



(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) **NO**

(11) **178548**

(13) **B**

(51) Int Cl⁶ C 08 F 8/00, 20/44, 265/08

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr 901829
(22) Inng. dag 25.04.90
(24) Løpedag 25.04.90
(41) Alm. tilgj. 28.10.91
(44) Utlegningsdato 08.01.96

(86) Int. inng. dag og
søknadsnummer
(85) Videreføringsdag
(30) Prioritet Ingen

(71) Patentsøker American Cyanamid Co, One Cyanamid Plaza, Wayne, NJ 07470-8426, US
(72) Oppfinner Larry Stanley Anderson, Norwalk, CT, US
Michael Timothy Cooke, New York, NY, US
David Arthur Ley, New Canaan, CT, US
(74) Fullmektig Dag Dawes, Bryn & Aarflot AS, Oslo

(54) Benevnelse Overflatehydratiserte porøse polyakrylonitrilsubstrater såsom kulederivater derav, og fremgangsmåter for fremstilling derav

(56) Anførte publikasjoner US 3948870, US 4110529, US 4371612

(57) Sammendrag

Porøse stoffer som omfatter akrylonitrilpolymer- eller kopolymerkjerner og en hydrolysert overflate med lav omdannelse til amidgrupper og i det vesentlige ingen dannelse av imid- eller karboksylgrupper på nevnte overflate. Forbindelsene og funksjonaliserte derivater av disse er anvendbare i høyt selektive kromatografiske separasjoner.

Denne oppfinnelse vedrører en overflate-hydratisert, porøs gjenstand omfattende polyakrylonitril eller en kopolymer derav, hvori polyakrylonitrilet består av en ikke-komprimerbar polyakrylonitrilkjerne med en hydrofil overflate, innbefattet de indre vegger i porene, som hovedsakelig består av jevnt fordelte amidgrupper som er dannet ved hydrolysering av nitriloverflate-gruppene, og en fremgangsmåte for fremstilling derav. Spesielt vedrører denne oppfinnelse porøse polyakrylonitrilkuler. Videre vedrører denne oppfinnelse substrater slik som porøse polyakrylo-nitrilkuler, med senere beskrevne funksjonaliserte grupper for å danne komplekser med biologisk aktive forbindelser for å separere nevnte forbindelser fra løsninger. Slike kuler er ideelt egnet til anvendelse i kromatograferingsseparasjonsprosesser, mens andre typer slik som hule fibre og membraner kan anvendes i separasjon slik som nyredialyse.

Faste ikke-svellbare polymere materialer som har nøytrale, hydrofile overflater, er anvendbare i forbindelse med proteinløsninger for mange formål. Disse inkluderer kromatograferingsbærere, membraner, bærere for immobiliserte enzymer eller immunoassaybærere. Hydrogenering av polyakrylonitriloverflater for å danne akrylamidgrupper er vel kjent.

Stoy, US-patent nr. 4 110 529, beskriver innføring av reaktive grupper i overflatelaget til kuler under koagulering. Eksempel 5 i Stoy-patentet beskriver den delvise hydrogenering av et polyakrylonitril til 40% amidgrupper og så koagulering for å danne porøse kuler. Imidlertid er kuler fremstilt på denne måte sterkt svellbare i vann og inneholder en vesentlig mengde av biprodukt karboksylatgrupper i tillegg til de ønskete amidgrupper. Således er kulene ikke spesielt anvendbare som kromatografiske bærere. Deres tendens til å swelle resulterer i veldige trykkfall og springende strømhastigheter i kromatografiske kolonner, og tilstedeværelse av karboksylatgrupper forårsaker ikke-spesifikk binding i separasjonsprosesser som ikke involverer ionebytte. Problemer fremkommer også fra den høye, 40%, amidomdannelses-hastighet, da høy omdannelse til amidgrupper resulterer i betydelige tap i

kromatografisk strøm på grunn av tap av kulefasthet.

Andre forsøk på å omdanne nitrilgrupper til amider tidligere har medført behandling med sterke syrer eller baser. Begge disse teknikker fører hovedsakelig til noe dannelselse av overflatekarboksylgrupper. Rigopolous, US-patent nr. 4 143 203 beskriver faste partikler som har en impermeabel fast polyakrylonitrilkjerne med en hydrolysert overflate. Overflaten hydrolyseres ved å varme opp de faste polyakrylonitrilpartikler i en løsning av svovelsyre ved temperaturer som varierer fra 75-95°C. Imidlertid er kuler dannet under disse betingelser ikke-porøse og har en vesentlig mengde av biprodukt karboksylgrupper; og er således ikke anvendbare i ikke-ionebytteprotein-spesifikke kromatografiske anvendelser.

Overflatemodifiseringen av polyakrylonitril under basiske betingelser ble studert av K. Ohta et al., Nippon Kagaku Kaishi, 6, 1200 (1985) ved å anvende infrarød overflate-spektroskopi. Etter behandling av polyakrylonitril-filmer med 5% natriumhydroksyd i 4 timer ved 70°C, fant 4,5% amid og 5,7% karboksylatgrupper på overflaten. Behandling av filmen med 5% natriumhydroksyd og 15% hydrogenperoksyd (en vandig alkalisk peroksydreaksjon) i 4 timer ved 70°C ga 2,1% amid og 0,7% karboksylat. Disse behandlinger er heller ikke tilstrekkelig selektive.

