

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 763314 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 763314

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C08F

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 18.11.1976

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 18.11.1976

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 23.05.1977

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

22.11.1975 DE 2552510

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Behringwerke Ag, Albert-Demnitz-Weg 8 Marbach bei Marburg/Lahn, BRD, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Huemer, Heinrich, BRD, SAKSA, (DE)

2 • Schmidtberger, Rudolf, BRD, SAKSA, (DE)

3 • Toth, Tibor, BRD, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Biologisesti aktiiviset yhdisteet ja menetelmä niiden valmistamiseksi

Biologiskt aktiva föreningar och förfarande för deras framställning

Behringwerke Aktiengesellschaft, Marburg/Lahn, Länsi-Saksa.



vinyl-
glykoli ?

Biologisesti aktiiviset yhdisteet ja menetelmä niiden valmistamiseksi
- Biologiskt aktiva föreningar och förfarande för deras framställning

Keksintö koskee biologisesti aktiivisten aineiden ja veteenliukenemattomien suurimolekyylisten yhdisteiden uusia yhdisteitä, menetelmää niiden valmistamiseksi ja niiden käyttöä edullisesti affiniteettikromatografiassa.

Viime vuosien aikana on uusi tekniikka lyönyt itsensä läpi yhä enemmän ja enemmän biokemiallisten työskentelymenetelmien alalla, joiden ensisijaisena tunnusmerkkinä on se, että käytetään kantaja-aineeseen sitoutuneiden, biologisesti aktiivisten aineiden affiniteettiä selektiivisesti suoritettaviin reaktioihin.

Kantaja-aineeseen sitoutuneen aineen spesifisellä kompleksimuodostuksella erään toisen aineen kanssa, joka on seoksena, voidaan poistaa kyseessäoleva aine seoksesta ja se voidaan mahdollisesti lopuksi eristää desorptiolla.

Kantaja-aineeseen sitoutuneilla entsyymeillä on etuna se, että aineenvaihdunnat suoritetaan preparatiivisissä, jatkuvatoimisisä prosesseissa ja reaktiotuotteet saadaan entsyymivapaina.

Biokemiallisessa entsyymianalytiikassa käytetään kantaja-aineeseen sitoutuneita veteenliukenemattomia entsyymejä useaan kertaan käytettävinä reagensseina.

Sen vuoksi, että entsyymeillä on ominaisuutena osoittaa affiniteettia ei ainoastaan substraatteja kohtaan, vaan myös spesifisiä inhibiittoreita kohtaan, on entsyymi-inhibiittorien saanti osoittautunut erittäin edulliseksi affiniteettikromatografian avulla koskien kantaja-aineeseen sitoutuneita entsyymejä. Toisaalta sallii inhibiittorien sitoutuminen veteenliukenemattomiin matriiseihin vastaavien entsyymien preparatiivisen saannin.

Niinsanottuina immuuniadsorbentteina sitoutuvat antigeenit (vasta-aineen synnyttäjät) tai vasta-aineet veteen liukenemattomiin matriiseihin ja senjälkeen voidaan vastaavat vasta-aineet tai antigeenit eristää.

Biologisesti aktiivisilla aineilla ymmärretään edelläolevien selvitysten mukaisesti in vivo ja in vitro vaikuttavia luonnollisia ja keinotekoisesti valmistettuja aineita, joita voidaan laajimmissa mielessä nimittää entsyymeiksi, aktivaattoreiksi, inhibiittoreiksi, antigeeneiksi tai vasta-aineiksi, vitamiineiksi ja hormoneiksi. Näille biologisesti aktiivisille aineille on annettu nimitys efektorit, koska ne kuvaavat veteenliukenemattomien systeemien vaikutusperiaatteita.

Useimmat tähänmennessä kuvatut kantaja-aineeseen sitoutuneet efektorit ovat oleellisesti stabiilempia kuin vastaavat biologisesti aktiiviset aineet liuoksessa.

Kantaja-aineina, niinsanottuina matriiseina, käytetään edullisesti sellaisia aineita, joilla vesipitoisiin systeemeihin liukenemattomuuden ohella on mahdollisimman alhainen epäspesifinen adsorptio. Siihen täytyy liittää hydrofobiset (vettä karttavat), hydrofiilliset (vettä suosivat) ja ioniset vuorovaikutukset matriisiin ja efektorin reaktiopartnerin välillä. Sellaisten aineiden kanssa, joiden sitoutuminen efektoriin on ei-toivottavaa, esim. sellaisten kanssa, jotka eivät ole efektorin spesifisiä reaktiopartnereita, ei sitoutuminen tule kysymykseen.

Tähänmennessä käytetyt matriisit biologisesti aktiivisten aineiden kantaja-aineina voidaan jakaa sellaisiin, jotka sitovat efektorit fysikaalisella adsorptiolla, näihin kuuluvat esim. polystyroli, aktiivihiili ja lasihelmet ja sellaisiin, jotka ovat liit-

tyneet efektoreihin kovalenttisella sidoksella. Viimeksimainittuihin kuuluvat vinyylipolymeerit homo- ja kopolymerisaatteina, esim. polyakryylihapot, polyakryylihapoamidit ja amino-, karboksi- tai sulfonyyli-substituoitu polystyrolä, edelleen selluloosa ja sen johdannaiset ja lopuksi luonnolliset ja synteettiset polypeptidit ja proteiinit. Tasapainoisen, matriisin ja efektorin välillä vallitsevan vuorovaikutuksen johdosta, on hiilihydraattien, erityisesti selluloosan, dekstraanin, tärkkelyksen, agarin tai niiden johdannaisten käyttö matriisina vesipitoisissa systeemeissä levinnyt laajalti, kun taas näissä luonnollisissa aineissa usein olevia karboksyyli-ryhmiä pidetään niiden epäspesifisten affiniteettien johdosta häiritsevinä. Senohella on näillä aineilla suhteellisen vähäinen terminen ja kemiallinen stabiliteetti.

Monet näistä haittapuolista voitaisiin poistaa hyvin käyttämällä polyvinyleeniglykolia, synteettistä polymeeriä. Polyvinyleeniglykolia, myös polyhydroksimetyleeniksi nimitettyä, valmistetaan happamalla tai emäksisellä hydrolyysillä polyvinyleenikarbonaatista. Jokaisessa hiiliatomissa on hydroksyyli-ryhmä ja vetyatomi. Läpikäyvän C-C-sidoksen johdosta on kantaja-aineella hyvin korkea stabiliteetti.

