Darstellung und Komplexverhalten von neuen Acrylsäurecopolymeren sowie deren Kopplung mit Insulin

Preparation and Complexation Behaviour of New Acrylic Acid Copolymers
and their Coupling with Insulin

HANS-G. BIEDERMANN, MANFRED EIBAND, HANS GUNTNER und HELMUT KOLB*

Anorganisch-chemisches Institut der Technischen Universität München und

*Institut für Diabetesforschung, München

(Z. Naturforsch. **32b**, 1455-1460 [1977]; eingegangen am 11. Juli 1977)

Acrylic Acid Copolymers, Insulin, Metal Complexes

Acrylic acid copolymers with styrene, acryloylchloride, acryloylpyrrolidinone, acryloyloxypyridine, acryloylsuccinimid and acryloyltriazole are prepared and coupled with insulin.

Metal complexes with BaCl_2 , $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{La}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ and $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ of the acrylic acid acryloylpyrrolidinone and of the acrylic acid acryloylsuccinimid copolymer are formed and characterized.

Insulin besitzt in biologischen Geweben ein weites Wirkungsspektrum. Die Reaktionen, die es beeinflusst, reichen von Spontaneffekten und Beschleunigung von Membrantransporten bis zu Langzeitwirkungen auf die DNS- und RNS-Synthese im Zellkern¹⁻⁴. Trotz der großen Bedeutung und Anwendungsbreite des Insulins ist der Reaktionsmechanismus erst unvollkommen aufgeklärt⁴. Durch die Studien mit an Sepharose gekoppeltem Insulin⁵ schien der experimentelle Beweis für die extrazelluläre Wirkung von Insulin erbracht, jedoch konnte gezeigt werden, daß die Bindung von Insulin an das Sepharose-Teilchen nicht genügend stabil war und während der Intubation kontinuierlich „freies“ niedermolekulares Insulin freigesetzt wurde⁶.

Kürzlich demonstrierten GOLDFINE *et al.*⁷, daß auch gereinigte Zellkerne Bindungsstellen für Insulin besitzen und postulierte aus kinetischen Messungen, daß das intakte Hormon in die Zelle aufgenommen wird⁸. Trotz dieser Daten ist der sichere experimentelle Beweis, daß Insulin in die Zelle eindringt, noch nicht erbracht.

Sonderdruckanforderungen an Univ.-Doz. Dr. HANS-G. BIEDERMANN, Anorganisch-chemisches Institut der Technischen Universität München, Arcisstr. 21, D-8000 München 2 oder: Priv.-Doz. Dr. HELMUT KOLB, Institut für Diabetesforschung, Kölner Platz 1, D-8000 München 40.

Mit Hilfe von wasserlöslichen und unlöslichen Acrylsäurecopolymeren, an die Insulin gebunden ist, wird in unserem Arbeitskreis versucht, dieser Fragestellung nachzugehen.

Das Eindringen von Insulin in die Zelle kann verhindert werden, wenn Insulin an ein unlösliches Polymeres gekoppelt wird. Behält das Insulin seine biologische Wirksamkeit, so kann angenommen werden, daß es ausschließlich an der Zellmembran seinen Angriffsort hat. Wird andererseits Insulin an ein lösliches Polymeres, das außerdem noch chelatbildende Gruppen enthält, gebunden, so kann nach Reaktion des Insulins an oder in der Zelle der Wirkungsort nach Komplexierung der Chelat-Gruppe mit schweren Metallionen elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Acrylsäuregruppen bzw. Acrylsäurechloridgruppen in den Polymeren sollen die reaktiven Gruppen für die Bindung zum Insulin liefern. An dieser Stelle berichten wir über einige vorbereitende Arbeiten zu diesem Problem.

Darstellung eines wasserunlöslichen Copolymeren aus Acrylsäure und Styrol

Unter Abwesenheit von Sauerstoff und Feuchtigkeit werden Styrol und Acrylsäure in den Molverhältnissen 85% Styrol (95%) und 15% Acrylsäure (5%) mit AIBN in Benzol polymerisiert. Die Re-

aktionsdauer wird so gewählt, daß hoch vernetzte, in Benzol unlösliche Strukturen entstehen.