Således har den foreliggende teknikkens stand fortsatt alvorlige ulemper når det gjelder dannelselse av høyt selektive ikke-svellbare høyt porøse akrylonitrilpolymere kuler som har nøytrale hydrofile overflater. Dess større overflateområde av høyt porøse kuler og den lille diameter i polymerstrukturen gjør det vesentlig å kontrollere nøyaktig graden av hydrogenering. Omdannelse av mer enn 10% av nitrilgruppene til amidgrupper resulterer i betydelige tap i strøm i kromatograferingsseparasjoner. Det er vanskelig å kontrollere nøyaktig graden av reaksjon med sur hydrogenering. Sur hydrogenering er også kjent for å ha sterk sidegruppевirkning som danner en "blokk"-polymerstruktur. En blokkpolymerstruktur ved lav omdannelse kan resultere i ikke-uniform dekning av overflaten. Igjen forårsaker dette problemer med ikke-

spesifikk binding i kromatograferingsanvendelser. Et tredje problem med sur hydrogenering er dannelsen av karboksyl- og imidgrupper. Tilstedeværelse av karboksylgrupper forårsaker uønskete ionevekslevirkninger under størrelsesekklusjon eller affinitetskromatograferingsanvendelser.

Overraskende nok har de foreliggende oppfinnere funnet at alkalisk peroksydhydratisering av nitriler med forsiktig kontroll av løsningsmiddelet kan omgå disse problemer. Reaksjonen omdanner selektivt nitrilgrupper til amidgrupper uten bireaksjoner til imid- eller karboksylgrupper.

I henhold til den foreliggende oppfinnelse er den innledningsvis nevnte overflate-hydratiserte, porøse gjenstand særpregget ved at amidgruppene omfatter mellom 1 mol% til mindre enn 15 mol% av de totale nitrilgrupper, at overflaten er uten eller i alt vesentlig uten imid- eller karboksylgrupper, og at gjenstanden i det vesentlige er ikke-svellbar i vann og ikke komprimerbar.

Produktet fremstilles ifølge oppfinnelsen ved

- a) oppslemming i et væskeformig ikke-løsningsmiddel for et porøst substrat av
 - (i) det porøse substrat omfattende polyakrylonitril eller en kopolymer derav; og
 - (ii) en alkalisk katalysator; og eventuelt
 - (iii) av et reaksjonsadditiv til nevnte suspensjon;
- b) tilsetning av et peroksyd til nevnte oppslemming og oppvarming av denne oppslemming inntil mellom 1 mol% og 15 mol% av de totale nitrilgrupper er hydratisert til amidgrupper; eventuelt
- c) redusering av i det minste en del av nevnte amid, nevnte nitril eller en blanding av disse til amingrunder, eventuelt succinylering av nevnte amingrunder for å omdanne i det minste en del av dem til grupper som inneholder karboksyl-grupper på enden av den tilheftende gruppe, eventuelt under aktivering av reaksjonen med karboksydiimid, og eventuelt
- d) tilknytting av en biologisk aktiv ligand til dette, idet nevnte substrater kan ha nevnte ligander knyttet til

seg for å danne komplekser med enzymer for å separere nevnte enzymer fra enzymholdige løsninger,
e) og utvinning av gjenstanden.

Tilknytning av en biologisk aktiv ligand ved karbodiimid-aktivering av karboksylgruppene er blitt funnet effektivt å danne komplekser med enzymer, hormoner eller blandinger av disse for biologiske separasjonsteknikker.

Polyakrylonitrilkjernens fasthet blir minimalt påvirket ved denne milde behandling, og således er produktene i henhold til denne oppfinnelse i det vesentlige ikke-svellbare i vann og ikke-sammenpressbare. Anvendt her og i de vedlagte krav betyr begrepet "ikke-sammenpressbar" istand til å motstå hydrostatiske trykk i kolonnelag på opptil omtrent 205 atm. uten å falle sammen.

I en foretrukket konfigurasjon er substratet i det vesentlige en hudløs porøs kule som har et porevolum på ikke i det vesentlige mindre enn 1,5 ml/g og som i det vesentlige er isotrop. Fortrinnsvis er den gjennomsnittlige porediameter fra omtrent 0,002 mikron til omtrent 5 mikron, og den gjennomsnittlige kulediameter er fra omtrent 5 mikron til omtrent 2 mm.

Fortrinnsvis omfatter ikke-løsningsmiddelet i væskeform metanol, den alkaliske katalysator omfatter natriumhydroksyd og peroksydet omfatter hydrogenperoksyd. Utvinningstrinnet kan omfatte en vaskingsprosedyrehvor man anvender salter, vann og bufferløsninger. Et reaksjonstilsetningsstoff slik som dimetylsulfoksyd, kan tilsettes til suspensjonen og substratet varmebehandles før kombinasjon i suspensjon. Videre kan reduksjonsmidler også anvendes for å redusere i det minste en del av amidgruppene, nitrilgruppene eller begge til funksjonelle amingrupper. Amingruppene kan videre suksinyleres for å danne karboksylgrupper. Gjennom å aktivere karboksylgruppene ved å la dem reagere med et hvilket som helst stoff kjent for å aktivere -COOH-grupper, slik som karbodiimid, kan en biologisk aktiv ligand tilknyttetes. Kulen med slik tilknyttet ligand kan bindes til enzymer, inkludert lipaser og proteinaser slik som

acetylcholin-esterase, for å binde seg til hormoner og for å binde seg til proteiner slik som human serumalbumin, okseserumalbumin, hemoglobin, ovalbumin, myoglobin, alfa-laktalbumin, thyroglobin og okseserumgammaglobulin, til biologiske separasjonsprosesser.

