Duolite, Spherone, hydrophile Vinylpolymere (Fractogel TIK) usw. verwendet werden.

Ein weiterer Vorteil besteht in der leichten Zugänglichkeit des verwendeten Chlorameisensäureesters I, der guten Lagerfähigkeit des aktivierten Trägers, der auch Umsetzungen in größerem Maßstab gestattet. Hervorzuheben ist, daß die im Überschuß eingesetzte Esterlösung I mehrfach für Umsetzungen ohne erneute Reinigung eingesetzt werden kann. Ausbeuteverluste an aktiviertem Träger sind nicht erkennbar.

Der so erhaltene Träger zeichnet sich durch eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit beim Umsatz mit aminogruppen- und SH-gruppenhaltigen Liganden aus.

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Als Ergebnis einer Aktivierung der Träger wurde die kovalente Bindung von Glycin nach dem Aktivierungsschritt bestimmt. Es wurde der Verbrauch an zugesetztem Glycin nach der TNBS-Methode (Trinitrobenzolsulfonsäure, Reagens für NH_2 -Gruppen) ermittelt.

Beispiel 1:

Zu 1 ml in wasserfreiem Dioxan sedimentierter Pericellulose (IPOC Teltow, Charge M 83/18 wurden 14 ml Esterlösung I (38 mg I/ml) zugegeben. Die Suspension wurde 3 h bei 60°C geschüttelt. Der abfiltrierte Träger wurde mit wasserfreiem Dioxan gewaschen und mit 5 ml Glycinlösung (Konz. 4 mg/ml = 53,4 $\mu\text{Mol/ml}$) in 0.1 Na-Tetraboratpuffer pH 8 versetzt. Nach 2stündigem Schütteln bei Raumtemperatur wurde der Träger abgesaugt, und im Überstand wurde der Glycinverbrauch ermittelt.

Ergebnis: 49,3 $\mu\text{Mol/ml}$ Träger.

Beispiel 2:

Sephacrose Cl wurde in der gleichen Weise, wie in Beispiel 1 angegeben, aktiviert und nach gleichem Verfahren mit Glycinlösung behandelt.

Ergebnis: 33,3 μ Mol/ml Träger.

Beispiel 3:

Spheron P 1000 wurde in der gleichen Weise, wie in Beispiel 1 angegeben, aktiviert und auch nach gleichem Verfahren mit Glycinlösung behandelt.

Ergebnis: 49,3 μ Mol/ml Träger.

Beispiel 4:

Pericellulose (IPOC Teltow, Charge M 83/43) wurde bei 80°C aktiviert unter Beibehaltung aller anderen im Beispiel 1 aufgeführten Bedingungen, einschließlich der Kopplung mit Glycin.

Ergebnis: 69,3 μ Mol/ml Träger.

Beispiel 5:

Pericellulose (IPOC Teltow, Charge M 83/43) wurde wie in Beispiel 1 aktiviert, wobei der Esterlösung 10 mg Triethylamin als Base pro ml Träger zugesetzt wurde. Die Kopplung mit Glycin wurde wie in Beispiel 1 durchgeführt.

Ergebnis: 41,3 μ Mol/ml Träger.

Beispiel 6:

Die aus Beispiel 5 zurückgewonnene Esterlösung wurde erneut zur Aktivierung verwendet (Bedingungen wie in Beispiel 5 unter nochmaligem Basenzusatz zur Esterlösung um 10 mg/ml Träger).

Ergebnis: 56,0 μ Mol/ml Träger.

Beispiel 7:

1 ml Pericellulose (IPOC Teltow, Charge M 83/43), sedimentiert in wasserfreiem Dioxan, wurde 6h bei 80°C mit 3,5 ml Esterlösung (Konz. 200 mg/ml) geschüttelt. Nach Filtration und Waschen mit wasserfreiem Dioxan wurden dem Träger 5 ml Glycinlösung (Konz. 4 mg/ml = 53,4 μ Mol/ml) in 0,1 M Na-Tetraboratpuffer pH 8 zugesetzt. Die Suspension wurde 2h bei Raumtemperatur und anschließend 22h bei 4°C geschüttelt. Nach Absaugen des Trägers wurde der Glycingehalt im Überstand ermittelt und die Differenz zur angegebenen Menge berechnet.

Ergebnis: 116 μ Mol/ml Träger.

Beispiel 8:

1 ml Pericellulose (IPOC Teltow, Charge M 83/43), sedimentiert in wasserfreiem Dioxan, wurde 3h bei 70°C mit 1,7 ml Esterlösung (Konz. 300 mg/ml) geschüttelt. Nach Filtration und Waschen des Trägers mit wasserfreier Dioxanlösung wurden 5 ml Glycinlösung (Konz. 4 mg/ml = 53,4 μ Mol/ml) in 0,1 M Phosphatpuffer pH 8 zugegeben und bei Raumtemperatur 2h geschüttelt. Der Glycinverbrauch wurde bestimmt.

Ergebnis: 116,7 μ Mol/ml Träger.