Durch mehrmalige Sprühfällung in Wasser (das Polymere ist in Dioxan löslich) und Hexan werden kurzkettige Anteile entfernt. Die Copolymeren liegen als weiße, feinflockige und hydrophobe Substanzen vor.

Die NMR-Spektren (D_6 -Aceton) zeigen ein breites Signal zwischen 1,3 und 1,9 ppm, das auf die Protonen der Polymerkette zurückzuführen ist. Die Protonen des Benzolringes vom Styrol erscheinen in zwei breiten, ineinander übergehenden Absorptionen zwischen 6,5 und 7,4 ppm. In den IR-Spektren (KBr-Preßling) treten bei 1740 cm^{-1} und 1705 cm^{-1} die Acrylsäuregruppen und bei 1600 cm^{-1} die Schwingungen der Benzolringe auf. Die Elementaranalyse zeigt schließlich, daß unter den Versuchsbedingungen der beiden Ansätze 85:15 und 95:5 acrylsäurereichere Copolymere entstanden sind, nämlich 70:30 und 80:20.

Aktivierung der Copolymeren^{9,10}

Die Säuregruppen werden zuerst mit Dicyclohexylcarbodiimid verestert, das sofort durch N-Hydroxysuccinimid unter Freiwerden von Dicyclohexylharnstoff ersetzt wird. Die Aktivierung kann in heterogener Reaktion in Essigsäureäthylester oder in Hexan erfolgen. Dadurch stehen nicht alle Acrylsäuregruppen für die Veresterung und die anschließende Kopplung mit Insulin zur Verfügung.

Da in Dimethylformamid die Copolymeren löslich sind, muß nach der Veresterung der Säuregruppen das Copolymere in Hexan gefällt werden. Die Aktivierung und Veresterung kann mit Hilfe der IR-Spektren gut verfolgt werden.

Kopplung mit Insulin

Die beiden N-terminalen Aminosäuren des Insulins werden mit Citraconsäureanhydrid bei pH 7 in wässriger Lösung geschützt¹¹, wobei die zur Kopplung benötigte ϵ -Aminogruppe der Aminosäure Lysin der B-Kette freibleibt. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß ein nach dieser Methode synthetisiertes Polyvinylpyrrolidon-Insulin biologische und immunologische Aktivität besitzt¹².

Anschließend wird das Copolymere zu dem geschützten Insulin gegeben und einige Tage bei Raumtemp. gerührt. Nach Abbruch der Kopplungsreaktion wird bei pH 3,5 die Citraconsäure vom Insulin abgespalten. Das Kopplungsprodukt

wird nun mit 0,1 N NaHCO_3 (pH 8,6) gewaschen, bis die optische Dichte (bei 280 nm) gegen null geht.

Darstellung eines Copolymeren aus Acrylsäurechlorid und Styrol

Unter Stickstoffatmosphäre werden Styrol und Acrylsäurechlorid (Molverhältnis 85%:15% bzw. 75%:25%) in Benzol mit AIBN polymerisiert. Nach Abbruch der Reaktion wird in Hexan gefällt und im HV getrocknet. Die Elementaranalyse zeigt Copolymere an, die genau den eingesetzten Ausgangsmengen entsprechen.

Die Kopplung mit citraconsäuregeschütztem Insulin kann nun direkt in DMF innerhalb zwei Std. geschehen. Nach Abspalten der Citraconsäure wird über eine Sephadex (LH-20) Säule mehrfach chromatographiert. Die Menge des gekoppelten Insulins ist durch den Angriff der Acrylsäurechloridgruppen wesentlich vergrößert worden. Jedoch zeigen immunologische Tests eine geringfügige Abspaltbarkeit des Insulins.