Substrater som omfatter polyakrylonitril-homopolymerer eller kopolymerer er hovedsakelig kjent. F.eks. blir semi-permeable membraner av polyakrylonitril anvendt i forskjellige kjemiske separasjoner. Hule fibre av polyakrylonitril slik som de markedsført av Asahi Medical Company Ltd. under betegnelsen PAN 140, blir vanlig anvendt i nyredialyseutstyr.

Porøse kuler som omfatter akrylonitrilpolymerer eller kopolymerer er kjent for fagfolk på området og anvendbare i utførelsen av den foreliggende oppfinnelse. En fremgangsmåte for fremstilling av porøse kopolymerer er beskrevet i US-patent nr. 4 246 352. En foretrukket fremgangsmåte for fremstilling av porøse polyakrylonitrilkuler er beskrevet i på vanlig måte overdratt samtidig under behandling US-patent-søknader, Cooke og Hiscock, serienr. 07/275 317 Attorney's Docket nr. 30 985, og Ley, Hiscock, og Cooke serienr. 07/275 170, Attorney's Docket nr. 30 987 og Cooke og Hiscock, serienr. 07/275 256 Attorney's Docket nr. 30 669. Den termisk induserte faseseparasjonsprosess beskrevet der gir mikroporøse kuler som omfatter akrylonitrilpolymerer eller kopolymerer som i det vesentlige er hudløse, isotrope og har et høyt porevolum. Slike kuler er foretrukket som substratet anvendt i utførelsen av den foreliggende oppfinnelse. Slike porøse kulesubstrater er blant de foretrukne substrater anvendt i utførelsen av den foreliggende oppfinnelse. Også anvendelige er polyakrylonitrilsubstrater slik som ikke-porøse plater eller filmer, porøse membraner, hule fibre, inkludert porøs fiber, monofilamenter, akryliske tråder og fibrilerte fibre. Også inkludert er strukturer som omfatter ett eller flere av de ovenfor identifiserte substrater. Det bør derfor være klart at formen for substrat ikke er vesentlig for utførelsen av oppfinnelsen beskrevet her.

Som nevnt ovenfor, kan polyakrylonitrilsubstratene

omfatte akrylonitrilhomopolymerer eller kopolymerer. Egnete komonomerer omfatter C_2 - C_6 -monoolefiner, vinylaminoaromatiske stoffer, alkenylaromatiske stoffer, vinylaromatiske stoffer, vinylhalogenider, C_1 - C_6 -alkyl(met)akrylater, akrylamider, metakrylamider, vinylpyrrolidoner, vinylpyridin, C_1 - C_6 -hydroksyestere av alkyl(met)akrylater, met(akryl)syrer, akrylometylpropylsulfonsyrer, N-hydroksy-inneholdende C_1 - C_6 -alkyl(met)akrylamid, akrylamidometylpropylsulfonsyrer, vinylacetat, glycidyl(met)akrylat, glyserol(met)akrylat, tris(hydroksymetyl)aminometyl(met)akrylamid eller en blanding av disse. Akrylonitrilkopolymerer kan omfatte fra omtrent 99 til omtrent 20 deler i vekt av akrylonitril og fra omtrent 1 til omtrent 80 deler i vekt av komonomer. Det er foretrukket at akrylonitril er tilstede i mer enn omtrent 90 molprosent, og den foretrukne komonomer omfatter metylakrylat.

Overflaten av akrylonitrilsubstratene hydrolyseres til amidgrupper ved å reagere nitriloverflategruppene med et alkalisk peroksyd i et væskeformig, ikke-løsningsmiddel for polymeren. Reaksjonen hydratiserer selektivt nitrilgrupper til amidgrupper uten bireaksjoner til imid- eller karboksylgrupper. Videre kan fremgangsmåten i henhold til denne oppfinnelse overraskende lett kontrolleres, og omdannelser på mer enn 15 molprosent av nitrilgrupper til amidgrupper kan lett oppnås. Hovedsakelig omfatter fremgangsmåten dannelsen av en suspensjon av akrylonitrilsubstratet og ikke-løsningsmiddel og eventuelt vann. Det er også mulig å innføre en katalysator i suspensjonen. Suspensjonen røres og et alkalisk reagens tilsettes. Suspensjonen blir så oppvarmet, et peroksyd tilsatt, suspensjonen røres og reaksjonen utføres i den ønskete grad.

Egnete peroksyder for anvendelse i utførelsen av den foreliggende oppfinnelse omfatter hydrogenperoksyd, t-butylhydroperoksyd eller blandinger av disse og liknende. Spesielt foretrukket er hydrogenperoksyd.

Mange alkaliske reagenser er kjent for fagfolk på området og er egnet til anvendelse i denne oppfinnelse. Alkaliske reagenser omfatter natriumhydroksyd, kaliumhydroksyd

eller blandinger av disse og liknende.

Vesentlig for utførelsen av den foreliggende oppfinnelse er valget av et egnet ikke-løsningsmiddel for akrylonitril-polymeren eller kopolymeren. Ikke-løsningsmiddelet må imidlertid også være et løsningsmiddel for det alkaliske reagens og peroksyd. Valget og konsentrasjonen av komponentene av løsningsmiddel ikke-løsningsmiddelsystemet er trodd å kontrollere selektiviteten og graden av reaksjon. Selv om søkere ikke ønsker å være bundet av noen teori, er det trodd at løsningsmiddelsystemets evne til å oppløse amidgruppene når de dannes, kontrollerer graden av reaksjon. Således, ved å kontrollere forholdet mellom løsningsmiddel og ikke-løsningsmiddel, kan graden av omdannelse kontrolleres. Fortrinnsvis, der hvor hydrogenperoksyd er peroksydet og natriumhydroksyd er det alkaliske reagens, anvendes metanol som ikke-løsningsmiddel.

