



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) **170428**

(13) B

(51) Int Cl<sup>5</sup> C 08 J 9/22, C 07 K 1/04

Styret for det industrielle rettsvern

---

(21) Søknadsnr	881761	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	22.04.88	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	22.04.88	(30) Prioritet	24.04.87, GB, 8709689
(41) Alm. tilgj.	25.10.88		24.11.87, GB, 8727474
(44) Utlegningsdato	06.07.92		

---

(71) Patentsøker	Unilever NV, Burgemeester s'Jacobplein 1, Rotterdam, NL
(72) Oppfinner	David Colin Sherrington, Lenzie, Kirkintilloch, Skottland, GB Philip William Small, Wirral, Merseyside, England, GB
(74) Fullmektig	Sigrun E. Græsbøll, Bryn & Aarflot AS, Oslo

---

(54) Benevnelse **Substrat av polymert materiale, samt fremgangsmåte for fremstilling av substratet og fremgangsmåte for peptid-syntese**

(56) Anførte publikasjoner Europeisk (EP) patentsøknad, publ. nr. 48110, Britisk (GB) patent nr. 1574414, 1600241.

(57) Sammendrag

Et substrat som omfatter et porøst polymermateriale som har en porøsitet på minst 75% og omfatter porer som har en diameter innen området 1 til 100 µm og er gjensidig forbundet ved en flerhet av hull, og en gel eller et materiale tilpasset for i bruk å danne en gel, hvor gelen eller for-gel-materialene inneholdes og tilbakeholdes inne i porene i polymermaterialet og er tilpasset for i bruk gjensidig å påvirke et reaktivt stoff, og kan dannes ved å avsette og tilbakeholde gelen, eller et materiale tilpasset for i bruk å danne en gel, inne i porene i det porøse polymermateriale. Den høye porøsitet hos det porøse polymermateriale i kombinasjon med tilbakeholdelsen av gelen inne i porene gir anledning til at høye belastningskapasiteter, spesielt når det gjelder peptid-syntese, kan oppnås. Substratet kan anvendes ved kjemisk syntese, kromatografiske teknikker, ionebytting og separasjons-teknikker.

Foreliggende oppfinnelse vedrører nye substrater, fremgangsmåter for fremstilling av slike og syntetisering av kjemiske forbindelser og peptider.

Visse former av substratet anvendes ved en rekke kromatografiske teknikker og fremgangsmåter ved kjemisk syntese. Ved en enkel satsvis drift inneholdes substratet i et kar og påvirker gjensidig etter hverandre tilsatte reagenser som så blir fjernet ved filtrering og omhyggelig vasking. Ved en kontinuerlig eller halv-kontinuerlig prosess er substratet i form av et sjikt så som en kolonne, og forskjellige reagenser blir etter hverandre ført gjennom sjiktet.

Kontinuerlige og halv-kontinuerlige teknikker gir således vanligvis fordeler overfor satsvis drift med hensyn til å oppnå lett drift, men de kan ikke desto mindre gi problemer med hensyn til volumforandring i sjiktet som resulterer i trykkforandringer ved gjennomflytingen gjennom kolonnen. Slike problemer kan være spesielt påtrengende når substratet omfatter en eller annen gel-form. En omtale av disse problemer på området fast-fase-syntese finnes i Dryland og Sheppard, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 1986, s. 125 til 137. En ytterligere relevant publikasjon på dette området er Epton, Marr, McGinn, Small, Wellings og Williams, Int. J. Biol. Macromol 1985 7, s. 289 til 298. Det er kjent, som forklart i den første av disse publikasjoner, når det dreier seg om gel-substrat, å tilveiebringe en stiv ramme for å innelukke gel-polymeren, som er således oppbygget at det opprettholdes kanaler for væskestrøm, og dog tillates diffusjon av reaktanter inn i og ut av gel-matriksen.

U.S.-patentskrift nr. 3.991.017 beskriver et substrat for anvendelse i ionebytterharpikser i hvilket en tverrbundet kopolymer av gel-type i det minste delvis fyller makroporene i en makroretikulær ionebytterharpiks. De makroretikulære polymerer har typisk et overflateareal på minst 1 m<sup>2</sup> pr. gram, og mer vanlig minst 5 m<sup>2</sup> pr. gram, og har porer som er større enn 15 til 20 Å-enheter. De makroretikulære polymerer er konvensjonelt i perle-form og vanligvis med en total partikkelstørrelse på 10 til 900 mikrometer. Minst 5 vekt-deler av geldannende komponenter, og opptil maksimalt 300 vektdeler av gel-kopolymer

pr. 100 vektdeler av makroretikulær basis-polymer, blir passende anvendt.

Britisk patentskrift nr. 1.574.414 beskriver et komposittmateriale som omfatter en flerhet av atskilte partikler av et porøst stivt bæremateriale som har en deformerbar gel innen porestrukturen til partiklene. Partiklene er atskilte porøse partikler av uorganisk materiale så som naturlig diatoméjord.

Det er et formål med foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe et forbedret substrat for anvendelse til for eksempel fast-fase-syntese, kromatografi og ionebytte-formål. Det er et ytterligere formål med foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe et slikt substrat at det blir mulig å oppnå forbedrede belastningsfaktorer.

I henhold til et første aspekt ved foreliggende oppfinnelse er det tilveiebrakt et substrat som omfatter et porøst, tverrbundet polymermateriale som har en gel som inneholdes og tilbakeholdes i nevnte porestruktur ved gjensidig påvirkning mellom overflatene av det nevnte polymermateriale, idet gelen er polymer, og substratet er karakterisert ved at gelen har en reaktiv funksjonalitet, og at det nevnte polymermateriale har en porestruktur som gir en åpen porøsitet på minst 75% og omfatter celler som har en diameter i området 1-100  $\mu\text{m}$  som er gjensidig forbundet ved hull, idet cellene og hullene i det nevnte polymermateriale har en form og oppbygning som resulterer fra polymerisasjon av forløpermaterialet for polymermaterialet i et emulsjonssystem med høy indre fase.

Den gjensidige påvirkning mellom gelen og et reaktivt stoff vil bli valgt med henblikk på den ønskede anvendelse av kompositt-substratet. Når det dreier seg om kjemisk syntese, er den gjensidige påvirkning passende den med kjemisk binding, og gelen er tilpasset til dette.

Ved anvendelse av foreliggende oppfinnelse blir det tilveiebrakt et substrat i hvilket gelen, når det dreier seg om syntese, er i stand til en belastning av de reaktive rester på opptil 5 mmol av syntetisert kjemisk forbindelse pr. g av kompositt-substrat. Gelen er passende en sterkt løsningsmiddel-svellet tverrbundet gel og kan for eksempel være en myk

deformerbar polyamidgel. Eksempler på andre geler som kan anvendes, inkluderer geler av polystyrener, sakkarose, dekstraner, polyakryloylmorfolin, polyakrylater, polymetylakrylater, polyakrylamider, polyakrylolpyrrolidon, polyvinylacetater, polyetylglykol, agaroser, sefarose, andre konvensjonelle materialer av kromatografi-type og derivater og blandinger derav. Det høyporøse materiale har fortrinnsvis et porevolum på 75 til 98%, mer foretrukket 85 til 98%, og enda mer foretrukket 90 til 95%. Materialet er passende et tverrbundet polymermateriale. På vekt-for-vekt-basis kan forholdet mellom svellet gel og porøst materiale ligge i området fra 60:40 til 95:5 for svellet gel:porøst materiale, mer foretrukket fra 75:25 til 95:5, og med et foretrukket forhold på ca. 80:20.

Det porøse materiale kan være i partikkelform, fortrinnsvis med en partikkelstørrelse mellom 125 og 1500  $\mu\text{m}$ , og mer foretrukket mellom 250 og 850  $\mu\text{m}$ , og kan for eksempel være det tverrbundne vinylmateriale som er beskrevet i EP-patentsøknad, publ.nr. 60138, eller et sterkt porøst tverrbundet polymert polykondensasjonsmateriale beskrevet i EP-søknad, publ.nr. 289.238. Begge disse porøse materialer har et høyt porevolum og kan ha porer innen området på tilnærmet 1 til 100  $\mu\text{m}$ , fortrinnsvis 1 til 50  $\mu\text{m}$ . Materialer dannet ved fremgangsmåten beskrevet i EP 60138 eller EP 289.238 er spesielt egnet for anvendelse ved foreliggende oppfinnelse siden de er sterkt porøse og kan bestå av regelmessig formede, fullstendig gjensidig forbundne celler. En slik kombinasjon av trekk tilveiebringer en struktur som kan fremvise hurtig opptak av fluider og relativt uhindret flyting gjennom matriksen. Disse porøse strukturer blir passende dannet ved hjelp av en høy-indre-fase-emulsjon og har således den fordel at de kan oppbygges reproduserbart for å tilveiebringe et område av celle-størrelser og gjensidig forbundne hull. De porøse polymermaterialer er fortrinnsvis tverrbundet i en slik utstrekning at de ikke sveller til mer enn det dobbelte av sitt tørre sjiktvolument ved anvendelse. Gjennom hele denne beskrivelse refererer porøsitetsverdier og porestørrelsemålinger til det porøse polymermateriale i den usvellede tilstand.

