

Polymergebundenes N-(Hexyl)-5-azido-2-nitro-benzoesäureamid; ein photoreaktiver Träger zur Immobilisierung von Liganden

Polymer Linked N-(Hexyl)-5-azido-2-nitro-benzoic Acid Amide;
a Photoreactive Resin for the Immobilization of Ligands

Frank Seela und Fritz Hansske

Universität Paderborn—Gesamthochschule, Fachbereich 13 (Organische Chemie), Paderborn und
Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen

(Z. Naturforsch. **31 c**, 263—266 [1976]; eingegangen am 12. Februar 1976)

Photoreactive Agarose Derivative, Immobilization of Ligands

The preparation of a new photochemically-activatable polymer was accomplished by condensation of aminohexyl-6-yl-agarose with the N-hydroxysuccinimide ester of 5-azido-2-nitro-benzoic acid. The latter compound was obtained by diazotization of 5-amino-2-nitro-benzoic acid, exchange of the diazonium group through azide and condensation with N-hydroxysuccinimide. As shown for the photolysis on the monomer level, irradiation of the polymer led to the intermediate formation of a highly reactive nitrene, which is able to immobilize ligands *e.g.* L-phenylalanine to the polymer.

Die Entwicklung neuer Methoden zur Immobilisierung von katalytisch aktiven bzw. biologisch wirksamen Molekülen an polymere Träger erfolgt aus zwei Gründen:

1. Zur Entwicklung polymerer Reagenzien¹⁻⁴, die aufgrund ihrer leichten Abtrennbarkeit die zeit-sparende Isolierung von Reaktionsprodukten ermöglichen und die durch ihre stetige Regenerierbarkeit rationell benutzt werden können. Polymere Reagenzien, speziell mit Enzymen⁵, aber auch niedermolekularen Substanzen als Liganden⁶, finden deshalb eine immer breitere Anwendung in der Organischen Chemie und Biochemie.

2. Zur Darstellung von Adsorbentien, die aufgrund der biospezifischen Wechselwirkung des immobilisierten Liganden mit der abzutrennenden Substanz schwierige Trennprobleme lösen helfen^{7, 8}. Derartige Träger mit bioaktiven Liganden⁹ werden als Adsorbentien in der Affinitätschromatographie benutzt.

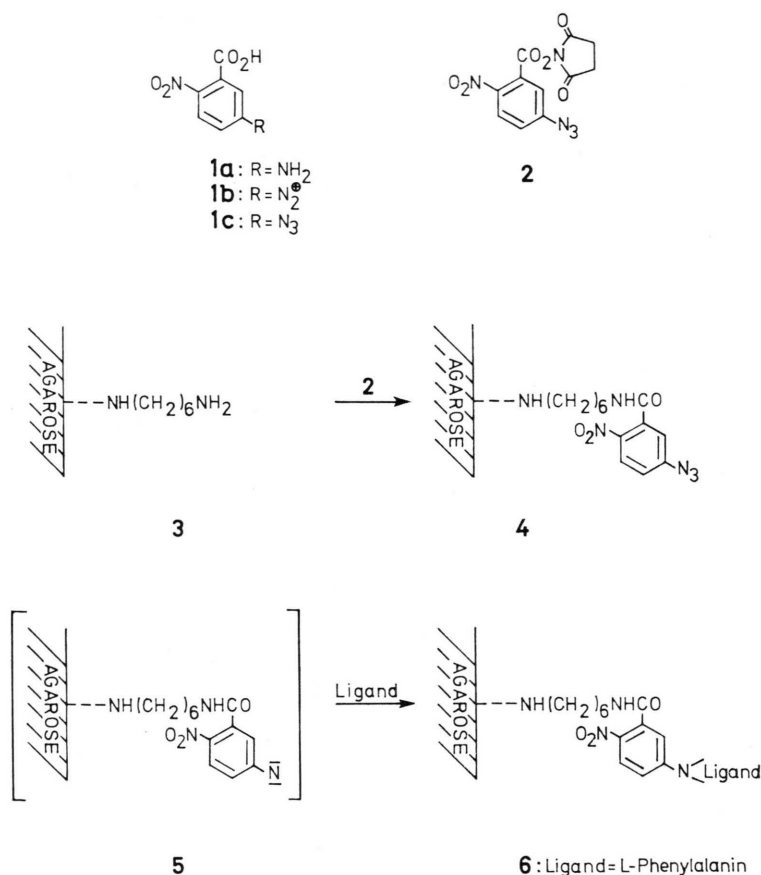
Die Immobilisierung eines Liganden an einem Polymer setzt einen reaktiven Substituenten, häufig am Liganden und einen aktivierbaren Rest, meist am Träger, voraus. Diese gezielte Verknüpfung der beiden Reaktionspartner führt zu Polymeren mit chemisch definierter Struktur.

