Institut für Organische Chemie der Universität Mainz, D-65 Mainz

Monomere und polymere Succinimidoester von ω -Methacryloylaminosäuren, ihre Darstellung und ihre Reaktion mit Aminen

Hans-Georg Batz und Johanna Koldehoff

(Eingangsdatum: 9. Juni 1975*)

ZUSAMMENFASSUNG:

Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Synthese von ω -Methacryloylaminosäure-succinimidoestern (1) wurden Monomere erhalten, die leicht mit Methacrylamid copolymerisiert werden konnten. Die entstandenen Copolymeren, die als Träger für Enzyme und Pharmaka verwendet werden können, tragen die selektiv mit Aminen reagierende Succinimidoester-Gruppe an einem „Spacerarm“. Die Reaktionsfähigkeit der neuen Monomeren gegenüber verschiedenen Aminen wurde untersucht.

SUMMARY:

The synthesis of succinimido esters of ω -methacryloylaminocarboxylic acids affords monomers which can easily be copolymerized with methacrylamide. The resulting copolymers have a succinimido ester group fixed on a "spacer arm", which reacts with amines selectively. These copolymers may be used as carriers for enzymes and drugs. The reactivity of the new monomers towards various amines was investigated.

Einleitung

In einer früheren Arbeit¹⁾ war gezeigt worden, daß Polymere mit reaktiven Estergruppierungen selektiv mit Aminverbindungen umgesetzt werden können. Aus den entsprechenden Monomeren lassen sich gezielt Copolymere mit definierten Eigenschaften herstellen, die unter anderem als Träger für Enzyme und Pharmaka verwendet werden können. Die Verknüpfung kann in einfacher und schonender Weise erfolgen²⁾, ist bei Enzymen allerdings mit Aktivitätsverlusten verbunden. Da diese Verluste unter anderem auf die

*) Revidiertes Manuskript vom 9. Oktober 1975.

Die äußersten Banden im Carbonylbereich der IR-Spektren von **1** sind im Exp. Teil aufgeführt. Die Lage dieser Bande liefert einen Hinweis auf die Reaktivität der Esterbindung. Sie liegt beim Propionsäure-succinimidoester, der noch relativ hydrolysestabil ist und selektiv mit Aminosäure reagiert, bei 1815 cm^{-1} und beim sehr reaktiven, leicht hydrolysierenden Chloressigsäure-succinimidoester bei 1835 cm^{-1} ⁷⁾. Die Kernresonanzspektren bestätigen die angegebenen Strukturen.

Als hydrophile, biologisch spaltbare Spacer kommen Dipeptide in Frage⁸⁾. Ihre Herstellung wurde am Beispiel des Glycylglycin-Derivates untersucht. Da dessen Herstellung aus dem oben beschriebenen Methacryloylglycin-succinimidoester über den Methacryloylglycylglycin-äthylester zu noch schlechteren Ausbeuten führt und damit aufwendiger ist als die direkte Acylierung von Glycylglycin oder Glycylglycin-äthylester, scheinen derartige Spacer zumindest für die Enzymimmobilisierung zu aufwendig zu sein. Dabei ist die Synthese durch Acylierung des Dipeptids der schrittweisen Synthese vorzuziehen, denn bei der Umsetzung der monomeren Succinimidoester **1** mit nucleophilen Reagentien, wie Glycin-äthylester oder auch Cyclohexylamin oder Anilin, werden schlechtere Ausbeuten erzielt als üblicherweise mit Succinimidoestern. Dies ist im wesentlichen auf eine „1,4-Addition“ zurückzuführen, die bei den Acylierungsbedingungen weder im rein organischen Milieu, noch im wässrig organischen unterdrückt werden konnte.

Die Copolymerisationseigenschaften der neuen Monomeren entsprachen im wesentlichen den in der Literatur⁹⁾ angegebenen Werten für *N*-monosubstituierte Methacrylamide, mit Ausnahme des schlecht löslichen Undecansäureesters.

Bei der Kupplung des Enzyms Glucuronidase (β -Glucuronidase aus *Helix pomatia*, „Boehringer Mannheim 15472“) an die verschiedenen Copolymeren, die aus den beschriebenen Monomeren durch Copolymerisation mit Methacrylamid erhalten wurden und jeweils ähnlich große Anteile an OSu-Ester enthalten, wurde gefunden, daß die Enzym-Aktivität bei den spacerhaltigen Copolymeren höher ist als bei einem Copolymeren aus Methacrylsäure-succinimidoester und Methacrylamid.

