



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: C 08 F 8/00
G 01 N 33/54
C 08 G 81/02
C 08 H 1/00



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

636 628

⑮① Gesuchsnummer: 14536/76

⑮② Anmeldungsdatum: 18.11.1976

⑮③ Priorität(en): 22.11.1975 DE 2552510

⑮④ Patent erteilt: 15.06.1983

⑮⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 15.06.1983

⑮⑦ Inhaber:
Behringwerke Aktiengesellschaft, Marburg/Lahn
(DE)

⑮⑧ Erfinder:
Dr. Heinrich Huemer, Schwalbach/Taunus (DE)
Rudolf Schmidtberger, Marburg/Lahn (DE)
Dr. Tibor Toth, Marburg/Lahn (DE)

⑮⑨ Vertreter:
Brühwiler & Co., Zürich

⑮④ Verfahren zur Herstellung biologisch aktiver Verbindungen und deren Verwendung.

⑮⑦ Eine Verbindung aus einem Copolymeren des Vinylenglykols und einer daran chemisch gebundenen biologisch aktiven Substanz wird hergestellt, indem man ein Copolymeres des Vinylencarbonats mit einer biologisch aktiven Substanz umsetzt. Die Cyclocarbonatgruppen werden vor oder nach der Umsetzung in Hydroxygruppen übergeführt.

Die neuen Verbindungen werden zur Affinitätschromatographie, zur Durchführung von Immunreaktionen oder zur Durchführung von Enzymreaktionen verwendet.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung aus einem Copolymeren des Vinylenglykols und einer daran chemisch gebundenen biologisch aktiven Substanz, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Copolymeres des Vinylencarbonats mit einer biologisch aktiven Substanz umsetzt und danach die noch vorhandenen Cyclocarbonatgruppen in Hydroxygruppen überführt.

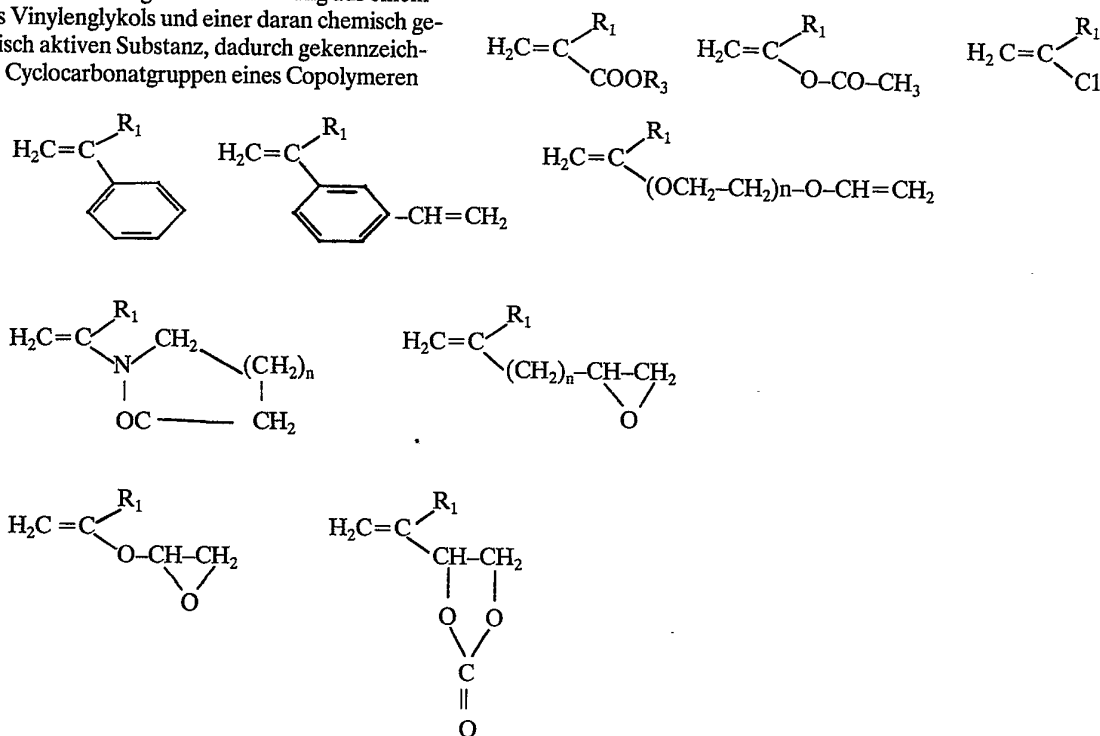
2. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung aus einem Copolymeren des Vinylenglykols und einer daran chemisch gebundenen biologisch aktiven Substanz, dadurch gekennzeichnet, dass man die Cyclocarbonatgruppen eines Copolymeren des Vinylencarbonats in Hydroxygruppen überführt und elektrophile Gruppen im Copolymerisat mit einer biologisch aktiven Substanz umsetzt.

3. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung aus einem Copolymeren des Vinylenglykols und einer daran chemisch gebundenen biologisch aktiven Substanz, dadurch gekennzeichnet, dass man die Cyclocarbonatgruppen eines Copolymeren

des Vinylencarbonats in Hydroxygruppen überführt und das Copolymere zuerst mit einer elektrophilen Gruppen enthaltenen Verbindung und dann mit einer biologisch aktiven Substanz umsetzt.

4. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung aus einem Copolymeren des Vinylenglykols und einer daran chemisch gebundenen biologisch aktiven Substanz, dadurch gekennzeichnet, dass man die Cyclocarbonatgruppen eines Copolymeren des Vinylencarbonats in Hydroxygruppen überführt und das Copolymere mit einer elektrophilen Gruppen tragenden biologisch aktiven Substanz umsetzt.

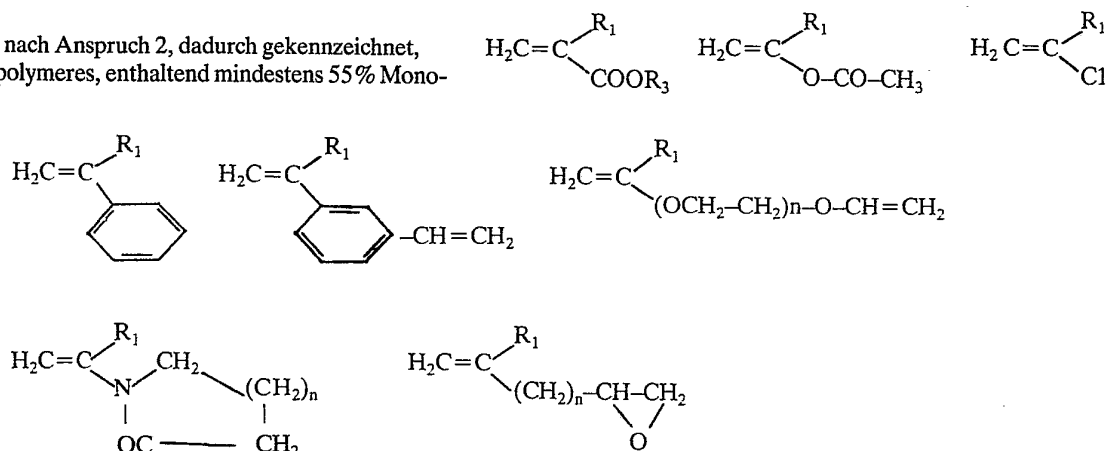
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Copolymeres, enthaltend mindestens 55% Monomereinheiten des Vinylenglykols und höchstens 45% Monomereinheiten, mindestens einer Verbindung der Formeln