Eine Verknüpfung der reaktiven Gruppen des Liganden mit den aktivierten Resten am Polymer setzt voraus, daß durch diese Bindung der Ligand funktional nicht verändert wird. Befindet sich die reaktive Gruppe am katalytisch wirksamen Zentrum, dann muß zusätzlich ein reaktiver Rest eingeführt werden.

Eine Möglichkeit, auf die Einführung reaktiver Gruppen an Liganden generell zu verzichten, kann durch die Erhöhung der Reaktionsbereitschaft des aktivierten Rests am Polymer erreicht werden. Derartige Reste besitzen jedoch eine kurze Lebensdauer und müssen in Gegenwart des Liganden *in situ* erzeugt werden. Uns erschienen aromatische Azide für diesen Zweck geeignet, da sie bei Raumtemperatur stabil und chemisch inert sind. Bestrahlt man sie jedoch mit UV-Licht, so werden unter Stickstoffabspaltung (Photolyse) intermediär reaktive Nitrene gebildet¹⁰. Diese Nitrene besitzen Halbwertszeiten von 10^{-4} sec und können unter Einschiebung in CH-Einfachbindungen, Addition an CC-Doppelbindungen und Reaktion mit Nucleophilen weiterreagieren¹¹. Verknüpft man das aromatische Azid mit einem polymeren Träger, so sollte es nach Photolyse zum polymeren Nitren, Liganden kovalent an das Polymer binden.

Wir haben zu diesem Zweck 5-Azido-2-nitro-benzoesäure (**1c**) mit Aminohexyl-6-yl-agarose („AH-Sephärose“) gekuppelt und das Reaktionsprodukt auf seine Fähigkeit untersucht, nach Photolyse Liganden, wie z. B. L-Phenylalanin kovalent zu binden.

Sonderdruckanforderungen an Priv.-Doz. Dr. Frank Seela, Dr. Fritz Hansske, Universität Paderborn—Gesamthochschule, Fachbereich 13 (Organische Chemie, Pohlweg 55, D-4790 Paderborn.



Darstellung von N-(Hexyl-6-yl-agarose)-5-azido-2-nitro-benzoesäureamid (**4**) und photochemische Kupplung mit L-Phenylalanin

Diazotiert man 5-Amino-2-nitro-benzoesäure in wässriger Lösung und tauscht den Diazoniumrest durch Azid aus, so entsteht 5-Azido-2-nitro-benzoesäure (**1c**). Diese besitzt verglichen mit dem 4-Azido-2-nitro- bzw. 5-Azido-3-nitro-Isomer eine bemerkenswert langwellige UV-Absorption ($\lambda_{\max} = 376 \text{ nm}$; $\epsilon = 14900$), die auf die günstige Mesomeriefähigkeit der zueinander para-ständigen Azido/Nitro-Substituenten zurückzuführen ist. Beim kurzzeitigen Bestrahlen mit UV-Licht photolysiert die Säure **1c** (Abb. 1).

Mit N-Hydroxysuccinimid kann **1c** in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid zum Ester **2** aktiviert werden. Löst man diesen in einer Dimethylformamid/Wasser-Mischung, versetzt mit dem Agarose-Derivat **3** und schüttelt das Reaktionsgemisch 10 h bei Dunkelheit, dann kann nach Filtration das schwach gelbliche Harz **4** isoliert werden.