Nyt todettiin, että kantaja-matriisina voidaan käyttää edullisesti polyvinyleeniglykolin sijasta vinyleeniglykoli-kopolymeeriä. Polymeroimalla sopivat komonomeerit polyvinylikarbonaatiksi voidaan näin valmistetun polyvinyleeniglykolin fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia vaihdella suuresti. Niinpä voidaan esim. polyvinyleeniglykolin "hydrofiliaa" tai "turpoamista" muuttaa polymeroimalla hydrofobiset monomeerit, kuten etyleeni, vinyyliskloridi tai styrolä polyvinyleenikarbonaatiksi. Vinyylisetaatin kopolymerisaatiolla korvataan saippuoidussa lopputuotteessa vinyleeniglykoli-ryhmä vinyylialkoholiryhmällä, mistä on seurauksena kohonnut turpoavuus vesipitoisessa väliaineessa.

On mahdollista saada aikaan komonomeerien, kuten esim. dietyleeniglykolidivinyylieetterin ja divinyylibentseenin avulla, verkostus ja täten kantaja-aineen mekaanisten ominaisuuksien paraneminen. Polymeroimalla elektrofiiliset funktio, esim. oksiraaniryhmät (epoksiryhmät) vinyyliglysidyylieetteri-komonomeereistä on matriisin suora reaktio nukleofiilisten funktioiden kanssa ($-NH_2$, $-OH$) mahdollinen. Karboksyyli-ryhmät voidaan liittää akryylihapoesteri-

komonomeereilla. Päättäneen kopolymerisaation jälkeen saippuoidaan esteriryhmät karboksyyli ryhmiksi. $-NH_2$ - tai $-COOH$ -ryhmien liittämisen sallii aktivoinnin karbodi-imidien, isoksatsoliumsuolojen, glutaraldehydin jne. avulla. Kopolymerisaattivinyleeniglykoli/vinyylialkoholilla on suurempi spesifinen ulkopinta ja täten suurempi sitoutumiskapasiteetti esim. proteiineihin nähden polymeerijauheen ulkopinnalla verrattuna vinyleeniglykoli-homopolymerisaatiin.

Keksinnön kohteena ovat senmukaisesti biologisesti aktiiviset yhdisteet jotka ovat peräisin edullisesti polyvinyleeniglykolin, ja siihen-säilyttämällä sen biologinen aktiviteetti-sitoutuneen biologisesti aktiivisen aineen veteenliukenemattomasta kopolymerisaatista. Näissä yhdisteissä on kantajamatriisi polyvinyleeniglykoli-kopolymerisaatti, joka sisältää korkeintaan 45 %, edullisesti 5-20 % komonomeeriä. Biologisesti aktiiviset aineet ovat aineita, kuten entsyymejä, aktivaattoreita, inhibiittoreita, antigeenejä, tai vasta-aineita, muita plasmaproteiineja, veriryhmä-aineita, fythemagglutiniineja, antibiootteja, vitamiineja tai hormoneja, peptidejä tai aminohappoja tai synteettisesti valmistettuja efektoreja.

Polymeerinen kantaja-aine ja biologisesti aktiivinen aine ovat liittyneet kovalenttisesti toisiinsa joko suoraan tai sivuketjun kautta (Spacer).

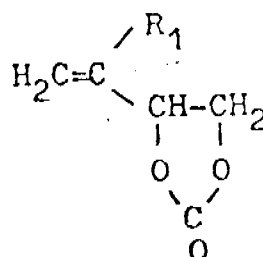
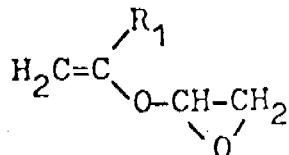
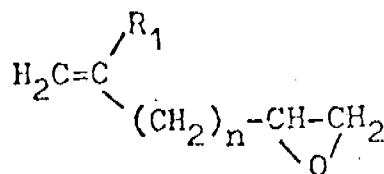
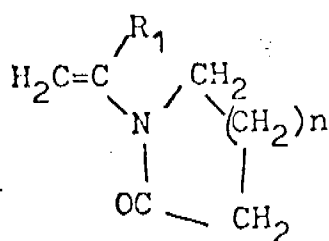
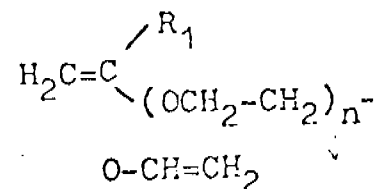
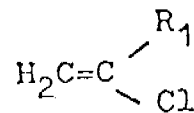
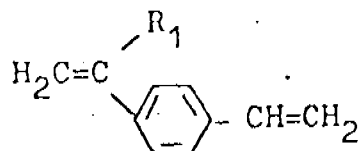
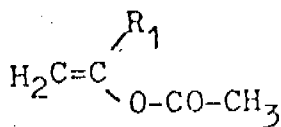
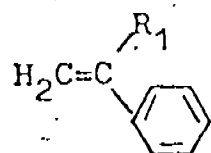
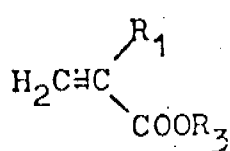
Biologisesti aktiivisten yhdisteiden sitominen sivuketjun kautta (Spacer) on edullista, jos niiden affiinien partnerien molekyyllipainot ovat hyvin erilaisia, tai jos käytössä biospesifisessä prosessissa ovat osallisena hyvin suurimolekyylliset tai useammista alayksiköistä rakennetut proteiinit. Spacereita ovat polymeeriseen matriisiin kiinnittyneet määrätynpituiset sivuketjut, joita voidaan saada polymeroimalla, liittämällä tai rakentamalla (bi- tai poly-funktionaalisten yhdisteiden- esim. tripeptidin- sitoutuminen matriisiin) tai rakentamalla funktionaaliset ryhmät ja vaihteittain pidentämällä näitä.

Keksinnön kohteena on edelleen menetelmä biologisesti aktiivisen aineen kovalenttiseksi sitomiseksi kantaja-aineen kanssa.

Tällöin on käytettävissä joukko yleisesti tunnettuja reaktioita.

Ne koskevat lähinnä tapaa valmistaa polyvinyleeniglykoli-kopolymeriä. Ne ovat tunnettuja siitä, että vinyleenikarbonaatti

polymeroidaan komonomeerillä, joilla on yleinen kaava:



joissa R_1 on vety, metyyli, etyyli, R_3 on metyyli, etyyli, propyyli ja n on kokonaisluku 1-4.

Polyvinyleenikarbonaatin polymerisaatio tapahtuu korkeintaan 45 %:lla komonomeerejä, edullisesti 5-20 %:lla.

Biologisesti aktiivisen yhdisteen valmistus on mahdollista esimerkiksi siten, että elektrofiilinen ryhmä liitetään joko biologisesti aktiiviseen aineeseen tai polyvinyleeniglykoli-kopolymeeriin ja tämän kautta annetaan biologisesti aktiivisen aineen reagoida polyvinyleeniglykoli-kopolymeerin kanssa.