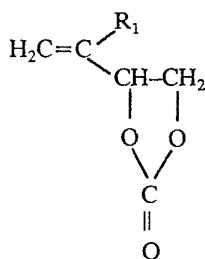
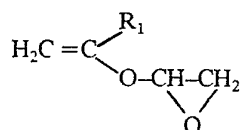


in denen R_1 Wasserstoff, Methyl, Äthyl, R_3 Methyl, Äthyl, Propyl und n eine ganze Zahl zwischen 1 und 4 bedeuten, verwendet.

6. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Copolymeres, enthaltend mindestens 55% Mono-

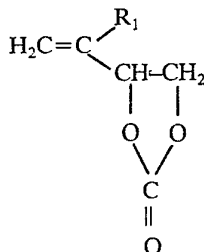
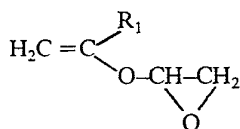
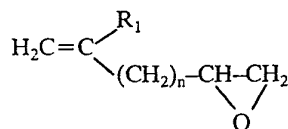
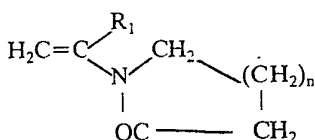
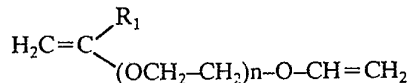
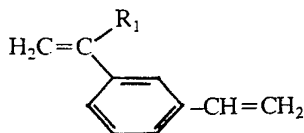
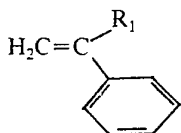
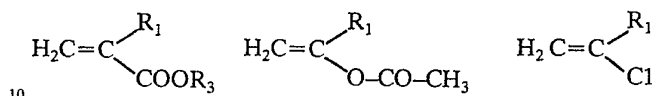
merleinheiten des Vinylenglykols und höchstens 45% Monomereinheiten, mindestens einer Verbindung der Formeln





in denen R_1 Wasserstoff, Methyl, Äthyl, R_3 Methyl, Äthyl, Propyl und n eine Zahl zwischen 1 und 4 bedeuten, verwendet.

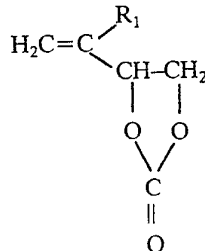
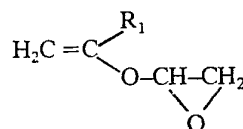
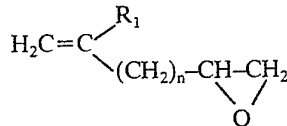
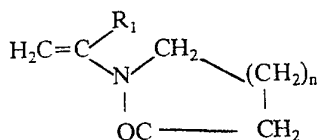
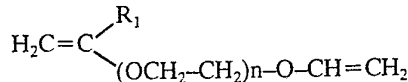
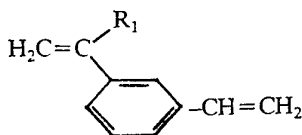
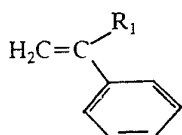
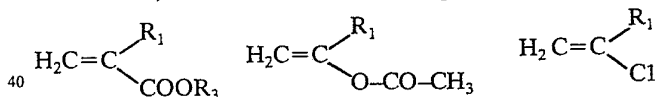
7. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Copolymeres, enthaltend mindestens 55 % Monomereinheiten des Vinylenglykols und höchstens 45 % Monomereinheiten, mindestens einer Verbindung der Formeln



in denen R_1 Wasserstoff, Methyl, Äthyl, R_3 Methyl, Äthyl, Propyl und n eine ganze Zahl zwischen 1 und 4 bedeuten, verwendet.

8. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Copolymeres, enthaltend mindestens 55 % Mono-

mereinheiten des Vinylenglykols und höchstens 45 % Monomereinheiten, mindestens einer Verbindung der Formeln



in denen R_1 Wasserstoff, Methyl, Äthyl, R_3 Methyl, Äthyl, Propyl und n eine ganze Zahl zwischen 1 und 4 bedeuten, verwendet.

9. Mittel, enthaltend eine Verbindung aus einem Copolymeren des Vinylenglykols und einer daran chemisch gebundenen, biologisch aktiven Substanz als aktive Komponente.

10. Verfahren einer Verbindung aus einem Copolymeren des Vinylenglykols und einer daran chemisch gebundenen, biologisch aktiven Substanz zur Durchführung von Immunreaktionen in vitro.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung neuer Verbindungen von biologisch aktiven Substanzen und wasserunlöslichen hochmolekularen Verbindungen, ihre Verwendung zur Durchführung von Immunreaktionen in vitro und Mittel, die diese Verbindungen enthalten.

In den letzten Jahren hat sich eine neue Technik innerhalb der biochemischen Arbeitsmethoden mehr und mehr durchgesetzt, deren primäres Merkmal darin besteht, die Affinität von trägergebundenen, biologisch aktiven Substanzen zu selektiv durchzuführenden Reaktionen einzusetzen.

Über eine spezifische Komplexbildung der trägergebundenen Substanz mit einer zweiten, die in einem Gemisch vorliegt, kann die betreffende Substanz aus dem Gemisch entfernt und gewünschtenfalls anschliessend durch Desorption isoliert werden.

Trägergebundene Enzyme bieten den Vorteil, Stoffumwandlungen in präparativen, kontinuierlichen Prozessen durchzuführen und die Reaktionsprodukte enzymfrei zu erhalten.

In der biochemischen, enzymatischen Analytik stehen trägergebundene wasserunlösliche Enzyme als mehrfach verwendbare Reagenzien zur Verfügung.

Aufgrund der Eigenschaft der Enzyme, Affinitäten nicht nur gegenüber den Substraten, sondern auch gegenüber den spezifischen Inhibitoren aufzuweisen, hat sich die Gewinnung von Enzyminhibitoren mit Hilfe der Affinitätschromatographie an trägergebundenen Enzymen besonders günstig erwiesen. Andererseits erlaubt die Bindung von Inhibitoren an wasserunlösliche Matrizen die präparative Gewinnung der entsprechenden Enzyme.

