



(12) Ausschließungspatent

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

4(51) C 08 J 7/12  
C 08 F 8/30  
C 08 G 65/32  
C 08 G 65/48

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

---

(21) DD C 08 J / 330 166 5 (22) 29.08.89 (44) 31.01.91

---

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE

(72) Kühn, Manfred, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DE

(73) Akademie der Wissenschaften der DDR, Zentralinstitut für Molekularbiologie, Robert-Rössle-Straße 10, O - 1115 Berlin-Buch, DE

(74) siehe (73)

---

(54) Verfahren zur Herstellung wasserlöslicher Makromoleküle mit primären Aminogruppen

---

(55) Verfahren; nukleophile Substitution; wasserlösliche Makromoleküle mit primären Aminogruppen; säurebindende Mittel; organische Lösungsmittel

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung wasserlöslicher Makromoleküle mit primären Aminogruppen. Anwendungsgebiete sind unter anderem die Biotechnologie, Biochemie und Medizin. Durch Umsetzung wasserlöslicher, nukleophile Gruppen enthaltender Makromoleküle mit Halogenverbindungen, Schwefelsäureestern, Salpetersäureestern oder Sulfonsäureestern von organischen Verbindungen mit zusätzlichen, primären Aminogruppen im Molekül werden wasserlösliche Polymere mit primären Aminogruppen synthetisiert. Die Reaktionen werden in organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel oder Gemischen organischer Lösungsmittel mit Wasser in Gegenwart eines säurebindenden Mittels durchgeführt. Die Reaktionstemperaturen liegen im Bereich von 20 °C bis 150 °C und die Reaktionszeiten bei 1 Stunde bis 10 Stunden.

### Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung neuer, wasserlöslicher Makromoleküle mit primären Aminogruppen, dadurch gekennzeichnet, daß Hydroxylgruppen oder Thiolgruppen oder primäre beziehungsweise sekundäre Aminogruppen enthaltende, wasserlösliche Makromoleküle in Gegenwart eines säurebindenden Mittels mit Halogenverbindungen, Schwefelsäureestern, Salpetersäureestern oder Sulfonsäureestern organischer Verbindungen mit zusätzlichen, primären Aminogruppen im Verlaufe von 1 Stunde bis 10 Stunden in organischen Lösungsmitteln oder Mischungen dieser mit wäßrigen Lösungen oder Gemischen organischer Lösungsmittel bei 20°C bis 150°C umgesetzt werden, und die neuen, wasserlöslichen Makromoleküle mit primären Aminogruppen durch Dialyse, Ultrafiltration und Lyophilisierung oder durch Ausfällen mit organischen Lösungsmitteln oder, nach eventuell erforderlicher Addition von destilliertem Wasser zu den Reaktionslösungen aus organischen Lösungsmitteln, durch Extraktion mit in Wasser nicht löslichen oder mischbaren, organischen Lösungsmitteln und Ausfällen aus diesen mit anderen organischen Lösungsmitteln aus den Reaktionslösungen gewonnen werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als säurebindende Mittel die zu bindenden Verbindungen mit primären Aminogruppen selbst, tertiäre Amine, Heterocyklen mit endocyclischem, tertiärem Stickstoffatom, Alkalihydroxide, Alkalikarbonate, Alkalialkoholate oder Alkalisalze kondensierter Aromaten und Heteroaromaten verwendet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Sulfonsäureester der organischen Verbindungen mit zusätzlichen, primären Aminoverbindungen Alkyl- oder substituierte Alkyl-, Aryl- oder Hetaryl-, substituierte Aryl- oder Hetaryl-, kondensierte und/oder substituierte Aryl- oder Hetarylsulfonsäureester eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß für die Umsetzungen als organische Lösungsmittel Alkohole, Ketone, cyclische Ether wie Tetrahydrofuran und Dioxan oder aprotische Lösungsmittel wie Acetonitril, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid oder Gemische dieser organischen Lösungsmittel untereinander oder Gemische dieser mit in Wasser nicht löslichen oder nicht mischbaren, organischen Lösungsmitteln wie Chloroform, Methylenchlorid, Benzen oder Toluol verwendet werden.

### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung wasserlöslicher Makromoleküle mit primären Aminogruppen. Diese aminogruppenhaltigen Makromoleküle können in der stoffwandelnden Industrie, Biochemie, Pharmazie und Medizin angewendet werden.

### Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die wasserlöslichen Makromoleküle besitzen für die kovalente Bindung niedermolekularer und hochmolekularer, biologisch aktiver Verbindungen erhebliche Bedeutung sowohl in der Forschung als auch in der Praxis. Niedermolekulare, biologisch aktive Verbindungen wie die Kofaktoren werden dadurch erst in Zweiphasensystemen zur ökonomischen Enzymreinigung einsetzbar, und biologisch aktive Makromoleküle, zum Beispiel verschiedene Enzyme, werden durch eine Modifizierung mit anderen, wasserlöslichen Makromolekülen teilweise erheblich stabilisiert. Diese Vorteile der kovalenten Verbindung wasserlöslicher, vor allem synthetischer Makromoleküle, mit biologisch aktiven Verbindungen werden aber erst dann umfassend wirksam, wenn für die Verknüpfungsreaktionen Makromoleküle mit geeigneten, funktionellen Gruppen zur Verfügung stehen. Außer bei den Polyaminosäuren und dem Polyethylenimin enthalten die für den Einsatz in Forschung und Praxis geeigneten, wichtigsten wasserlöslichen und synthetischen Makromoleküle wie die Dextrane, Polyoxyalkylenglykole oder der Polyvinylalkohol aber lediglich die wenig reaktiven Hydroxylgruppen als funktionalisierbare Gruppen. Die Möglichkeiten der Modifizierung und Aktivierung von Hydroxylgruppen sind zudem noch begrenzt und häufig werden dazu auch noch giftige Chemikalien verwendet, so daß immer wieder nach neuen Methoden gesucht wird, die Hydroxylgruppen durch andere reaktive, funktionelle Gruppen zu ersetzen, die einfache Verknüpfungsreaktionen unter Ausbildung stabiler Bindungen erlauben. Primäre Aminogruppen sind ebenfalls geeignete, funktionelle Gruppen zur Immobilisierung biologisch aktiver Verbindungen an Makromoleküle. Im Gegensatz zu unlöslichen Polymeren, bei denen eine Vielzahl von präparativen Methoden zur Einführung von primären Aminogruppen in diese Makromoleküle bekannt sind (Methods Enzymol. 1988, 137 [Immobilized Enzymes and Cells], Pt. A and Pt. B) existieren für wasserlösliche, synthetische und hydroxylgruppenhaltige Makromoleküle nur wenige solche Methoden. Nur einige wenige nukleophile Substitutionsreaktionen an aktivierten, wasserlöslichen Makromolekülen werden angewendet, um für weitere Modifizierungs- und Aktivierungsreaktionen geeignete, wasserlösliche Makromoleküle mit primären Aminogruppen zu erhalten. (Makromol. Chem. 1981, 182, 1379-1384). Andere Synthesewege und andersartig substituierte Derivate wasserlöslicher und synthetischer Makromoleküle wurden zur Synthese von Makromolekülen mit primären Aminogruppen bisher nicht herangezogen.



**Ziel der Erfindung**

Das Ziel der Erfindung besteht darin, durch eine einfache Substitutionsreaktion primäre Aminogruppen aliphatischer oder aromatischer Natur in wasserlösliche, synthetische und hydroxylgruppenhaltige Makromoleküle einzuführen, um reaktive, aminogruppenhaltige Makromoleküle zur Immobilisierung von biologisch aktiven Verbindungen zu erhalten.

**Darlegung des Wesens der Erfindung**

Aufgabe der Erfindung ist die Herstellung wasserlöslicher Makromoleküle mit primären Aminogruppen. Erfindungsgemäß werden hydroxylgruppenhaltige, thiolgruppenhaltige oder primäre beziehungsweise sekundäre Aminogruppen enthaltende, wasserlösliche Makromoleküle in Gegenwart säurebindender Mittel mit Halogenverbindungen, Schwefel-säureester, Salpetersäureestern oder Sulfonsäureestern organischer Verbindungen mit zusätzlichen primären Aminogruppen in organischen Lösungsmitteln oder Mischungen dieser mit wäßrigen Lösungen oder Gemischen organischer Lösungsmittel bei 20°C bis 150°C umgesetzt. Als säurebindende Mittel kommen bevorzugt tertiäre Amine wie Trialkylamine oder Heterocyclen mit endocyclischem, tertiärem Stickstoffatom wie Pyridin oder Imidazol oder Alkalihydroxide, Alkalikarbonate, Alkalialkoholate oder Alkalisalze kondensierter Aromaten und Heteroaromaten zum Beispiel der Naphthalins in Frage, und als Sulfonsäureester werden bevorzugt substituierte Alkyl- oder aromatische Sulfonsäureester eingesetzt. Mit Vorteil arbeitet man bei den Umsetzungen der Makromoleküle mit den reaktiven, funktionellen Gruppen und den aktivierten, organischen Verbindungen mit zusätzlichen, primären Aminogruppen im Molekül in organischen Lösungsmitteln wie Alkoholen, Ketonen, den cyclischen Ethern Tetrahydrofuran beziehungsweise Dioxan, den aprotischen Lösungsmitteln Acetonitril, Dimethylformamid beziehungsweise Dimethylsulfoxid oder Gemischen dieser organischen Lösungsmittel untereinander oder Gemischen dieser organischen Lösungsmittel mit in Wasser nicht löslichen oder mischbaren, organischen Lösungsmitteln wie Chloroform, Methylenchlorid, Benzen oder Toluol. In Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch liegen die Reaktionszeiten bei den Umsetzungen im Bereich von 1 Stunde bis 10 Stunden. Bei der Verwendung von Lösungsmittelgemischen mit Wasser müssen die längeren Reaktionszeiten gewählt werden.