Gelen dannes fortrinnsvis in situ i porene av det porøse

materiale. Det partikkelformede porøse materiale kan blandes med en løsning som gjennomtrenger de åpne gjensidig forbindende porer i det partikkelformede materiale og danne gel deri. Det resulterende materiale blir fortrinnsvis anbrakt, eller kan dannes, i en kolonne for å tilveiebringe et passende gjennomflyte-system, for eksempel for utførelse av en kjemisk syntese. Alternativt kan det porøse materiale være i form av monolittiske blokker, og gelen kan dannes in situ etter gjennomtrengingen inn i de gjensidig forbindende porer i blokkene.

I henhold til et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for fremstilling av det nevnte substrat, for anvendelse i kjemisk syntese, som omfatter følgende trinn:

- a) å danne et porøst, tverrbundet polymermateriale som har en porestruktur som tilveiebringer en åpen porøsitet på minst 75% og omfatter celler som har en diameter i området 1-100  $\mu\text{m}$  som er gjensidig forbundet ved hull, ved polymerisasjon av et forløpermateriale for dette i et emulsjons-system med høy indre fase,
- b) å tilveiebringe en polymergel som har reaktiv funksjonalitet som er tilgjengelig for anvendelse i kjemisk syntese i nevnte porestruktur til det nevnte porøse polymermateriale, idet gelen utsettes for gjensidig påvirkning fra det nevnte porøse polymermateriale slik at det tilbakeholdes i porestrukturen.

Fremgangsmåten inkluderer fortrinnsvis å danne gelen inne i porene av det porøse materiale. Mer foretrukket inkluderer fremgangsmåten å danne gelen inne i porene av det porøse materiale og samtidig holde tilbake gelen under dens dannelse inne i porene av det porøse materiale. Gelen kan for eksempel dannes ved de konvensjonelle polymerisasjons- og kopolymerisasjons-måter for å danne geler, for eksempel ved friradikalvinylpolymerisasjon, polykondensasjons-reaksjoner og tverrbinding av løselige, lineære polymerer.

Gelen og de porøse polymermaterialer er passende slike som nevnt ovenfor. Vi har spesielt funnet at anvendelse av porøse polymermaterialer som beskrevet i EP-patentsøknader, publ.nr.

60138 eller EP 289.238 som har gjensidig forbundne porer, muliggjør lett adgang for gelmaterialene inn i porene og deretter lett adgang for reaktive stoffer ved anvendelse.

Fremgangsmåten inkluderer fortrinnsvis å danne gelen inn i porene av det porøse materiale. Tilbakeholdelsen av gelen inne i porene er fortrinnsvis ved kjede-sammenfloking og/eller gjensidig gjennomtrenging mellom gelen og overflaten av det porøse polymermateriale og/eller ved en fremgangsmåte som er antatt å involvere kjemisk binding av gelen til overflaten av porene i det porøse materiale.

Fremgangsmåten inkluderer således fortrinnsvis avsetning og tilbakeholdelse av gelen inne i porene av det porøse polymermateriale ved å utsette porøst tverrbundet polymermateriale for en løsning som omfatter et svelle-løsningsmiddel for det porøse polymermateriale og gel-forløper-materialer, som muliggjør at gel-forløper-materialene gjennomtrenger det svelledede polymermateriale og danner gelen fra gel-forløper-materialene inne i porene. Fremgangsmåten inkluderer fortrinnsvis i tillegg eller alternativt å avsette og holde tilbake gelen inne i porene av det porøse materiale hvorpå det er reaktive grupper, ved å la gel-forløper-materialene gjennomtrengre porene til polymermaterialet og danne gelen fra gel-forløpermaterialene inne i porene og samtidig la gelen og/eller gel-forløperen omsettes med de reaktive grupper på porene av det porøse polymermateriale.

Ved den tilbakeholdelses-metode som omfatter kjede-sammenfloking/gjensidig gjennomtrenging, blir det passende anvendt et porøst tverrbundet polymermateriale som er blandet med forløperne for dannelse av gelen i nærvær av et svellemiddel for polymermaterialet. Når gel-forløperne gjennomtrenger det porøse polymermateriale, sveller det porøse materiale og innfanger den sammentrekkbare del av det tverrbundne svelledede gelmateriale som dannes ved gjensidig polymerkjede-gjennomtrenging mellom de svellende polymere polymermateriale og den tverrbundne svelledede gel som dannes. Tverrbinding av det porøse polymermateriale i en slik grad at det kan svelle opptil det dobbelte av dets tørre sjikt volum, er funnet passende. Passende svelle-løsningsmidler vil avhenge av naturen til det porøse

polymermateriale. For polystyren vil for eksempel egnede løsningsmidler være halogenkarboner så som dikloretan, diklorometan, kloroform, toluen og tetrahydrofuran. Gelmaterialet er passende de monomer-forløpere som gjennomtrenger porene og polymeriserer in situ, hvilket fører til kjede-sammenfloking og gjensidig gjennomtrenging.

Når tilbakeholdelsen er antatt å skyldes kjemisk binding mellom det sterkt porøse materiale og det beskrevne materiale som ved anvendelse skal være i form av en gel, kan den kjemiske binding oppnås ved omsetning mellom den lett dannede gel og reaktive grupper på det porøse materiale og/eller ved omsetning med reaktive grupper på det porøse materiale under geldannelse. Et eksempel på denne siste teknikk er vinyl-polymerisasjon for å danne gelen og samtidig festing via en reaktiv gruppe på det porøse materiale. Referanser gjennom hele denne beskrivelse til kjemisk binding mellom gelen og det porøse polymermateriale skal forstås som den antatte mekanisme når det gjelder den godt-gjørelse som er gitt nedenfor.

Det porøse materiale med de reaktive grupper kan lett dannes in situ, eller det porøse materiale kan behandles etter fremstillingen for at det skal inneholde de reaktive grupper. Passende reaktive grupper inkluderer vinyl, aminometyl og karboksyl.

Påvisning som viser en liten forskjell i fremtreden mellom disse to måter for oppnåelse av tilbakeholdelse, kan gis som følger, og denne viser begunstigelse for bindingsmåten og viser at bindingen trolig er kjemisk kovalent binding. For hver utførelse ble det fremstilt en prøve av substrat, og utbyttet av kompositt-substrat i forhold til utgangsmaterialene ble beregnet. For kjede-sammenflokingsmåten med svelling av det porøse polymermateriale ble det oppnådd 70% tilbakeholdelse av gelen i kompositt-substratet. For den antatte bindingsmåte ble det oppnådd 100% inkludering av gelen, hvilket viser fullstendig tilbakeholdelse av gelen i det porøse materiale. For å sammenligne med bare gjennomtrengingen av gelen inn i det porøse polymermateriale uten noen aktive trinn for å bevirke tilbakeholdelse ble det da oppnådd 0% inkludering av gel etter

konvensjonelle vasketrinn.

I henhold til et tredje aspekt ved foreliggende oppfinnelse er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for peptidsyntese, hvor det substrat som anvendes for syntesen er det substrat som er beskrevet ovenfor, idet et reaktivt stoff føres gjennom substratet, fortrinnsvis under flyteforhold, for å gjensidig påvirkes av det reaktive stoff.

Eksempler på anvendelse av den foreliggende metode inkluderer således: kjemisk syntese innbefattet peptid-syntese, oligonukleotid-syntese, oligosakkarid-syntese og monoklonal-syntese; kromatografi; ionebytte; og separate teknikker innbefattet gel-elektroforese. Ved kjemisk syntese kan et første stoff føres gjennom substratet, og så kan ytterligere reaktive stoffer føres i rekkefølge gjennom substratet for således å omsettes med den reaktive rest som da er til stede og festes kjemisk til substratet. Eventuelt kan den endelige kjemiske sammensetning fraskilles og fjernes fra substratet. Den foreliggende fremgangsmåte kan således være spesielt egnet for syntese av peptider.

