

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
12. Februar 2004 (12.02.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/013188 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C08F 2/44**,  
220/34, 2/14

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/008032

(22) Internationales Anmeldedatum:  
23. Juli 2003 (23.07.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 35 302.6 1. August 2002 (01.08.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF  
AKTIEN** [DE/DE]; Henkelstrasse 67, 40589 Düsseldorf  
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **LAMMERSCHOP,  
Olaf** [DE/DE]; Eutiner Strasse 32, 47829 Krefeld

(DE). **BREVES, Roland** [DE/DE]; Schwalbenweg 5,  
40822 Mettmann (DE). **STUMPE, Stefan** [DE/DE];  
Haus-Endt Strasse 148, 40593 Düsseldorf (DE).  
**MÜLLER-SCHULTE, Detlef** [DE/DE]; Lütticher  
Strasse 517b, 52074 Aachen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, BR, BY, CA, CN,  
DZ, ID, IL, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RU, SG, UA,  
US, UZ, VN, YU, ZA.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,  
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,  
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.



**WO 2004/013188 A1**

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF ACRYLIC-BASED BEAD-SHAPED OR SPHERICAL MAGNETIC PAR-  
TICLES FOR CLEANING BIOLOGICAL SUBSTANCES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG PERL-BZW. KUGELFÖRMIGER MAGNETISCHER PARTIKEL AUF  
ACRYLSÄUREBASIS ZUR AUFREINIGUNG BIOLOGISCHER SUBSTANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of acrylic-based bead-shaped or spherical magnetic particles for  
cleaning biological substances.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung perl- bzw. kugelförmiger magnetischer  
Partikel auf Acrylsäurebasis zur Aufreinigung biologischer Substanzen.

## **Verfahren zur Herstellung perl- bzw. kugelförmiger magnetischer Partikel auf Acrylsäurebasis zur Aufreinigung biologischer Substanzen**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung perl- bzw. kugelförmiger magnetischer Partikel auf Acrylsäurebasis zum Zweck der Aufreinigung biologischer Substanzen.

Im Bereich der Biowissenschaften werden in zunehmendem Maße magnetische Polymerpartikel für die Analyse, Diagnostik oder Aufreinigung von Zellen und Biomolekülen wie Antikörpern oder anderen Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Biopolymeren eingesetzt.

Bei diesen sogenannten Magnetbeads handelt es sich um ein aus einer Polymerhülle bestehendes, vorzugsweise perlförmiges Partikel mit einer Teilchengröße von 1 bis 100  $\mu\text{m}$ , in das ein magnetisches Kolloid oder eine mikro- bzw. nanopartikuläre magnetische Substanz (z.B. Magnetit) eingekapselt ist und so dem Polymerteilchen magnetische Eigenschaften verleiht. Zur Auftrennung von Biomolekülen oder Zellen können bestimmte Liganden („Fängermoleküle“) an die Polymerhülle chemisch gekoppelt werden, die die Biomoleküle oder Zellen selektiv zu binden vermögen. Durch magnetische Separation, im einfachsten Fall durch Anlegen eines Handmagneten an das Reaktionsgefäß, können die betreffenden Zielsubstanzen aus dem Substanzgemisch abgetrennt und analysiert werden.

Die Verwendung magnetischer Polymerpartikel bietet gegenüber den klassischen chromatographischen Trennverfahren zwei entscheidende Vorteile:

- a) Man arbeitet in einer Suspension, wodurch eine Reaktionskinetik ähnlich der einer homogenen Lösung gegeben ist,
- b) der Trennvorgang gegenüber den herkömmlichen Verfahren wird um den Faktor 10 bis 100 verkürzt. Ferner kann bei der Nukleinsäure-Auftrennung der zeitaufwendige Zentrifugationsschritt gänzlich umgangen werden.

In der PCT Anmeldung WO 99/62079 werden magnetische Nanopartikel mit einer Teilchengröße  $<0,3 \mu\text{m}$  beschrieben, die durch Beschichten eines magnetischen Oxids mit einem chelatierenden Stabilisator wie Gelatine, Polyethylenimin, Polyaminen, Dextran, Chitosan, Polylysin, Polyvinylpyrrolidon oder Proteinen gewonnen werden. Ein Einsatz dieser Teilchen in der Nukleinsäure-Aufreinigung ist nicht möglich.

Magnetische Eisen-Dextran Mikropartikel sind in der U.S. Patentschrift 4,452,773 beschrieben. Durch Mischen einer Fe(II)- und Fe(III)-Salzlösung in Gegenwart einer definierten Menge Dextran und anschließende Zugabe von Alkali werden 30-40 nm große, kolloidale Eisenoxid- Teilchen gewonnen, an die Dextran adsorbiert ist. Ein ähnliches Verfahren liegt der PCT Anmeldung WO 90/07380 zugrunde. Es werden Fe(II)- und Fe(III)-Salzlösungen unter Zugabe von Dextran bei  $40^\circ\text{C}$  behandelt und anschließend mit NaOH titriert, aufgrund dessen superparamagnetische Partikel mit einer Größe von 40-100 nm erhalten werden. Der Nachteil beider Verfahren im Hinblick auf rasche und einfache Abtrennung besteht darin, daß aufgrund der Feinheit der Partikel eine Separation nur mittels eines hochgradienten Magnetfeldes („High Gradient Magnetic Field“) möglich ist. Ein hochgradientes Magnetfeld wird durch eine mit Stahlwolle dicht-gepackte Säule erzeugt, die sich zwischen den Polschuhen zweier starker Elektro- bzw. Handmagnete befindet. Die Trennung der Teilchen erfolgt durch Hindurchleiten der Suspension durch die gefüllte Trennsäule. Eine Abtrennung solcher Kolloide ist mittels herkömmlicher Handmagnete nicht möglich. Grundsätzliche experimentelle Unterschiede zu der herkömmlichen Chromatographietechnik bestehen somit kaum. Erschwerend für den Nachweis dieser Magnetpartikel ist ferner der Umstand, daß die Teilchen unter dem Lichtmikroskop nicht mehr sichtbar sind.