Utvinningstrinnet kan også omfatte en vaskingsprosedyre katalytisk redusert for å danne funksjonelle amingrudder. Amingruddene kan videre suksinyleres for å danne karboksyl-funksjonalitet i enden av den tilknyttede gruppe. Aktivering av karboksylgruppene med karbodiimid muliggjør tilknytting av en biologisk aktiv ligand. Kuler som inneholder biologisk aktive ligander, slik som para-aminobenzamidin (PABA) kan anvendes i biologiske separasjonsprosesser for å binde seg til enzymer, slik som acetylcholinesterase.

I en foretrukket utførelsesform blir substratkulene varmebehandlet før innføring i suspensjonen med ikke-løsningsmiddelet. Varmebehandlingstrinnet utføres fortrinnsvis i to stadier. Først blir kulene oppvarmet til en temperatur over omtrent 50°C i et ikke-løsningsmiddel. Egnete ikke-løsningsmidler inkluderer vann, lavere alkoholer og C₁- og C₈-hydrokarboner. Kulene blir så tørket ved en temperatur på mindre enn 50°C og så oppvarmet til 90-100°C i omtrent 30-60 minutter. Det viser seg at det første trinn (oppvarming i et ikke-løsningsmiddel) eliminerer kuleagglomerering i det andre trinn. Varmebehandlingstrinnet viser seg å minske reaktiviteten av kulen. Selv om søkerne ikke ønsker å være bundet av

noen enkelt teori, er det antatt at dette foregår ved at polymeren blir mer ordnet og/eller minsker overflate-området. Varmebehandling representerer således en videre metode for kontroll av reaksjonen fra nitril- til amidgrupper.

De følgende eksempler illustrerer den foreliggende oppfinnelse.

Den følgende fremgangsmåte anvendes for å fremstille porøse polymere kuler som omfatter polyakrylonitril eller en kopolymer av dette egnet til anvendelse som substrater for overflatehydrogenering.

Porøse kuler lages fra akrylonitrilpolymerer og/eller kopolymerer. Akrylonitrilkopolymerene omfatter fortrinnsvis polyakrylonitril kopolymerisert med f.eks. en (C₂-C₆)-monoolefin, et vinylaromatisk stoff, et vinylaminoaromatisk stoff, et vinylhalogenid, et (C₁-C₆)-alkyl(met)akrylat, et (met)akrylamid, et vinylpyrrolidon, et vinylpyridin, et (C₁-C₆)-hydroksyalkyl(met)akrylat, en (met)akrylsyre, en akrylometylpropylsulfonsyre, et N-hydroksy-inneholdende (C₁-C₆)-alkyl(met)-akrylamid, eller en blanding av hvilke som helst av de foregående. Spesielt blir det nevnt (C₁-C₆)-alkyl(met)-akrylater.

Som løsningsmidler for akrylonitrilpolymerer eller kopolymerer kan enhver organisk eller uorganisk væske istand til å løse dem uten permanent kjermisk transformasjon anvendes. Disse inkluderer dimetylsulfoksyd, dimetylformamid, dimetylsulfon, vandige løsninger av zinkklorid, og natriumthiocyanat.

Ikke-løsningsmidler for akrylonitrilpolymerer eller kopolymerer kan omfatte ethvert væskemedium som er ikke-blandbart med disse. Disse kan omfatte urea, vann, glyserol, propylenglykol, etylenglykol eller blandinger av disse.

Ikke-løsningsmiddeldispergeringsmidler kan omfatte ethvert væskemedium som er ikke-blandbart med akrylonitrilpolymerene eller kopolymerene og polymerløsningsmiddelet. Vanligvis vil de omfatte væsker med lav polaritet, slik som alifatiske, aromatiske eller hydroaromatiske hydrokarboner og deres halogenerte derivater, polysiloksaner med lav molekyl-

vekt, olefiner, etere og liknende slike forbindelser.

Foretrukne løsningsmiddel/ikke-løsningsmiddelsystemer omfatter en løsningsmiddelblanding av dimetylsulfon/urea/vann eller dimetylsulfon med enten vann, propylenglykol eller etylenglykol tilsatt.

Kontroll av den ytre porøsitet og porestørrelsesfordeling bestemmes begge gjennom sammensetningen av løsningen av polymer, løsningsmiddel og ikke-løsningsmiddel(midler). Det følgende er detaljerte fremgangsmåter for fremstilling av disse porøse polymere kuler.

5 g av en våt kopolymer som inneholder 99 molprosent akrylonitril og 1 molprosent metylakrylat (1:1 kopolymer:vann i vekt) males med 5 g urea og 30 g dimetylsulfon til en pulverisert blanding. Blandingen plasseres i en 1 liters kolbe med 100 ml mineralolje oppvarmet til 160°C. Blandingen røres inntil to væskefaser fremstår, én fase er en homogen polymer-løsning, den andre mineralolje. Hurtig røring av blandingen med en overliggende skovlrører gir en suspensjon som består av dråper av den varme (omtrent 120°C) polymerløsning i mineralolje. Dråpene avkjøles ved å overføre suspensjonen via en kanyle til en annen rørt blanding som består av 500 ml mineralolje, 6 g dimetylsulfon og 1 g urea holdt ved 70°C. Dråpene blir faste ved kontakt med den kaldere mineralolje. Blandingen avkjøles under røring til romtemperatur, fortynnes så med metylenklorid for å redusere viskositeten av oljen. Dråpene oppsamlet på en Buchner-trakt og vaskes med metylenklorid, så ekstraheres løsningsmiddelet med 200 ml aceton i 1,5 timer ved romtemperatur. De resulterende kuler undersøkes ved scanning-elektronmikroskopi og observeres som sterkt porøse med relativt ensartet porediameter på omtrent 0,5 mikron. Porene strekker seg gjennom de ytre overflater av kulene. Kulene varierer i størrelse fra 10 mikron til noen få mm i diameter.