Darstellung und Komplexierungsverhalten von Acrylsäurechlorid-Acryloylpyrrolidinon-Copolymeren und deren Reaktion mit Insulin

Darstellung von Polyacrylsäurechlorid¹³

Die Polymerisation wird mit AIBN in Dioxan durchgeführt. Die Reaktionskomponenten werden dabei unter N_2 -Gasatmosphäre in Ampullen eingeschmolzen. Nach Abbruch der Reaktion wird durch Fällung in Hexan das sehr feuchtigkeitsempfindliche Polymere isoliert. Mittlere Molmasse: 35000.

Umsetzung von Polyacrylsäurechlorid mit Pyrrolidinon¹⁴

In Dioxan gelöstes Acrylsäurechlorid reagiert unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemp. mit Pyrrolidinon.

Da für die Kopplung des Insulins noch genügend Säurechloridgruppen vorhanden sein müssen, werden nur ca. 40% der Chloridgruppen durch Pyrrolidinon ersetzt. Wegen der Bildung von Pyrrolidinonsalzen, die kurz nach der tropfenweisen Zugabe des Amins auszufallen beginnen, ist es notwendig, die doppelte Menge Pyrrolidinon zuzusetzen. Nach Ab-

filtrieren des Pyrrolidinonhydrochlorids kann das Polymere durch Sprühfällung in Hexan als feines Pulver erhalten werden. Bei pH 7 (mit NaHCO_3 eingestellt) ist das Polymere in wäßriger Lösung gut löslich.

Kopplung mit Insulin

In DMF werden citraconsäuregeschütztes Insulin und das Acrylsäurechlorid-Acryloylpyrrolidinon-Copolymere bei Raumtemp. umgesetzt.

Nach der Kopplungsreaktion wird das Polymere durch Zugabe von Wasser zur DMF-Lösung hydrolysiert. Durch Zugabe von 0,1 N NaHCO_3 -Lösung bis pH 7 bleibt das Reaktionsprodukt in Lösung.

Dieses Gemisch kann nun mit 0,1 N HCl auf pH 3,5 eingestellt werden, um die Citraconsäure zu entfernen. Die Reinigung des Reaktionsproduktes^{15,16} erfolgt durch mehrmalige Säulenchromatographie (Polyacrylamid-Gel) in H_2O .

Analoge Reaktionen wurden an Stelle des Pyrrolidinons mit 2-Hydroxypyridin, 1,2,4-Triazol und Succinimid durchgeführt.

Bei Verwendung von Succinimid konnte die beste Löslichkeit in wäßriger Lösung von mit Insulin gekoppeltem Polymeren gefunden werden.

Darstellung von Metallkomplexen der mit komplexierenden Gruppen modifizierten Acrylsäurepolymeren

Die Polyacryloylpyrrolidinonkomponente des Acrylsäure-Acryloylpyrrolidinon-Copolymeren kann über zwei Carbonylgruppen eine Chelatbindung an Metallionen eingehen:

Zu einer auf pH 7 eingestellten Lösung des Polymeren (mit NaHCO_3) werden tropfenweise folgende Metallsalzlösungen zugegeben: $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ mit $\text{La}(\text{NO}_3)_3$. Dabei werden pro Mol Acryloylpyrrolidinon ca. 1,3 mol Metallverbindung eingesetzt.

Die Metalle können einerseits über die Chelate des Polymeren gebunden sein, andererseits aber auch über die Sauerstoffatome zweier benachbarter Säure-

regruppen. Im zweiten Fall besitzt das Metall keine vom Metallsalz herrührenden Liganden. Da in der Reaktionslösung durch Zugabe von 0,1 N NaHCO_3 -Lösung auch Na^+ -Ionen vorhanden sind, findet auch die Bildung von Natriumcarboxylat statt.

Aufgrund der C, H, N und Metallanalyse läßt sich die Zusammensetzung der Komplexe weitgehend berechnen. Dabei zeigt sich, daß etwa die Hälfte der Chelate des Kupferkomplexes mit Kupferacetat besetzt sind. Die restlichen 50% Kupfer sind über zwei benachbarte Säuregruppen als Carboxylationen gebunden. Etwa 25% der noch vorhandenen Säuregruppen liegen als Natriumcarboxylat vor.