Als sogenannte Immunadsorbentien werden Antigene oder Antikörper an wasserunlösliche Matrizen gebunden und erlauben danach die Isolierung der korrespondierenden Antikörper bzw. Antigene.

Als biologisch aktive Substanzen werden entsprechend den vorhergehenden Ausführungen in vivo und in vitro wirksame natürliche und künstlich hergestellte Stoffe verstanden, die im weitesten Sinne als Enzyme, Aktivatoren, Inhibitoren, Antigene oder Antikörper, Vitamine und Hormone bezeichnet werden können. Für diese biologisch aktiven Substanzen hat sich, da sie die Wirkprinzipien der wasserunlöslichen Systeme darstellen, die Bezeichnung Effektoren eingeführt.

Die meisten der bisher beschriebenen trägergebundenen Effektoren sind wesentlich stabiler als die entsprechenden biologisch aktiven Substanzen in Lösung.

Als Trägermaterialien, sogenannte Matrizen, sind vorteilhaft solche Stoffe einzusetzen, die neben der Unlöslichkeit in wässrigen Systemen eine möglichst niedrige unspezifische Adsorption aufweisen. Dazu müssen hydrophobe, hydrophile und ionische Wechselwirkungen zwischen Matrice und dem Reaktionspartner des Effektors weitgehend unterbunden werden. Mit Substanzen, deren Bindung an den Effektor unerwünscht ist, z.B. solchen, die keine spezifischen Reaktionspartner des Effektors sind, sollte eine Bindung ausgeschlossen sein.

Die bislang verwendeten Matrizen als Träger für biologisch aktive Substanzen können unterteilt werden in diejenigen, die die Effektoren durch physikalische Adsorption binden, dazu gehören beispielsweise Polystyrol, Aktivkohle und Glasperlen und diejenigen, die mit dem Effektoren über eine kovalente Bindung miteinander verknüpft sind. Die letztgenannten schliessen Vinylpolymere als Homo- und Copolymerisate, z.B. Polyacrylsäuren, Polyacrylsäureamide und Amino-, Carboxy- oder Sulfo-

nylsubstituiertes Polystyrol, ferner die Zellulose und ihre Abkömmlinge und schliesslich natürliche und synthetische Polypeptide und Proteine ein. Wegen der ausgeglichenen Wechselwirkung zwischen Matrice und Effektor hat die Verwendung von Kohlehydraten, insbesondere der Zellulose, des Dextrans, der Stärke, des Agars bzw. deren Abkömmlingen, als Matrice in wässrigen Systemen die höchste Verbreitung gefunden, wenn auch die in diesen Naturstoffen häufig enthaltenen Carboxylgruppen wegen ihren unspezifischen Affinitäten als störend empfunden werden. Daneben weisen diese Stoffe eine relativ geringe thermische und chemische Stabilität auf.

Viele dieser Nachteile konnten durch Verwendung von Polyvinylenglykol, einem synthetischen Polymeren, als Matrice weitgehend beseitigt werden. Polyvinylenglykol, auch Polyhydroximethylen genannt, wird durch saure oder basische Hydrolyse aus Polyvinylencarbonat hergestellt. Jedes Kohlenstoffatom trägt eine Hydroxylgruppe und ein Wasserstoffatom. Die durchgehende $-C-C-$ -Bindung verleiht dem Träger eine besondere hohe Stabilität.

Es wurde nun gefunden, dass man statt Polyvinylenglykol vorteilhaft Vinylenglykol-Copolymeren als Trägermatrix verwenden kann. Durch Einpolymerisieren von geeigneten Comonomeren in Polyvinylencarbonat können die physikalischen und chemischen Eigenschaften des daraus hergestellten Polyvinylenglykols weitgehend variiert werden.

So kann z.B. die «Hydrophilie» bzw. «Quellung» des Polyvinylenglykols durch Einpolymerisieren von hydrophoben Monomeren, wie Äthylen, Vinylchlorid oder Styrol in das Polyvinylencarbonat verändert werden. Durch die Copolymerisation von Vinylacetat wird im verseiften Endprodukt eine Vinylenglykolgruppe durch eine Vinylalkoholgruppe ersetzt, was eine erhöhte Quellbarkeit in wässrigem Medium zur Folge hat.

Es ist möglich, mit Hilfe von Comonomeren, wie z.B. Diäthylenglykoldivinyläther und Divinylbenzol eine Vernetzung und damit eine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften des Trägers zu erhalten. Durch Einpolymerisieren von elektrophilen Funktionen, z.B. Oxirangruppen (Epoxigruppen) aus Vinylglycidyläther-Comonomeren, ist eine direkte Umsetzung der Matrix mit nucleophilen Funktionen ($-NH_2$, $-OH$ usw.) möglich. Carboxylgruppen können durch Acrylsäureester-Comonomere eingeführt werden. Nach erfolgter Copolymerisation werden die Estergruppen zu Carboxylgruppen verseift. Die Einführung von $-NH_2$ - oder $-COOH$ -Gruppen erlaubt die Aktivierung mit Hilfe von Carbodimiden, Isoxazoliumsalzen, Glutaraldehyd usw. Copolymerisate-Vinylenglykol/Vinylalkohol haben eine höhere spezifische Oberfläche und damit eine höhere Bindungskapazität für z.B. Proteine an der Oberfläche des Polymerpulvers im Vergleich zu Vinylenglykol-Homopolymerisat.

Gegenstand der Erfindung sind demnach Verfahren zur Herstellung von biologisch aktiven, Verbindungen aus einem vorzugsweise wasserunlöslichen Copolymerisat des Polyvinylenglykols und einer daran chemisch unter Erhaltung ihrer biologischen Aktivität gebundenen biologisch aktiven Substanz. In diesen Verbindungen ist die Trägermatrix ein Polyvinylenglykol-Copolymerisat enthaltend bevorzugt bis zu 45 %, vorzugsweise 5–20 %, eines Comonomeren. Die biologisch aktiven Substanzen sind Stoffe wie z.B. Enzyme, Aktivatoren, Inhibitoren, Antigene oder Antikörper, andere Plasmaproteine, Blutgruppensubstanzen, Phytämagglutinine, Antibiotika, Vitamine oder Hormone, Peptide oder Aminosäuren oder synthetisch hergestellte Effektoren.