Elektrofiilisten ryhmien liittäminen kantaja-amatriisiin tapahtuu joko kopolymeroimalla vinyleenikarbonaatti elektrofiilisiä ryhmiä sisältävillä komonomeereillä tai antamalla kantaja-matriisin reagoida aktivoivien, elektrofiilisiä ryhmiä sisältävien pienimolekyylisten yhdisteiden kanssa.

Yleensä on reaktiopartnerin kemiallinen kytkentä kantaja-matriisiin yksinkertaista, jos toisella puolella on nukleofiilisiä ja toisella puolella elektrofiilisiä funktioita. Reaktiivisina nukleofiilisinä funktioina tulevat kysymykseen ennen kaikkea amino-, sulfhydryyli- ja hydroksyyli-ryhmät, jotka tavallisesti ovat jo sisältyneenä joko matriisiin tai reaktiopartneriin. Elektrofiiliset funktiot täytyy ensiksi liittää. Tällöin voidaan karboksyyli-ryhmät muuttaa happohalogenideiksi, happoatsideiksi, happoanhydrideiksi, imidat-solideiksi tai ne voidaan suoraan aktivoida karbodi-imideillä. Reaktiivisina elektrofiilisinä ryhminä käytetään myös isosyanaatti-, isotiosyanaatti-, diatsonium-ryhmiä tai syklisiä imidokarbonaatti-estereitä. Erittäin edullista on reaktiivisten ryhmien liittäminen kopolymerisaation avulla.

Polymeroimalla monomeerit epoksi-ryhmillä, esim. epoksialkyy-livinyylieettereillä polyvinyleenikarbonaatiksi, ja sen johdosta, että saippuointinopeudessa syklisten karbonaatti- ja epoksiryhmien välillä esiintyy hyvin suuria eroja, saadaan helposti polyvinyleeni-glykoli-matriisi, jossa on reaktiivisia epoksi-ryhmiä, joiden voidaan antaa reagoida nukleofiilisten funktioiden kanssa. Niinpä ovat biologisesti aktiivisen aineen suora sitoutuminen ja/tai sivuketjun (Spacer) liittäminen (pidentäminen mahdollisia).

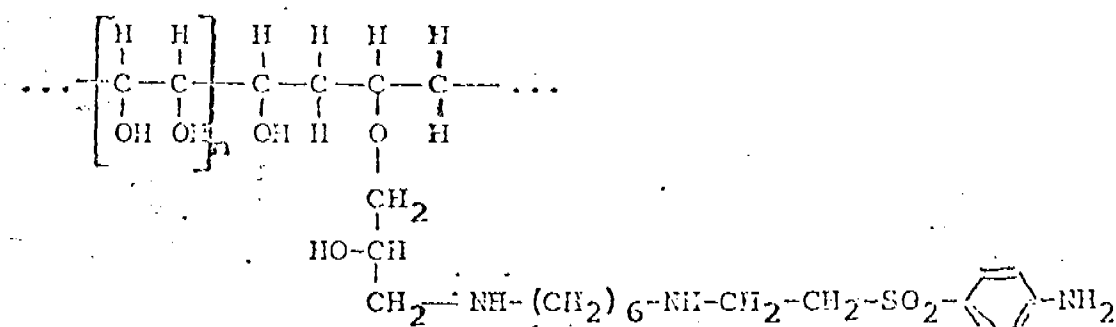
Eräänä toisena etuna on senmukaisesti kopolymeerien käytössä myös elektrofiilisten funktioiden - jotka sallivat reaktion tunnettujen menetelmien mukaisesti - suoran liittämisen (polymeroinnin) mahdollisuus.

Kopolymeroimalla vinyleenikarbonaatti etyyli-akrylaatilla ja senjälkeen saippuoimalla polymeerit saadaan matriisi, jossa on -OH- ja COOH-funktiot. Karboksyyli-ryhmät voidaan aktivoida karbodi-imidien avulla ja senjälkeen suorittaa heti amidin sitoutuminen efektorin aminoryhmillä. Karboksyyli-ryhmät sallivat edelleen amidisidosten muodostumisen Woodwardin liittämiä isoksatsoliumsuolojen avulla.

Eräs toinen menetelmä biologisesti aktiivisten yhdisteiden kytkemiseksi karboksyyli-ryhmiä sisältäviin polymeereihin suoritetaan N-etoksikarbonyyli-2-etoksi-1,2-dihydrokinoliinin (EEDQ) avulla.

Karboksyyli-ryhmät voidaan esteröidä tunnettujen menetelmien mukaisesti, senjälkeen esteri muutetaan hydratsidiksi ja lopuksi jatkossa tulokseksi saatava atsidi liitetään efektoriproteiinin aminoryhmän kanssa polyvinyleeniglykoli-matriisiin.

Jos matriisiin kopolymeroidussa komonomeerissa on seuraavien reaktioiden johdosta vapaasti käytettävissä olevia aminoryhmiä, niin on aryyliaminoryhmien liittäminen aryyliaminoryhmiä sisältävillä vinyylisulfonijohdannaisilla tai β -hydroksietyylisulfonien rikkihappoestereillä mahdollista, jolloin aryyliaminoryhmät sitten diatsotoidaan tunnettujen menetelmien mukaisesti ja lopuksi ne voidaan liittää efektorin vastaavasti reaktiivisiin ryhmiin, esim.



Tällä tavalla voidaan myös suorittaa Spacerin "pidentäminen". Toinen menetelmä proteiinien sitomiseksi aminoryhmien kautta tapahtuu glutardialdehydin avulla.

Yksinkertaista on efektorin liittäminen matriisiin polyvinyleeniglykolykopolymerin hydroksyyli- tai aminoryhmien aktivoinnin jälkeen, joka tapahtuu syanhalogenidien avulla, edullisesti bromisyynin avulla ja sen jälkeen tapahtuvan, aminoryhmiä sisältävien, biologisesti aktiivisten efektorien reaktion jälkeen näin aktivoitujen ryhmien kautta.

Eräs toinen mahdollisuus efektorin liittämiseksi polyvinyleeniglykoli- tai polyvinyleeniglykoli-kopolymerisaatti-matriisiin koostuu hydroksiryhmien asyloinnista bromiasetyyli-bromidilla, ja sen jälkeen seuraavasta efektorin aminoryhmän alkyloinnista.

Vastaavanlaisia reaktiotapoja saavutetaan esim. antamalla kantaja-aineen hydroksyyli-ryhmien reagoida reaktiivisten triatsiinien kanssa, jolloin osa triatsiinin reaktiivisista ryhmistä reagoi polyvinyleeniglykoli-yhdisteen kanssa, ja osa efektorin aminoryhmien kanssa.