Die U.S. Patentschrift 4,647,447 beschreibt die Herstellung ferromagnetischer Partikel für die NMR-Diagnostik. Hierbei wird entweder von Fe(II)/Fe(III)-Salzlösungen oder direkt von mikropartikulären Ferriten ausgegangen, die in Gegenwart eines Komplexbildners wie z.B. Serum Albumin, Polysacchariden, Dextran oder Dextrin zu Magnetsuspensionen umgesetzt werden.

Aus der U.S. Patentschrift 4,070,246 ist ein mit p-Aminobenzoessäure und einem Aldehyd unter Zugabe eines ferromagnetischen Pulvers umgesetztes Produkt bekannt, mit dem jedoch eine Nukleinsäure-Aufreinigung nicht möglich ist. Die Herstellung definierter perlförmiger Partikel, wie sie für diagnostische Tests erforderlich sind, ist mit diesem Verfahren ebenfalls nicht durchführbar. Ähnliches gilt auch für die in den U.S. Patentschriften 4,106,448, 4,136,683 und 4,735,796 beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Dextran eingekapselten magnetischen Partikeln für die Diagnostik und die Tumorthherapie.

Serum Albumin-, Polypeptid- oder Polysaccharid-beschichtete superparamagnetische Eisenoxid-Partikel, die als Kontrastmittel in der NMR-Diagnostik eingesetzt werden können, sind in dem U.S. Patent 4,827,945 beschrieben.

Die Herstellungen von Eisenoxiden durch Ausfällen von Eisensalzen in Gegenwart von Dextranen oder Polyglutaraldehyden gehen aus den U.S. Patenten 2,870,740 und 4,267,234 hervor.

Allen vorgenannten Verfahren und Produkten ist gemeinsam, daß die ferromagnetischen oder superparamagnetischen Partikel erst durch Ausfällen einer Fe-Salzlösung, die ein bestimmtes molares Verhältnis von Fe(II) und Fe(III)-Salzen voraussetzt, in Gegenwart eines Komplexbildners bzw. Beschichtungsagens hergestellt werden.

Die Synthese magnetischer Albumin- oder Protein-beschichteter Mikropartikel für die Virus- und Zell-Separation sowie für diagnostische Tests ist Gegenstand der U.S. Patente 4,345,588; 4,169,804; 4,115,534; 4,230,685; 4,247,406 und 4,357,259.

Definierte perl- bzw. kugelförmige Partikel, lassen sich mit den vorgenannten Verfahren nicht herstellen. Die Abtrennung der magnetischen Fraktionen ist darüber hinaus mittels einfacher Handmagnete, wie sie für schnelle Separationsprozesse erforderlich ist, nicht möglich.

Perlförmige Magnetpartikel sind aus den U.S. Patenten 4,861,705 bekannt. Es werden Agarose-Polyaldehyd-Komposit-Partikel durch Suspension der Polymerphase in einer Öl-Phase gewonnen. Die Polymerpartikel weisen eine Teilchengröße von 40-1000 µm auf.

Kugelförmige Partikel aus Polyacrylaten oder Polystyrol werden in dem U.S. Patent 4,654,267 beschrieben, die mittels Suspensionspolymerisation hergestellt werden. Anschließend werden die Teilchen in einer organischen Phase unter definierten Bedingungen gequollen. Es folgt eine Inkubation der Polymerpartikel in einer Eisen-Salzlösung, die, nachdem sie in die Teilchen diffundiert ist, mittels Ammoniak zu superparamagnetischen Eisenoxiden oxidiert werden. Das Verfahren liefert perlförmige Partikel mit Korngrößen zwischen 0.5 und 20 µm. Das Verfahren ist technisch sehr aufwendig. Neben der Verwendung hochtoxischer Substanzen beträgt der Zeitaufwand für die Präparation der Grundmatrix 10-30 Stunden. Ferner bedarf es zusätzlicher Nitro-, Nitroso- oder Amino-Gruppen, die durch einen zusätzlichen Präparationsschritt in die Polymermatrix eingeführt wird, um eine ausreichende Adsorption der Fe-Salze zu gewährleisten. Der entscheidende Nachteil der dort beschriebenen Partikel liegt in dem Grundpolymeren Polystyrol begründet. Polystyrol stellt ein äußerst hydrophobes Material dar, das im Kontakt mit Proteinlösungen oder anderen Biomolekülen stark zur unspezifischen Adsorption neigt, ein Phänomen, das besonders bei Separationsprozessen nachteilig ist. Ein Einsatz der dort beschriebenen Partikel in der Nukleinsäure-Aufreinigung ist nicht möglich.

In der PCT Anmeldung WO92/22201 (identisch mit DEOS 38 36 475 A1) werden Polystyrol Partikel beschrieben, die in einem Zweischnittverfahren auf ein Magnetkolloid aufpolymerisiert werden. Perlförmige Partikel mit eindeutigen Kolloideinschlüssen sind nicht möglich. Das Verfahren stellt einen zeit- (> 20 Std.) und arbeitsaufwendigen Prozess dar. Die Verwendung als DNA-Adsorber ist nicht möglich.

Gegenstand des französischen Patent No. 79 21 343/2463 807 sind Polystyrol-Beads, an die u.a. anti-DNA Antikörper oder Enzyme gekoppelt werden. Es wird

eine Öl-in-Wasser-Dispersionspolymerisation verwendet, die bei 90°C über mehrere Stunden hinweg stattfindet und zu relativ großen Partikeln führt: >0,2 mm. Eine DNA Abtrennung ist mit diesen Trägern nicht möglich.