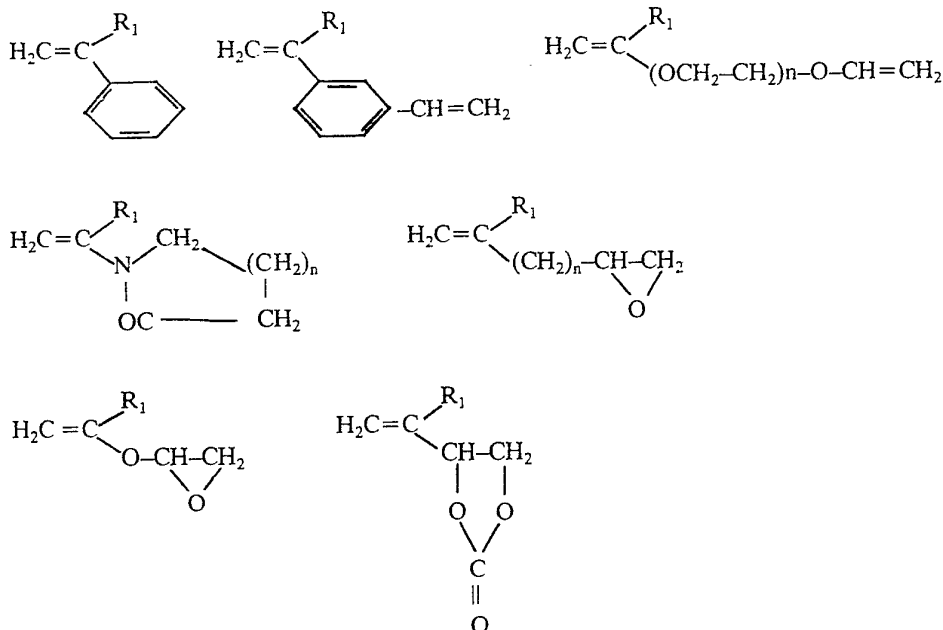
Der polymere Träger und die biologisch aktive Substanz sind im allgemeinen entweder direkt oder über eine Seitenkette (Spacer) kovalent miteinander verknüpft.

Die biologisch aktiven Verbindungen über eine Seitenkette (Spacer) zu binden ist von Vorteil, wenn die Molekulargewichte ihrer affinen Partner sehr unterschiedliche sind, oder wenn bei der Verwendung in einem biospezifischen Prozess sehr hochmo-

lekulare oder aus mehreren Untereinheiten aufgebaute Proteine teilnehmen. Spacer sind an der polymeren Matrix verankerte Seitenketten bestimmter Länge, die durch Einpolymerisieren, durch An- oder Einbau (Bindung von bi- oder polyfunktionellen Verbindungen – z.B. einem Tripeptid – an die Matrix) oder durch Einbau von funktionellen Gruppen und schrittweise Verlängerung an diesen erhalten werden können.

Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur kovalenten Verbindung der biologisch aktiven Substanzen mit dem Träger.

Hierzu steht eine Reihe von allgemein bekannten Reaktionen zur Verfügung.



in denen R_1 Wasserstoff, Methyl, Äthyl, R_3 Methyl, Äthyl, Propyl und n eine ganze Zahl zwischen 1 und 4 bedeuten, polymerisiert wird.

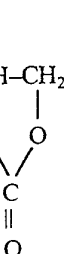
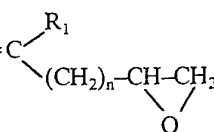
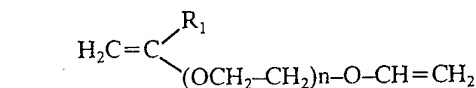
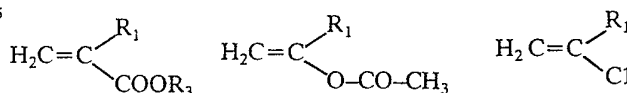
Die Polymerisation des Polyvinylencarbonats erfolgt bevorzugt mit bis zu 45% Comonomeren, besonders bevorzugt mit 5 bis 20%.

Die Herstellung der biologisch aktiven Verbindung ist beispielsweise dadurch möglich, dass eine elektrophile Gruppe entweder in die biologisch aktive Substanz oder in das Polyvinylenglykopolcopolymer eingeführt wird und über diese die biologisch aktive Substanz mit den Polyvinylenglykopolcopolymeren umgesetzt wird.

Die Einführung der elektrophilen Gruppen in die Trägermatrix erfolgt im allgemeinen entweder durch Copolymerisieren von Vinylencarbonat mit elektrophile Gruppen enthaltenden Comonomeren oder durch Umsetzung der Trägermatrix mit aktivierenden, elektrophile Gruppen tragenden niedermolekularen Verbindungen.

Allgemein ist die chemische Kupplung eines Reaktionspartners an die Trägermatrix einfach, wenn auf der einen Seite nucleophile und auf der anderen elektrophile Funktionen vorhanden sind. Als reaktive nucleophile Funktionen kommen vor allem Amino-Sulphydryl- und Hydroxylgruppen in Betracht, die gewöhnlich entweder in der Matrix oder im Reaktionspartner bereits enthalten sind. Elektrophile Funktionen müssen erst eingeführt werden. Dazu können Carboxalgruppen in Säurehalogenide, Säureazide, Säureanhydride, Imidazole übergeführt oder direkt mit Carbodiimiden aktiviert werden. Als reaktive elektrophile Gruppen werden auch Isocyanat-, Isothiocyanat-, Diazonium-Gruppen oder cyclische Imidocarbonatester benutzt. Besonders günstig ist die Einführung reaktiver Gruppen mit Hilfe der Copolymerisation.

Sie betreffen zunächst die Verfahren zur Herstellung des Polyvinylenglykol-Copolymeren. Sie sind z.B. dadurch gekennzeichnet, dass Vinylencarbonat mit Comonomeren der Formeln:



Durch Einpolymerisieren von Monomeren mit Epoxy-Gruppen, z.B. mit Epoxyalkylvinyläthern in das Polyvinylencarbonat und durch die sehr grossen Unterschiede in der Verseifungsgeschwindigkeit zwischen cyclischen Carbonat- und Epoxy-Gruppen, erhält man leicht eine Polyvinylenglykol-Matrix mit reaktiven Epoxy-Gruppen, die mit nucleophilen Funktionen umgesetzt werden können. So ist die direkte Bindung einer biologisch aktiven Substanz und/oder die Einführung (Verlängerung) einer Seitenkette (Spacer) möglich.

Ein weiterer Vorteil ist demnach bei der Verwendung von Copolymeren auch die Möglichkeit der direkten Einführung (Einpolymerisieren) von elektrophilen Funktionen, die eine Umsetzung nach bekannten Methoden erlauben.

