



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 286 598 A5

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
C 08 B 37/02

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 08 J / 330 167 3	(22)	29.06.89	(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 Einführung von primären Aminogruppen in wasserlösliche Polymere

(55) Verfahren; nukleophile Substitution; aktivierte und wasserlösliche Polymere; bifunktionelle Reagentien; Mercaptogruppen; Aminogruppen; Nitrogruppen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Einführung von primären Aminogruppen in wasserlösliche Polymere. Durch nukleophile Substitutionsreaktionen von aktivierten, wasserlöslichen Polymeren mit bifunktionellen, organischen Verbindungen mit mindestens einer Mercaptogruppe und zusätzlichen, primären Aminogruppen oder Nitrogruppen, die nachträglich reduziert werden unter sauren oder alkalischen Bedingungen, werden modifizierte, wasserlösliche Polymere mit primären Aminogruppen aliphatischer und aromatischer Natur erhalten. Die Umsetzungen werden in wäßrigen Lösungen, organischen Lösungsmitteln oder Gemischen beider in Gegenwart säurebindender Mittel bei Temperaturen von 20°C bis 150°C ausgeführt. Die Isolierung der aminogruppenhaltigen Polymeren geschieht durch Lyophilisierung der dialysierten Reaktionslösungen oder durch Extraktion und/oder Ausfällung mit organischen Lösungsmitteln.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Einführung von primären Aminogruppen in wasserlösliche Polymere, dadurch gekennzeichnet, daß Halogenderivate, Schwefelsäureester, Salpetersäureester oder Sulfonsäureester von wasserlöslichen Polymeren mit bifunktionellen, organischen Verbindungen mit mindestens einer Merkapto-Gruppe und einer aliphatischen oder aromatischen, primären Aminogruppe beziehungsweise einer Merkapto-Gruppe und einer oder mehrerer aromatischer Nitrogruppe(n) in wäßrigen Lösungen, organischen Lösungsmitteln oder Gemischen beider in Gegenwart von Alkalihydroxiden, Alkalikarbonaten oder Alkalialkoholaten und gegebenenfalls in Anwesenheit von Reduktionsmitteln, bei 20°C bis 150°C innerhalb von 1 Stunde bis 10 Stunden umgesetzt werden und die mit primären Aminogruppen modifizierten, wasserlöslichen Polymeren, gegebenenfalls nach Alkalisieren und Filtrieren saurer Reaktionslösungen, durch Dialyse, Ultrafiltration und Lyophilisierung oder Ausfällung mit organischen Lösungsmitteln oder Extraktion mit organischen Lösungsmitteln und Ausfällung aus diesen mit anderen organischen Lösungsmitteln aus den Reaktionslösungen isoliert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Sulfonsäureester Alkyl- oder substituierte Alkyl-, Aryl- oder Hetaryl-, substituierte Aryl- oder Hetaryl-, kondensierte und/oder substituierte Aryl- oder Hetarylsulfonsäureester eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als bifunktionelle, organische Verbindungen Cysteamin, Cystein, Aminothiophenol oder Nitrothiophenole eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß für die Umsetzungen als organische Lösungsmittel Alkohole, Ketone, cyclische Ether wie Tetrahydrofuran beziehungsweise Dioxan oder aprotische Lösungsmittel wie Acetonitril, Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid oder in Wasser nicht lösliche oder mischbare, organische Lösungsmittel wie Chloroform, Methylenchlorid, Benzen oder Toluol verwendet werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Reduktionsmittel Natriumdithionit unter alkalischen Bedingungen oder Zinn(II)-chlorid in Salzsäure eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Einführung von primären Aminogruppen in wasserlösliche Polymere. Diese Polymere finden Anwendung in der Biotechnologie, Chemie, Biochemie, Pharmazie und Medizin.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Modifizierung wasserlöslicher Polymere mit kovalent gebundenen Hydroxylgruppen ist notwendig, um in diesen Polymeren die Hydroxylgruppen durch andere reaktive und wiederum, aber oftmals leichter funktionalisierbare, funktionelle Gruppen zu ersetzen. Unter den funktionellen Gruppen, die zur weiteren Modifizierung dieser Polymeren besonders geeignet sind, spielen primäre Aminogruppen eine herausragende Rolle. Zur Einführung von primären Aminogruppen in wasserlösliche Polymere können verschiedene Synthesereaktionen angewendet werden. Ein geeigneter Reaktionstyp wird als nukleophile Substitutionsreaktion bezeichnet, bei der reaktive Zwischenprodukte der wasserlöslichen Polymeren mit Ammoniak oder Diaminen umgesetzt werden. Die Umsetzungen nach diesem Reaktionstyp geben aber häufig Anlaß zu Nebenreaktionen, so daß in den Polymeren nach auf diesem Wege erfolgter Modifizierung neben den gewünschten primären Aminogruppen auch noch sekundäre beziehungsweise tertiäre Aminogruppen vorliegen können. Dieser Umstand erfordert aber zusätzlichen, präparativen Aufwand zur Isolierung von wasserlöslichen Polymeren mit ausschließlichem oder überwiegendem Gehalt an primären Aminogruppen.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, in wasserlösliche, hydroxylgruppenhaltige Polymere durch einfache chemische Reaktionen primäre Aminogruppen einzuführen und mit diesen funktionellen Gruppen modifizierte Polymere für die Immobilisierung von biologisch aktiven Verbindungen bereitzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Einführung von primären Aminogruppen in wasserlösliche Polymere, bei denen Hydroxylgruppen durch primäre Aminogruppen substituiert werden sollen. Erfindungsgemäß erreicht man das dadurch, daß man die aus hydroxylgruppenhaltigen, wasserlöslichen Polymeren erhältlichen Halogenderivate, Schwefelsäureester,