Beispiel 9:

1 ml Pericellulose (IPOC Teltow) wurde wie im Beispiel 8 behandelt. Lediglich das Glycin wurde in 0,5 M NaHCO₃ zugegeben und die Kopplung 24h bei 4°C durchgeführt.

Ergebnis: 150,7 μ Mol/ml Träger.

Beispiel 10:

100 mg Zellstoff (trocken) wurden mit 30 ml Esterlösung I (Konz.: 37 mg/ml) 3 Stunden bis 60°C aktiviert. Die Kopplung mit Glycin erfolgte 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 10 ml Lösung (Konz.: 4 mg Glycin/ml 0,1 M Na-Boratpuffer pH 8) unter leichtem Schütteln:

Ergebnis: 4,78 mg Glycin/100 mg Zellstoff
63,7 μ Mol Glycin/100 mg Zellstoff

Beispiel 11:

Bei dem Verfahren nach Beispiel 1 wurde anstelle von Pericellulose faserförmige Cellulose (Cellulose CF 1, Fa. Whatmann) und anstelle der Glycinlösung, auch in den Beispielen 12 bis 18, Ovomucoidlösung — 1,2 ml in 0,1 M Na-Tetraboratpuffer pH 8 (Konz. des Ovomucoid 8,33 mg/ml = 10 mg/ml Träger) — verwendet. Die gebundenen Ovomucoidmenge betrug 5,7 mg/ml Cellulose.

Beispiel 12:

Bei dem Verfahren nach Beispiel 1 wurde anstelle von Pericellulose ein Phenol-Formaldehyd-Kondensat, Duolite S 30 (Hersteller: Fa. Diamond-Shamrock, USA) verwendet. Die gebundene Ovomucoidmenge betrug 4,2 mg/ml Träger.

Beispiel 13:

Bei dem Verfahren nach Beispiel 1 wurde anstelle von Pericellulose gekörnte, mit Epichlorhydrin vernetzte Stärke (Hersteller: Akademie der Wissenschaften der DDR) verwendet. Die gebundene Ovomucoidmenge betrug 8,2 mg Ovomucoid/ml Träger.

Beispiel 14:

Bei dem Verfahren nach Beispiel 1 wurde anstelle von Pericellulose ein hydroxylgruppenhaltiges Copolymerisat aus Acrylnitril und Vinylacetat (Hersteller: VEB Farbenfabrik Wolfen, DDR) verwendet. Die gebundene Ovomucoidmenge betrug 0,8 mg Ovomucoid/ml Träger.

Beispiel 15:

Bei dem Verfahren nach Beispiel 1 wurde anstelle von Pericellulose ein Träger auf der Basis von Polyacrylamid (Biogel P 100) eingesetzt. Die gebundene Ovomucoidmenge betrug 2,1 mg Ovomucoid/ml Träger.

Beispiel 16:

Bei dem Verfahren nach Beispiel 4 wurde anstelle von Pericellulose das synthetische Polymer des N-acryloxyl-2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediols, (Trisacryl GF 2000) (Hersteller: IBF, Frankreich) verwendet. Die gebundene Ovomucoïdmenge betrug 4 mg/ml Träger.

Beispiel 17:

Bei dem Verfahren nach Beispiel 1 wurde anstelle von Pericellulose Polyvinylalkohol verwendet. Nach der Aktivierung ist die Wasserlöslichkeit des Polyvinylalkohols stark eingeschränkt. Die gebundene Ovomucoïdmenge betrug 1,2 mg Ovomucoïd/ml wasserunlöslicher Träger.

Beispiel 18:

Bei dem Verfahren nach Beispiel 1 wurde anstelle von Pericellulose ein wasserlösliches Stärkehydrolyseprodukt (SHP) (Hersteller: Akademie der Wissenschaften der DDR) eingesetzt. Das aktivierte SHP ist wasserlöslich. Nach Kopplung von Ovomucoïd wird nichtumgesetztes Ovomucoïd durch Chromatographie am Sephadex G 100 abgetrennt. Die gebundene Ovomucoïdmenge beträgt 117 μ g Ovomucoïd/mg SHP.

Beispiel 19:

Bei dem Verfahren nach Beispiel 8 wurde anstelle von Pericellulose Filterpapier der Fa. Whatmann Typ 540 verwendet. Die gebundene Aminmenge betrug 9,8 μ Mol Amin/cm² Papier.

Beispiel 20:

Pericellulose wird entsprechend Beispiel 8 mit I umgesetzt, mit Aceton gewaschen, abgesaugt und in trockenem Aceton suspendiert. 1 ml der acetonfeuchten aktivierten Cellulose wird mit 5 ml acetonischen Lösung von Hexamethyldiamin (8 mg Amin/ml Aceton) 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Durch Waschen mit Aceton wird die Reaktion beendet. Die gebundene Aminmenge wird nach G. Antoni et al. [Anal. Biochem. 129 (1983/60)] bestimmt. Ergebnis: 14,4 μ Mol Amin/ml Pericellulose.