Durch Copolymerisieren von Vinylencarbonat mit Äthylacrylat und nachfolgender Verseifung der Polymeren erhält man eine Matrix mit -OH- und -COOH-Funktionen. Die Carboxylgruppen können mit Hilfe von Carbodiimiden aktiviert werden und sodann eine Amidbindung mit Aminogruppen des Effektors eingehen. Carboxylgruppen lassen ferner die Ausbildung von Amidbindungen mit Hilfe der von Woodward eingeführten Isoxazoliumsalze zu.

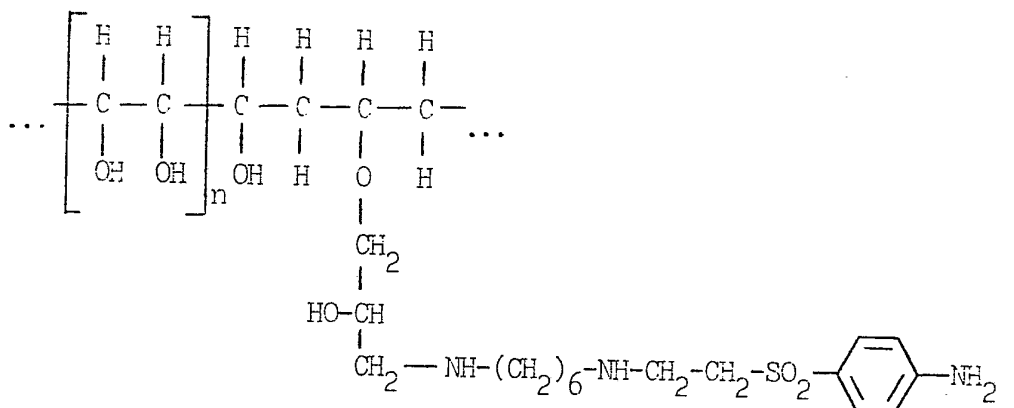
Eine weitere Methode zur Kupplung von biologisch aktiven Verbindungen an Carboxylgruppen-haltigen Polymeren wird mit Hilfe von N-Äthoxycarbonyl-2-äthoxy 1,2-Dihydrochinolin (EEDQ) ausgeführt.

Die Carboxylgruppen können nach bekannten Methoden verestert, danach der Ester in das Hydrazid überführt und schliesslich das in der Folge resultierende Azid mit der Aminogruppe des Effektorproteins mit der Polyvinylenglykol-Matrix verknüpft werden.

Besitzt das in die Matrix einpolymerisierte Comonomere durch nachfolgende Umsetzungen frei verfügbare Aminogruppen, so ist mit Arylaminogruppen enthaltenden Vinylsulfonde-

privaten oder Schwefelsäureestern von β -Hydroxyäthylsulfonen die Einführung von Arylaminogruppen möglich, wobei die Arylaminogruppen sodann nach bekannten Methoden diazo-

tiert und anschliessend mit entsprechend reaktiven Gruppen eines Effektors verbunden werden können, z.B.



Auf diese Weise kann auch eine «Verlängerung» eines Spacers vorgenommen werden.

Ein anderer Weg zur Bindung von Proteinen über die Aminogruppen erfolgt mit Hilfe von Glutardialdehyd.

Einfach ist die Verknüpfung des Effektors an die Matrix nach einer Aktivierung der Hydroxyl- oder Aminogruppen des Polyvinylenglykol-Copolymeren mittels Cyanhalogeniden, vorteilhaft mit Bromcyan und einer nachfolgenden Umsetzung der Aminogruppen enthaltenden biologisch aktiven Effektoren über diese aktivierten Gruppen.

Eine weitere Möglichkeit zur Verknüpfung des Effektors mit einer Polyvinylenglykol- oder Polyvinylenglykol-Copolymerisat-Matrix besteht in der Acylierung der Hydroxylgruppen mit Bromacetyl bromid, gefolgt von der Alkylierung der Aminogruppe des Effektors.

Ähnliche Reaktionsverläufe sind beispielsweise durch Umsetzung der Hydroxylgruppen des Trägers mit reaktiven Triazinen zu erreichen, wobei ein Teil der reaktiven Gruppen des Triazins mit der Polyvinylenglykol-Verbindung, ein anderer mit Aminogruppen des Effektors in Reaktion tritt.

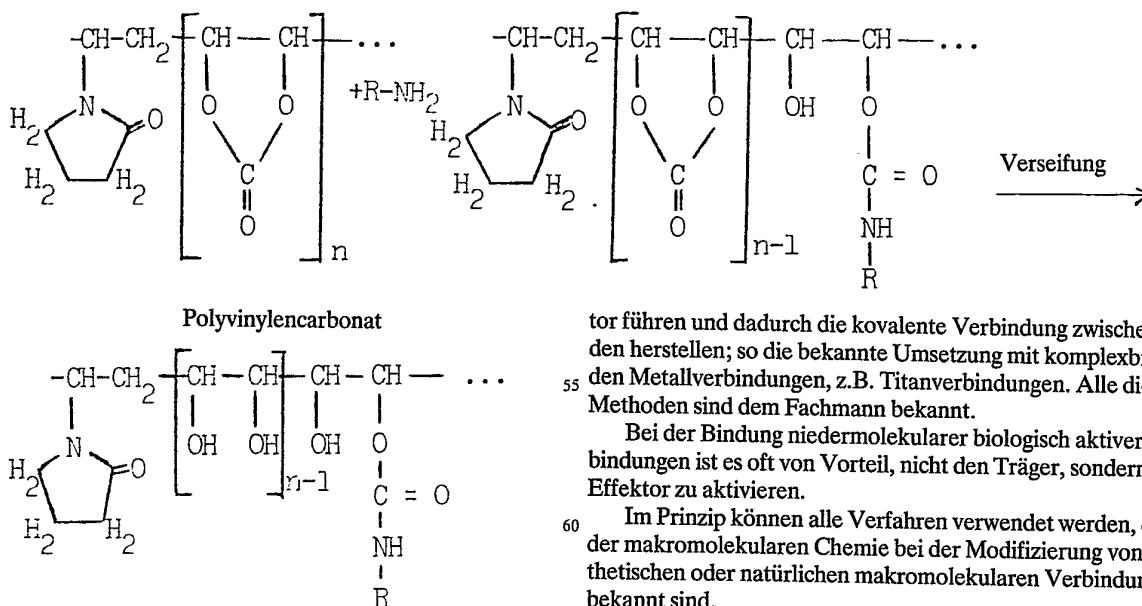
Diazotierbare aromatische Amine, die über eine weitere reaktive Gruppe mit den Hydroxylgruppen des Trägers einerseits

in Verbindung treten können, erlauben auf der anderen Seite die Kupplung mit dazu befähigten, aktivierten Aminosäuren, beispielsweise den Tyrosin- oder Histidinresten des Proteineffektors.