Die Isolierung der mit primären Aminogruppen – die in Abhängigkeit von den in den nukleophilen Substitutionsreaktionen eingesetzten, niedermolekularen Kopplungsreagentien sowohl aliphatischer als auch aromatischer Natur sein können – modifizierten, wasserlöslichen Makromoleküle erfolgt, nachdem die Reaktionslösungen mit mindestens dem dreifachen Volumen destilliertem Wasser versetzt wurden. Bei den nur in wäßrigen Lösungen löslichen und modifizierten Makromolekülen werden die niedermolekularen Reaktionskomponenten zuerst durch Dialyse und/oder Ultrafiltration entfernt. Anschließend werden aus diesen wäßrigen Lösungen die erfindungsgemäßen, neuen und in Wasser löslichen Makromoleküle mit aliphatischen oder aromatischen, primären Aminogruppen durch Lyophilisierung oder durch Ausfällen mit wassermischbaren, organischen Lösungsmitteln wie niedere Alkohole oder Ketone beziehungsweise Tetrahydrofuran oder Dioxan und anschließender Trocknung der Niederschläge in der Regel bei Zimmertemperatur in fester Form gewonnen. In organischen Lösungsmitteln wie Chloroform, Methylenchlorid, Benzen oder Toluol und Wasser lösliche Makromoleküle wie zum Beispiel die Polyoxyalkylenglykole oder ihre Monoalkoxyderivate werden dagegen vorteilhafter zunächst durch Extraktion mit den genannten, organischen Lösungsmitteln aus den Reaktionslösungen abgetrennt, aus den eingeeengten organischen Lösungsmitteln mit Ether oder Petrolether ausgefällt und bei Zimmertemperatur getrocknet.

Elementaranalyse, Umsetzungen mit Trinitrobenzonsulfonsäure und auch die IR-Spektren belegen zusammengenommen das Vorliegen primärer Aminogruppen in den wasserlöslichen Makromolekülen. Die erfindungsgemäßen, aminogruppenhaltigen Makromoleküle sind stabil, einfach herstellbar und zur Immobilisierung biologisch aktiver Verbindungen geeignet. Der Gegenstand der Erfindung wird durch Beispiele weiter erläutert.

**Ausführungsbeispiele****Beispiel 1**

3g Polyethylenglykol (MG 6000) werden in 15ml frisch destilliertem Dimethylformamid gelöst. Zu dieser Lösung werden 0,5g Kaliumkarbonat und 0,5g p-Aminophenylsulfonylethylsulfat addiert. Das Reaktionsgemisch wird bei 80°C 6 Stunden gerührt und danach in 100ml destilliertes Wasser eingetragen. Der ausgefallene Niederschlag wird abgetrennt und verworfen, und aus der resultierenden Lösung wird das aminogruppenhaltige Polymere durch dreimaliges Ausschütteln mit jeweils 20ml Chloroform extrahiert. Die Chloroformlösung wird mit Natriumsulfat getrocknet, eingeeengt, und das aminogruppenhaltige Polymere wird mit Ether oder Petrolether ausgefällt.

**Beispiel 2**

1g Polyvinylalkohol werden in 20ml eiskaltem, destilliertem Wasser gelöst. 0,5g festes Natriumhydroxid werden zu dieser Lösung gegeben, und es wird so lange gerührt, bis alles Natriumhydroxid gelöst ist. Danach werden zu dieser Lösung 15ml frisch destilliertes Dimethylformamid addiert, in dem zuvor 0,8g Ethanolamin-O-sulfat aufgelöst wurden. Das Reaktionsgemisch wird 8 Stunden bei 80°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wird die Reaktionslösung gegen destilliertes Wasser dialysiert, ihr Volumen durch Ultrafiltration verringert und das aminogruppenhaltige Polymere daraus durch Lyophilisierung in fester Form erhalten.

**Beispiel 3**

3g w,w'-Dimerkapto-polyethylenglykol (MG 6000) werden in 20ml Chloroform gelöst. Zu dieser Lösung werden zuerst 0,5g p-Aminophenylsulfonylethylsulfat, aufgelöst in 20ml Aceton, zugetropft und danach 0,5g festes Kaliumkarbonat addiert. Das Reaktionsgemisch wird 10 Stunden bei 80°C gerührt und anschließend mit 50ml destilliertem Wasser versetzt. Die Lösung wird noch 1 Stunde bei Zimmertemperatur gerührt, und danach wird die organische Phase abgetrennt. Sie wird noch zweimal mit jeweils 20ml destilliertem Wasser ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet und auf etwa 5ml eingeeengt. Aus der eingeeengten Lösung wird das aminogruppenhaltige Polymere mit Ether oder Petrolether ausgefällt und getrocknet.