Substratet kan være hvilket som helst av slike som er beskrevet ovenfor. Ved hjelp av foreliggende anvendelse kan sekvensiell syntese foregå med høyt utbytte. Den kjemiske natur til den sterkt svullete gel i et gjennomflyttings-system muliggjør at reaktive rester kan festes med en høy belastning som fører til høye utbytter. Ved peptid-syntese kan det oppnås utbytter på 0,1 til 5 mmol pr. g av kompositt-substrat.

Ved en foretrukket utførelse ved hvilken gel inneholdes og tilbakeholdes inne i porene på et sterkt porøst polymermateriale, kan det samlede substrat ikke desto mindre være i alt vesentlig stivt, usammenpressbart og homogent. Med et slikt substrat i form av en pakket kolonne kan det oppnås flyte-hastigheter egnet for drift ved flyting. Satsvis drift kan alternativt anvendes.

Dessuten kan det ved en mer foretrukket utførelse ved hvilken gelen er antatt å være kjemisk bundet til det porøse polymermateriale, oppnås egnede flytehastigheter uten at gelen blir vasket ut av det porøse materiale eller går tapt i løsning.

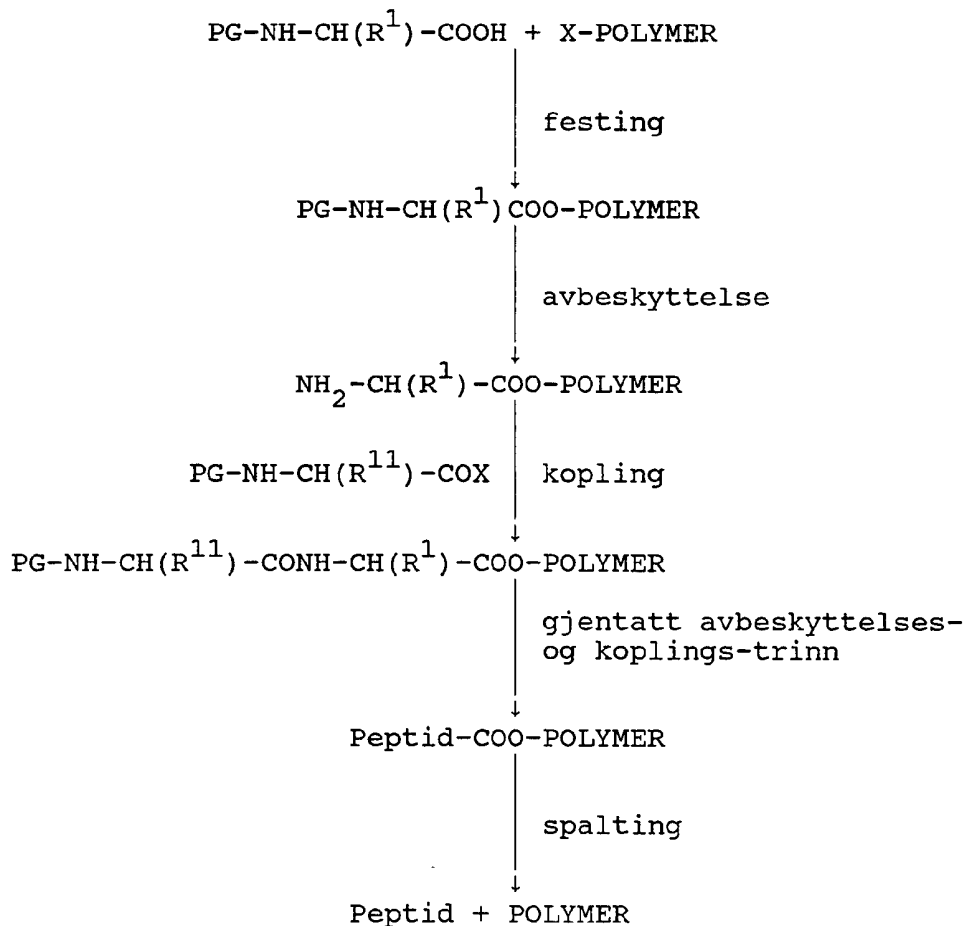
Utførelser av foreliggende oppfinnelse vil nå bli beskrevet

med henvisning til de følgende eksempler.

Foreliggende oppfinnelse kan anvendes på en rekke systemer. Ett system som imidlertid er av spesiell interesse, er peptid-syntese. Det foreliggende system er spesielt anvendbart ved peptid-syntese siden det egner seg til gjentatte sekvensielle reaksjoner med en relativt høy gjennomførings-hastighet.

Ved et peptidsyntese-skjema er således den reaktive gruppe (X) festet til polymeren og blir omsatt med den første aminosyre i sekvensen ved syntetiseringen. Denne første aminosyre inneholder sin egen beskyttelsesgruppe (PG). Etter avbeskyttelse blir en ytterligere beskyttet aminosyre festet og så blir prosessen med avbeskyttelse og kopling gjentatt inntil den ønskede aminosyre-sekvens er dannet. Det resulterende peptid blir så fraskilt fra polymerbæreren og kan om ønskes renses.

Skjematisk kan peptid-syntesen fremstilles som følger:



Ved én utførelse foregår syntesen inne i en sterkt svellet deformerbar polyamidgel som er polymerisert inne i porestrukturen til det strukturelle polymermateriale, som er stivt. Diffusjon av reaktanter inn og ut av polyamidgelen hvor reaksjonen foregår kan være rask, og det utvikles ubetydelig trykk når systemet for eksempel er i form av en kolonne under vanlige flyteforhold. Syntese under flyte-forhold er foretrukket, siden flytesystemer vanligvis gir større anledning til analytisk regulering. Den kontinuerlige overvåking av utstrømmende strømmer ved UV-VIS-spektr-fotometri og andre kontinuerlige overvåkingsteknikker kan for eksempel lett utføres og gir potensiale for automatisk tilbakekopling av hver syntesyklus.

#### EKSEMPEL 1

##### Fremstilling av substrat

Et tverrbundet porøst polyvinyl-polymermateriale dannet ved høy-indre-fase-emulsjons-metoden som er beskrevet i vårt EP-patent nr. 60138, ble anvendt som struktur-bærer. Den hadde 90% porevolum, og benyttet 10% av tverrbindingsmidler divinylbenzen og hadde en densitet på 0,047 g/cm<sup>3</sup>. Polymermaterialet var i form av et malt og siktet pulver med en partikkelstørrelse innen området 850 til 1200 µm. Dets porestørrelse var innen området 1 til 50 µm.

Polymergel-matriksen var av poly(N-2-(4-acetoksyfenyl)etyl)akrylamid). En løsning av 2,5 g av monomeren N-(2-(4-acetoksyfenyl)etyl)akrylamid, 0,075 g av tverrbindingsmidler etylen-bis(akrylamid) og 0,1 g av initiatoren azobisisobutyronitril ble fremstilt i 10 cm<sup>3</sup> dikloretan og deoksygenert ved spyling med nitrogen.

Det malte og siktede partikkelformede polymermateriale (0,7 g) ble satt til løsningen, og polymeriseringen av akrylamidet ble initiert ved oppvarming av blandingen ved 60°C mens prøven ble rotert på en roterende inndamper modifisert for tilbakeløp. Dikloretanet tjente til å svulle det porøse polymermateriale og muliggjorde lett gjennomtrenging av polyamid-monomeren og etterfølgende innfangning og gjensidig

gjennomtrenging av det polymeriserende polyamid i det porøse polymermateriale.

Etter 1 times reaksjonstid ble den resulterende kompositt vasket uttømmende med dimetylformamid og dietyleter og så vakuuttørket. Utbyttet av den resulterende kompositt var 2,7 g, og gelen ble tilbakeholdt inne i det porøse polymermateriale på grunn av kjede-sammenfloking.

0,25 g av kompositten ble behandlet med 5%ig løsning av hydrazin-hydrat i dimetylformamid i 5 minutter. Denne behandling tilveiebrakte frie fenoliske funksjonaliteter innen den sekundære gel-matriks som virker som reaktive grupper (X).

#### Peptid-syntese

For å starte en peptid-syntese ble 0,95 g (5,0 mmol) t-butyloksy-karbonyl-alanin og 1,24 g (6 mmol) dicykloheksyl-karbodiimid oppløst i 10 cm<sup>3</sup> dimetylformamid og hensatt for omsetning i 30 minutter under omrøring. Denne aktiverte form av det således dannede beskyttede aminosyre-(O-acyl-urinstoff) ble satt til det tørkede kompositt-substrat (0,25 g), fulgt av 0,24 g (2,0 mmol) dimetylaminopyridin, og forestringsreaksjonen fikk foregå i 24 timer, og herunder ble blandingen agitert ved å føre nitrogen igjennom i en fast-fase-reaktor. Ved slutten av denne tid ble kompositten vasket uttømmende med dimetylformamid og dietyleter. Vekten av den belastede kompositt var etter omsetningen 0,52 g.