In dem U.S. Patent 4,157, 323 werden Acrylat-Beads für die Zellseparation und – markierung beschrieben. Aufgrund der Feinheit der Magnetpartikel (30-200 nm) können diese Partikel nicht in routinemäßigen (automatisierten) Separationen eingesetzt werden. Das Verfahren erfordert aufwendige Synthesebedingungen: 100 °C Synthesetemperatur, Argon-Atmosphäre, Gamma-Bestrahlung. Eine DNA-Separationen ist nicht möglich.

Die PCT Anmeldung WO 90/15666 beinhaltet die Herstellung magnetischer Partikel, die durch Zucker- oder Vinylpolymere stabilisiert (eingekapselt) werden. Das Verfahren erfordert aufwendige Vernetzungsschritte mit z.B. Epichlorhydrin (extrem giftig) oder Dibrompropanol.

Polystyrol Komposit-Partikel (keine perlförmigen Teilchen) sind Gegenstand des U.S. Patentes 5,834,121. Eine eindeutige Einkapselung des Magnetkolloids ist bei diesem Verfahren nicht möglich. Das Kolloid liegt vielmehr auf der Oberfläche der Partikel auf. Dadurch scheiden Anwendungen in der PCR sowie in der Nukleinsäure Separation von vornherein aus. Das Verfahren findet unter Stickstoff-Atmosphäre bei 65-90°C über einen Zeitraum von 24 Std. statt.

Hua und Quian, J. Mater. Sci, Vol 36, 2001, 731 beschreiben Na-Polyacrylat Hydrogele, die mit Hilfe der „reversed-phase“ Suspensions-Polymerisation unter Anwendung von Gammastrahlen hergestellt werden. Zur Herstellung dieser Teilchen ist eine Gamma-Strahlen-Quelle vonnöten.

Die Präparation perlförmiger Polyacrylat-Partikel (Hydroxyethyl-methacrylat, Methacrylsäure) unter Zuhilfenahme speziell synthetisierter Polymethylmethacrylate und Polystyrole als Stabilisatoren werden von Takahashi et al. (J. Polymer Sci., Vol. 34, 1996, pp 175) beschrieben. Die Polymerisation

findet in Toluol bei 70-75°C über einen Zeitraum von 8 Stunden hinweg unter Stickstoff-Atmosphäre statt.

Eine weiteres Verfahren zur Herstellung von Polyhydroxymethylmethacrylat-Mikropartikeln, die für die Metall-Chelat-Affinitäts-Chromatographie einsetzbar sind, wird von Denizli et al. (Colloids and Surfaces, Vol. 174, 2000, pp 307) beschrieben. Die Synthese findet über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 65°C statt.

Ein Fällungspolymerisat aus Acrylamid, Methylenbis-Acrylamid und Methacrylsäure, das als Kernpartikel für die weitere Polymerisation mit Styrol benutzt wird, ist von Kawaguchi et al. (Polym. Int. Vol. 30, 1993, pp 225) beschrieben worden.

Hirayama et al. (J. Chromatogr. A, Vol. 676, 1994, pp 267) beschreiben die Synthese perlförmiger Mikropartikel auf der Basis von N,N-dimethylaminopropylacrylamid für die Endotoxin Adsorption. Die Synthesen finden bei 80°C über einen Zeitraum von 12 Stunden statt. Die Teilchen weisen einen Durchmesser von >50 µm auf.

Alle vorgenannten Verfahren auf Polyacrylat oder Polystyrol-Basis stellen sehr zeitaufwendige Präparationstechniken dar, die bis zu 24 Stunden dauern. Die Herstellung magnetischer Partikel, die für die Nukleinsäure-Aufreinigung geeignet wären, sind mit den Verfahren sowie den Produkten aus dem Stand der Technik nicht realisierbar.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, magnetische, perl- bzw. kugelförmige Mikropartikel bereitzustellen, die für die Abtrennung biologischer Substanzen, insbesondere für die Abtrennung von Biopolymeren geeignet sind und die die Nachteile der aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren und Produkte, beispielsweise in Bezug auf Herstellungsaufwand, Partikelgeometrie, magnetisches Separationsverhalten, Korngröße, Funktionalität und Trenneigenschaften vermeiden.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung perl- bzw. kugelförmiger magnetischer Partikel auf Acrylsäurebasis zur Aufreinigung biologischer Substanzen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine Mischung umfassend

- a) mindestens ein polares, vorzugsweise ionisches, besonders bevorzugt kationisches Acrylat-Monomer,
- b) mindestens einen Vernetzer mit mindestens zwei nicht konjugierten, ethylenisch ungesättigten Doppelbindungen,
- c) gegebenenfalls mindestens ein zusätzliches, copolymerisierbares wasserunlösliches monoethylenisch ungesättigtes Monomer,
- d) mindestens einen Polymerisationsinitiator,
- e) mindestens eine magnetische Komponente sowie
- f) gegebenenfalls weitere Bestandteile

in einer mit Wasser nicht mischbaren organischen Phase suspendiert und zu perlförmigen Polymerpartikeln radikalisch vernetzt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind unter „biologischen Substanzen“ insbesondere eukaryotische oder prokaryotische Zellen, Viren, Biopolymere (Nukleinsäuren wie DNA, RNA, PNA und Antikörper sowie andere Proteine und Proteinfragmente), sonstige Biomoleküle (z. B. Zucker) und auch chemisch modifizierte oder natürlich vorkommenden biologischen Substanzen nachempfundene Verbindungen zu verstehen, beispielsweise durch Anlagerung von Polyethylenglykol modifizierte Proteine, oder Nukleinsäuren, die vollständig (alle Nukleotide) oder teilweise (nur einige Nukleotide) modifiziert sind (Nukleinsäurederivate), beispielsweise durch:

- Veränderung der Internucleosidbrücken: Austausch von Phosphodiestern gegen Methylphosphonate, Phosphoramidate, Phosphorothioate oder Hydroxylamine;
- Veränderung der Zuckerkomponenten: Austausch der Ribose gegen diverse Hexo- bzw. Pentopyranosen oder 3'-5'-carbocyclisch verbrückte Derivate der 2'-Deoxyribose (Steffens R & Leumann CJ (1997) Tricyclo-DNA: A

phosphodiester-backbone based DNA analog exhibiting strong complementary base-pairing properties. J. Am. Chem. Soc. 119, 11548-11549);

- Austausch des Strangrückgrats: Austausch der Polyesterketten auf Basis von Zucker-Phosphat-Einheiten gegen Carboxamidketten auf Basis von Aminosäurederivaten wie N-(2-Aminoethyl)-glycin-Einheiten.