Bei den Komplexen mit $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ und $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ist der Anteil der chelatgebundenen Metallionen geringer, er liegt bei ca. 20%. Die restlichen 80% der Metalle sind wieder über Carboxylatgruppen gebunden.

Im Lanthankomplex sind nur knapp 10% des Lanthans über die Pyrrolidinongruppe gebunden; über 90% von Carboxylgruppen.

Analoge Reaktionsbedingungen liefern mit Acrylsäure-Acryloylsuccinimid-Copolymeren und Kupfer(II)acetat mit Kupfer besetzte Succinimidgruppen und Carboxylatgruppen zu etwa gleichen Anteilen.

Mit BaCl_2 ist das Verhältnis 35:65 und mit $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 20:80 zu Gunsten der carboxylatgebundenen Anteile.

Experimentelles

Darstellung der Styrol-Acrylsäure-Copolymeren (85:15, 95:5)

In einem 100 ml Kolben werden 30 mg AIBN eingewogen. Durch mehrmaliges Evakuieren und Füllen mit Stickstoff wird der Kolben von Luft befreit. Dann füllt man nacheinander 20 ml Benzol, 9,74 (10,9) ml Styrol und 1,02 (0,34) ml Acrylsäure ein, die alle unter Stickstoff frisch destilliert werden. Unter starkem Rühren läßt man den Ansatz bei 50 °C in N_2 -Gasatmosphäre etwa 7 h reagieren. Nach

Abbruch der Reaktion wird das Benzol vom Copolymerisat abfiltriert. Das Reaktionsprodukt wird in Dioxan gelöst und zweimal in 20-fachen Überschuß Wasser versprüht. Nach Abfiltrieren des Wassers wird das Copolymere wiederum in Dioxan gelöst und ebenfalls in 20-fachen Überschuß Hexan versprüht. Nach Filtration trocknet man das Copolymere *ca.* 50 h im HV.

Analyse:

Gef.	C 80,47	H 7,87	(95:5),
Ber.	C 80,8	H 7,1.	
Gef.	C 85,05	H 7,46	(85:15),
Ber.	C 85,39	H 7,34.	

Aktivierung des Copolymeren

In einem Kolben mit 30 ml Hexan bzw. Essigsäureäthylester werden 550 mg (1,66 g) Copolymeres, 9,6 mg N-Hydroxysuccinimid und 17,2 mg DCC gegeben. Nach *ca.* 50 h Rühren bei Raumtemp. wird filtriert und das Polymere im HV getrocknet.

Bei der Aktivierung in DMF werden 30 ml Lösungsmittel mit 550 mg Polymerem, 96 mg N-Hydroxysuccinimid und 172 mg Dcc vereinigt. Die Reaktionspartner lösen sich sofort in DMF auf. Der Reaktionsverlauf entspricht dem vorher beschriebenen, wobei aber Dicyclohexylharnstoff ausfällt, der nach Abbruch der Reaktion abfiltriert wird. Das aktivierte Copolymere kann anschließend in Hexan gefällt werden. Danach wird es 50 h im HV getrocknet.

Reaktion des Insulins mit Citraconsäureanhydrid

50 ml Insulin (Rinderinsulin) werden mit einem dreifachen Überschuß von in 10 ml Wasser gelöstem Citraconsäureanhydrid versetzt. Nach kurzer Zeit geht das Insulin in Lösung, welche daraufhin mit 0,1 N NaHCO₃ auf pH 7 eingestellt wird. Nach *ca.* 2 h ist die Reaktion, die unter starkem Rühren stattfindet, beendet.

Kopplung des Insulins mit dem Styrol-Acrylsäure-Copolymeren

Zu der vorher beschriebenen Reaktionslösung gibt man 56 mg des aktivierten Copolymeren (560 mg vom Copolymeren 95:5) und läßt es 48 h reagieren.