For å fjerne beskyttelsesgruppen (PG = t-butyloksy-karbonyl) ble 0,50 g av det belastede kompositt-substrat holdt tilbake i fast-fase-reaktoren og 9 cm<sup>3</sup> benzylalkohol ble tilsatt. Suspensjonen ble rørt under nitrogen i 1 time hvilket er tilstrekkelig tid til at den sekundære gelmatriks kan svulle i benzylalkoholen. 1 cm<sup>3</sup> av avbeskyttelses-reagensen bortri-fluorid-eterat ble tilsatt og reaksjonsblandingen i nitrogen ble rørt i 3 timer. Kompositten ble vasket uttømmende med dimetyl-acetamid og dietyleter.

For å utføre kontinuerlig flyte-syntese ble den resulterende kompositt overført til en kolonne i Pepsynthetiser Mk2 (fra Cambridge Research Biochemicals), som er en halv-

automatisk kontinuerlig peptid-flyte-syntetiserings-innretning. Kolonnen ble først spylt med en løsning av 0,2 g (2 mmol) N-metylmorfolin i 50 cm<sup>3</sup> dimetylformamid for å frigjøre de frie terminale aminogrupeer, fulgt av en gjennomgående vasking med dimetylformamid.

#### Ytterligere kjede-forlengelse

Det syntetiske anhydrid av Fmoc-Proline (PG = Fmoc = fluorenylmetoksykarbonyl) ble fremstilt ved å omsette 0,80 g Fmoc-Pro-OH (2,4 mmol) med 0,23 g dicykloheksylkarbodiimid i diklormetan i 30 minutter. Den resulterende utfelling ble fjernet ved filtrering. Løsningsmidlet ble avdampet under redusert trykk og det resulterende faste stoff ble oppløst i 3 cm<sup>3</sup> dimetylformamid.

Løsningen ble trukket inn i kolonnen i Pepsynthesiser-innretningen, som var innstilt til å operere på resirkuleringsmåte. Etter 25 minutter ble en liten prøve av komposittsubstratet tatt ut av kolonnen, vasket med dimetylformamid og eter og utsatt for Kaiser-testen (ninhydrin) for påvisning av primært amin. Testen var negativ, og Pepsynthesiser-innretningen ble derfor koplet om til vaskemetode ved anvendelse av dimetylformamid.

#### Avbeskyttelse

Fjerning av Fmoc-gruppen ble utført ved å la 20% dietylamin i dimetylformamid flyte gjennom kompositten i 10 minutter, fulgt av vasking ved anvendelse av dimetylformamid.

To ytterligere koplingsstrinn ble utført i henhold til den følgende sekvens:

(i) kopling med Fmoc-alanin (0,74 g, 2,4 mmol), (ii) avbeskyttelse med 20% piperidin i dimetylformamid, og (iii) kopling med Boc-alanin (0,44 g, 2,4 mmol).

Aminosyrene ble omsatt, etter pre-aktivering som det symmetriske anhydrid, ved anvendelse av den tidligere angitte fremgangsmåte og med de ovenfor angitte mengder.

### Fraskilling

Komposittene ble tatt ut av instrumentet, og en prøve på 100 mg ble utsatt for hydrazinolyse ved omsetning med 0,1 cm<sup>3</sup> hydrazin-hydrat i 5 cm<sup>3</sup> dimetylformamid i 2 minutter. Reaksjonsløsningen ble trukket inn i avkjølt dietyleter og utfellingen ble oppsamlet med filtrering. Utfellingen ble uttømmende vasket med dietyleter og ble vakuomtørket. Den vaskede og tørkede utfelling omfatter Boc-Ala-Ala-Pro-Ala-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub> med et utbytte på 61 mg.

### Analytiske kontroller

Produktet ble utsatt for: tynn-sjikt-kromatografi (silikagel 60<sub>254</sub>): propanol: H<sub>2</sub>O (3:1) R<sub>f</sub> = 0,78; kloroform : metanol (4:1) R<sub>f</sub> = 0,71 (begge homogene, enkle komponenter); og væske-kromatografi med høy ytelse (Waters Novapak C-18 kolonne) : R<sub>T</sub> = 12,5 min. (>90%) løsningsmiddel B vann inneholdende 0,1% trifluoreddiksyre; løsningsmiddel C acetonitril inneholdende 0,1% TFA, gradient 100% B til 70% C over 30 minutter.

Aminosyre-analyse gav et mol-forhold for Ala (2,9) og Pro (1,0).

### EKSEMPLER 2 OG 3

De foreliggende eksempler vedrører fremstilling av et substrat som omfatter et funksjonalisert porøst polymermateriale som blir kjemisk omsatt med en gel under fremstillingen av gelen.

I hovedtrekk ble det forhåndsformede porøse polymermateriale omsatt med N-hydroksymetylftalimid i nærvær av en katalysator (trifluormetansulfonsyre, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H) for å gi et ftalimid-derivat som ved nukleofil saksing med hydrazin tilveiebringer det porøse aminometyl-polymermateriale.

Dette derivat tilveiebringer ved omsetning med akryloyl-klorid et porøst polymermateriale med dobbeltbindinger ved overflatene av porene. Ved innføring av pre-gel-materialet i form av monomer i strukturen, fulgt av initiering av polymerisasjonen (varme), antas det at også overflate-dobbeltbindingene i det porøse materiale deltar i omsetningen, og danner det som er antatt å være en gel kjemisk bundet til det porøse polymermateriale.

EKSEMPEL 2Fremstilling av substrat

Et tverrbundet porøst polyvinyl-polymermateriale dannet ved den høy-indre-fase-emulsjonsmetoden som er beskrevet i EP-patent nr. 60138, ble anvendt som utgangsmateriale for strukturbæreren. Den hadde 90% porevolum og en densitet på 0,047 g/cm<sup>3</sup> og var dannet av en 10:90-blanding av kommersiell divinylbenzen og styren. Den hadde porestørrelser innen området 10 til 20 µm. Polymermaterialet var i form av malt og siktet pulver med en partikkelstørrelse innen området 425 til 850 µm.

Det pulveriserte polymermateriale (10 g, 10 mmol), forhåndsvasket og malt til størrelser fra 425 til 850 µm, og N-hydroksymetylfthalimid (5,85 g, 0,03 mol) ble anbrakt i en trehals-kolbe med rund bunn (500 cm<sup>3</sup>). Den resulterende harpiks ble suspendert i et blandet løsningsmiddelssystem av trifluor-eddiksyre : diklormetan (1:2) (totalt volum 300 cm<sup>3</sup>). Trifluor-metan-sulfonsyre (0,9 cm<sup>3</sup>, 0,01 mol) ble langsomt satt til den hurtig rørte reaksjonsblanding. Så snart ensartet blanding var oppnådd, og reaksjonsblandingen syntes å være konsistent, ble røringen avsluttet for å hindre ytterligere fragmentering av polymerpartiklene.

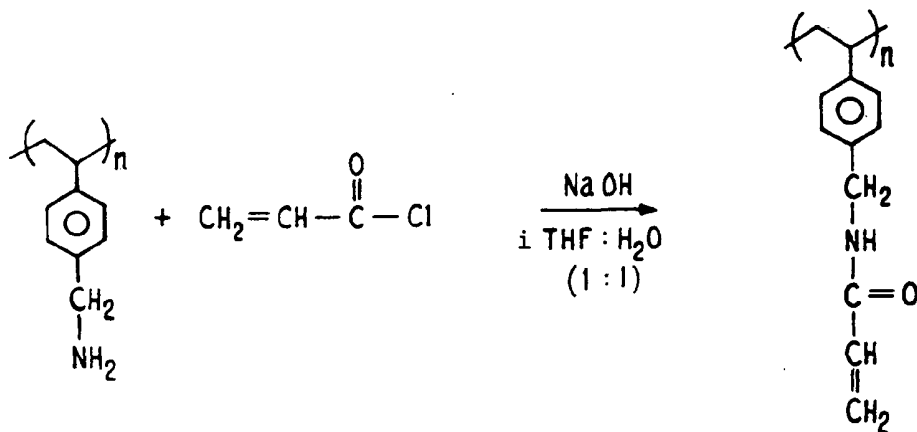
Blandingen ble hensatt ved romtemperatur natten over (d.v.s. 16 timer).