Salpetersäureester oder Sulfonsäureester mit bifunktionellen, organischen Verbindungen mit mindestens einer Merkapto-Gruppe und einer aliphatischen oder aromatischen, primären Aminogruppe beziehungsweise einer Merkapto-Gruppe und einer oder mehrerer, aromatischer Nitrogruppe(n) in wässrigen Lösungen oder organischen Lösungsmitteln oder Gemischen beider in Gegenwart von Alkalihydroxiden, Alkalikarbonaten oder Alkalialkoholaten und im Falle der Verwendung von Verbindungen mit aromatischen Nitrogruppen auch in Anwesenheit von Reduktionsmitteln bei 20°C bis 150°C in Zeiten von 1 Stunde bis 10 Stunden umgesetzt. Als Sulfonsäureester werden dabei Alkyl- oder substituierte Alkyl-, Aryl- oder Hetaryl-, substituierte Aryl- oder Hetaryl-, kondensierte und/oder substituierte Aryl- oder Hetarylsulfonsäureester eingesetzt. Geeignete, bifunktionelle, organische Verbindungen für die Umsetzungen mit den aktivierten Derivaten der wasserlöslichen Polymeren sind zum Beispiel Cysteamin oder Cystein beziehungsweise Aminothiophenole oder Nitrothiophenole. Die Reaktionstemperaturen liegen bei den nukleophilen Substitutionsreaktionen zwischen 20°C und 150°C, und als organische Lösungsmittel – auch in Gemischen mit wässrigen Lösungen – werden vorzugsweise Alkohole, Ketone, cyclische Ether wie Tetrahydrofuran beziehungsweise Dioxan oder aprotische Lösungsmittel wie Acetonitril, Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid, in manchen Fällen aber auch in Wasser nicht lösliche oder mischbare, organische Lösungsmittel wie Chloroform, Methylenchlorid, Benzen oder Toluol verwendet.

Die Nitrogruppen in mit Nitrothiophenolen modifizierten, wasserlöslichen Polymeren werden nach den Substitutionsreaktionen noch reduziert, um wasserlösliche Polymere mit primären, aromatischen Aminogruppen zu erhalten. Die Reduktion der Nitrogruppen erfolgt mit Vorteil gleichzeitig mit der Substitutionsreaktion, wenn Natriumdithionit unter alkalischen Bedingungen als Reduktionsmittel eingesetzt wird. Eine Reduktion dieser aromatischen Nitrogruppen enthaltenden Polymeren unter sauren Bedingungen ist auch möglich, zum Beispiel mit Zinn(II)-chlorid in konzentrierter Salzsäure. Die Polymeren werden dabei aber zunächst isoliert und danach reduziert. Die salzsauren Reduktionslösungen werden nach der Reduktion alkalisiert, filtriert und wie unten beschrieben aufgearbeitet.

Unter den gewählten Reaktionsbedingungen verlaufen die Reaktionen wegen der höheren Nukleophilie des Mercaptidschwefels gegenüber dem Stickstoff in den primären Aminogruppen und den Nitrogruppen in den bifunktionellen, organischen Verbindungen eindeutig unter Ausbildung von Thioethern wasserlöslicher Polymere, die zusätzlich noch ausschließlich freie, primäre Aminogruppen als reaktive funktionelle Gruppen enthalten.