Abspaltung der Citraconsäure

Nach Abbruch der Kopplungsreaktion werden die Reaktionsgemische mit 0,1 N HCl auf pH 3,5 eingestellt und 36 h gerührt. Danach wird filtriert und das Reaktionsprodukt nochmals mit Wasser gewaschen. Das Insulin-Kopplungsprodukt enthält etwa 4 mg Insulin pro Gramm Hochpolymeres.

Darstellung von Polyacrylsäurechlorid

In einer Ampulle werden 50 mg AIBN eingewogen. Unter Ausschluß von Luft und Feuchtigkeit werden 3 ml durch fraktionierte Destillation destabilisiertes Säurechlorid und 3 ml getrocknetes

Dioxan eingefüllt und abgeschmolzen. Man polymerisiert 48 h bei 50 °C. Das Gemisch Dioxan-Polyacrylsäurechlorid wird aus den Ampullen in *ca.* 2 l Hexan versprüht.

Analyse:

Ber.	C 39,78	H 3,32,
Gef.	C 40,82	H 3,77.

Darstellung von Acrylsäurechlorid-Acryloylpyrrolidinon-Polymeren

Zu 21,5 g in Dioxan gelöstem Polyacrylsäurechlorid werden in einem Kolben unter Stickstoff und starkem Rühren 16,3 g Pyrrolidinon tropfenweise zugegeben. Kurz nach Beendigung der Aminzugabe fällt unlösliches Pyrrolidinonhydrochlorid aus. Es wird noch etwa 24 h bei Raumtemp. gerührt.

Nach Filtration wird das in Dioxan lösliche Reaktionsprodukt in Hexan versprüht. Das erhaltene Copolymere besteht zu *ca.* 30% aus Polyacryloylpyrrolidinon.

Analyse:

Ber.	C 48,46	H 4,61	N 4,04,
Gef.	C 49,89	H 4,47	N 3,89.

Kopplung von Acrylsäurechlorid-Acryloylpyrrolidinon-Copolymeren mit Insulin

50 mg Insulin werden mit Citraconsäure geschützt und das Wasser nach der Reaktion im HV entfernt. Anschließend wird das Insulin noch 3 h scharf getrocknet. Zum Insulin gibt man anschließend 500 mg in 20 ml getrocknetem DMF gelöstes Copolymeres, worauf sich das Insulin sofort auflöst. Es wird 40 h gerührt. Nach Abbruch der Reaktion wird solange H₂O zugegeben, bis sich keine Trübung mehr zeigt, wobei mit 0,1 N NaHCO₃ pH 7 eingestellt und gehalten wird.

Die Abspaltung der Citraconsäure erfolgt wie bereits beschrieben. Das Kopplungsprodukt wird dann durch Abziehen der Lösungsmittel im HV gewonnen. Auf diese Weise gelingt es, bis zu 25 mg Insulin an 1 g Hochpolymeres zu koppeln.

Darstellung der Metallkomplexe von Acrylsäure-Acryloylpyrrolidinon-Copolymeren

Acrylsäurechlorid-Acryloylpyrrolidinon-Copolymeres wird bei pH 7 (mit 0,1 N NaHCO₃ eingestellt) in *ca.* 30 ml Wasser gelöst. Dazu gibt man tropfenweise unter starkem Rühren das in möglichst wenig Wasser gelöste Metallsalz. Pro Mol Pyrrolidinon werden 1,3 mol Metallsalz eingesetzt.

Die ausgefallenen Komplexe werden filtriert, gewaschen und im HV *ca.* 70 h getrocknet.

Darstellung des Acrylsäurechlorid-Styrol-Copolymeren

109 ml Styrol (103,3) und 3,97 ml Acrylsäurechlorid (7,94) werden unter Stickstoff in 200 ml absol. Benzol gegeben und mit 150 mg AIBN bei

50 °C ca. 100 h polymerisiert. Die gelbliche viskose Reaktionslösung wird in Hexan gefällt und im HV getrocknet. Die entstandenen Copolymeren bestehen zu 85% (75%) aus Styroleinheiten und zu 15% (25%) aus Acrylsäureeinheiten.