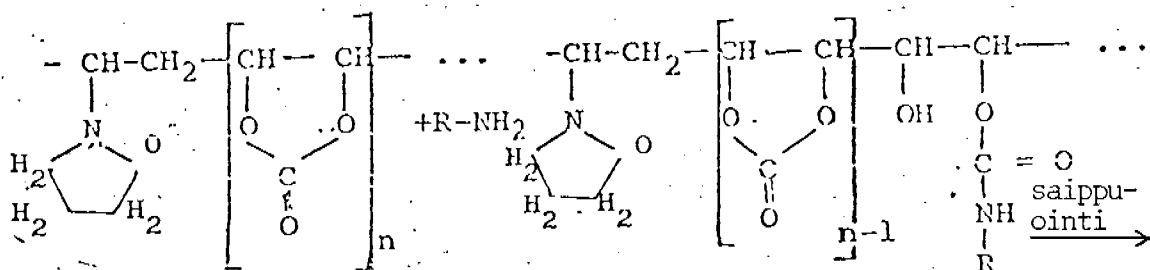
Diatsotoitavat aromaattiset amiinit, jotka toisaalta voivat liittyä jonkin toisen reaktiivisen ryhmän kautta kantaja-aineen hydroksyyli-ryhmiin, sallivat toisaalta kytkennän siihen kykenevien,

aktivoitujen aminohappojen kanssa, esim. proteiiniefektorin tyrosiini- tai histidiinitähteen kanssa.

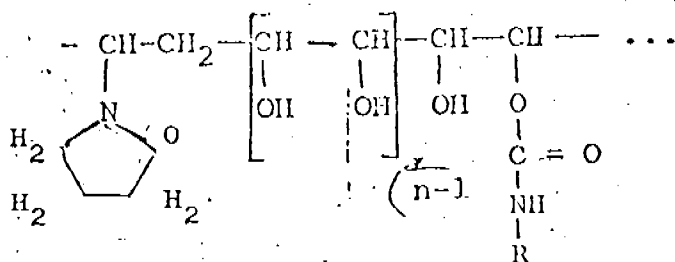
Aryyliaminoryhmiä sisältävät, β -hydroksietyyylisulfonien vinyylisulfonijohdannaiset ja rikkihappopuoliesterit voivat reagoida kantaja-aineen hydroksyyli ryhmien kanssa. Ne tekevät mahdolliseksi efektorin sitoutumisen edellä kuvatun diatsotointireaktion jälkeen.

Erittäin stabiileja eetterisidoksia muodostuu polyvinyleeni-glykolikopolymerisaatin hydroksyyli ryhmien reaktiossa ioneja muodostavien epoksidien kanssa, jotka sisältävät vähintään 2 reaktiivista ryhmää, kuten epihalohydrinejä tai polyepoksidgeja, esim. epikloorihydriiniä tai bisepoksidgeja.

Eräs toinen modifiointi-tapa on komonomeerien polymerointi polyvinyleenikarbonaattiketjuksi (kuten esim. vinyylipyrrolidonin) antamalla lopuksi polyvinyleenikarbonaatin syklokarbonaattirenkaiden reagoida osittain amiinin kanssa, esim. heksametyleenidiamiinin kanssa uretaanisidoksella Spacerin tai efektorin kanssa, substituoiduksi polyvinyleenikarbonaatti-kopolymerisaatiksi. Tähteenä jääneet syklokarbonaattiryhmät saippuoidaan sitten hydroksyyli ryhmiksi:



Polyvinyleenikarbonaatti



Tässä esimerkiksi esitettyjen menetelmien ohella, jotka koskevat tapaa valmistaa kovalenttinen sidos kantajamatriisiin ja proteiini-efektorin tai muiden efektorien välille, on olemassa vielä muita menetelmiä, jotka johtavat hydroksyyli ryhmien tai kopolymerien määrättyjen ryhmien reaktioon efektorin kanssa ja valmistavat täten kova-

lenttisen sidoksen näiden molempien välille; näin tunnetun reaktion komplekseja muodostavien metalliyhdisteiden, esim. titaaniyhdisteiden kanssa. Kaikki nämä menetelmät ovat asiantuntijalle tunnettuja.

Pienimolekyylisten biologisesti aktiivisten yhdisteiden sitomisessa on edullista aktivoida ei kantaja-aine, vaan efektori.

Periaatteessa voidaan käyttää kaikkia menetelmiä, jotka ovat tunnettuja makromolekyyllisessä kemiassa synteettisten tai luonnollisten makromolekyylisten yhdisteiden modifioinnissa.

Polyvinyleeniglykoli-kopolymerisaateilla on kemiallisen ja termisen stabiliteetin ohella edullisia työstämisteknisiä ominaisuuksia ja ne johtavat täten paremmuuteen verrattuna muihin tähänmennessä optimaalisiksi todettuihin kantaja-matriiseihin, joiden pohjana ovat luonnolliset hiilihydraatit. Ne ovat valmistettavissa esimerkiksi kuitujen säikeiden, kalvojen tai pallomaisten osasten muodossa, niin että aina sitoutuvan efektorin käyttötarkoituksen mukaan voidaan valita sopivin muoto. Edullisesti käytetään näitä kopolymerisaatteja hienojakoisina jauheina, joilla on suuri spesifinen ulkopinta.

Efektorien tai Spacereiden sitomiseen käytettävän ulkopinnan tuotantoteknisesti ohjattavissa oleva suuruus tarjoaa polyvinyleeniglykolikopolymerisaattien toisen edun verrattuna tunnettuihin kantaja-aineisiin.

Keksinnönmukaiset, biologisesti aktiiviset yhdisteet soveltuvat useimpiin käyttömenetelmiin, jotka tähänmennessä ovat tulleet tunnetuiksi muista hydrofiilisiin, veteenliukenemattomiin kantaja-aineisiin sitoutuneista efektoreista. Senmukaisesti entsyymit voidaan tehdä veteenliukenemattomiksi. Liukenemattomia entsyymejä voidaan lisääntyvässä määrin käyttää substraattien määritykseen analyysiautomaateissa ja niinsanottuina entsyymielektrodeina. Kohonneen stabiliteetin johdosta soveltuu joukko kantaja-aineeseen sitoutuneita entsyymejä teknisesti entsyymaattisten reaktioiden suorittamiseen.

Kantaja-aineeseen sitoutuneiden biologisesti aktiivisten aineiden käyttö affiniteettikromatografiassa on levinnyt laajalti niiden ominaisuuden "toimia spesifisinä adsorbentteinä" johdosta. Kantaja-aineeseen sitoutuneiden luonnollisten tai synteettisten entsyymi-inhibiittoreiden avulla onnistuu entsyymien puhdistaminen tehokkaasti, kun taas entsyymien on todettu soveltuvan erinomaisesti efektoreina erityisesti luonnollisten entsyymi-inhibiittoreiden

saamiseen raakauutteista. Kantaja-aineeseen sitoutuneita veteenliukenemattomia antigeenejä käytetään vastaavien vasta-aineiden eristämiseen, jotka saadaan tällä tavalla vapaiksi muista seeruminaineosasisista ja vapaiksi muista antigeeneistä. Affiniteettikromatografisesti voidaan myös eristää ei-saostettavat vasta-aineet sekä sellaiset, jotka eivät ole saostettavissa niiden vähäisen konsentraation takia seerumissa, ja ne voidaan myös määrittää kvantitatiivisesti.