Zur Isolierung der mit primären Aminogruppen modifizierten, wasserlöslichen Polymeren werden die Reaktionslösungen zunächst mit einer ausreichenden Menge destilliertem Wasser versetzt und dann entweder durch Dialyse gegen destilliertes Wasser, sich anschließender Ultrafiltration und Lyophilisierung oder durch Extraktion mit in Wasser nicht löslichen oder mischbaren, organischen Lösungsmitteln wie Chloroform, Methylenchlorid, Benzen oder Toluol und nachfolgendem Verdampfen des Lösungsmittels in fester Form erhalten. Auch eine Verringerung des Lösungsmittelvolumens und Versetzen des Restes mit Ether oder Petrolether zur Ausfällung ist eine geeignete Methode zur Isolierung der aminogruppenhaltigen Polymeren. Die erfindungsgemäße Einführung von primären Aminogruppen in wasserlösliche Polymere ist einfach durchführbar und führt zu weiter modifizierbaren, reaktiven Polymeren, die für die Immobilisierung biologisch aktiver Verbindungen eingesetzt werden können.

Die Erfindung wird durch Beispiele weiter erläutert.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

1 g Dextransulfat (MG 500000) wird in 15 ml destilliertem Wasser gelöst. Zu dieser Lösung werden 10 ml einer alkoholischen Lösung addiert, die 0,5 g aufgelöstes Natriumsalz des Cysteamins enthält. Das Reaktionsgemisch wird 10 Stunden bei 80°C gerührt. Das Volumen der dialysierten Lösung wird auf 5 ml eingeeengt, und daraus wird das aminogruppenhaltige Polymere durch Lyophilisierung gewonnen. Der Test mit Trinitrobenzensulfonsäure auf primäre Aminogruppen ist positiv. Ausbeute: 0,75 g

Beispiel 2

1 g Tosylester des Polyvinylalkohols wird in einem Gemisch aus 10 ml destilliertem Wasser und 15 ml frisch destilliertem Dimethylsulfoxid gelöst. Zu dieser Lösung werden 10 ml Dimethylsulfoxid zugegeben, in dem 0,8 g Natriumsalz des Cysteins aufgelöst waren. Das Reaktionsgemisch wird 6 Stunden bei 60°C gerührt und nach dem Abkühlen gegen destilliertes Wasser dialysiert. Nach dem Einengen der dialysierten Lösung auf etwa 5 ml wird das aminogruppenhaltige Polymere durch Lyophilisierung gewonnen. Der Test mit Trinitrobenzensulfonsäure auf primäre Aminogruppen ist positiv. Ausbeute: 0,6 g

Beispiel 3

3 g Schwefelsäureester des Polyethylenglykols (MG 6000) werden in 20 ml frisch destilliertem Acetonitril gelöst. Zu dieser Lösung wird 1 g Natriumsalz des p-Nitrothiophenols addiert, das in 10 ml absolutem Alkohol gelöst war. Das Reaktionsgemisch wird 4 Stunden am Rückfluß erhitzt, und danach wird bei dieser Reaktionstemperatur eine Lösung zum Reaktionsgemisch zugegeben, die aus 10 ml destilliertem Wasser, 1 ml konzentriertem Ammoniak und 1 g Natriumdithionit hergestellt wurde. Nach weiterem, zweistündigem Erhitzen am Rückfluß wird die Lösung mit 50 ml destilliertem Wasser verdünnt und dreimal mit jeweils 15 ml Chloroform extrahiert. Die Chloroformlösung wird mit Natriumsulfat getrocknet, eingeengt auf etwa 5 ml und mit 50 ml Petrolether versetzt. Beim Aufbewahren der Lösung bei 4°C fällt das aminogruppenhaltige Polymere aus. Es wird abfiltriert und bei Zimmertemperatur getrocknet. Der Test mit Trinitrobenzensulfonsäure auf primäre Aminogruppen ist positiv. Ausbeute: 2,85 g

Beispiel 4

3g Tosylester des Polyethylenglykols (MG 6000) werden in 50ml Toluol gelöst und 1g Natriumsalz des p-Aminothiophenols in 20ml absolutem Äthanol. Beide Lösungen werden vereinigt, und bei 80°C wird das Reaktionsgemisch 5 Stunden gerührt. Nach dem Abkühlen der Lösung werden 50ml destilliertes Wasser zum Toluol addiert. Das Lösungsmittelgemisch wird noch mit 10ml 1 normale Natronlauge versetzt und gut durchgeschüttelt. Dieser Vorgang wird noch zweimal wiederholt, aber nur mit destilliertem Wasser. Die organische Phase wird gesammelt, mit Natriumsulfat getrocknet und auf etwa 5ml eingeeengt. Nach Zugabe von 50ml Petrolether fällt das aminogruppenhaltige Polymere aus. Es wird abfiltriert und bei Zimmertemperatur getrocknet. Der Test mit Trinitrobenzensulfonsäure auf primäre Aminogruppen ist positiv.
Ausbeute: 2,2g