Da das Undecansäurederivat die höchste Aktivität zeigte, bleibt hier zu untersuchen, inwieweit die gefundenen Effekte lediglich auf hydrophobe Wechselwirkungen des Enzyms mit dem Polymeren und einer damit verbundenen adsorptiven Fixierung des Enzyms zurückzuführen sind. Diese bisherigen nur qualitativen Versuche mit der Glucuronidase sollen durch quantitative Messungen noch einmal überprüft werden. Diese Fixierungsmethode soll aber

vor allem noch mit anderen Verfahren verglichen werden, wozu bisher besser untersuchte Enzyme, wie etwa Trypsin oder die aus Untereinheiten bestehende Lactat-Dehydrogenase, verwendet werden sollen.

Experimenteller Teil

Darstellung von ω -Methacryloylaminosäuren (cf.⁵⁾)

Zu 0,2 mol ω -Aminosäure und 0,2 mol NaOH in 10 ml Wasser wurden eine Spatelspitze Hydrochinon und danach unter Rühren bei -10°C innerhalb von 60 min gleichzeitig 0,2 mol NaOH in 20 ml Wasser und 0,2 mol Methacryloylchlorid in 10 ml Dioxan zugefügt. Die Lösung wurde noch 1 h nachgerührt und anschließend auf pH 3 gebracht. Im Falle des Glycin- und β -Alanin-Derivates wurde die Lösung so weit eingengt, bis die Kristallisation begann. Diese Lösung wurde wie die Reaktionslösungen der höhermolekularen Aminosäuren mit Essigester ausgeschüttelt. Die Essigester-Phase wurde mit Wasser gewaschen, dann getrocknet und eingengt. Mit Ausnahme der *N*-Methacryloylaminobuttersäure kristallisierten die Säuren aus dem zurückgebliebenen Öl aus.

N-Methacryloylglycin: Ausb. 54%, Schmp $108-110^{\circ}\text{C}$ (aus Essigester).

N-Methacryloyl- β -alanin: Ausb. 45%, Schmp $70-73^{\circ}\text{C}$ (aus Essigester/Petroläther).

γ -Methacryloylaminobuttersäure: Ausb. 75%, Öl.

ϵ -Methacryloylaminocaprinsäure: Ausb. 49%, Schmp $47-50^{\circ}\text{C}$ (aus Essigester/Petroläther).

NMR (CDCl_3): $\delta = 1,50$ (m; $-(\text{CH}_2)_3-$), 1,97 (t; $-\text{CH}_3$), 2,36 (t; $-\text{CH}_2\text{CO}$), 3,37 (dxt; $-\text{CH}_2\text{NH}$), 5,29 und 5,67 ppm (CH_2 von Methacryl).

11-Methacryloylaminoundecansäure: Ausb. 35%, Schmp $65-68^{\circ}\text{C}$ (aus Essigester/Petroläther).

NMR (CDCl_3): $\delta = 1,29$ (m; $-(\text{CH}_2)_3-$), 1,97 (t; $-\text{CH}_3$), 2,34 (t; $-\text{CH}_2\text{CO}$), 3,31 (dxt; $-\text{CH}_2\text{NH}$), 5,27 und 5,64 ppm (CH_2 von Methacryl).

Darstellung der ω -Methacryloylaminosäure-succinimidoester (1)

In einem 500-ml-Dreihalskolben wurden 0,1 mol ω -Methacryloylaminosäure und 0,11 mol *N*-Hydroxysuccinimid in einer Mischung aus absol. Methylenchlorid und absol. Tetrahydrofuran vorgelegt und im Eisbad auf 5°C gekühlt. Dazu wurde unter Rühren eine Lösung von 0,11 mol Dicyclohexylcarbodiimid in 50 ml absol. Methylenchlorid zugetropft und etwa 12 h gerührt, wobei die Temp. auf 25°C anstieg. Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und das Filtrat eingengt. Das entstandene Öl wurde in Acetonitril aufgenommen und mehrere Stunden im Kühlschrank stehengelassen. Erneut ausgefallener Harnstoff wurde abgetrennt und das Acetonitril abgedampft. Aus dem verbleibenden Öl kristallisierten im Kühlschrank die Ester aus.

N-Methacryloylglycin-succinimidoester: Ausb. 50%, Schmp $170-172^{\circ}\text{C}$ (aus Essigester).

IR (KBr): 1825 (CO; Ester) und 1653 cm^{-1} (CO; Amid).

Monomere und polymere Succinimidoester von *N*-Methacryloyl- ω -aminosäuren

NMR (DMSO- d_6): δ = 1,87 (t; $-\text{CH}_3$), 2,80 (s; $-(\text{CH}_2)_2-$), 4,20 (d; $-\text{CH}_2$), 5,35 und 5,68 ppm (CH_2 von Methacryl).