Erfindungsgemäß einsetzbare Monomere a) sind beispielsweise Acrylsäure, Methacrylsäure, Acrylamid, Methacrylamid, Dimethylaminoethylacrylat, Diethylamino-ethylacrylat, Dimethylaminoneopentylacrylat und Dimethylaminoethylmethacrylat, Dimethylaminopropylacrylat, Dimethylaminoneopentylacrylat und Dimethylaminoneopentylmethacrylat. Die basischen Acrylate und Methacrylate werden vorzugsweise in Form ihrer Salze mit starken Mineralsäuren, Sulfonsäuren oder Carbonsäuren oder in quaternisierter Form verwendet.

Weitere geeignete Monomere a) sind Sulfoethylacrylat, Sulfoethylmethacrylat, Sulfopropylacrylat, Sulfopropylmethacrylat, 2-Hydroxy-3-methacryloxypropylsulfonsäure und 2-Acrylamido-2-methylpropansulfonsäure.

Die Säuregruppen der vorgenannten Säuren können entweder in nicht neutralisierter Form oder in partiell bzw. bis zu 100% neutralisierter Form bei der Polymerisation eingesetzt werden.

Bevorzugte Monomere der Gruppe a) sind Acrylsäure, Methacrylsäure, Acrylamid, Methacrylamid, Acrylamidpropansulfonsäure und insbesondere Methacrylsäure-2-dimethylaminoethylester, Acrylsäure-[2-(dimethylamino)-ethylester], Acrylsäure-[3-(dimethylamino)-propylester] oder Methacrylsäure-2-diethylaminoethylester sowie Mischungen dieser Monomere.

Diese Monomeren können in jedem beliebigen Verhältnis miteinander copolymerisiert werden, wobei besonders bevorzugt partiell neutralisierte Säuren verwendet werden. Bevorzugte Monomergemische a) sind Acrylsäure und/oder Methacrylsäure; (Meth)acrylsäure/Ester der (Meth)acrylsäure mit C1 bis C4-Alkanolen, z. B. n-Butylacrylat. Die (Meth)acrylsäure kann dabei teilweise oder

vollständig als Salz vorliegen. Weitere bevorzugt verwendete Monomergemische a) sind z. B. Acrylsäure und/oder Alkaliacrylat/Methacrylsäure, Acrylsäure/Alkaliacrylat, Acrylsäure und/oder Alkaliacrylat/Acrylamidopropansulfonsäure, Acrylsäure und/oder Alkaliacrylat/Acrylamid, Acrylamid/Dimethylaminoethylacrylatmethochlorid.

Die Monomere a) werden in einer Menge von 10 bis 95 Gew.-%, vorzugsweise von 20 bis 90 Gew.-%, insbesondere von 30 bis 90 Gew.-%, bezogen auf die eingesetzte Monomergesamtmenge eingesetzt.

Zur Herstellung vernetzter Polymerisate enthält die Mischung wenigstens einen Vernetzer b) mit mindestens zwei nicht konjugierten, ethylenisch ungesättigten Doppelbindungen.

Geeignete Vernetzer sind beispielsweise N,N'-Methylenbisacrylamid, Polyethylenglykoldiacrylate und Polyethylenglykoldimethacrylate, die sich jeweils von Polyethylenglykolen eines Molekulargewichts von 120 bis 8500, vorzugsweise 400 bis 2000, ableiten, Trimethylolpropantriacrylat, Trimethylolpropantrimethacrylat, Ethylenglykoldiacrylat, Propylenglykoldiacrylat, Butandioldiacrylat, Hexandioldiacrylat, Hexandioldimethacrylat, Diacrylate und Dimethacrylate von Blockcopolymerisaten aus Ethylenoxid und Propylenoxid, zweifach bzw. dreifach mit Acrylsäure oder Methacrylsäure veresterte mehrwertige Alkohole, wie Glycerin oder Pentaerythrit, Triallylamin, Tetraallylethylendiamin, Divinylbenzol, Diallylphthalat, Polyethylenglykoldivinylether von Polyethylenglykolen eines Molekulargewichts von 126 bis 4000, Trimethylolpropaniallylether, Butandioldivinylether, Pentaerythrittriallylether und/oder Divinylethylenharnstoff.

Vorzugsweise setzt man wasserlösliche Vernetzer ein, z. B. 1,1,1,-Tris-(hydroxymethyl)propantriacrylat, 3-(acryloyloxy)-2-hydroxypropylmethacrylat, Methacrylsäureallylester, Acrylsäurevinylester N,N'-Methylen-bisacrylamid, Polyethylenglykoldiacrylate und Polyethylenglykoldimethacrylate, die sich von Additionsprodukten von 2 bis 400 Mol Ethylenoxid an 1 Mol eines Diols oder Polyols ableiten, Vinylether von Additionsprodukten von 2 bis 400 Mol Ethylenoxid

an 1 Mol eines Diols oder Polyols, Ethylenglykoldiacrylat, Ethylenglykoldimethacrylat oder Triacrylate und Trimethacrylate von Additionsprodukten von 6 bis 20 Mol Ethylenoxid an ein Mol Glycerin, Pentaerythrittriallylether und/oder Divinylharnstoff.