Harpiksen ble overført til en sintret trakt og vasket med diklormetan (2 x 200 cm<sup>3</sup>) og etanol (2 x 200 cm<sup>3</sup>).

Den fuktige ftalimidoharpiks ble anbrakt i en rund-bunnet trehals-kolbe (1 liter). Etanol (422,5 ml) inneholdende 5% hydrazin (22,5 ml) (totalt volum 450 ml) ble satt til harpiksen, og blandingen ble hensatt for tilbakeløp under omrøring i 16 timer. En ninhydrin-test etter 5 timer gav imidlertid et positivt resultat, og omsetningen ble fortsatt. Omsetningen ble avsluttet etter 16 timer ved filtrering av harpiksen, mens den var varm, og vasking med varm etanol (4 x 100 ml) og kald metanol (4 x 100 ml). Harpiksen ble anbrakt i en vakuumovn ved romtemperatur, og aminometyl-polymermateriale (10,21 g) av partikkelformet natur ble oppnådd. Materialet gav en intens blå farve ved en endelig ninhydrin-test, og dette viser at det er

til stede en stor mengde av aminogruupper.

AKRYLERING AV PORØST AMINOMETYL-POLYMERMATERIALE  
ANVENDELSE AV AKRYLOYLKLOORID

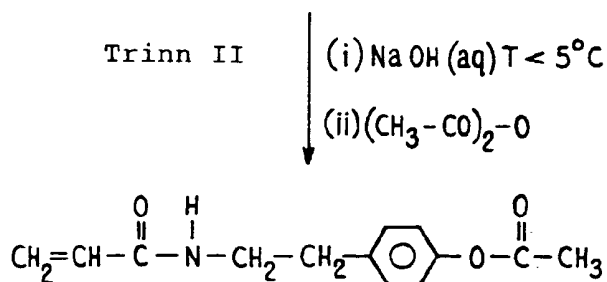
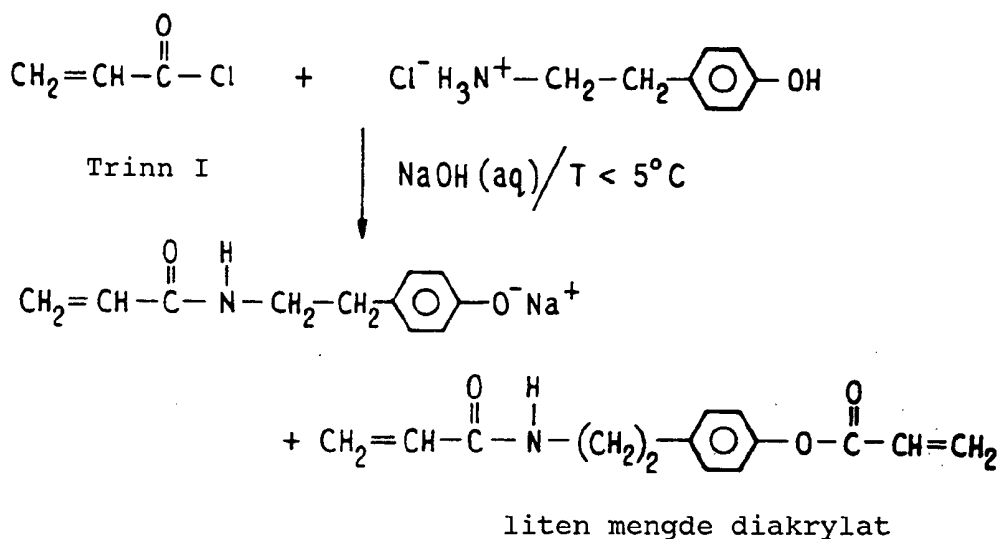


Det aminometylerede polymermateriale (2,0 g, 0,20 mmol) ble anbrakt i en kolbe med rund bunn (50 ml) som var anbrakt i et salt/is-bad. Natriumhydroksyd (9,28 mg, 0,29 mmol) ble oppløst i destillert vann (2,5 ml), og denne løsning ble blandet med tetrahydrofuran (THF) (2,5 ml). Det blandede løsningsmiddel-system, inneholdende natriumhydroksyd, ble satt til polymermaterialet i kolben. Akryloylchlorid (10 ml, 0,12 mol) ble satt dråpevis til blandingen. Under denne tilsetning ble pH overvåket ved at det ble tatt flekkprøver av reaksjonsblandingen på et indikatorpapir med fullt område, og det ble holdt en pH >11 ved tilsetning av natriumhydroksyd-løsning, når dette var nødvendig. Etter 4 timer var en ninhydrin-test på harpiksen negativ, hvilket viser fravær av primært amin.

Omsetningen ble avsluttet ved filtrering av reaksjonsblandingen og vasking med metanol : vann (1:1) (3 x 50 ml) fulgt av metanol (3 x 50 ml). Det resulterende faste stoff ble anbrakt i vakuumnoven ved romtemperatur inntil konstant vekt var oppnådd. Et hvitt fast stoff (2,05 g) ble oppnådd.

SYNTESE AV N-(2-(4-ACETOKSYFENYL)-ETYL)AKRYLAMID  
(ELLER AKRYLOYL-TYRAMIN-ACETAT)

Anvendelse av tyramin-hydroklorid



Akryloyl-tyramin-acetat (ATA)

Natriumhydroksyd (57,6 ml, 12 mol.dm<sup>3</sup>, 0,69 mol) ble hellet inn i en trehalset kolbe med rund bunn (500 ml), utstyrt med en dråpetrakt, overliggende elektrisk rører og sikringsrør. Tyramin-hydroklorid (25 g, 0,144 mol) ble satt til den hurtig rørte kaustiske blanding, og det ble tatt ut en alikvot av oppslemningen. Denne prøve ble utsatt for en ninhydrin-test, og resultatet av denne var positivt, som ventet, og dette viser nærvær av primære amingrunder.

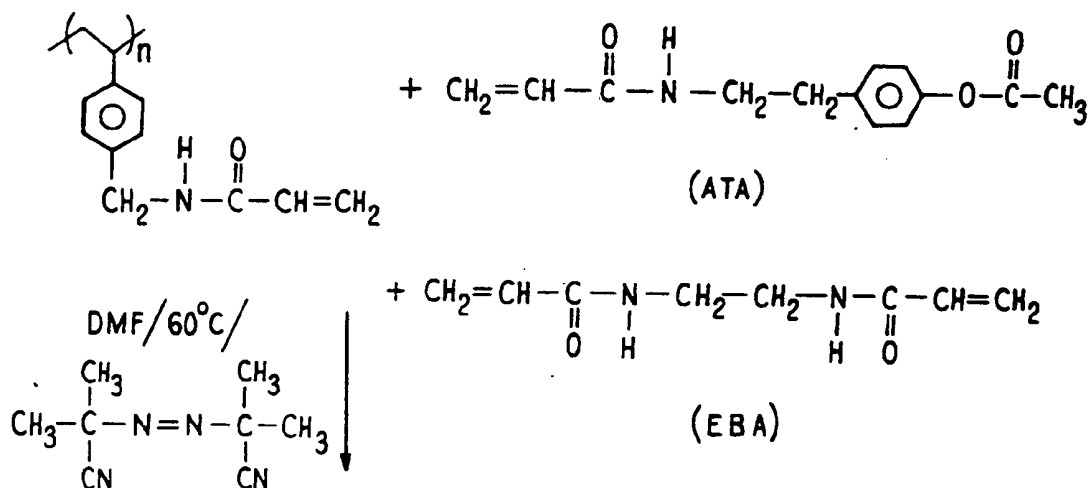
Reaksjonskolben ble avkjølt til 0°C, ved anvendelse av et salt/is-bad, før den dråpevis tilsetning av akryloylklorid (14

ml, 0,17 mol) i løpet av blandingen overvåket med flekk-prøver av reaksjonsblandingen på et indikatorpapir med fullt område og opprettholdelse av pH ved 10 ved tilsetning av natriumhydroksyd-løsning etter behov. pH ble regulert til dette nivå for å hindre dannelse av diakrylat-avfallsproduktet så godt som mulig. Blandingen ble rørt i 30 minutter, og en ny alikvot av oppslemmingen ble tatt ut og utsatt for en ninhydrin-test. Resultatet var igjen positivt, og dette viser at det første trinn av omsetningen ikke var fullført. En annen del av akryloylchlorid (14 ml, 0,17 mol) ble tilsatt, under regulerte pH-forhold, som ovenfor. Blandingen ble rørt i ytterligere 30 minutter og utsatt for en ninhydrin-test på primært amin, som viste seg å være negativ. Et likt volum av etylacetat ble satt til blandingen.