Et annet detaljert eksempel på fremstilling av disse porøse polymerkuler er som følger:

288 g dimetylsulfon, 12 g akrylonitrilkopolymer som består av et 99:1 molforhold akrylonitril:metylakrylat, og 100

ml propylenglykol kombineres og plasseres i en Parr-reaktor utstyrt med en magnetisk drevet rører og et fallrør. Reaktoren oppvarmes til 140°C for å danne en homogen løsning. Løsningen presses gjennom oppvarmete, 140°C, rørledninger og en forstøvningsdyse (f.eks. Lechler Co. fullkjegle "center jet" dyse, åpningsdiameter på 11,7 mm) ved å anvende 10,2 atm. nitrogentrykk. Dysen monteres 7,6 cm over 3 liter rørt mineralolje eller 10,2 cm over 4 liter rørt heptan for å stoppe væskedråpene. Stivnete dråper vaskes med heptan for å fjerne mineralolje, tørkes og ekstraheres i 1 time med 3 liter 85-90°C vann for å produsere mikroporøse kuler. Porestørrelser varierer fra 0,5-1,5 mikron, og majoriteten av kulene er mellom 25 og 150 mikron.

Eksempel 1

En suspensjon av 5 g tørre, varmebehandlede polyakrylonitrilkuler (45-90 mm, 94,5 mmol) i 115 ml metanol og 4 ml dimetylsulfoksyd (56,4 mmol) ble rørt under nitrogengjennomblåsning. Etter 10 minutter ble 2,4 ml 2N vandig natriumhydroksyd (4,8 mmol) tilsatt til suspensjonen og suspensjonen oppvarmet til 35°C. Hydrogenperoksyd, 4,9 ml av en 30% løsning (0,96 mmol) ble tilsatt i løpet av 10 minutter. Reaksjonsblandingen ble rørt ved 35°C i 3 timer. Etter 3 timer ble 2,4 ml 2N saltsyre (4,8 mmol) tilsatt, og reaksjonsblandingen ble rørt i 1 minutt og filtrert. Kulene ble vasket med 0,1N vandig saltsyre, vann, metanol og så tørket. Amidinnholdet i kulene ble bestemt til å være 8,3% ved infrarød analyse.

Eksempel 2

Fremgangsmåten i eksempel 1 ble fulgt, med unntak av at 5,6 ml vann ble tilsatt til reaksjonsblandingen før gjennomblåsning av suspensjonen med nitrogen. Amidinnholdet i kulene ble bestemt til å være 9,5% ved infrarød analyse.

Eksempel 3

Fremgangsmåten i eksempel 1 ble fulgt, med unntak av at 14,7 ml 30% hydrogenperoksyd ble anvendt, og reaksjonen ble kjørt ved 35°C i 45 minutter. Amidinnholdet i kulene ble bestemt til å være 9,2% ved infrarød analyse.

Eksempler 4 og 5

Porøse 99:1 molforhold akrylonitril/metylakrylat kopolymerkuler fremstilt ved termisk indusert faseinversjon ble lagret i vann etter ekstrahering av løsningsmidler som skulle kastes. En prøve ble fjernet, tørket og varmebehandlet ved 95°C i 0,5 timer. Både varmebehandlede kuler og våte kuler (0,2 g tørre) ble reagert med 0,16 ml dimetylsulfoksyd, 0,58 ml 30% hydrogenperoksyd og 0,1 ml 2N natriumhydroksyd i 9 ml metanol. Etter 3 timer hadde de varmebehandlede kuler 1,8% amidomdannelse, mens de ikke-varmebehandlede, våte kuler hadde 8,5% amidomdannelse. Dette illustrerer videre kontrollnivået for mulig omdannelse gjennom anvendelse av den foreliggende oppfinnelse.

Eksempler 6-12

Fremgangsmåten i eksempel 1 ble fulgt ved å variere mengden av hydrogenperoksyd og vann. Resultatene er fremsatt i tabell 1 nedenfor.

TABELL 1

<u>Eksempel</u>	6	7	8	9	10	11	12	6A*
<u>Reaksjonsbetingelser</u> (vektforhold)								
Nitrilkule	1	1	1	1	1	1	1	1
30% H ₂ O ₂	1,1	1,1	1,1	1,1	2,2	2,2	2,2	3,2
H ₂ O	0	0,7	1,5	2,3	0	0,8	1,5	0
Metanol	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2

Amidomdannelse (%)

3 h, 35°C, ±0,5	8,3	9,2	10,6	10,6	10,8	13,4	12,9	16,7
4 h, 35%, ±0,5	8,6	10,0	11,6	11,8	11,7	14,3	14,5	19,8

* Kontrollprøver

Tabell 1 viser evnen til å kontrollere graden av amidomdannelse ved å variere forholdet mellom løsningsmiddel og ikke-løsningsmiddel.