Als Vernetzer b) sind außerdem Verbindungen geeignet, die mindestens eine polymerisierbare ethylenisch ungesättigte Gruppe und mindestens eine weitere funktionelle Gruppe enthalten. Die funktionelle Gruppe dieser Vernetzer muß in der Lage sein, mit den funktionellen Gruppen, im wesentlichen den Carboxylgruppen oder Sulfonsäuregruppen der Monomeren a) zu reagieren. Geeignete funktionelle Gruppen sind z. B. Hydroxyl-, Amino-, Epoxi-, Isocyanat-, Ester-, Amid- und Aziridinogruppen.

Als Vernetzer b) kommen außerdem solche Verbindungen in Betracht, die mindestens zwei der vorgenannten funktionellen Gruppen tragen, die mit Carboxyl- und Sulfonsäuregruppen der Monomeren a) reagieren können. Beispiele für solche Vernetzer b) sind Ethylenglykol, Diethylenglykol, Triethylenglykol, Tetraethylenglykol, Polyethylenglykol, Glycerin, Polyglycerin, Propylenglykol Diethanolamin, Triethanolamin, Polypropylenglykol, Blockcopolymerisate aus Ethylenoxid und Propylenoxid, Sorbitanfettsäureester, ethoxylierte Sorbitanfettsäureester, Trimethylolpropan, Pentaerythrit, Polyvinylalkohol, Sorbit, Polyglycidylether wie Ethylenglykoldiglycidylether, Polyethylenglykoldiglycidylether, Glycerindiglycidylether, Glycerinpolyglycidylether, Diglycerinpolyglycidylether, Polyglycerinpolyglycidylether, Sorbitpolyglycidylether, Pentaerythritpolyglycidylether, Propylenglykoldiglycidylether und Polypropylenglykoldiglycidylether, Polyaziridinverbindungen wie 2,2-Bishydroxymethylbutanoltris[3-(1-aziridinyl)propionat], 1,6-Hexamethylen-diethylenharnstoff, Diphenylmethan-bis-4,4'-N,N'-diethylenharnstoff, Halogen-epoxyverbindungen wie Epichlorhydrin und  $\alpha$ -Methylfluorhydrin, Polyisocyanate wie 2,4-Toluylendiisocyanat und Hexamethylen-diisocyanat, Alkylencarbonate wie 1,3-Dioxolan-2-on und 4-Methyl-1,3-dioxolan-2-on, polyquaternäre Amine wie Kondensationsprodukte von Dimethylamin mit Epichlorhydrin, Homo- und Copolymere von Diallyldimethylammoniumchlorid sowie Homo- und

Copolymerisate von Dimethylaminoethyl(meth)acrylat, die gegebenenfalls mit beispielsweise Methylchlorid quaterniert sind.

Weitere geeignete Vernetzer b) sind polyvalente Metallionen, die in der Lage sind, ionische Vernetzungen auszubilden. Beispiele für solche Vernetzer sind Magnesium-, Calcium-, Barium- und Aluminiumionen. Diese Vernetzer werden beispielsweise als Hydroxide, Carbonate oder Hydrogencarbonate der wäßrigen polymerisierbaren Lösung zugesetzt.

Weitere geeignete Vernetzer sind multifunktionelle Basen, die ebenfalls in der Lage sind, ionische Vernetzungen auszubilden, beispielsweise Polyamine oder deren quaternierte Salze. Beispiele für Polyamine sind Ethylendiamin, Diethylentriamin, Triethyltetramin, Tetraethylenpentamin, Pentaethylenhexamin und Polyethylenimine sowie Polyvinylamine mit Molmassen von jeweils bis zu 4000000.

Die vorgenannten Vernetzer b) können einzeln oder in Mischungen verwendet werden.

Die Monomeren b) werden in einer Menge von 0,01 bis 30 Gew.-%, vorzugsweise von 0,1 bis 30 Gew.-%, insbesondere von 0,5 bis 20 Gew.-%, bevorzugt von 0,5 bis 15 Gew.-%, besonders bevorzugt von 0,5 bis 10 Gew.-%, bezogen auf die Monomergesamtmenge, eingesetzt. Für die Herstellung hochporöser Träger (Porenweite >50 nm) werden in der Regel Vernetzerkonzentrationen zwischen 0,5 und 1 Gew.% eingesetzt.

Erfindungsgemäß geeignete Monomere c) sind solche monoethylenisch ungesättigte Monomere, die mit den Monomeren a) und b) copolymerisierbar sind. Hierzu gehören beispielsweise die Amide und Nitrile von monoethylenisch ungesättigten Carbonsäuren, z. B. Acrylamid, Methacrylamid und N-Vinylformamid, Acrylnitril und Methacrylnitril, Dialkyldiallylammoniumhalogenide wie Dimethyldiallylammoniumchlorid, Diethyldiallylammoniumchlorid, Allylpiperidiniumbromid, N-Vinylimidazole wie z. B. N-Vinylimidazol, 1-Vinyl-2-methylimidazol und

N-Vinylimidazoline wie N-Vinylimidazolin, 1-Vinyl-2-methylimidazolin, 1-Vinyl-2-ethylimidazolin oder 1-Vinyl-2-propylimidazolin, die gegebenenfalls in Form der freien Basen, in quaternisierter Form oder als Salz bei der Polymerisation eingesetzt werden können.

Außerdem eignen sich Dialkylaminoalkylacrylate und Dialkylaminoalkylmethacrylate, Dimethylaminoethylacrylat, Dimethylaminoethylmethacrylat, Diethylaminoethylacrylat und Diethylaminoethylmethacrylat. Die basischen Ester werden vorzugsweise in quaternisierter Form oder als Salz eingesetzt.