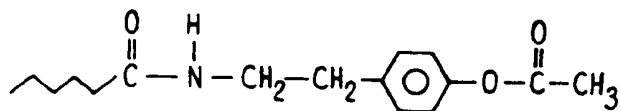
Natriumhydroksyd-løsning (26,4 ml, 12 mol.dm<sup>-3</sup>, 0,32 mol) ble tilsatt og reaksjonskolben ble avkjølt til 0°C ved anvendelse av et salt/is-bad. Det ble anvendt hurtig røring for å oppnå effektiv blanding av de to fasene. Eddiksyreanhydrid (32,7 ml, 0,35 mol) ble satt til den hurtig rørte reaksjonsblanding over en periode på 5 minutter. Under acetyleringen ble pH i reaksjonsblandingen overvåket med flekk-prøver av reaksjonsblandingen på indikatorpapir med fullt område, og pH ble opprettholdt ved >11 ved tilsetning av natriumhydroksyd-løsning, etter behov. pH ble regulert til dette nivå for å hindre tilbake-hydrolyse av akryloyl-tyramin-acetat- (ATA) produktet. Etter at alt eddiksyreanhydridet var tilsatt ble reaksjonsblandingen hensatt for å skilles i to faser. Den nedre vandige fase ble kastet mens den øvre med etylacetat ble hensatt over vannfritt magnesiumsulfat i en periode, filtrert og produktet ble tatt ut med anvendelse av løsningsmiddel, ved anvendelse av en roterende inndamper. Det ble fremstilt et hvitt, fast produkt, og dette ble vasket flere ganger med eter. Den endelige produkt var et hvitt pulver med et utbytte på 21 g (65%).

Produktet ble utsatt for <sup>1</sup>H nmr analyse. Det resulterende spektrum fremviste alle de topper og hele høyder som var ventet for akryloyl-tyramin-acetat.

IMPREGNERING AV DERIVATISERT PORØST POLYMERMATERIALE MED  
AKRYLOYL-TYRAMIN-ACETAT



Sterkt uløselig, tverrbundet gel som inneholder de følgende typer av funksjonelle grupper.



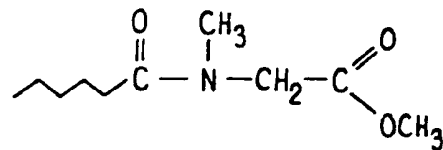
Derivatisert porøst polymermateriale (1,0 g, 0,10 mmol), akryloyl-tyramin-acetat (ATA) (5 g, 0,03 mol), hvert fremstilt som ovenfor, N,N'-etylen-bis-akrylamin (EBA, tverrbindende monomer) (0,15 g, 0,9 mmol) og azo-bis-(isobutyronitril) (AIBN, friradikal-initiator) (0,10 g) ble anbrakt i en kolbe med rund bunn (50 ml) og suspendert i et minimalt volum av dimetylformamid (DMF) (15 cm<sup>3</sup>). Reaksjonsblandingen ble spylt med nitrogen i 30 minutter for å fjerne ethvert spor av oksygen som ville inhibere den etterfølgende polymerisering. Kolben ble anbrakt på en roterende inndamper, med vakuum, og ble rotert og holdt i et vannbad ved 60°C i én time. Kolben ble rotert for å hindre polymerisering på overflaten mellom tilstøtende polymerpartikler og befordre polymerisering av ATA inne i porene på polymermaterialet.

Det endelige produkt ble filtrert, vasket med DMF (3 ganger), så med eter og ble tilsist tørket i vakuumovnen ved romtemperatur.





Sterkt uløselig, tverrbundet gel som inneholder de følgende typer av funksjonelle grupper.



To typer av harpiks ble dannet, med forskjellige ladningskapasiteter.

#### Harpiks I

Derivatisert porøst polymermateriale (1 g, 0,01 mmol), ASME (0,5 g, 3 mmol), N-N-dimetylakrylamid (DMA) (5 g, 50 mmol), EBA (tverrbindingsmonomer) (0,5 g, 3 mmol) og AIBN (0,1 g) ble anbrakt i en kolbe med rund bunn (100 ml) og suspendert i et minimalt volum av dimetylformamid (DMF) (15 cm<sup>3</sup>). Reaksjonsblandingen ble spylt med nitrogen i 30 minutter for å fjerne ethvert spor av oksygen som ville inhibere den etterfølgende polymerisering. Kolben ble anbrakt på en roterende inndamper, med vakuum, og ble rotert og senket ned i et vannbad ved 60°C i 2 timer. Kolben ble rotert for å hindre polymerisering på overflatene mellom tilstøtende porøse polymerpartikler og å befordre polymerisering av ASME inne i porene på det porøse polymermateriale.

Det endelige produkt ble filtrert, vasket med DMF (3 x 50 ml), etanol (3 x 50 ml) og så med eter (3 x 50 ml) og ble tilsist tørket i vakuumovnen ved romtemperatur. Siden det resulterende materiale bestod av en blanding av partikler med forskjellig størrelse, ble produktet malt, ved anvendelse av en morter og støter og ble siktet for å oppnå partikler med diameter i området 250 til 500 mikrometer.

#### Harpiks II

Fremstillingsmetoden er identisk med den som nettop er beskrevet for harpiks I ovenfor, bortsett fra at de følgende mengder ble anvendt:

derivatisert porøst materiale	(1g, 0,01 mmol)
ASME	(2g, 0,01 mmol)
DMA	(3,5g, 0,04 mmol)
EBA	(0,5g, 3 mmol)
AIBN	(0,1g)

Begge harpiksene var kjemisk og fysikalsk egnet for anvendelse som fast-fase-bærere ved peptid-syntese som skissert ovenfor.

Harpiks I hadde en syntese-kapasitet på 0,25 mmol/g og harpiks II hadde en syntese-kapasitet på 1,00 mmol/g, begge målinger med hensyn til mmol av peptid syntetisert pr. g av kompositt-substrat. Det er av interesse å sammenligne disse belastnings-kapasiteter med kommersielt tilgjengelige kiselgur-baserte harpikser som har en syntese-kapasitet på ca. 0,1 mmol/g.

Hvert av de foreliggende kompositt-substrater av harpiks I (0,25 mmol/g) og av harpiks II (1,00 mmol/g) ble anvendt ved syntese av leucin-enkefalin (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH). I hvert tilfelle ble kompositten som inneholdt reaktive sarkosin-metylester-grupper, hensatt natten over for å omsettes med etylendiamin for å tilveiebringe primære aminogrupeer gjennom hele gelen.

Et referanse-aminosyre-derivat Fmoc-Norleucin ble koplet til amin-gruppene ved kondensasjon i nærvær av dicykloheksyl-karbodiimid. Etter avbeskyttelse (fjerning av Fmoc) i nærvær av 20% piperidin i dimetylformamid ble bindingsmidlet 4-hydroksymetylfenoksyeddiksyre koplet til de eksponerte aminogrupeer.

Den C-terminale aminosyre i den ønskede sekvens Fmoc-Leucin ble festet til bæreren med karbodiimid-formidlet forestring i nærvær av en katalytisk mengde av 4-dimetylaminopyridin. Ytterligere sykluser av avbeskyttelse og kopling ble utført ved anvendelse av Fmoc-Phe, Fmoc-Gly, Fmoc-Gly og Fmoc-Tyr (O<sup>t</sup>Bu) for å fullstendiggjøre sammensetningen. Alle trinnene ble utført under kontinuerlige flyte-forhold med kompositten pakket i en kolonne ved anvendelse av en Pepsyntetiserings-innretning Mk II

fra Cambridge Research Biochemicals.

De følgende resultater ble oppnådd:

Ladningskapasitet for kompositten (mmol/g)	0,25	1,00
Fraskillings-utbytte (per 1,0 g av kompositt)	0,10 g	0,48 g
Renhet (ved hplc)	95,3%	98,2%

hplc = væske-kromotografi med høy ytelse.

Til sammenligning er det teoretisk maksimale utbytte fra kiselgurbaserte bærere (f.eks. Pepsyn KA som er tilgjengelig fra Cambridge Research Biochemicals) på 0,05 g per 1,0 g med kompositt, basert på en maksimal belastningskapasitet på 0,1 mmol/g og ved benyttelse av de samme mengder av løsningsmidler og reagenser.

De følgende peptider er også blitt syntetisert ved anvendelse av den ovenfor beskrevne oppskrift og komposittsubstratet som beskrevet ovenfor (harpiks II) med en kapasitet på 1,00 mmol/g.