Analyse:

(85% Styrol)	Ber.	C 85,28	H 7,16,
	Gef.	C 85,52	H 7,13.
(75% Styrol)	Ber.	C 80,48	H 6,75,
	Gef.	C 80,03	H 6,48.

Kopplung mit Insulin:

700 mg des Polymeren werden in maximal 40 ml DMF gelöst. Dazu werden 50 mg Insulin gegeben und ca. $\frac{1}{2}$ h gerührt. Anschließend wird filtriert und zu der Lösung etwa 1 g Wasser hinzugefügt und ca. 15 h gerührt (Abspaltung der Citraconsäure). Nach Zugabe von 40 ml Wasser fällt ein feinflockiger weißer Niederschlag aus, der abfiltriert und im HV getrocknet wird. Das Produkt wird in 8 ml DMF/Äther (6:1) gelöst und mehrmals über eine Sephadex (LH 20)-Säule chromatographiert. Es konnten bis zu 34 mg Insulin pro Gramm Polymeres gekoppelt werden. Tab. I zeigt die Aminosäurezusammensetzung eines unlöslichen Kopplungsproduktes nach Hydrolyse mit 6 N HCl, wie sie auch bei der Hydrolyse reinen Insulins zu erwarten ist.

Tab. I. Aminosäurezusammensetzung von polymergebundenem Insulin (85% Styrol, 15% Acrylsäurechlorid) nach Hydrolyse mit 6 N HCl bei 110 °C¹⁷.

Aminosäure	n mol	Reste*	Insulin
Asparaginsäure	42,0	2,8	3
Threonin	17,3	1,1	1
Serin	46,3	3,1	3
Prolin	14,1	0,9	1
Glutaminsäure	99,2	6,6	7
Glycin	66,4	4,4	4
Alanin	47,2	3,2	3
Valin	61,4	4,1	5
Cystin	—	—	6
Methionin	—	—	—
Isoleucin	12,0	0,8	1
Leucin	78,1	5,2	6
Tyrosin	48,3	3,2	4
Phenylalanin	41,8	2,8	3
Lysin	15,1	1,0	1
Histidin	27,4	1,8	2
Arginin	18,7	1,2	1

* 15 nm = 1 Rest = 1 nmol Insulin.

Umsetzung von Polyacrylsäurechlorid mit 2-Hydroxypyridin

Zur Lösung von 9,26 g Polyacrylsäurechlorid in 60 ml Dioxan werden unter N₂-Gasschutz 7,8 g 2-Hydroxypyridin in 200 ml Dioxan langsam zugegeben. Es fällt sofort ein Niederschlag aus, der sich

nach Zugabe weiterer 200 ml Dioxan größtenteils wieder löst.

Nach Filtration wird das Filtrat eingengt (ca. 50 ml) und in viel Hexan versprüht. Weiße Flocken, die im HV 8 h getrocknet werden. Unter diesen Bedingungen treffen im Polymeren auf 10 Acrylsäurechlorideinheiten 4 2-Hydroxypyridineinheiten.

Umsetzung von Polyacrylsäurechlorid mit 1.2.4-Triazol

Zu 11 g Polyacrylsäurechlorid in 70 ml THF wird eine Lösung auf 6,7 g Triazol in 200 ml THF getropft. Es fällt sofort ein weißer Niederschlag aus (Triazolhydrochlorid). Nach Filtration wird die Lösung in ca. 3 l Hexan gefällt. Das feinflockige Produkt wird mit Hexan gewaschen und im HV 150 h getrocknet. Pro 10 Einheiten Acrylsäurechlorid treffen 4 Triazoleinheiten.

Umsetzung von Polyacrylsäurechlorid mit Succinimid

7,5 g Polyacrylsäurechlorid und 4,1 g Succinimid werden in je 50 ml absol. Dioxan gelöst, zusammengegeben und gerührt.