Weitere geeignete Verbindungen c) sind beispielsweise Vinylester von gesättigten C1- bis C4-Carbonsäuren wie Vinylformiat, Vinylacetat oder Vinylpropionat, Alkylvinylether mit mindestens 2 C-Atomen in der Alkylgruppe, wie z.B. Ethylvinylether oder Butylvinylether, Ester von monoethylenisch ungesättigten C3- bis C6-Carbonsäuren, z. B. Ester aus einwertigen C1- bis C18-Alkoholen und Acrylsäure wie z. B. Methylacrylat, Ethylacrylat, Propylacrylat, Isopropylacrylat, n-Butylacrylat, Isobutylacrylat, Hexylacrylat, 2-Ethylhexylacrylat, Stearylacrylat, die entsprechenden Ester der Methacrylsäure, Fumarsäure oder Maleinsäure, Halbester von Maleinsäure, z.B. Maleinsäuremonomethylester und Hydroxyalkylester der genannten monoethylenisch ungesättigten Carbonsäuren, z. B. 2-Hydroxyethylacrylat, Hydroxypropylacrylat, Hydroxybutylacrylat, Hydroxyethylmethacrylat, Hydroxypropylmethacrylat und Hydroxybutylmethacrylat, N-Vinylactame wie N-Vinylpyrrolidon oder N-Vinylcaprolactam, Acrylsäure- und Methacrylsäureester von alkoxylierten einwertigen, gesättigten Alkoholen, z. B. von Alkoholen mit 10 bis 25 C-Atomen, die mit 2 bis 200 Mol Ethylenoxid und/oder Propylenoxid pro Mol Alkohol umgesetzt worden sind, sowie Monoacrylsäureester und Monomethacrylsäureester von Polyethylenglykol oder Polypropylenglykol, wobei die Molmassen (MM) der Polyalkylenglykole beispielsweise bis zu 2000 betragen können. Weiterhin geeignete Monomere der Gruppe c) sind alkylsubstituierte Styrole wie Ethylstyrol oder tert. Butylstyrol.

Die Monomeren c) können auch als binäre oder ternäre Mischungen bei der Copolymerisation mit den anderen Monomeren eingesetzt werden, z. B. Mischungen aus Vinylacetat und 2-Hydroxyethylacrylat in beliebigem Verhältnis.

Bevorzugte Monomere c) sind 2-Hydroxyethylmethacrylat, Acrylamid, 2-Hydroxyethylacrylat, Vinylacetat, (Meth)acrylamid, (Meth)acrylsäureester, vinylaromatische Verbindungen und N-Vinylactame, insbesondere N-Vinylpyrrolidon.

Gegebenenfalls setzt man die Monomere der Gruppe c) in Mengen von 0,5 bis 60 Gew.-%, insbesondere 0,5 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise 5 bis 50 Gew.-%, bevorzugt 5 bis 40 Gew.-%, besonders bevorzugt 5 bis 30 Gew.-% und ganz besonders bevorzugt 5 bis 20 Gew.-%, bezogen auf die insgesamt zur Polymerisation gelangenden Monomere ein.

Als Polymerisationsinitiatoren d) können sämtliche unter den Polymerisationsbedingungen in Radikale zerfallende Verbindungen eingesetzt werden, z.B. Peroxide, Hydroperoxide, Wasserstoffperoxid, Persulfate, Azoverbindungen sowie Redoxkatalysatoren.

Bevorzugt ist der Einsatz von wasserlöslichen Initiatoren. In manchen Fällen ist es vorteilhaft, Mischungen verschiedener Polymerisationsinitiatoren zu verwenden, z. B. Mischungen aus Wasserstoffperoxid und Natrium- oder Kaliumperoxidisulfat. Mischungen aus Wasserstoffperoxid und Natriumperoxidisulfat können in jedem beliebigen Verhältnis verwendet werden.

Geeignete organische Peroxide sind beispielsweise Acetylacetonperoxid, Methyläthylketonperoxid, tert.-Butylhydroperoxid, Cumolhydroperoxid, tert.-Amylperpivalat, tert.-Butylperpivalat, tert.-Butylperneohehexanoat, tert.-Butylperisobutyrat, tert.-Butylper-2-ethylhexanoat, tert.-Butylperisononanoat, tert.-Butylpermaleat, tert.-Butylperbenzoat, tert.-Butylper-3,5,5-trimethylhexanoat und tert.-Amylperneodekanoat.

Besonders geeignete Polymerisationsinitiatoren sind N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS), durch deren kombinierte Zugabe eine signifikante Beschleunigung der Polymerisation erzielt werden kann.

Die bevorzugten Konzentrationen von TEMED und APS (40%ige wäßrige Lösung) liegen, bezogen auf die Monomerphase, im Bereich von 1-10 Vol. % für TEMED und 1-20% für APS, wobei generell eine steigende Konzentration an TEMED und APS mit einem proportionalen Anstieg der Polymerisationsgeschwindigkeit einhergeht.

Überraschenderweise konnte gezeigt werden, daß die oben beschriebene Polymerisationsbeschleunigung nur dann eintritt, wenn die APS Zugabe zeitlich vor der TEMED Zugabe erfolgt. Auf diese Weise kann die Polymerisation und somit die Beadbildung innerhalb weniger Minuten abgeschlossen werden.

Weiterhin geeignet sind wasserlösliche Azostarter, z. B. 2,2'-Azobis-(2-amidinopropan)dihydrochlorid, 2,2'-Azobis-(N,N'-dimethylen)iso-butyramidindihydrochlorid, 2-(Carbamoylazo)isobutyronitril, 2,2'-Azobis [2-(2'-imidazolin-2-yl)propan-dihydrochlorid und 4,4,-Azobis-(4-cyanovaleriansäure).

Als Initiatoren können weiterhin Redoxkatalysatoren verwendet werden. Redoxkatalysatoren enthalten als oxidierende Komponente mindestens eine der oben angegebenen Perverbindungen und als reduzierende Komponente z. B. Ascorbinsäure, Glukose, Sorbose, Ammonium- oder Alkalimetall-hydrogensulfit, -sulfit, -thiosulfat, -hyposulfit, -pyrosulfit oder -sulfid, Metallsalze, wie Eisen-II-ionen oder Silberionen oder Natriumhydroxymethylsulfoxylat.