Eksempel 13

46 g porøse kuler med 99 mol% akrylonitrilkopolymer og 1

mol% metylakrylat ble fremstilt ved termisk induisert fase-inversjon. Kulene ble varmebehandlet og så reagert med 37,0 ml dimetylsulfoksyd, 207,5 ml metanol, 133,2 ml 30% hydrogenperoksyd og 21,7 ml 2N natriumhydroksyd. Blandingen ble oppvarmet til 50°C mens den ble rørt. Etter å ha blitt holdt ved 50°C i 1 time ble kulene oppsamlet og vasket med 0,6 l deionisert vann, 1,5 l 0,1N saltsyre, 4,0 l deionisert vann og 1,0 l metanol. Etter vakuumbørking ble 44,1 g (96%) kuler fjernet. Amidinnholdet i kulene ble bestemt til å være 8,1% ved FI-IR-analyse.

Eksempel 14

Produktet fra eksempel 13 ble reagert med et kompleks som besto av 1500 ml dioksan og 700 ml boran-tetrahydrofuran. Denne blanding ble tatt under tilbakesløp ved 85°C i 4 timer i en tørr 5 liters kolbe som var tilpasset med en kondensator. Etter avkjøling ble overskudd av boran bundet ved langsomt å tilsette 1M saltsyre. Etter 20 minutter ble kulene oppsamlet på en Buchner-trakt, vasket med vann, metanol og vakuumbørket. Amininnholdet i kulene ble bestemt til å være 184 mmol amin/g ved fremgangsmåten til G. Antoni et al., Analytical Biochemistry, 129, 60-63, 1983.

Eksempel 15

26,1 g av de porøse kuler fremstilt ved fremgangsmåten i eksempel 14 ble blandet med et kompleks fremstilt ved å tilsette 313 g ravsyreanhydrid i pulverform til 94 ml deionisert vann, hvortil 313 ml 1,0N natriumhydroksyd ble tilsatt. Løsningen ble rørt for å opprettholde en pH på 6,0. Kulene ble oppsamlet på en Buchner-trakt og vasket med 1,5 l deionisert vann, 3,0 l 0,1N saltsyre, 3,0 l deionisert vann og 1,0 l metanol. Etter vakuumbørking ble 25,1 g (96%) kuler utvunnet. Restamininnholdet i kulene ble bestemt til å være 10 mmol amin/g ved trinitrobenzensulfonat(TBNS)-aminmåling.

Eksempel 16

10 g aminoetylsuksinylerte kuler fremstilt ved fremgangsmåten i eksempel 15 ble nedsenket i 0,5M natriumklorid i 1 time, vasket fem ganger med 100 ml 0,5M natriumklorid og vasket fem ganger med 100 ml vann. De vaskete kuler ble

suspendert i en løsning av 100 ml vann som inneholdt 500 mg p-aminobenzamidin, hvortil 1N natriumhydroksyd ble tilsatt for å opprettholde en pH på 5,0. 800 mg fast 1-etyl-3-(ϵ -dimetylaminopropyl)karbodiimidhydroklorid (EDAC) ble tilsatt for å opprettholde en pH på 5,0, 1N natriumhydroksyd ble tilsatt dråpevis, og suspensjonen ble rystet ved romtemperatur i 1 time. En tilleggsmengde på 800 mg fast EDAC ble tilsatt, og 1N natriumhydroksyd ble tilsatt for å opprettholde pH 5,0. Etter at suspensjonen var blitt rystet ved romtemperatur i 18 timer ble bæreren vasket to ganger med 100 ml hver av de følgende løsninger, i følgende rekkefølge: vann, 0,5M natriumklorid, 0,2M NaOAc ved en pH på 4,5, vann, 0,1M natriumbikarbonat ved en pH på 9,0, vann og 0,1M NaHPO_4 ved en pH på 7,0 som inneholdt 0,02% natriumazid. PABA-innholdet bundet til kulene ble bestemt til å være 137 mmol PABA/g ved å analysere den initielle reaksjonssuspensjon og den første vaskesekvens spektrofotometrisk for PABA.

Eksempel 17

Porøse kuler som inneholdt p-aminobenzamidin, som ble fremstilt ved fremgangsmåten i eksempel 16, ble pakket ved oppslemmingstilsetning i glasskolonner på 0,7 i.d. x 25 cm som inneholdt 0,01M NaHPO_4 med 0,02% natriumazid (elueringsbuffer) med 4,8 mg acetylcholinesterase tilsatt til 0,25 ml elueringsbuffer. Kolonnen ble eluert inntil den initielle manglende topp eluerte (20-30 ml). Kolonnen ble så eluert med elueringsbuffer som inneholdt 1M natriumklorid for å utvinne ethvert enzym tilbakeholdt på kolonnen. Det saltholdige elueringsvolumet ble bestemt å ha 6,9-21% utvunnet protein med 47-37% utvunnet aktivitet. Acetylcholinesterasen ble målt ved å anvende Ellmans kolormetriske måling (Ellman, G.L., et al., Biochem. Pharmac. 7. 88-108, 1961) og representerte en 1,5-2,0 gangers rensing av AChE.

Eksempel 18

Porøse kuler som inneholdt 8,1% amid, fremstilt ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 13, ble pakket ved oppslemmingstilsetning i en glasskolonne av 0,7 i.d. x 25 cm som inneholdt 0,1M natriumhypofosfat med pH 7,0 og 0,02%

natriumazid (elueringsbuffer). 5 ml trypsin ble tilsatt til kolonnen i 0,25 ml kjørebuffer. Kolonnen ble eluert inntil det i begynnelsen manglende volum var eluert. Kolonnen ble så eluert med elueringsbuffer som inneholdt 1M natriumklorid for å utvinne ethvert enzym tilbakeholdt på kolonnen. Det i begynnelsen manglende volum ble målt å inneholde 8,6% utvunnet protein med 7,8% aktivitet. Saltelueringen ble målt å gi 53% utvunnet protein med 80% utvunnet aktivitet. Derfor adsorberte/bandt de ikke-derivatiserte kuler seg til trypsin, som kan vises ved salteluering. Proteinverdier ble bestemt ved BCA-proteinmåling (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.).