- i) H-Asp-Asn-Trp-Arg-Ser-Glu-Leu-Tyr-Lys-Tyr-OH  
utbytte: 1,15g per 1g kompositt  
renhet: 98,0%
- ii) H-Val-Pro-Val-Trp-Lys-Glu-Ala-Thr-Thr-Thr-OH utbytte:  
0,98g per 1g kompositt  
renhet: 95,1%
- iii) H-Cys-Val-Pro-Thr-Asp-Pro-Asn-Pro-Glu-Glu-Val-Val-OH  
utbytte: 1,02g per 1g kompositt  
renhet: 97,2%
- iv) ACP (65 - 74) d.v.s. et segment fra acyl-bærer-protein  
utbytte: 0,91g per 1g kompositt  
renhet: 97,0%

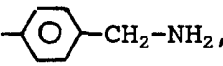

For å sammenligne ble ACP (65 - 74) ytterligere syntetisert på sammenlignings-kompositter av Pepsyn-KA (en kiselgur-basert kompositt med en maksimal teoretisk belastningskapasitet på 0,1 mmol/g) og porsjons-polystyren med en maksimal teoretisk belastningskapasitet på 0,7 mmol/g. Resultatene var som følger:

<u>Substrat</u>	<u>Utbytte</u>	<u>Renhet</u>
Som i (iv)	0,91g	97,0%
Pepsyn-KA	0,07g	96,0%
Porsjons-polystyren	0,35g	35,0%

EKSEMPEL 4

Et tverrbundet porøst polyvinyl-polymermateriale dannet ved den høy-indre-fase-emulsjonsmetode som er beskrevet i EP-patent nr. 60138, ble anvendt som substrat. Det hadde 90% porevolum, en densitet på 0,047 g/cm<sup>3</sup> og ved fremstillingen av det ble det anvendt 10% av det kommersielle tverrbindingsmidlet divinylbenzen. Polymermaterialet var i form av et malt og siktet pulver med en partikkelstørrelse innen området 850 til 1200  $\mu\text{m}$ . Det hadde en porestørrelse innen området 1 til 50  $\mu\text{m}$ .

Overflaten av det porøse polymermateriale ble modifisert som beskrevet ovenfor ved festing av den reaktive gruppe

-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, som så tjente som reaktiv gruppe X i det ovenfor skisserte peptidsyntese-skjema. Ved i alt vesentlig å følge dette peptidsyntese-skjema, ble (Fmoc-Leu)<sub>2</sub>O anvendt som den første kilde for aminosyre for kopling til substratet. Den resulterende belastning av aminosyren Leu var 0,12 mmol/g substrat. Fjerning av Fmoc gruppen for å gi avbeskyttelse foregikk ved anvendelse av 20% piperidin i DMF. Det syre-labile koplingsmiddel HO-CH<sub>2</sub>--OCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H ble deretter koplet til den avbeskyttede aminosyre som en aktiv hydroksy-benzotriazolester. Forestring foregikk så mellom sammensetningen på substratet og (Fmoc-Gly)<sub>2</sub>-O i nærvær av 0,1 ekv. av DMAP. Aminosyreanalyse av Gly-belastningen på substratet viste 0,09 mmol/g substrat. Avbeskyttelse foregikk så for å fjerne Fmoc endegruppen og tillate etterfølgende kopling til Ala ved anvendelse av (Fmoc-Ala)<sub>2</sub>O.

Den resulterende peptid-sammensetning hadde et Gly:Ala-forhold på 1:1, hvilket viser en kvantitativ dannelselse av det ønskede peptid.

## P a t e n t k r a v

1. Substrat som omfatter et porøst, tverrbundet polymermateriale som har en gel som inneholdes og tilbakeholdes i nevnte porestruktur ved gjensidig påvirkning mellom overflatene av det nevnte polymermateriale, idet gelen er polymer, k a r a k t e r i s e r t v e d at gelen har en reaktiv funksjonalitet, og at det nevnte polymermateriale har en porestruktur som gir en åpen porøsitet på minst 75% og omfatter celler som har en diameter i området 1-100  $\mu\text{m}$  som er gjensidig forbundet ved hull, idet cellene og hullene i det nevnte polymermateriale har en form og oppbygning som resulterer fra polymerisasjon av forløpermaterialet for polymermaterialet i et emulsjonssystem med høy indre fase.

2. Substrat i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at cellene har en diameter i området 1-50  $\mu\text{m}$ .

3. Substrat i henhold til krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at det porøse polymermateriale har en åpen porøsitet i området 85-98%.

4. Substrat i henhold til hvilket som helst av kravene 1- 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at det porøse polymermateriale er tverrbundet i en slik grad at det ved anvendelse sveller opptil det dobbelte av dets tørrsjikt-volum.

5. Substrat i henhold til hvilket som helst av kravene 1- 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at gelen er i stand til å gi en belastning for reaktiv rest på fra 0,1 til 5 mmol syntetisert kjemisk forbindelse pr. g av substrat.

6. Substrat i henhold til hvilket som helst av kravene 1- 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at gelen er kjemisk bundet til det porøse polymermateriale.

7. Substrat i henhold til krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at den kjemiske binding skjer ved hjelp av en amid-binding.

8. Substrat i henhold til hvilket som helst av kravene 1- 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at gelen holdes tilbake inne i porene i det porøse polymermateriale ved kjede-sammenflokning mellom gelen og det porøse polymermateriale.

9. Substrat i henhold til hvilket som helst av kravene 1- 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at vektforholdet mellom svellet gel og porøst polymermateriale ligger i området 60:40 til 95:5.

10. Fremgangsmåte for fremstilling av et substrat i henhold til krav 1 for anvendelse i kjemisk syntese, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter følgende trinn:

- a) å danne et porøst, tverrbundet polymermateriale som har en porestruktur som tilveiebringer en åpen porøsitet på minst 75% og omfatter celler som har en diameter i området 1-100  $\mu\text{m}$  som er gjensidig forbundet ved hull, ved polymerisasjon av et forløpermateriale for dette i et emulsjonssystem med høy indre fase,
- b) å tilveiebringe en polymergel som har reaktiv funksjonalitet som er tilgjengelig for anvendelse i kjemisk syntese i nevnte porestruktur til det nevnte porøse polymermateriale, idet gelen utsettes for gjensidig påvirkning fra det nevnte porøse polymermateriale slik at det tilbakeholdes i porestrukturen.

11. Fremgangsmåte i henhold til krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at gelen tilbakeholdes i porestrukturen ved å bevirke kjede-sammenfloking mellom gelen og det nevnte porøse polymermateriale.

12. Fremgangsmåte i henhold til krav 10 eller 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inkluderer å avsette og tilbakeholde gelen inne i porestrukturen i det porøse polymermateriale ved å utsette porøst polymermateriale for en løsning som omfatter gelforløper-materialer og et svellingsmiddel for det porøse polymermateriale, gi gelforløper-materialene anledning til å gjennomtrengte det svullede porøse polymermateriale, og danne gelen fra gelforløper-materialene inne i porestrukturen.

13. Fremgangsmåte i henhold til krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at den nevnte gel bindes kjemisk til det nevnte porøse polymermateriale.

14. Fremgangsmåte i henhold til krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inkluderer å avsette og tilbakeholde gelen inne i porestrukturen i det porøse polymermateriale ved å tilveiebringe reaktive grupper på det nevnte porøse polymermateriale, gi gelforløper-materialene anledning til å gjennomtrenge porene i polymermaterialet og danne gelen fra gelforløper-materialene inne i porestrukturen og samtidig gi gelen og/eller gelforløperen anledning til å omsettes med de reaktive grupper på porene i det porøse polymermateriale for å bevirke den kjemiske binding.

15. Fremgangsmåte i henhold til krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at gelforløper-materialene inkluderer minst én monomer og en prepolymer og at gelen dannes ved en polymerisasjonsreaksjon.