Arylaminogruppen enthaltende Vinylsulfonderivate und Schwefelsäurehalbesten von β -Hydroxyäthylsulfonen können mit den Hydroxylgruppen des Trägers zur Reaktion gebracht werden. Sie ermöglichen die Bindung des Effektors nach der vorgeschriebenen Diazotierungsreaktion.

Besonders stabile Ätherbindungen entstehen bei der Umsetzung der Hydroxylgruppen des Polyvinylenglykol-Copolymerisats mit nicht ionenbildenden Epoxiden, die mindestens 2 reaktive Gruppen enthalten, wie die Epichlorhydrine oder die Polyepoxide, beispielsweise Epichlorhydrin oder Bisepoxide.

Eine weitere Art der Modifizierung ist die Einpolymerisation von Comonomeren in die Polyvinylencarbonat-Kette (wie z.B. von Vinylpyrrolidon) mit anschliessender partieller Umsetzung der Zyklocarbonatringe des Polyvinylencarbonats mit einem Amin, z.B. mit Hexamethyldiamin, zu einem über eine Urethanbindung mit einem Spacer oder Effektor substituierten Polyvinylencarbonat-Copolymerisat. Die restlichen Zyklocarbonatgruppen werden dann zu Hydroxylgruppen verseift:



Neben den hier beispielhaft angeführten Verfahren zur Herstellung der kovalenten Verbindung zwischen der Trägermatrix und dem Proteineffektor oder anderen Effektoren, existieren noch weitere Methoden, die zur Reaktion der Hydroxylgruppen oder bestimmten Gruppen des Copolymeren mit einem Effek-

tor führen und dadurch die kovalente Verbindung zwischen beiden herstellen; so die bekannte Umsetzung mit komplexbildenden Metallverbindungen, z.B. Titanverbindungen. Alle diese Methoden sind dem Fachmann bekannt.

Bei der Bindung niedermolekularer biologisch aktiver Verbindungen ist es oft von Vorteil, nicht den Träger, sondern den Effektor zu aktivieren.

Im Prinzip können alle Verfahren verwendet werden, die in der makromolekularen Chemie bei der Modifizierung von synthetischen oder natürlichen makromolekularen Verbindungen bekannt sind.

Die Polyvinylenglykol-Copolymerisate zeichnen sich neben der chemischen und thermischen Stabilität durch vorteilhafte verarbeitungstechnische Eigenschaften aus und führen damit zu einer Überlegenheit gegenüber den bisher als optimal gefundenen Trägermatrizen auf der Basis von natürlichen Kohlenhydra-

ten. Sie sind z.B. in Form von Fasern, Fäden, Folien oder sphärischen Partikeln herstellbar, so dass je nach dem Anwendungszweck des daran zu bindenden Effektors die geeignetste Form gewählt werden kann. Vorzugsweise werden diese Copolymerisate in Form von feinteiligen Pulvern mit hoher spezifischer Oberfläche angewendet.

Durch die produktionstechnisch lenkbare Grösse der für die Bindung der Effektoren bzw. der Spacer zugänglichen Oberfläche zeigt sich ein weiterer Vorzug der Polyvinylenglykol-Copolymerisate gegenüber den bekannten Trägermaterialien.

Die neuen biologisch aktiven Verbindungen eignen sich für die meisten Anwendungsverfahren, die bisher für andere an hydrophile, wasserunlösliche Träger gebundene Effektoren bekannt geworden sind. Es können demnach Enzyme wasserunlöslich gemacht werden. Die unlöslichen Enzyme werden zunehmend zur Bestimmung von Substraten in Analysenautomaten und als sogenannte Enzymelektroden verwendet. Wegen der erhöhten Stabilität eignet sich eine Reihe trägergebundener Enzyme für die Durchführung technisch enzymatischer Umsetzungen.

Trägergebundene, biologisch aktive Substanzen haben wegen ihrer Eigenschaft als spezifische Adsorbentien eine breite Anwendung in der Affinitätschromatographie gefunden. Mit Hilfe von trägergebundenen natürlichen oder synthetischen Enzyminhibitoren gelingt die Hochreinigung von Enzymen, während die Enzyme als Effektoren insbesondere zur Gewinnung natürlicher Enzyminhibitoren aus Rohextrakten hervorragend geeignet gefunden wurden. Trägergebundene wasserunlösliche Antigene können zur Isolierung der zugehörigen Antikörper verwendet werden, die auf diese Weise frei von anderen Serumbestandteilen und frei von anderen Antigenen erhalten werden. Affinitätschromatographisch können auch nicht präzipitierbare Antikörper sowie solche, die wegen ihrer geringen Konzentration im Serum nicht fällbar sind, isoliert und auch quantitativ bestimmt werden.

Beispiele

Herstellung der Vinylencarbonat-Copolymeren

Das bei der Herstellung der Copolymeren (CP) eingesetzte Vinylencarbonat wurde vor dem Einsatz eine Stunde über Natriumborhydrid (100 Gewichtsteile Vinylencarbonat auf 2 Gewichtsteile NaBH_4) bei einem Druck von 33 mm am Rückfluss gekocht, dann bei 75°/33 mm über eine 50 cm lange, mit Raschig-Glasringen gefüllte Silbermantel-Kolonne destilliert und möglichst umgehend für die Copolymerisation eingesetzt. Ebenso wurden die eingesetzten Comonomeren zuvor noch durch Destillation gereinigt.

1. Copolymerisat-Vinylenglykol/Vinylalkohol aus verseiftem Copolymerisat-Vinylencarbonat/Vinylacetat

a) In 9 Gewichtsteilen Vinylencarbonat und 1 Gewichtsteil Vinylacetat werden 0,05 Gewichtsteile Azobisisobutyronitril unter Stickstoff gelöst. Das Monomergemisch wird unter Stickstoff in eine flachgedrückte (4 mm dicke, 60 mm breite, 150 mm lange) Aluminiumtube mit Schraubverschluss eingefüllt (Gesamtfüllvolumen etwa 35 ml), unter N_2 verschlossen und 48 h in ein 50° warmes Wasserbad eingehängt. Es werden harte, spröde Kunststoffplatten erhalten, die in einer Schlagmühle vorzerkleinert werden. Anschliessend wird das Granulat bei 1–2 mm Druck 5 h lang auf 120° erwärmt, um das nicht polymerisierte Rest-Monomere abzutrennen.

Das entmonomerisierte Granulat wird in einer Mühle weiter auf eine Korngrösse <0,1 mm gemahlen, in 500 Gewichtsteilen 0,5 N Natronlauge eingetragen, bei 20° mit einem schnell-laufenden Rührer eine Stunde lang gemischt, wobei die Carbonat- und Acetyl-Gruppen verseift werden. Das wasserunlösliche CP-Vinylenglykol/Vinylalkohol wird abgesaugt, gut mit Wasser von anorganischen Salzen freigewaschen und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 4,7 Gewichtsteile CP-Vinylenglykol/Vinylalkohol mit einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von $34 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

b) Wie unter 1. a) beschrieben, nur dass auf 7 Gewichtsteile Vinylencarbonat 3 Gewichtsteile Vinylacetat eingesetzt werden.