De følgende eksempler viser anvendelsen av substrater forskjellige fra porøse polymere kuler i utførelsen av den foreliggende oppfinnelse.

Eksempel 19

Tørre, varmebehandlede polyakrylonitrilhule fibre, 0,5 g, ble blandet med 11,5 ml metanol, 0,5 g vann, 0,24 ml 2N vandig natriumhydroksydøsning og 0,4 ml dimetylsulfoksyd. Blandingen ble oppvarmet til 35°C, og 0,49 ml av en 30% hydrogenperoksydøsning ble tilsatt. Etter henstand ved romtemperatur i 3 timer ble reaksjonsblandingen filtrert. Fibrene ble vasket med vann og metanol og vakuumtørket (40°C). Amidinnholdet av fibrene ble bestemt til å være 14,1% ved infrarød analyse.

Eksempel 20

Fremgangsmåten i eksempel 19 ble fulgt, med unntak av at 0,50 g av en ikke-varmebehandlet fibrilert fiberplate ble anvendt med 1,47 ml 30% hydrogenperoksydøsning, og fiberen ble varmebehandlet før reaksjonen. IR-analyse viste at amidinnholdet i det fibrilerte fiberprodukt var omtrent 2%.

Eksempel 21

Reaksjonsprosedyren i eksempel 19 ble fulgt, med unntak av at 0,52 g av en ikke-porøs film laget fra en 89,5:10,5 akrylonitril:metylakrylatfilm ble anvendt, og filmen ble ikke varmebehandlet. Kontaktvinkel for vann var 42° fulgt av reaksjon, mens filmen først hadde en vannkontaktvinkel på 63°.

De ovenfor nevnte patenter, patentsøknader og referanser

er inkorporert her ved referanse.

Mange varianter av det ovenfor beskrevne kan tenkes. F.eks., i stedet for å hydratisere akrylonitrilhomopolymer eller kopolymerer med metylakrylat, kan andre akrylonitril-kopolymerer slik som akrylonitril-vinylklorid og akrylonitril-styren anvendes. Akrylonitrilkopolymerer i form av hule fibre eller membraner er også mulige, liksom anvendelse av t-butylhydroperoksyd istedet for hydrogenperoksyd; kaliumhydroksyd istedet for natriumhydroksyd som alkalisk reagens og etanol og i-propanol istedet for metanol som ikke-løsningsmiddel.

P a t e n t k r a v

1. Overflate-hydratisert, porøs gjenstand omfattende polyakrylonitril eller en kopolymer derav, hvori polyakrylonitrilet består av en ikke-komprimerbar polyakrylonitrilkjerne med en hydrofil overflate, innbefattet de indre vegger i porene, som hovedsakelig består av jevnt fordelte amidgrupper som er dannet ved hydrolysering av nitril-overflategruppene, k a r a k t e r i s e r t v e d at amidgruppene omfatter mellom 1 mol% til mindre enn 15 mol% av de totale nitrilgrupper, at overflaten er uten eller i alt vesentlig uten imid- eller karboksylgrupper, og at gjenstanden i det vesentlige er ikke-svellbar i vann og ikke komprimerbar.

2. Gjenstand ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den porøse gjenstand har en form av en membran, en fiber eller en kule.

3. Gjenstand ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er en kule med en ikke-komprimerbar kjerne omfattende en polyakrylonitril-kopolymer.

4. Gjenstand ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ikke-komprimerbare

polyakrylonitrilkjerne omfatter mer enn 90% akrylonitril.

5. Porøs gjenstand som definert i krav 2, karakterisert ved at den er en kule som i det vesentlige er isotrop.

6. Porøs gjenstand som definert i krav 2, karakterisert ved at den er en kule med porevolum som ikke er vesentlig mindre enn 1,5 ml/g.

7. Porøs gjenstand som definert i krav 3, karakterisert ved at den er en kule og at nevnte polyakrylonitrilkopolymer omfatter akrylonitril kopolymerisert med et (C₂-C₆)-monoolefin, et alkenylaromatisk stoff, en vinylaromatisk forbindelse, et vinylhalogenid, et (C₁-C₆)-alkyl(met)akrylat, et akrylamid, et metakrylamid, et vinylpyrrolidon, (C₁-C₆)-hydroksy-alkyl(met)akrylat, en (met)akrylsyre, en akrylometylpropylsulfon-syre eller en blanding av hvilke som helst av de foregående.

8. Porøs gjenstand som definert i krav 2, karakterisert ved at den er en kule med gjennomsnittsdiameter på fra 5 µm til 2 mm.

9. Porøs gjenstand som definert i krav 2, karakterisert ved at den er en kule med gjennomsnittsporediameter på fra 0,002 til 5 µm.

10. Porøs gjenstand som definert i krav 2, karakterisert ved at den er en kule og at den videre omfatter en forbindelse som i det minste delvis utfyller porene i nevnte porøse kule.

11. Porøs gjenstand som definert i krav 10, karakterisert ved at nevnte forbindelse er valgt fra et protein, et enzym, et hormon, et peptid, et

polysakkarid, en nukleinsyre, et fargestoff, et pigment eller en blanding av hvilke som helst av de foregående.

12. Porøs gjenstand som definert i krav 2, karakterisert ved at den er en kule og at i det minste en del av nevnte amidgrupper, nevnte nitrilgrupper eller en blanding av nevnte grupper er redusert til aminometylgrupper.