Esimerkit

Vinyleenikarbonaatti-kopolymeerien valmistus

Kopolymeerien (CP) valmistuksessa käytettyä vinyleenikarbonaattia keitettiin paluujäähdyttäen ennen käyttöä 1 tunnin ajan natriumboorihydridin kanssa (100 paino-osaa vinyleenikarbonaattia 2 paino-osaa NaBH_4 :ää kohden) 33 mm:n paineessa, sitten tislattiin 75°C :ssa/33 mm 50 cm pitkän, Raschig-lasirenkailla täytetyn hopeavaippakolonnin läpi ja käytettiin mahdollisimman pikaisesti kopolymerisaatioon. Samoin puhdistettiin käytetyt komonomeerit vielä ensiksi tislamalla.

1.) Kopolymerisaatti-vinyleeniglykoli/vinyylialkoholi saippuoidusta kopolymerisaatti-vinyleenikarbonaatti/vinyyliasetaatista

a) 9 paino-osaan vinyleenikarbonaattia ja 1 paino-osaan vinyyliasetaatia liuotetaan 0,05 paino-osaa atsobisisobutyronitriiliä typpiatmosfäärissä. Monomeeriseos täytetään typpiatmosfäärissä litteäksipainettuun (4 mm paksu, 60 mm leveä, 150 mm pitkä) alumiiniputkeen, jossa on ruuvisulku (kokonaistäyttötilavuus noin 35 ml), suljetaan N_2 -atmosfäärissä ja ripustetaan 48 tunniksi 50°C :seen vesihauteeseen. Saadaan kovia, hauraita muovilevyjä, jotka hienonnetaan iskumyllyssä. Lopuksi lämmitetään granulaattia 1-2 mm:n paineessa 5 tunnin ajan 120°C :ssa, jotta voitaisiin erottaa polymeroimaton tähde-monomeeri granulaattia, josta on monomeeri poistettu jauhetaan myllyssä edelleen, kunnes saavutetaan raekoko, joka on $<0,1$ mm, lisätään 500 paino-osaan 0,5 N natronlipeätä, sekoitetaan 20°C :ssa nopeasti-kulkeavalla sekoittajalla 1 tunnin ajan, jolloin karbonaatti- ja asetyyli-ryhmät saippuoidaan. Veteen liukenematon CP-vinyleeniglykoli/vinyylialkoholi imusuodatetaan, pestään hyvin vedellä vapaaksi epäorgaanisista suoloista ja suoritetaan sublimaatiokuivaus.

Saanto: 4,7 paino-osaa CP-vinyleeniglykoli/vinyylialkoholia, jonka spesifinen ulkopinta oli $34 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, mitattu BET:n mukaan.

b) Menetellään, kuten kohdassa 1) a) kuvattiin, ainoastaan käytetään 7 paino-osaa vinyleenikarbonaattia ja 3 paino-osaa vinyyli-asetaattia. Saanto: 4,1 paino-osaa CP-vinyleeniglykoli/vinyylialkoholia, jonka sublimaatiokuivatun polymeerijauheen spesifinen ulkopinta on $62,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

c) Vertailukoe, kuten kohdassa 1) a) kuvattiin, ainoastaan erona se, että käytetään 10 paino-osaa vinyleenikarbonaattia eikä ollenkaan komonomeeriä.

Saanto: 4,7 paino-osaa homopolymerisaatti-vinyleeniglykolia, sublimaatiokuivatun polymeerijauheen spesifisen ulkopinnan ollessa $20,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

2) Kopolymerisaatti-vinyleeniglykoli/vinyyliglysidyylietteri

Seosta, jossa on 7 paino-osaa vinyleenikarbonaattia, 3 paino-osaa vinyyliglysidyylietteriä ja 0,1 paino-osaa atsobisisobutyronitriiliä lämmitetään kuten edellä kohdassa 1) a) kuvattiin, litteissä alumiiniputkissa N_2 -atmosfäärissä 3 päivän ajan 50°C :ssa. Saadut muovilevyt hienonnetaan kuten kohdassa 1) a) kuvattiin, niistä poistetaan monomeeri, jauhetaan, kunnes raekoko on $< 0,1 \text{ mm}$, suspensoidaan 500 paino-osaan jääkylmää, 0,5 n NaOH:ta nopeakäyttöisellä sekoittajalla 30 min. ajan, lopuksi saippuoitu polymeeri sentrifugoidaan heti, lietetään jääveteen, neutraloidaan jääjäähdytyksen alaisena 2n H_2SO_4 :llä pH 7:ksi, imusuodatetaan, pestään jäävedellä ja suoritetaan sublimaatiokuivaus. Saanto: 3,9 paino-osaa CP-vinyleeniglykoli/vinyyliglysidyylietteriä, joka sisältää 1,3 milliekvivalenttia oksiraaniryhmiä/g kohden, (määritetty julkaisun: "Praktikum der makromolekularen organischen Chemie", sivu 221, von Braun, D., Cherdron, H., Kern, W., Hüthing Verlag, Heidelberg 1966 mukaisesti).

3) Aminosubstituoitu kopolymerisaatti-kantaja-aine

3,9 paino-osaa CP-vinyleeniglykoli/vinyyliglysidyylietteriä (esimerkistä 2) suspensoidaan Ultra-Turrax-sekoittajalla 100 paino-osaan H_2O :ta ja lisätään 10 ml 30 %:sta ammoniakkia. Pienellä magneettisekoittajalla sekoitetaan lopuksi vielä edelleen 10 tunnin ajan 50°C :ssa, lopuksi imusuodatetaan ja pestään hyvin vedellä ja suoritetaan sublimaatiokuivaus. Saanto: 3,5 paino-osaa kopolymerisaatti-kantaja-ainetta, joka sisältää 0,9 m ekvivalenttia ammoniryhmiä grammaa kohden, 3-amino-2-hydroksi-propyyli-ryhmien muodossa (ammoniakin reaktiosta glysidyyli-ryhmien kanssa).