Nach 10 h wird das ausgefallene Salz abfiltriert und die Lösung eingengt. Diese wird anschließend in viel Hexan versprüht und das feinflockige Produkt 200 h im HV getrocknet. Auf 10 Acrylsäurechlorideinheiten treffen 3 Succinimideinheiten.

Die Kopplung mit Insulin verläuft wie bereits vorher beschrieben durch direkten Angriff der Säurechloridgruppen auf die Lysin-NH₂-Gruppe des terminalständig geschützten Insulin.

Darstellung von Metallkomplexen des Acrylsäure-Succinimid-Polymeren

Mit BaCl₂ · 2H₂O: 300 mg Polymeres werden in 25 ml H₂O gelöst unter Zugabe von ca. 400 mg NaHCO₃ (pH 7). Dazu werden 370 mg BaCl₂ · 2H₂O, gelöst in wenig Wasser, gegeben. Sofort fällt ein weißer Niederschlag aus, der filtriert und getrocknet wird. Der Komplex enthält ca. 4,3% Ba und 1,5% Na.

Mit Cu(acetat)₂ · H₂O: 400 mg Polymeres werden in 25 ml Wasser unter Zugabe von 430 mg NaHCO₃ gelöst (pH 7). Dazu werden 300 mg Cu(acetat)₂ · H₂O, in wenig Wasser gelöst, zugeotropft. Der blaue Niederschlag wird abgesaugt, gewaschen und getrocknet. Der Komplex enthält ca. 1% Na als Acrylsäuresalz und ca. 11,5% Kupfer zur Hälfte als Acrylsäuresalz und zur Hälfte am Succinimidkomplex gebunden.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie sei für die Unterstützung der Arbeit gedankt.

Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1975.

⁴ R. GEIGER, Chem.-Ztg. **100**, 111 [1976].

⁵ P. CUALRECASAS, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **63**, 450 [1969].

¹ S. J. PILKIS und C. R. PARK, Ann. Rev. Pharmacol. **14**, 368 [1974].

² M. E. KRAHL, Ann. Rev. Physiol. **36**, 331 [1974].

³ G. LÖFFLER und L. WEISS, in K. OBERDISSE: Handbuch der Inneren Medizin VII/2A, S. 249–303,

- ⁶ H. J. KOLB, R. RENNER, K. D. HEPP, L. WEISS und O. H. WIELAND, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 248 [1975].
- ⁷ I. D. GOLDFINE und G. J. SMITH, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **73**, 1427 [1976].
- ⁸ I. D. GOLDFINE, G. J. SMITH, K. Y. WONG und A. L. JONES, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **74**, 1368 [1977].
- ⁹ R. GEIGER, *Chem. Unserer Zeit* **7**, 131 [1973].
- ¹⁰ B. U. v. SPECHT, H. SEINFELD und W. BRENDDEL, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **354**, 1659 [1973].
- ¹¹ H. ZAHN, D. BRANDENBURG und H. G. GATTNER, *Diabetes* **21**, 468 [1972].
- ¹² H. J. KOLB, B. U. v. SPECHT, R. RENNER und K. D. HEPP, *Diabetes* **25**, 370 [1976].
- ¹³ R. C. SCHULZ, P. ELZNER und W. KERN, *Makromol. Chem.* **42**, 189 [1960].
- ¹⁴ R. C. SCHULZ, P. ELZNER und W. KERN, *Makromol. Chem.* **42**, 197 [1960].
- ¹⁵ B. U. v. SPECHT, M. WAHL, H. J. KOLB und W. BRENDDEL, *Arch. Int. de Pharmacodyn. Ther.* **213**, 242 [1975].
- ¹⁶ D. M. KRÄMER und K. LEHMANN, *FEBS Lett.* **22**, 49 [1972].
- ¹⁷ D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN und S. MOORE, *Anal. Chem.* **30**, 1190 [1958].