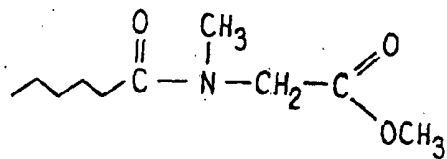
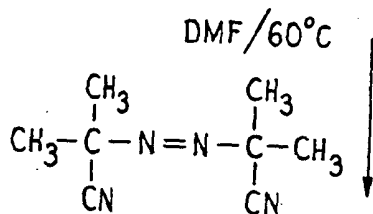
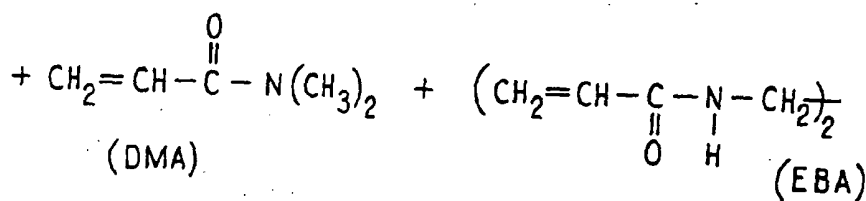
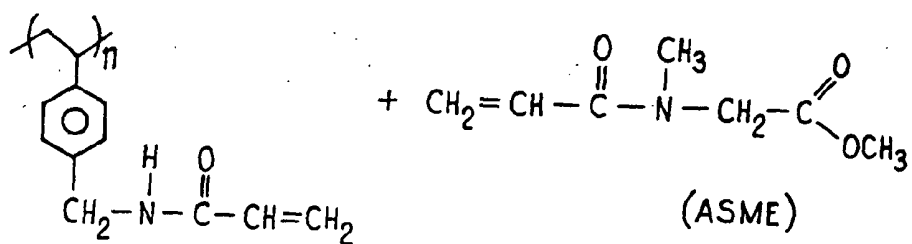
16. Fremgangsmåte i henhold til hvilket som helst av kravene 13 til 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at den kjemiske binding mellom gelen og det porøse polymermateriale oppnås ved å danne en amidbinding mellom dem.

17. Fremgangsmåte for peptid-syntese, k a r a k t e r i s e r t v e d at det som substrat for syntesen anvendes et substrat i henhold til hvilket som helst av kravene 1 til 9.

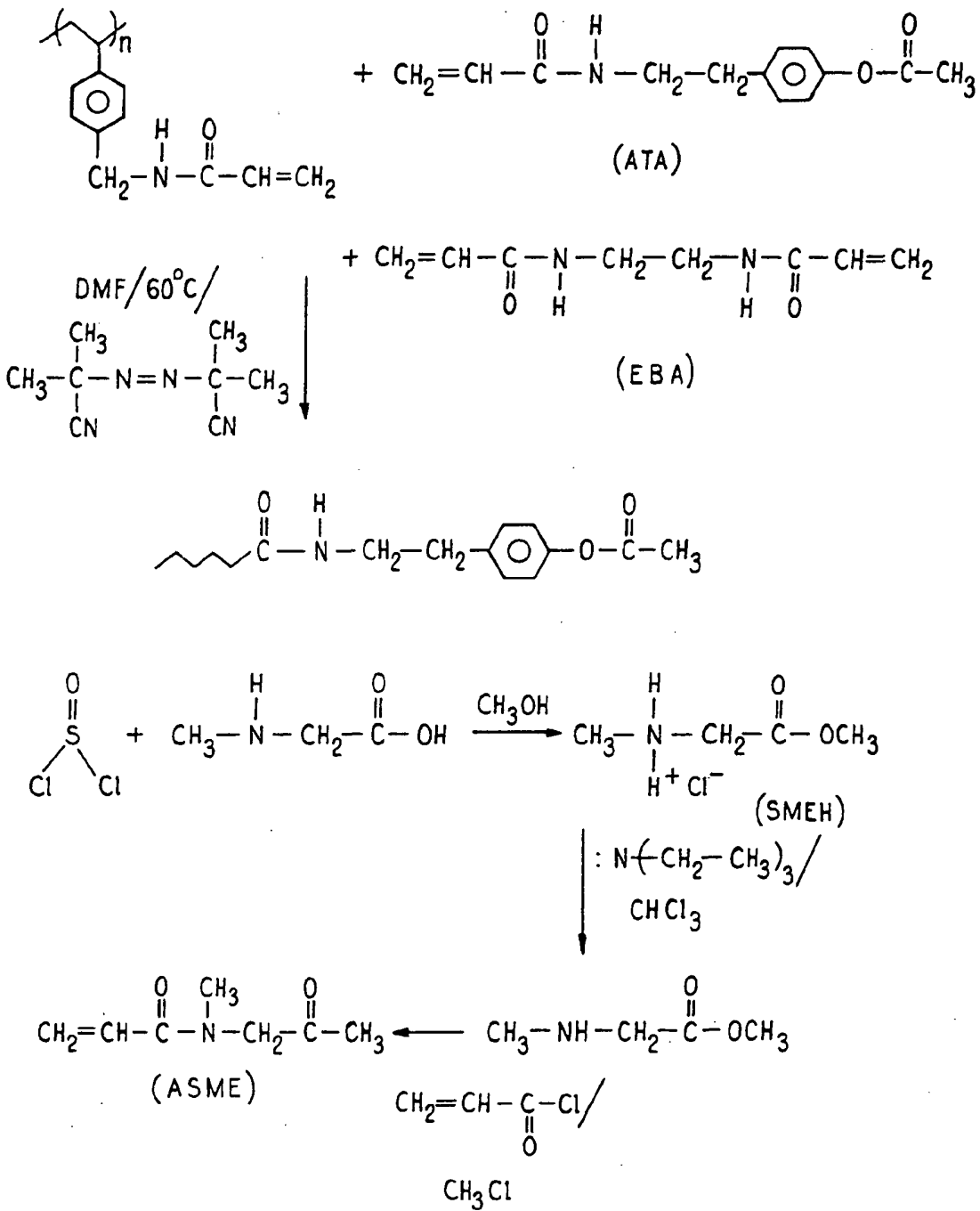
18. Fremgangsmåte i henhold til krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte peptid-syntese omfatter å føre reagenser etter hverandre gjennom porestrukturen til det nevnte substrat for å utøve følgende trinn:

- a) å binde en første aminosyre-rest til gelen via gelens reaktive funksjonelle grupper,
- b) å binde en andre aminosyre-rest til nevnte første aminosyre-rest for å danne en peptid-kjede,
- c) å binde ytterligere aminosyrer etter hverandre for å øke lengden på peptid-kjeden, for derved å oppnå et forhåndsbestemt peptid,
- d) å ta bort det forhåndsbestemte peptid fra gelen.

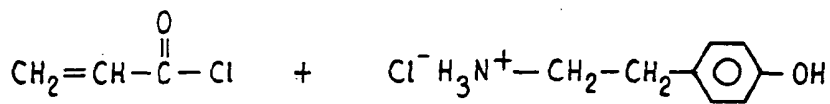
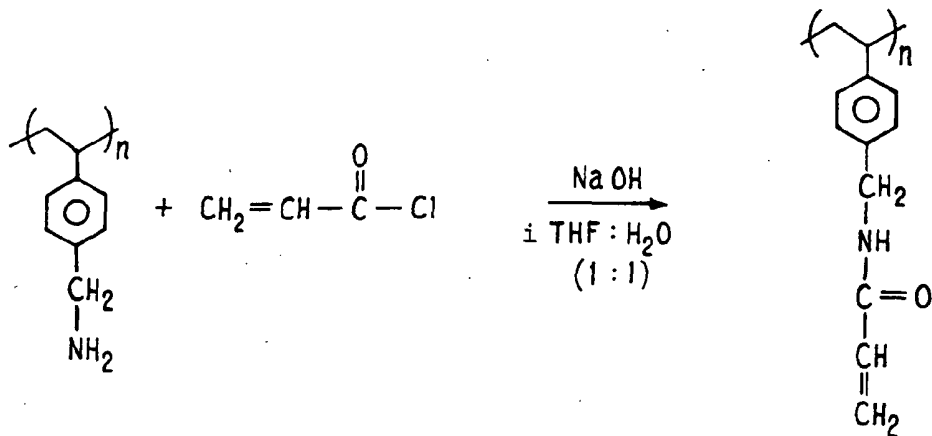
170428



170428

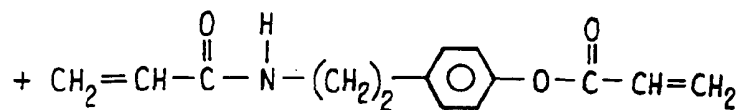
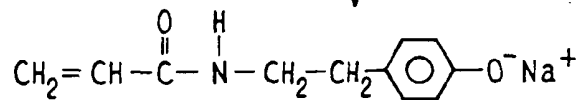


170428



Trinn I

NaOH (aq) / T < 5°C

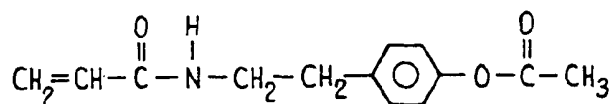


liten mengde diaksylat

Trinn II

(i) NaOH (aq) T < 5°C

(ii) (CH<sub>3</sub>-CO)<sub>2</sub>O



Akryloyl tyramine acetat (ATA)