4) CP-vinyleeniglykoli/akryylihappo

9 paino-osaa vinyleenikarbonaattia, 1 paino-osa akryylihappo-etyyliesteriä ja 0,05 paino-osaa atsobisisobutyronitriiliä polymroidaan N_2 -atmofäärissä kuten esimerkissä 1) a), hienonnettiin, poistettiin monomeeri ja jauhettiin, kunnes saavutettiin raekoko $< 0,1$ mm, saippuointiin, imusuodatettiin, pestiin ja suoritettiin sublimaatiokuivaus.

Saanto: 5,0 paino-osaa hydrofiilistä (vettä suosivaa) polymeerijauhetta, joka sisältää 1,1 milliekvivalenttia karboksyyli-ryhmiä grammaa kohden kantaja-ainetta, spesifisen ulkopinnan ollessa BET:n mukaan $27,2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

5) ω -aminoheksyyli-ryhmillä-substituoitu poly-vinyleeniglykoli

5 paino-osaa CP-vinyleeniglykoli/akryylihappoa esimerkistä 4) suspensoidaan Ultra-Turrax-sekoittajalla 100 ml:aan H_2O :ta, jäähdytetään 5° :een, lisätään 2,5 g N-sykloheksyyli-N'-(N-metyylimorfoliino)-etyyli)-karbodi-imidi-p-tolueenisulfonaattia, sekoitetaan 30 min. ajan pH 5:ssä ja 5° :ssa suodatetaan ja pestään nopeasti jäävedellä. Aktivoitu kantaja-aine suspensoidaan lopuksi heti 5° :een jäähdytettyyn liuokseen, jonka pH-arvo on saatettu 2 n HCl:llä 7,5:ksi, ja joka sisältää 5 g heksametyleenidiamiinia 100 ml:ssa vettä ja sekoitetaan vielä edelleen 24 tunnin ajan näissä olosuhteissa magneettisekoittajalla, imusuodatetaan, pestään hyvin vedellä ja suoritetaan sublimaatiokuivaus.

Saanto: 4,5 paino-osaa ω -aminoheksyyli-ryhmillä-substituoitua polyvinyleeniglykolia, jossa on 0,7 milliekvivalenttia aminoryhmiä grammaa kantaja-ainetta kohden.

6) Esimerkistä 1) a) peräisin olevan CP-vinyleeniglykoli/vinyylialkoholin, jonka spesifinen ulkopinta on BET:n mukaan $34 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, reagointi

a) Epikloorihydriinin kanssa

50 g CP-vinyleeniglykoli/vinyylialkoholia, valmistettu esimerkin 1) a) mukaisesti suspensoidaan 1 litraan 2 n NaOH:ta, lisätään 250 ml epikloorihydriiniä ja sekoitetaan 2 tunnin ajan $55-60^\circ$:ssa. Suspension pH-arvo laskee lyhyen ajan kuluttua 10 - 11:een. Senjälkeen kun on lisätty NaOH:ta pidetään vielä 1 tunnin ajan tätä pH-arvoa. 2 tunnin reaktioajan jälkeen imusuodatetaan kiinteä aine, pestään vedellä, asetonilla ja lopuksi jälleen vedellä.

b) Heksametyleenidiamiinin kanssa

50 g heksametyleenidiamiinia liuotetaan 1,5 litraan vettä ja lisätään HCl:ää, kunnes pH-arvo on 10. Liuokseen lisätään 6) a) mukaisesti aktivoitua CP-vinyleeniglykoli/vinyylialkoholia ja sekoitetaan 50-55^o:ssa 6 tunnin ajan. Sen jälkeen tuote imusuodatetaan ja pestään vedellä vapaaksi heksametyleenidiamiinista.

c) 1-aminobentseeni-4- β -hydroksietyyylisulfonirikkihappoesterin kanssa

Kohdassa 6) b) saatua tuotetta sekoitetaan 50 g:n 1-aminobentseeni-4- β -hydroksietyyylisulfonirikkihappoesteriä kanssa 55^o:ssa ja pH-arvon ollessa 10 1 tunnin ajan. Lopuksi kiinteä aine suodatetaan, pestään vedellä, asetonilla ja jälleen vedellä.

d) Diatsotointi

10 g kohdassa 6) c) saatua tuotetta pestään imusuodattimessa 200 ml:lla 0,1 n HCl:ää, ja sen jälkeen suspensoidaan 300 ml:aan 0,5 n HCl:ää. Suspensioon lisätään sekoittaen 0,1 n NaNO₂-liuosta 0-4^o:ssa, kunnes diatsotoinnissa on todettavissa KJ-tärkkelyspaperilla vähäinen nitriittiylimäärä. 10 min. kuluttua suodatetaan imusuodattimen läpi ja jäännös pestään jäävedellä ja lopuksi 0,15 M natriumfosfaatti-puskuriaineella, pH 7,5, 0-4^o:ssa.

e) Kovalenttinen sidos proteiinin kanssa

0,8 g albumiinia liuotetaan 350 ml:aan fosfaattipuskuriainetta pH 7,5, jäädytetään 4^o:een ja lisätään kohdassa 6) d) valmistettu tuote. Suspensiota sekoitetaan 20 tuntia 4^o:ssa, sen jälkeen suodatetaan ja kiinteä aine pestään 1M NaCl:llä ja fosfaattipuskuroidulla keittosuolaliuoksella (PBS) (vesipitoinen 0,9 %:nen NaCl-liuos, joka sisältää 1/15 moolia Na₂HPO₄-KH₂PO₄-puskuriainetta, jonka pH on 7,2). Suodos ja pesu-lipeät tutkitaan radiaalisen immuunidiffuusion menetelmän mukaisesti albumiinin suhteen. 60 mg albumiinia on sitoutunut 1 g:aan näin valmistettua kantaja-ainetta.

7) Esimerkistä 1) b) peräisin olevan CP-vinyleeniglykoli/vinyylialkoholin, jonka spesifinen ulkopinta on BET'n mukaan 62,5 m²g⁻¹, reagointi

Vastaavien reaktioiden jälkeen kuten kohdassa 6) a) - e) kuvattiin voi 1 g:aan aktivoitua kantaja-ainetta sitoutua kvantitatiivisesti 80 mg albumiinia.

8) Esimerkistä 1) c) peräisin olevan homopolymerisaatti-vinyleeniglykolin, jonka spesifinen ulkopinta on BET'n mukaan 20,5 m²g⁻¹, reagointi

Vastaavien reaktioiden, kuten kohdassa 6) a) - e) kuvattiin,

jälkeen voi 1 g:aan aktivoitua kantaja-ainetta sitoutua 45 mg albumiinia kvantitatiivisesti.