Ausbeute: 4,1 Gewichtsteile CP-Vinylenglykol/Vinylalkohol mit einer spezifischen Oberfläche des gefriergetrockneten Polymerpulvers von $62,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

c) Vergleichsversuch wie unter 1. a) beschrieben, nur dass 10 Gewichtsteile Vinylencarbonat und kein Comonomer eingesetzt werden.

Ausbeute: 4,7 Gewichtsteile Homopolymerisat-Vinylenglykol mit einer spezifischen Oberfläche des gefriergetrockneten Polymerpulvers von $20,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

2. Copolymerisat-Vinylenglykol/Vinylglycidyläther

Ein Gemisch von 7 Gewichtsteilen Vinylencarbonat, 3 Gewichtsteilen Vinylglycidyläther und 0,1 Gewichtsteil Azobisisobutyronitril wird wie unter 1.) a) beschrieben in flachen Aluminiumtuben unter N_2 3 Tage auf 50 °C erwärmt. Die erhaltenen Kunststoffplatten werden wie unter 1.) a) beschrieben zerkleinert, entmonomerisiert, auf eine Korngrösse <0,1 mm gemahlen, in 500 Gewichtsteilen eiskalter, 0,5 n NaOH mit einem schnell-laufenden Rührer 30 Minuten suspendiert, anschliessend das verseifte Polymere sofort abzentrifugiert, in Eiswasser aufgeschlämmt, unter Eiskühlung mit 2n H_2SO_4 auf pH 7 neutralisiert, abgesaugt, mit Eiswasser ausgewaschen und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 3,9 Gewichtsteile CP-Vinylenglykol/Vinylglycidyläther enthaltend 1,3 Milliäquivalente Oxirangruppen/g (bestimmt nach: «Praktikum der makromolekularen organischen Chemie», S. 221, von Braun, D., Cherdron, H., Kern, W., Hüthig Verlag, Heidelberg 1966).

3. Aminosubstituiertes Copolymerisat-Trägermaterial

3,9 Gewichtsteile CP-Vinylenglykol/Vinylglycidyläther (aus Beispiel 2.) werden mit einem Ultra-Turrax-Rührer in 100 Gewichtsteilen H_2O suspendiert und mit 10 ml 30%igem Ammoniak versetzt. Mit einem kleinen Magnetrührer wird anschliessend noch weitere 10 h bei 50° gerührt, schliesslich abgesaugt und gut mit Wasser ausgewaschen und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 3,5 Gewichtsteile Copolymerisat-Trägermaterial enthaltend 0,9 m äquivalente Aminogruppen pro Gramm, in Form von 3-Amino-2-hydroxy-propyl-Gruppen (aus der Umsetzung von Ammoniak mit Glycidylgruppen entstanden).

4. CP-Vinylenglykol / Acrylsäure

9 Gewichtsteile Vinylencarbonat, 1 Gewichtsteil Acrylsäureäthylester und 0,05 Gewichtsteile Azobisisobutyronitril werden unter N_2 wie bei Beispiel 1. a) polymerisiert, zerkleinert, entmonomerisiert und auf eine Korngrösse <0,1 mm gemahlen, verseift, abgesaugt, ausgewaschen und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 5,0 Gewichtsteile hydrophiles Polymerpulver, enthaltend 1,1 Milliäquivalente Carboxylgruppen pro Gramm Träger mit einer spezifischen Oberfläche nach BET von $27,2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

5. ω-Aminohexyl-Gruppen-substituiertes Poly-Vinylenglykol

5 Gewichtsteile CP-Vinylenglykol/Acrylsäure aus Beispiel 4. werden mit dem Ultra-Turrax in 100 ml H_2O suspendiert, auf 5° gekühlt mit 2,5 g N-Cyclohexyl-N'-(N-methylmorpholino)-äthyl)-carbodiimid-p-toluol-sulfonat versetzt, 30 Minuten bei pH 5 und 5° gerührt, abfiltriert und schnell mit Eiswasser gewaschen. Der aktivierte Träger wird anschliessend sofort in eine mit 2 n HCl auf pH 7,5 gestellte und auf 5° gekühlte Lösung von 5 g Hexamethyldiamin in 100 ml Wasser suspendiert und noch weitere 24 Stunden unter diesen Bedingungen mit einem

Magnetrührer gerührt, abgesaugt, gut mit Wasser ausgewaschen und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 4,5 Gewichtsteile ω -Aminoheptyl-Gruppen-substituiertes Poly-Vinylenglykol mit 0,7 Milliäquivalenten Aminogruppen pro Gramm Träger.

6. Umsetzung von CP-Vinylenglykol/Vinylalkohol aus Beispiel 1. a) mit einer spezifischen Oberfläche nach BET von $34 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$

a) mit Epichlorhydrin

50 g eines CP-Vinylenglykol/Vinylalkohol, hergestellt nach Beispiel 1. a) werden in 1 Liter 2 n NaOH suspendiert, mit 250 ml Epichlorhydrin versetzt und 2 Stunden bei $55-60^\circ$ gerührt. Der pH-Wert der Suspension sinkt nach kurzer Zeit auf 10–11. Durch Zugabe von NaOH wird noch 1 Stunde dieser pH-Wert gehalten. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird der Feststoff abgesaugt, mit Wasser, Aceton und zum Schluss wieder mit Wasser gewaschen.

b) mit Hexamethyldiamin

50 g Hexamethyldiamin werden in 1,5 l Wasser gelöst und mit HCl bis pH 10 versetzt. Zu der Lösung wird das nach 6. a) aktivierte CP-Vinylenglykol/Vinylalkohol gegeben und bei $50-55^\circ$ 6 Stunden gerührt. Danach wird das Produkt abgesaugt und mit Wasser frei von Hexamethyldiamin gewaschen.

c) mit 1-Aminobenzol-4- β -hydroxyäthylsulfonschwefelsäureester

Das unter Beispiel 6. b) erhaltene Produkt wird mit 50 g 1-Aminobenzol-4- β -hydroxyäthylsulfonschwefelsäureester bei 55° und pH 10 eine Stunde lang gerührt. Anschliessend wird der Feststoff abfiltriert, mit Wasser, Aceton und wieder mit Wasser gewaschen.

d) Diazotierung 10 g des unter Beispiel 6. c) erhaltenen Produktes werden auf einer Nutsche mit 200 ml 0,1 n HCl gewaschen und danach in 300 ml 0,5 n HCl suspendiert. Die Suspension wird unter Rühren mit 0,1 n NaNO_2 -Lösung bei $0-4^\circ$ versetzt, bis bei der Diazotierung mit KJ-Stärkepapier ein geringer Nitrit-Überschuss festzustellen ist. Nach 10 Min. wird über eine Nutsche abfiltriert und der Rückstand mit Eiswasser und anschliessend mit 0,15 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,5 von $0-4^\circ$ gewaschen.

e) Kovalente Bindung mit Protein

0,8 g Albumin werden in 350 ml Phosphatpuffer pH 7,5 gelöst, auf 4° abgekühlt und das unter 6. d) hergestellte Produkt zugegeben. Die Suspension wird 20 Stunden bei 4° gerührt, danach abfiltriert und der Feststoff mit 1 M NaCl und phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (wässrige 0,9%ige NaCl-Lösung mit einem Gehalt an $1/15$ Mol $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer vom pH 7,2) gewaschen.