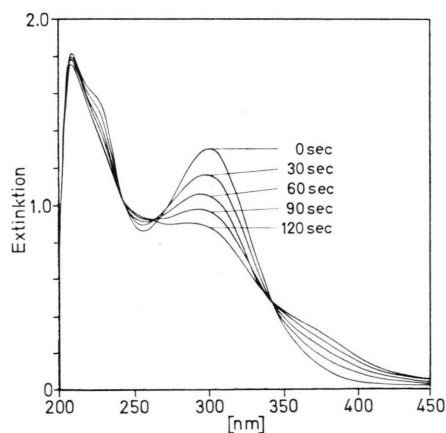


Abb. 1. Änderung des UV-Spektrums von 5-Azido-2-nitro-benzoesäure (**1c**) bei der Photolyse in Äthanol in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer; Schichtdicke 1 cm; 2 Sylvania UV-Lampen (G8T5); Abstand 10 cm.

Zum Nachweis der kovalenten Verknüpfung von **2** mit **3** wird **4** bestrahlt, wobei es sich im Gegensatz zum Agarose-Derivat **3**, ähnlich wie die Säure **1c**, intensiv gelb färbt.

Um **4** auf seine Fähigkeit zu untersuchen, nach Photolyse Moleküle als Liganden zu immobilisieren, wurde es in Gegenwart von radioaktiv markiertem L-[^{14}C]Phenylalanin in wässriger Lösung mit UV-Licht bestrahlt.

Nach Auswaschen von niedermolekularem, nicht immobilisiertem Material wurde die Menge an trägergebundenem L-Phenylalanin durch Bestimmen der [^{14}C]-Aktivität gemessen. Das photochemisch aktivierbare Polymer **4** hatte $3,1 \mu\text{mol}$ L-Phenylalanin/g Gel kovalent gebunden. Diese Menge entspricht einer Ligandenkonzentration, wie sie allgemein für Trennungen benutzt wird⁹. Über die Position der Verknüpfung kann keine Aussage gemacht werden.

Um Adsorptionseffekte auszuschließen und sicherzustellen, daß die Kupplung des Liganden über das Azid **4** via Nitren **5** erfolgt, wurde die Inkubation von **4** mit L-Phenylalanin ohne Bestrahlung durchgeführt; auch wurde die Photolyse vom Agarose-Derivat **3**, das keine Azidgruppen besitzt, in Gegenwart von L-Phenylalanin untersucht. In beiden Fällen erhielten wir am isolierten Harz nur Restaktivitäten von wenigen Prozent der Menge an immobilisierten Liganden, die über die photochemische Kupplung des Agarose-Derivates **4** erreicht worden war.

Wie orientierende Versuche zeigen, scheint sich der photoreaktive Rest von **4** generell auch zur Immobilisierung von höhermolekularen Liganden zu eignen.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Monoskop der Fa. Reichert, Österreich, bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Elementaranalysen wurden vom Mikroanalytischen Labor Beller, Göttingen, ausgeführt. NMR-Spektren: Bruker HX 60-Spektrometer (Tetramethylsilan als innerer Standard), UV-Spektren: Zeiss PMQ II- bzw. Shimadzu UV 200-Spektrometer. Die [^{14}C]-Aktivität wurde im Packard-Szintillationszähler (Modell 3385) gemessen.

Amino-hexyl-6-yl-agarose („AH-Sepharose 4B“) (**3**) war das Handelspräparat der Fa. Pharmacia, Fine Chemical AB (Uppsala, Schweden). Die Gewichtsmengen der Agarose-Derivate beziehen sich auf das gequollene Gel, das nach Waschen auf dem Büchner-Trichter so lange abgesaugt wurde, bis das Gel brach.