13. Porøs gjenstand som definert i krav 12, karakterisert ved at i det minste en del av nevnte aminometylgrupper er omdannet til succinylerte aminometylgrupper.

14. Porøs gjenstand som definert i krav 13, karakterisert ved at i det minste en del av nevnte succinylerte aminometylgrupper er kovalent bundet til en biologisk aktiv ligand.

15. Porøs gjenstand som definert i krav 14, karakterisert ved at nevnte succinylerte aminometylgrupper som er kovalent bundet til en biologisk aktiv ligand videre er kompleksdannet med et biologisk aktivt stoff.

16. Porøs gjenstand som definert i krav 15, karakterisert ved at nevnte biologisk aktive forbindelse omfatter et enzym.

17. Porøs gjenstand som definert i krav 16, karakterisert ved at nevnte biologisk aktive ligand omfatter p-aminobenzamidin, og nevnte enzym omfatter acetylcholinesterase.

18. Fremgangsmåte for fremstilling av en porøs gjenstand omfattende en ikke-komprimerbar kjerne av polyakrylonitril eller kopolymer derav med en hydrofil overflate som

hovedsakelig består av jevnt fordelte amidgrupper og som er uten eller i alt vesentlig uten imid- og karboksylgrupper, hvilke amidgrupper omfatter fra 1 mol% til mindre enn 15 mol% av de totale nitrilgrupper,

k a r a k t e r i s e r t v e d

- a) oppslemming i et væskeformig ikke-løsningsmiddel for et porøst substrat av
 - (i) det porøse substrat omfattende polyakrylonitril eller en kopolymer derav; og
 - (ii) en alkalisk katalysator; og eventuelt
 - (iii) av et reaksjonsadditiv til nevnte suspensjon;
- b) tilsetning av et peroksyd til nevnte oppslemming og oppvarming av denne oppslemming inntil mellom 1 mol% og 15 mol% av de totale nitrilgrupper er hydratisert til amidgrupper; eventuelt
- c) redusering av i det minste en del av nevnte amid, nevnte nitril eller en blanding av disse til amingrupper, eventuelt succinylering av nevnte amingrupper for å omdanne i det minste en del av dem til grupper som inneholder karboksyl-grupper på enden av den tilheftende gruppe, eventuelt under aktivering av reaksjonen med karboksydiimid, og eventuelt
- d) tilknytting av en biologisk aktiv ligand til dette, idet nevnte substrater kan ha nevnte ligander knyttet til seg for å danne komplekser med enzymer for å separere nevnte enzymer fra enzymholdige løsninger,
- e) og utvinning av gjenstanden.

19. Fremgangsmåte som definert i krav 18,

k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte gjenstand har form av hule fibre, porøse fibre, monofilamenter, akryliske tråder, fibrilerte fibre, porøse og ikke-porøse membraner, semi-permeable membraner, ikke-porøse plater, porøse og ikke-porøse kuler og porøse polymere kuler.

20. Fremgangsmåte i henhold til krav 18,

k a r a k t e r i s e r t v e d at ikke-løsningsmiddelet i

væskeform er metanol.

21. Fremgangsmåte som definert i krav 18, karakterisert ved at nevnte alkaliske katalysator i trinn (a) (ii) omfatter natriumhydroksyd.

22. Fremgangsmåte som definert i krav 18, karakterisert ved at nevnte reaksjonsadditiv i trinn (a) (iii) omfatter dimetylsulfoksyd.

23. Fremgangsmåte som definert i krav 18, karakterisert ved at nevnte peroksyd i trinn (b) omfatter hydrogenperoksyd.

24. Fremgangsmåte som definert i krav 18, karakterisert ved at nevnte trinn (a) videre omfatter tilsetning av vann til nevnte suspensjon.

25. Fremgangsmåte som definert i krav 18, karakterisert ved at blandingen nøytraliseres etter trinn (b) og før trinn (c) med et surt reagens.

26. Fremgangsmåte som definert i krav 18, karakterisert ved at utvinningstrinnet (c) omfatter vasking med 0,1N saltsyre, vann og metanol og så separering og tørking av kjernen.

27. Fremgangsmåte som definert i krav 18, karakterisert ved at kjernen i trinn (a) (i) varmebehandles før den blir kombinert i suspensjon med komponent (ii).

28. Fremgangsmåte som definert i krav 27, karakterisert ved at nevnte varmebehandling omfatter oppvarming av kjernen ved en temperatur på omtrent 50-90°C i et ikke-løsningsmiddel i omtrent 1 time, tørking av kjernen og så oppvarming av substratet ved en temperatur på

omtrent 90°C i omtrent 0,5 timer.

29. Fremgangsmåte som definert i krav 18, karakterisert ved at utvinningstrinn (c) omfatter vasking i rekkefølge av substratet med vann, salter, vann, buffer, vann og salter.

30. Fremgangsmåte som definert i krav 29, karakterisert ved at saltene omfatter natriumklorid, natriumhypofosfat eller natriumazid, og bufferen omfatter natriumbikarbonat.

31. Fremgangsmåte som definert i krav 18, karakterisert ved at nevnte ligand omfatter p-aminobenzamidin og nevnte enzym omfatter acetylcholin-esterase.

32. Fremgangsmåte som definert i krav 18, karakterisert ved at den videre omfatter anvendelse av nevnte substrat for å danne komplekser med biologisk aktive forbindelser for å separere nevnte forbindelser fra løsninger som de foreligger i.

33. Fremgangsmåte som definert i krav 32, karakterisert ved at nevnte biologisk aktive forbindelser omfatter enzymer.