Filtrat und Waschanlagen werden nach der Methode der radialen Immundiffusion auf Albumin untersucht. Es werden 60 mg Albumin an 1 g des so hergestellten Trägers gebunden.

7. Umsetzung von CP-Vinylenglykol/Vinylalkohol aus Beispiel 1. b) mit einer spezifischen Oberfläche nach BET von $62,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$

Nach analogen Umsetzungen wie unter 6. a) bis e) beschrieben können an 1 g aktivierten Träger 80 mg Albumin quantitativ gebunden werden.

8. Umsetzung von Homopolymerisat-Vinylenglykol aus Beispiel 1. c) mit einer spezifischen Oberfläche nach BET von $20,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$

Nach analogen Umsetzungen wie unter 6. a) bis e) beschrieben können an 1 g aktivierten Träger 45 mg Albumin quantitativ gebunden werden.

9. ω -Aminoheptylgruppen-substituiertes Vinylenglykol/Vinylpyrrolidon-Copolymerisat

In 9 Gew.Tl. Vinylencarbonat und 1 Gew.Tl. Vinylpyrrolidon werden 0,05 Gew.Tl. Azobisisobutyronitril unter Stick-

stoff gelöst und analog Beispiel 1. a) polymerisiert und aufgearbeitet.

Nach dem Entmonomerisieren wird das Granulat zu einer 12 Gew.-%igen Dimethylformamid-Lösung gelöst, und mit einem Druck von 15 Atü wird diese Lösung in ein Methanol-Fällbad hineingedüst. Man erhält einen feinfaserigen Niederschlag Vinylencarbonat/Vinylpyrrolidon-Copolymerisat, der abgesaugt, mit Methanol nachgewaschen und in 200 Gew.Tl. Methanol resuspendiert wird. Es werden 6 Gew.Tl. Hexamethyldiamin, gelöst in 50 Gew.Tl. Methanol, zugegeben, die Suspension 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt, abgesaugt und mit Methanol ausgewaschen. Der gewaschene Filtrerrückstand wird jetzt in einer Lösung von 10 Gew.Tl. Natriummethylat in 300 Gew.T. 96%igem Methanol 4 Tage bei Raumtemperatur suspendiert, mit Methanol und dann sehr intensiv mit Wasser ausgewaschen und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 5,0 Gew.Tl. eines über Urethan-Bindungen mit ω -Aminoheptyl-Gruppen substituierten Vinylenglykol/Vinylpyrrolidon-Copolymerisates enthaltend 1,6 m Äquivalent NH_2 -Gruppen/g Träger.

10. Bindung von IgG an ω -Aminoheptyl-Gruppen-substituiertes Copolymerisat aus Beispiel 9 mit Hilfe von Bernsteinsäureanhydrid und wasserlöslichem Carbodiimid

5 Gew.Tl. von nach Beispiel 9 hergestelltem ω -Aminoheptylsubstituierten Träger werden bei 10° und pH 6 mit 2,5 Gew.Tl. Bernsteinsäureanhydrid, die in 200 Gew.Tl. Wasser suspendiert sind, 4 Stunden succinoyliert. Der pH-Wert wird mit 2 n NaOH einreguliert. Nach der Waschung des Feststoffes mit Wasser wird das Produkt mit 1,25 Gew. Tl. N-Cyclohexyl-N'-(N-methylmorpholino)-äthyl-carbodiimid-p-toluol-sulfonat bei pH 5 und 5° 30 Min. gerührt, abfiltriert und schnell mit Eiswasser gewaschen.

0,5 Gew.Tl. IgG werden in 150 Gew.Tl. Phosphat-Puffer pH 7,5 gelöst und mit dem aktivierten Träger 24 Stunden bei 4° gerührt. Nach Filtration wird das Produkt mit 1 M Kochsalz und mit PBS gewaschen.

An 1 g des Trägers werden 75 mg IgG kovalent gebunden.

11. Copolymerisat-Vinylenglykol/Diäthylenglykoldivinyläther In 9 Gew.Tl. Vinylencarbonat und 1 Gew.Tl. Diäthylenglykoldivinyläther werden 0,1 Gew.Tl. Azobisisobutyronitril unter Stickstoff gelöst und wie unter 1. a) beschrieben in flachen Aluminiumtuben unter N_2 3 Tage auf 50° erwärmt und polymerisiert. Nach Aufarbeitung und Verseifung wie unter 1. a) beschrieben werden 3,5 Gew.Tl. CP-Vinylenglykol/Diäthylenglykoldivinyläther erhalten.

12. Copolymerisat-Vinylenglykol/N-Acryloylaminoacetaldehyddimethylacetal

a) In 9 Gew.Tl. Vinylencarbonat und 1 Gew.Tl. N-Acryloylaminoacetaldehyddimethylacetal werden 0,05 Gew. Tl. Azobisisobutyronitril unter Stickstoff gelöst. Das Monomerenmisch wird wie unter 1. a) beschrieben polymerisiert, aufgearbeitet und verseift zu 4,1 Gew.Tl. N-Acryloylaminoacetaldehyddimethylacetal/Vinylenglykol-Copolymer.

10 Gew.Tl. N-Acryloylaminoacetaldehyddimethylacetal/Vinylenglykol-Copolymere wurden in 100 Gew.Tl. 1 N HCl 4–5 Stunden gerührt. Der aktivierte Träger wurde mit Wasser und Phosphat-Puffer pH 7,5 gewaschen.

b) 0,5 g Albumin wurden in 200 ml PBS gelöst und mit dem unter a) hergestellten Produkt 14 Stunden bei 4° gerührt. Nach Filtration wurde das trägergebundene Protein mit 1 M Kochsalz und mit PBS gewaschen. 1 g des so hergestellten Trägers bindet 40 mg Albumin.