5-Azido-2-nitro-benzoesäure (**1c**):

Eine Suspension von 10,92 g (60 mmol) 5-Amino-2-nitro-benzoesäure (**1a**) in 120 ml Wasser wird unter Rühren tropfenweise mit eben der Menge 40-prozentiger Kalilauge versetzt, die zum Lösen der Säure notwendig ist. Danach trägt man 4,14 g (60 mmol) Natriumnitrit in die Lösung ein, kühlt auf 0 °C und tropft bei gleicher Temperatur eine Mischung aus 30 ml konz. Salzsäure und 150 ml Wasser zu. Die Lösung des Diazoniumsalzes **1b** wird noch 30 min gerührt und das Diazoniumsalz durch tropfenweisen Zusatz von 3,9 g (60 mmol) Natriumazid in 40 ml Wasser unter Stickstoffentwicklung zum Azid, das aus der Lösung ausfällt, umgewandelt. Nach weiteren 30 min Rühren bei Raumtemperatur wird der Niederschlag abgesaugt und aus Wasser umkristallisiert. 10,0 g (80%) gelbe Kristalle vom Schmelzpunkt 162–164 °C.

UV (Äthanol): λ_{max} 209, 234, 376 ($\epsilon = 11600$, 7400, 14900).

IR (KBr): 2115 cm^{-1} cm; Azid.

NMR (d_6 -DMSO): 7,38 (q, 1H, $J_{3,4} = 5,5$ Hz, $J_{3,5} = 2,5$ Hz); 7,45 (q, 1H, $J_{4,6} = 3,8$ Hz, $J_{3,6} = 2,5$ Hz); 8,07 (q, 1H, $J_{3,4} = 5,5$ Hz, $J_{4,6} = 3,8$ Hz).

$\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_4$ (208,13)

Ber. C 40,49 H 1,94 N 26,92;

Gef. C 40,60 H 1,99 N 27,00.

5-Azido-2-nitro-benzoesäure-N-hydroxysuccinimid-ester (**2**):

4,16 g (20 mmol) 5-Azido-2-nitro-benzoesäure (**1c**) und 2,3 g (20 mmol) N-Hydroxysuccinimid werden unter Rühren und Eiskühlung in 80 ml Dioxan gelöst und mit einer Lösung von 4,12 g (20 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in 40 ml Dioxan versetzt. Nach 15 min entfernt man das Kältebad und rührt 5 h bei Raumtemperatur weiter. Der Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert und mit 40 ml Dioxan gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden abgedampft und der Rückstand aus Äthylacetat umkristallisiert. 5,85 g (96%) gelbe Prismen vom Schmelzpunkt 135 °C.

UV (Äthanol): λ_{max} 229, 312 ($\epsilon = 13200$, 10900).

IR (KBr): 2160, 2140 cm^{-1} ; Azid.

NMR (d_6 -DMSO): 2,9 (s, $\text{CH}_2 - \text{CH}_2$); 7,39 (q, 1H, $J_{4,6} = 2,4$ Hz, $J_{3,6} = 0,5$ Hz); 7,65 (q, 1H, $J_{3,4} = 8,8$ Hz, $J_{4,6} = 2,4$ Hz); 8,31 (q, 1H, $J_{3,4} = 8,8$ Hz, $J_{3,6} = 0,5$ Hz).

$\text{C}_{11}\text{H}_7\text{N}_5\text{O}_6$ (305,21)

Ber. C 43,29 H 2,31 N 22,95;

Gef. C 43,49 H 2,35 N 22,81.

N-(Hexyl-6-yl-agarose)-5-azido-2-nitro-benzoesäureamid (**4**):

152 mg (0,5 mmol) 5-Azido-2-nitro-benzoesäure-N-hydroxysuccinimidester (**2**) werden in 10 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst, mit 10 ml Wasser versetzt und in die Lösung 5 g 6-Amino-hexyl-yl-agarose-Gel (**3**) eingetragen. Das Reaktionsgemisch wird 8 h im Dunkeln bei RT geschüttelt und das Agarose-Derivat **4** abgesaugt. Man wäscht zuerst mit wässrigem 0,5 M NaCl/DMF (1:1), wässrigem 0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl/DMF (1:1) und wässrigerem 0,1 M Ammoniumacetat, 0,5 M NaCl/DMF (1:1), dann mit den entsprechenden Dimethylformamid-freien Lösungen und Wasser. 5 g gelbliches Agarose-Gel **4**.