Vorzugsweise verwendet man als reduzierende Komponente des Redoxkatalysators Ascorbinsäure oder Natriumsulfit. Anstelle der oxidierenden Komponente des Redoxkatalysators kann man auch einen oder mehrere wasserlösliche Azostarter verwenden.

Die genannten Polymerisationsinitiatoren werden in üblichen Mengen eingesetzt, die in Abhängigkeit von dem gewünschten Reaktionsverlauf durch den Fachmann in geeigneter Weise angepaßt werden können.

Erfindungsgemäß geeignete magnetische Komponenten e) sind insbesondere Magnetkolloide oder magnetische Pulver. Als magnetische Kolloide bzw. Magnetpulver können grundsätzlich solche ferro-, ferri- oder superparamagnetischen Substanzen eingesetzt werden, die eine homogene Mischung mit der Monomerphase eingehen.

Als bevorzugte magnetische Substanz wird Magnetit mit Partikelgrößen im Bereich von etwa 10 nm bis etwa 600 nm, insbesondere etwa 20 bis etwa 400 nm eingesetzt. Substanzen solcher Art sind z.B. unter der Handelsbezeichnung Bayferrox im Handel erhältlich. Die Herstellung solcher Kolloide ist allgemeiner Stand der Technik und wurde u.a. von Shinkai et al., Biocatalysis, Vol. 5, 1991, pp61, Reimers und Khalafalla, Br. Patent 1,439,031 oder Kondo et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol 41, 1994, pp 99, beschrieben.

Die Konzentrationen der Kolloide in der Polymerphase liegen, jeweils bezogen auf die Monomerphase, vorzugsweise im Bereich von etwa 5 bis etwa 30 Vol.-%, insbesondere 5 bis 10 Vol.-% bei den Kolloiden, die herstellungsbedingt bereits als wäßrige Kolloide vorliegen, und im Bereich von etwa 1 bis etwa 20 Gew.-%, insbesondere 5 bis 10 Gew.-% bei den Festsubstanzen.

Die magnetischen Eigenschaften der erfindungsgemäß herstellbaren Polymerpartikel werden durch direktes Zumischen eines geeigneten Magnetkolloids oder magnetischen Pulvers vor der Suspension zu der Monomerphase erzielt. Durch die Möglichkeit des genauen Zudosierens der magnetischen Substanz können parallel damit die magnetischen Eigenschaften der Polymerpartikel in gezielter Weise eingestellt bzw. verändert werden. Dies ist vor allem im Hinblick auf die die Trenneffizienz determinierenden magnetischen Attraktionskräfte der Teilchen von ausschlaggebender Bedeutung. Dieser einfach zu variierende Verfahrensparameter zeichnet den erfindungsgemäßen Prozess

gegenüber den meisten aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren zur Herstellung magnetischer Träger eindeutig aus.

So sind in dem im U.S. Patent 4,654,267 beschriebenen Verfahren zur Herstellung magnetischer Partikel aufwendige Quellungsprozesse mit Eisensalzen und anschließende Oxidation zum Magnetit erforderlich, während bei dem erfindungsgemäßen Verfahren das magnetische Kolloid in einfacher Weise der Monomerphase zugesetzt werden kann.

Bei der anschließenden Suspension in der organischen Phase werden die Magnet-Kolloide dann simultan in die sich bildenden Polymertröpfchen eingekapselt. Diese Verfahrensweise stellt eine deutliche verfahrenstechnische Vereinfachung gegenüber dem vorgenannten Verfahren dar, womit auch eine erhebliche Zeitersparnis verbunden ist.

Die Präparationszeiten bei dem vorgenannten Verfahren aus dem Stand der Technik betragen zwischen 10 und 30 Stunden, das erfindungsgemäße Verfahren benötigt hingegen lediglich etwa 5 bis 15 Minuten zur Gewinnung der funktionalisierten Magnetpartikel.

Um eine möglichst feindisperse, gleichmäßige Verteilung der Magnetpartikel in dem Polymeren zu gewährleisten, ist es vorteilhaft eine kurzzeitige Beschallung der Monommischung mit Hilfe eines Ultraschallfingers oder in einem entsprechenden Ultraschallbad vorzunehmen oder, beispielsweise durch Einsatz üblicher Homogenisatoren, hohe Scherkräfte auf die Mischung einwirken zu lassen.

Neben der Beschallung können den magnetischen Pulvern auch solche Substanzen zugesetzt werden, die emulsionsstabilisierende Eigenschaften besitzen und dadurch eine homogenere Verteilung der Magnetsubstanzen in der Monomerphase fördern. Substanzen dieser Art sind z.B. Poly-N-Vinylpyrrolidon, Celluloseacetat-butyrat, Serum-Albumin, aliphatische und aromatische Sulfonsäure-Derivate, Gelatine oder Polyethylenglykole. Die Mengen der

eingesetzten Emulgatoren liegen zumeist im Bereich von etwa 0.5 bis etwa 5 Gew.-%, bezogen auf die eingesetzte Magnetsubstanz.

Die homogene Verteilung der Magnetsubstanzen in der Monomerphase lässt sich auch fördern, indem man beispielsweise hohe Scherkräfte auf die Mischung einwirken lässt. Dazu verwendet man Homogenisatoren, die dem Fachmann bekannt sind.

Beispielhaft seien genannt:

- Labordissolver Dispermat, Fa. VMA-Getzmann, Reichshof, DE
- Ultra-Turax, Fa. Janke und Kunkel, Staufen, DE
- Druckhomogenisator, Fa. Gaulin, Lübeck, DE
- Geräte mit einem Rotor-Stator-System, etwa
  - Dispax, Fa. Janke und Kunkel, Staufen, DE
  - Cavitron-Homogenisatoren, Fa. v. Hagen & Funke, Sprochhövel, DE
  - Homogenisatoren der Fa. Kotthoff, Essen, DE
  - Homogenisatoren der Fa. Dorr Oliver, Grevenbroich, DE.