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$ (240,2)	Ber.	C 50,0	H 5,04	N 11,7
	Gef.	C 50,0	H 5,15	N 11,9

N-Methacryloyl- β -alanin-succinimidoester: Ausb. 33%, Schmp 125–129°C (aus Essigester).

γ -Methacryloylaminobuttersäure-succinimidoester: Ausb. 32%, Schmp 109–111°C (aus Essigester).

IR (KBr): 1815 (CO; Ester) und 1650 cm^{-1} (CO; Amid).

NMR (CDCl_3): δ = 1,92 (t; $-\text{CH}_3$), 2,04 (m; $-\text{CH}_2-$), 2,62 (t; $-\text{CH}_2\text{CO}$), 2,76 (s; $-(\text{CH}_2)_2-$), 3,35 (dxt; $-\text{CH}_2\text{NH}$), 5,22 und 5,55 ppm (CH_2 von Methacryl).

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$ (268,2)	Ber.	C 53,7	H 6,01	N 10,4
	Gef.	C 53,5	H 6,15	N 10,8

ϵ -Methacryloylaminocaprinsäure-succinimidoester: Ausb. 48,7%, Schmp 81–84°C (aus Essigester).

IR (KBr): 1815 (CO; Ester) und 1650 cm^{-1} (CO; Amid).

NMR (CDCl_3): δ = 1,58 (m; $-(\text{CH}_2)_3-$), 1,97 (t; $-\text{CH}_3$), 2,62 (t; $-\text{CH}_2\text{CO}$), 2,83 (s; $-(\text{CH}_2)_2-$), 3,33 (dxt; $-\text{CH}_2\text{NH}$) und 5,31 ppm (CH_2 von Methacryl).

$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$ (296,3)	Ber.	C 57,1	H 6,80	N 9,45
	Gef.	C 56,9	H 6,61	N 9,52

11-Methacryloylaminoundecansäure-succinimidoester: Ausb. 43%, Schmp 85–87°C (aus THF).

IR (KBr): 1815 (CO; Ester) und 1650 cm^{-1} (CO; Amid).

NMR (CDCl_3): δ = 1,31 (m; $-(\text{CH}_2)_8-$), 1,97 (t; $-\text{CH}_3$), 2,62 (t; $-\text{CH}_2\text{CO}$), 2,83 (s; $-(\text{CH}_2)_2-$), 3,30 (dxt; $-\text{CH}_2\text{NH}$), 5,32 und 5,68 ppm (CH_2 von Methacryl).

$\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$ (366,4)	Ber.	C 62,7	H 8,25	N 7,64
	Gef.	C 61,8	H 8,40	N 7,43

Umsetzung von ω -Methacryloylaminosäure-succinimidoestern mit Aminen

Zu einer Lösung des Esters **1** in Methylchlorid oder Acetonitril wurde unter Rühren und Eiskühlung die doppelt äquivalente Menge Amin, gelöst im gleichen Lösungsmittel, zugegeben. Es wurde dann noch 1 h unter Eiskühlung und 24 h bei Raumtemp. gerührt. Nach dieser Zeit war der Fleck des Esters im Dünnschichtchromatogramm nicht mehr festzustellen. Zur Isolierung und Charakterisierung wurden die Amide folgendermaßen aufgearbeitet. Die Reaktionslösung wurde eingeeengt, in Essigester aufgenommen, dann nacheinander mit 0,5 N Weinsäure, gesättigter Hydrogencarbonatlösung und Wasser ausgeschüttelt, getrocknet und wieder eingeeengt. Durch Zugabe von Petroläther wurden die Amide kristallisiert.

N-Methacryloylglcyclanilid: Ausb. 52%, Schmp 176–178 °C (aus Essigester/Petroläther).

$C_{12}H_{14}N_2O_2$ (218,2)	Ber.	C 66,04	H 6,43	N 12,83
	Gef.	C 65,79	H 6,85	N 12,89

γ -Methacryloylaminobutyranilid: Ausb. 69%, Schmp 96–98 °C (aus Essigester/Petroläther).

$C_{14}H_{18}N_2O_2$ (246,2)	Ber.	C 68,27	H 7,38	N 11,37
	Gef.	C 67,96	H 7,42	N 11,48

N-Methacryloylglcyclcyclohexylamid: Ausb. 56%, Schmp 138–140 °C (aus Essigester/Petroläther).

$C_{12}H_{19}N_2O_2$ (223,2)	Ber.	C 64,56	H 8,56	N 12,54
	Gef.	C 64,31	H 8,95	N 12,11

4-Methacryloylaminobutyryl-cyclohexylamid: Ausb. 67%, Schmp 134–138 °C (aus Essigester/Petroläther).