9) ω -aminoheksyyli-ryhmillä-substituoitu vinyleeniglykoli/vinyylipyrrolidoni-kopolymerisaatti

9 paino-osaan vinyleenikarbonaattia ja 1 paino-osaan vinyylipyrrolidonia liuotetaan 0,05 paino-osaa atsobisisobutyronitriiliä tyypiatmosfäärissä ja polymeroidaan esimerkin 1) a) mukaisesti ja käsitellään edelleen. Senjälkeen kun monomeeri on poistettu liuotetaan granulaatti 12 paino-%:seen dimetyyliformamidi-liuokseen, ja 15 atün paineessa suihkutetaan tämä liuos metanoli-saostushauteeseen. Saadaan hienosyinen sakka vinyleenikarbonaatti/vinyylipyrrolidoni-kopolymerisaatti, joka imusuodatetaan, pestään metanolilla ja suspensoidaan uudelleen 200 paino-osaan metanolia. Lisätään 6 paino-osaa heksametyleenidiamiinia, liuotettuna 50 paino-osaan metanolia, suspensiota sekoitetaan 2 päivän ajan huoneenlämpötilassa, imusuodatetaan ja pestään metanolilla. Pesty suodatinjäännös suspensoidaan nyt liuokseen, jossa on 10 paino-osaa natriummetylaattia 300 paino-osassa 96 %:sta metanolia, 4 päivän ajan huoneenlämpötilassa, pestään metanolilla ja sitten hyvin intensiivisesti vedellä ja suoritetaan sublimaatiokuivaus.

Saanto: 5,0 paino-osaa uretaani-sidosten kautta ω -aminoheksyyli-ryhmillä substituoitua vinyleeniglykoli/vinyylipyrrolidoni-kopolymerisaattia, joka sisältää 1,6 m ekvivalenttia NH_2 -ryhmiä/g kantaja-ainetta kohden.

10) IgG:n sitoutuminen esimerkistä 9) peräisin olevaan ω -aminoheksyyli-ryhmillä-substituoituun kopolymerisaattiin meripihkahappoanhydridin ja vesiliukoisen karbodi-imidin avulla

5 paino-osaa esimerkin 9) mukaan valmistettua ω -aminoheksyyli-substituoitua kantaja-ainetta sukkinoyloidaan 10° :ssa ja pH:n ollessa 6 2,5 paino-osalla meripihkahappoanhydridiä, joka on suspensoitu 200 paino-osaan vettä, 4 tunnin ajan. pH-arvo säädetään 2 n NaOH:lla. Senjälkeen kun kiinteä aine on pesty vedellä sekoitetaan tuotetta 1,25 paino-osan N-sykloheksyyli-N'-(N-metyylimorfolino)-etyyli)-karbodi-imidi-p-tolueeni-sulfonaatin kanssa pH:n ollessa 5 ja 5° :ssa 30 min. ajan, suodatetaan ja pestään nopeasti jäävedellä.

0,5 paino-osaa IgG:tä liuotetaan 150 paino-osaan fosfaattipuskurivainetta pH 7,5 ja sekoitetaan aktivoidun kantaja-aineen kanssa 24 tunnin ajan 4° :ssa. Suodattamisen jälkeen pestään tuote

1M keittosuolalla ja PBS:llä. 1 g:aan kantaja-ainetta on sitoutunut 75 mg IgG:tä kovalenttisesti.

11) Kopolymerisaatti-vinyleeniglykoli/dietyleeniglykolidivinyylieetteri

9 paino-osaan vinyleenikarbonaattia ja 1 paino-osaan dietyleeniglykolidivinyylieetteriä liuotetaan typpiatmosfäärissä 0,1 paino-osa atsobisisobutyrolinitriiliä ja lämmitetään kuten kohdassa 1) a) kuvattiin litteissä alumiiniputkissa N_2 -atmosfäärissä 3 päivän ajan $50^{\circ}C$:ssa ja polymerisoidaan. Edelleen käsittelyn ja saippuoinnin jälkeen kuten kohdassa 1) a) kuvattiin, saadaan 3,5 paino-osa CP-vinyleeniglykoli/dietyleeniglykoli-divinyylieetteriä.

12) Kopolymerisaatti-vinyleeniglykoli/N-akryloyyliaminoasetaldehydidimetyyliasetaaali

a)

9 paino-osaan vinyleenikarbonaattia ja 1 paino-osaan N-akryloyyliaminoasetaldehydidimetyyliasetaaalia liuotetaan 0,05 paino-osaan atsobisisobutyronitriiliä typpiatmosfäärissä. Monomeeriseos polymeroidaan kuten edellä kohdassa 1) a) kuvattiin, käsitellään edelleen ja saippuoidaan 4,1 paino-osaksi N-akryloyyliaminoasetaldehydidimetyyliasetaaali/vinyleeniglykoli-polymeeriksi.

10 paino-osa N-akryloyyliaminoasetaldehydidimetyyliasetaaali/vinyleeniglykoli-kopolymeeriä sekoitettiin 100 paino-osassa 1 N HCl:ää 4-5 tunnin ajan. Aktivoitu kantaja-aine pestiin vedellä ja fosfaattipuskuraineella, pH 7,5.

b)

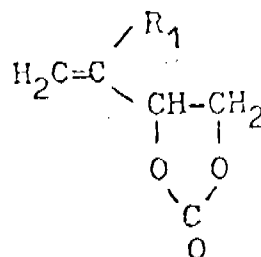
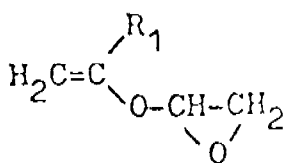
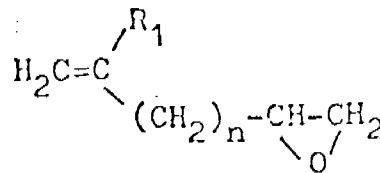
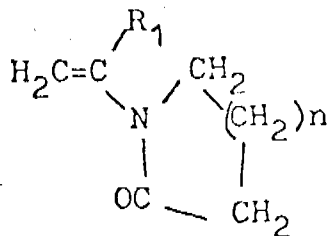
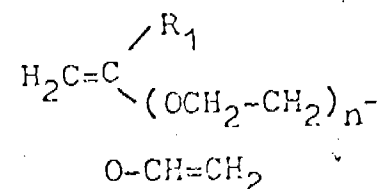
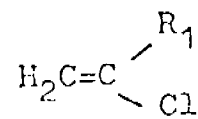
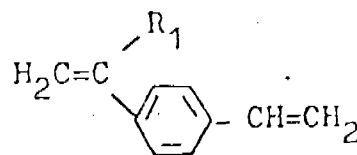
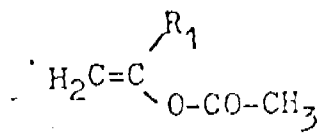
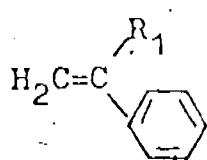
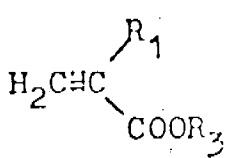
0,5 g albumiinia liuotettiin 200 ml:aan PBS:ää ja sekoitettiin kohdassa a) valmistetun tuotteen kanssa 14 tunnin ajan 4° :ssa. Suodattamisen jälkeen pestiin kantaja-aineeseen sitoutunut proteiini 1 M keittosuolalla ja PBS:llä.