Photochemische Kupplung von 4 mit L-Phenylalanin:

1,0 g Agarose-Gel **4** wird in 5 ml 0,01 M Salzsäure, die 100 mg (0,61 mmol) L-Phenylalanin und 25 µl einer Lösung * (25×10^{-9} mol) L-[¹⁴C]-Phenylalanin enthält eingetragen und in einer offenen Kristallisierschale ($\phi = 4,5$ cm) 5 min lang mit 2 Sylvania UV-Lampen (G8T5) im Abstand von 10 cm bestrahlt. Man saugt das gelbliche Gel ab und wäscht sorgfältig mit 50 ml 0,5 M NaCl, 50 ml einer Lösung von 0,1 M NaHCO₃/0,5 M NaCl, dann

mit 0,1 M Ammoniumformiat (pH 4) und Wasser. Nach Absaugen des Lösungsmittels erhält man 1,0 g gelbes Agarose-Gel **6**.

Bestimmung von gebundenem L-Phenylalanin:

1,0 g des Agarose-Gels **6** werden in 15 ml Aquasol suspendiert und im Flüssigkeitsszintillationsmesser die [¹⁴C]-Aktivität bestimmt. Zum Vergleich wird die Aktivität von 1,0 g einer wie oben behandelten Probe, die nicht bestrahlt worden war, bestimmt. Weiterhin wird die Photoreaktion statt mit **4** mit **3** durchgeführt und von 1,0 g die [¹⁴C]-Aktivität gemessen.

[¹⁴C]-Aktivitäten nach Inkubation von L-Phenylalanin mit:

Agarose-Gel **4** (mit Bestrahlung):

$$7500 \text{ cpm} = 3,1 \mu\text{mol L-Phe/g Gel};$$

Agarose-Gel **4** (ohne Bestrahlung):

$$400 \text{ cpm} = 0,2 \mu\text{mol L-Phe/g Gel};$$

Agarose-Gel **3** (mit Bestrahlung):

$$800 \text{ cpm} = 0,4 \mu\text{mol L-Phe/g Gel}.$$

Dem Land Nordrhein-Westfalen wird für finanzielle Unterstützung gedankt.

¹ J. I. Crowley u. H. Rapoport, J. Amer. Chem. Soc. **92**, 6363 [1970].

² A. Patchornik u. M. A. Kraus, J. Amer. Chem. Soc. **92**, 7587 [1970].

³ H. Guilford, Chem. Soc. Rev. **2**, 249 [1973].

⁴ G. Manecke, Chimica **28**, 467 [1974].

⁵ O. Zaborsky, Immobilized Enzymes, CRC Press, Cleveland 1974.

⁶ F. Seela u. S. Waldeck, Nucleic Acids Research **2**, 2343 [1975].

⁷ W. B. Jakoby u. M. Wilchek, Methods in Enzymology, Enzyme Purification, Part B, Vol. XXXIV (S. P. Colowick u. N. D. Kaplan, eds.), Academic Press, New York 1974.

⁸ C. R. Lowe u. P. D. G. Dean, Affinity Chromatography, John Wiley u. Sons, London 1974.

⁹ F. Seela, Z. Naturforsch. **29c**, 521 [1974].

¹⁰ A. Reiser u. H. M. Wagner, The Chemistry of the Azido Group (S. Patai, ed.), p. 441, Interscience, London 1971.

¹¹ J. R. Knowles, Accounts Chem. Res. **5**, 155 [1972].

* 1 µl enthält 1 nmol L-Phenylalanin = 60 000 cpm; Verdünnungsfaktor L-[¹⁴C]Phe/L-Phe = 24 400.