$C_{14}H_{23}N_2O_2$ (251,3)	Ber.	C 66,89	H 9,23	N 11,14
	Gef.	C 66,36	H 9,36	N 11,29

N-Methacryloylglcyclglycin-äthylester: Ausb. 36%, Schmp 102–104 °C (aus Essigester/Petroläther).

$C_{10}H_{16}N_2O_4$ (228,2)	Ber.	C 52,62	H 7,06	N 12,27
	Gef.	C 52,85	H 6,80	N 12,97

Copolymerisation der ω -Methacryloylaminocarbonsäure-succinimidoester mit Methacrylamid

Es wurde eine sauerstofffreie Lösung (1 mol/dm³) der beiden Monomeren in absol. THF hergestellt. (Monomerenverhältnis Ester:Amid = 1:5). Die Polymerisation erfolgte durch Zugabe von 0,8% (mol/mol) AIBN bei 58 °C. Nach 4 h wurde die Polymerisation durch Abkühlung (Eintauchen in ein Eisbad) abgebrochen und das ausgefallene Polymere abgesaugt. Es wurde in Wasser wieder gelöst und durch Eintropfen in Aceton umgefällt. Bei einem durchschnittlichen Umsatz von 50% lag das Einbauverhältnis für das Glycin-, Aminobuttersäure- und Aminocaprinsäure-Derivat jeweils etwa bei 1:9. Bei der Amino-undecansäure wurde ein Einbauverhältnis von 1:18 ermittelt, was mit der schlechten Löslichkeit dieses Monomeren in THF erklärt werden kann. (Das Einbauverhältnis wurde bestimmt, indem zunächst mit 0,1 M NaOH hydrolysiert und anschließend mit 0,1 M HCl zurücktitriert wurde.)

Kupplung von Glucuronidase an die verschiedenen Copolymeren

Zu 6,0 g des jeweiligen Copolymeren in 50 ml Phosphat-Puffer (pH 8,3) wurden 0,15 mg Hexamethyldiamin gegeben. Dann wurde 24 h bei Raumtemp. geschüttelt. Zu dem

hierdurch entstandenen Gel wurde soviel Watte gegeben, daß das gesamte Gel bei weiterem Schütteln aufgesaugt wurde. Das so stabilisierte Gel wurde auf einer großporigen Fritte isoliert, mit Wasser und Pufferlösung gewaschen und wieder in eine Pufferlösung gebracht. Dazu wurden 0,5 ml einer Enzymlösung gegeben. Nach dreitägigem Schütteln erfolgte die Isolierung und Reinigung wieder über eine Fritte.

Die Aktivitätsbestimmung der erhaltenen Enzymgele erfolgte in Analogie zum Test des löslichen Enzyms¹⁰⁾.

Das Enzym wurde in Acetatpuffer (pH 4,6) aufgenommen. Dazu wurden 0,3 mg Phenolphthalein-glucuronid gegeben. Es wurde dann 16 h bei 37 °C incubiert, danach wurden 3 ml Lösung entnommen und auf pH 10 gebracht. Die unterschiedliche Intensität der Färbung konnte mit dem bloßen Auge erfaßt werden.

- 1) H. G. Batz, G. Franzmann, H. Ringsdorf, *Angew. Chem.* **84**, 1189 (1972); P. Ferrutti, A. Bettelli, A. Fere, *Polymer* **13**, 462 (1972)
- 2) H. G. Batz, G. Franzmann, H. Ringsdorf, *Makromol. Chem.* **172**, 27 (1973); R. L. Schnaar und Y. C. Lee, *Biochemistry* **14**, 1535 (1975)
- 3) I. B. Taylor, H. E. Swaisgood, *Biochem. Biophys. Acta* **284**, 268 (1972)
- 4) H. D. Orth, W. Bruemmer, *Angew. Chemie* **84**, 319 (1972); W. B. Jakoby, M. Wilchek in "Methods in Enzymology XXXIV", Academic Press, New York 1974
- 5) K. Huebner, F. Kollinsky, G. Markert, H. Penewiss, *Angew. Makromol. Chem.* **11**, 109 (1970)
- 6) H.-G. Batz, unveröffentlichte Ergebnisse
- 7) H.-G. Batz, Dissertation, Technische Universität München 1970
- 8) H. Jatzkewitz, *Z. Naturforschung* **10b**, 27 (1955)
- 9) J. Brandrup, E. H. Immergut, "Polymer Handbook", Interscience Publ., New York 1967, S. II-141
- 10) H. U. Bergmeyer, „Meth. d. enzymatischen Analyse“, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1970, Band I, S. 449