1 g näin valmistettua kantaja-ainetta sitoo 40 mg albumiinia.

Patenttivaatimukset.

1. Vinyleeniglykolin ja siihen kemiallisesti sitoutuneen biologisesti aktiivisen aineen kopolymeerista peräisin oleva yhdiste

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että kopolymeeri sisältää vähintään 55 % vinyleeniglykolin monomeeriyksikköjä ja korkeintaan 45 % vähintään yhden, yleisten kaavojen mukaisen yhdisteen monomeeriyksikköjä:



joissa R_1 on vety, metyyli, etyyli, R_3 on metyyli, etyyli, propyyli ja n on kokonaisluku 1-4.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että biologisesti aktiivinen aine on entsyymi, aktivaattori, inhibiittori, antigeeni (vasta-aineen synnyttaja) tai vasta-aine, plasmaproteiini, veriryhmäaine, fythemagglutiniini, antibiootti, vitamiini tai hormoni, peptidi tai aminohappo, luonnollinen tai syntetisest valmistettu efektori.

4. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

(A) annetaan vinyleenikarbonaatin kopolymerin reagoida biologisesti aktiivisen aineen kanssa ja sen jälkeen muutetaan vielä esilläolevat syklokarbonaattiryhmät hydroksiryhmiksi tai

(B) muutetaan vinyleenikarbonaatin kopolymerin syklokarbonaattiryhmät hydroksiryhmiksi ja

(a) annetaan kopolymerisaatissa olevien tai siihen liitettyjen elektrofiilisten ryhmien reagoida biologisesti aktiivisen aineen kanssa tai

(b) annetaan näiden hydroksiryhmien reagoida

(1) joko ensiksi elektrofiilisiä ryhmiä sisältävän yhdisteen kanssa ja sitten biologisesti aktiivisen aineen kanssa

(2) tai välittömästi elektrofiilisiä ryhmiä sisältävän biologisesti aktiivisen aineen kanssa.

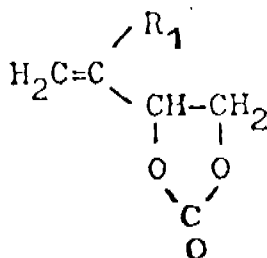
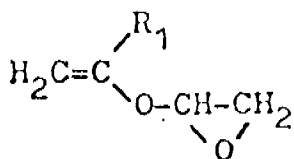
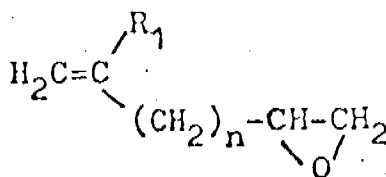
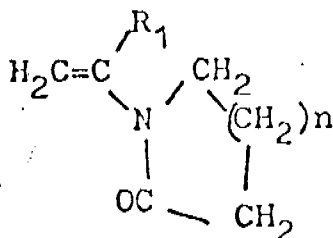
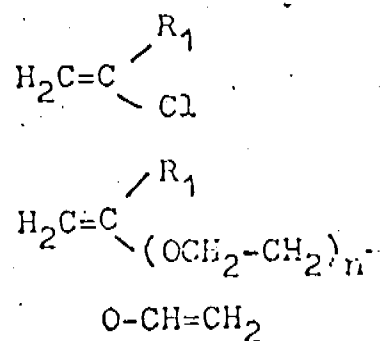
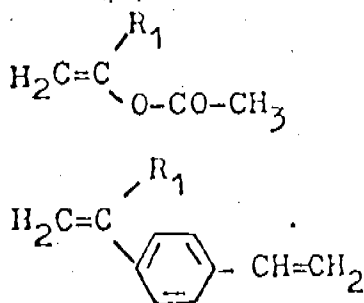
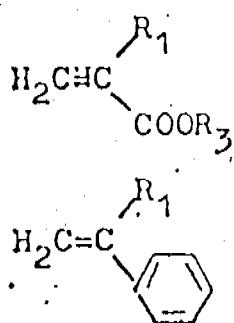
5. Aine, joka sisältää patenttivaatimuksen 1 mukaista yhdistettä.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen yhdisteen käyttö affiniteettikromatografiassa, immuunireaktioiden suorittamiseen tai entsyymireaktioiden suorittamiseen.

Patentkrav:

1. Förening mellan ett sampolymerisat av vinylenglykol och en därtill kemiskt bunden biologiskt aktiv substans.

2. Förening enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att sampolymerisatet innehåller minst 55% monomerenheter av vinylenglykolen och högst 45% monomerenheter av minst en förening med någon av de allänna formlerna:



där R_1 betyder väte, metyl, etyl, R_3 metyl, etyl, propyl och n ett helt tal mellan 1 och 4.

3. Förening enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att den biologiskt aktiva substansen är ett enzym, en aktivator, en inhibitor, ett antigen eller en antikropp, ett plasmaprotein, en blodgruppssubstans, ett fythemagglutinin, ett antibiotikum, ett vitamin eller ett hormon, en peptid eller en aminosyra, en naturlig eller syntetiskt framställd effektor.

4 4. Förfarande för framställning av en förening enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav,

(A) att ett sampolymerisat av vinylenkarbonat omsätts med en biologiskt aktiv substans och att de ännu förekommande cyklokarbonatgrupperna överförs till hydroxigrupper, eller

(B) att cyklokarbonatgrupperna av ett sampolymerisat av vinylenkarbonat överförs till hydroxigrupper och

(a) att i sampolymerisatet förekommande eller i detta införda elektrofila grupper omsätts med en biologiskt aktiv substans eller

(b) att dessa hydroxigrupper

(1) antingen först omsätts med en elektrofila grupper innehållande förening och därefter med en biologiskt aktiv substans.

(2) eller direkt omsätts med en elektrofila grupper bärande biologiskt aktiv substans.

5. Medel innehållande en förening enligt patentkravet 1.

6. Användning av en förening enligt patentkravet 1 för för affinitetskromatografi, för genomförande av immunreaktioner eller för genomförande av enzymreaktioner.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

DE-up

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patent-
ansökningar: _____

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patenskrifter:

Suomi - Finland _____

Iso-Britannia - Storbritannien _____

Norja - Norge _____

Ranska - Frankrike _____

Ruotsi - Sverige _____

Saksa - BRD - Tyskland H 2402340 , H 2421789

Sveitsi - Schweiz _____

Tanska - Danmark _____

USA _____

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

1977-80

AM

Allekirjoitus

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja
vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P