Üblicherweise betreibt man diese Geräte bei Drehzahlen von 1000 bis 25.000 pro Minute, bevorzugt 2000 bis 25.000 pro Minute. Weiterhin können die hohen Scherkräfte ebenso durch

- Hindurchpressen der Mischung unter hohem Druck durch einen engen Spalt oder durch Düsen kleinen Durchmessers,
  - Kolloidmühlen,
- oder andere geeignete Homogenisatoren erzeugt werden.

Die erfindungsgemäß hergestellten Partikel weisen vorzugsweise eine Teilchengröße im Bereich von etwa 1 bis etwa 50  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 1 bis 30  $\mu\text{m}$ , insbesondere 1 bis 20  $\mu\text{m}$  auf. Solche Teilchengrößen haben sich im Bereich der Separationstechnologie sowohl im Hinblick auf eine rasche magnetische Abtrennung als auch in Bezug auf maximal verfügbare Teilchenoberflächen, die ausschlaggebend für die Trennkapazität des Trägers sind, als optimal herausgestellt.

Die aus dem Stand der Technik bekannten Magnetpartikel auf Polyacrylat-Basis weisen durchweg eine Partikelgröße  $>50 \mu\text{m}$ , solche auf Basis von Polystyrol eine solche von  $<1 \mu\text{m}$  auf.

Teilchengrößen im Bereich von etwa 1 bis etwa  $50 \mu\text{m}$  zu erhalten, wird überraschenderweise durch die Verwendung von Ölen, insbesondere Mineralöl, tierischen oder pflanzlichen Ölen (Pflanzenölen) als Suspensionsmedium mit einer Viskosität im Bereich von 25 bis  $150 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ , insbesondere im Bereich von 30 bis  $80 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  (bzw. Centipoise) ermöglicht.

Vorzugsweise wird die Monomerphase vor der Suspension in der organischen Phase etwa 5 bis etwa 180 Sekunden vorpolymerisiert.

Erfindungsgemäß bevorzugt einsetzbare Öle sind ausgewählt unter

- a) Mineralölen, d. h. flüssigen Destillationsprodukten, die aus mineralischen Rohstoffen (Erdöl, Braun- u. Steinkohlen, Holz, Torf) gewonnen wurden und die im wesentlichen aus Gemischen von gesättigten Kohlenwasserstoffen bestehen,
- b) Ölen tierischen Ursprungs, insbesondere technischen Fischölen, wie Capelinöl, Heringsöl, Makrelenöl, Orange-Roughy-Öl, Sardinenöl, Thunfischöl und anderen, sowie
- c) Ölen pflanzlichen Ursprungs, insbesondere Aprikosenkernöl, Arganöl, Avocadoöl, Babassuöl, Baumwollsaatöl, Boragesamenöl, Calendulaöl, Camelinaöl, Erdnussöl, Frittieröl, Hagebuttenkernöl, Hanföl, Haselnussöl, Johannesbeersamenöl, Johanniskrautöl, Jojobaöl, Kakaobutter, Knoblauchöl, Kokosöl, Kürbiskernöl, Kukuinussöl, Leinöl, Lorbeeröl, Maiskeimmöl, Makadamianussöl, Mandelöl, Mangofett, M.C.T.-Öl, Mohnöl, Nachtkerzenöl, Olivenöl, Palmkernöl, Palmöl, Paranussöl, Pekannussöl, Perillaöl, Pfirsichkernöl, Pistazienkernöl, Rain Forest Öle, Reiskeimmöl, Rizinusöl, Gemischen aus Rüböl / Rapsöl, Gemischen aus Safloröl / Distelöl, Sanddornfruchtfleischöl, Schwarzkümmelöl, Senföl, Sesamöl,

Sheabutter, Sojaöl, Sonnenblumenöl, Traubenkernöl, Walnussöl und Weizenkeimöl,  
oder Mischungen davon.

Die Polymerisationsreaktion wird bevorzugtermaßen in dem Fachmann bekannter Weise entweder im Batch-Reaktor, im kontinuierlichen Strömungsrohr, in der Rührkesselkaskade oder im kontinuierlichen Rührkesselreaktor durchgeführt. Die Kesselreaktoren haben in der chemischen Industrie dabei die größte Bedeutung erlangt, da sie eine sehr große Flexibilität bezüglich der Betriebsbedingungen und der Betriebsweise aufweisen und an fast alle Prozeßerfordernisse angepaßt werden können. Rührkesselreaktoren eignen sich für diskontinuierliche und kontinuierliche Betriebsweise und sie besitzen einen weiten Einsatzbereich, der vom Laborkessel bis zum Großreaktor reicht. Rührkesselreaktoren sind in standardisierter Bauweise für zahlreiche Anwendungen in verschiedensten Werkstoffen und Werkstoffkombinationen erhältlich. Rührkesselreaktoren sind leicht begeh- und reinigbar und erlauben eine relativ einfache Umstellung auf andere Polymerisationsreaktionen (s. z. B. Ullmann, Band 3, 4. Aufl., S. 505-510).

Neben den üblichen Kühl- und Heizeinrichtungen, Zu- und Ableitungen für Reaktionsedukte und -produkte weisen die für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneten Reaktorbehälter Rührvorrichtungen auf, die meist aus einem über eine Rührwelle angetriebenen Rührer bestehen und für gewisse Anwendungsfälle zudem Statoren aufweisen, die zur besseren Durchmischung als Stromstörer dienen. Die Rührer selbst sind an meist senkrechten Rührerachsen befestigt, welche entweder von unten oder von oben in den im allgemeinen zylindrischen Reaktorbehälter hineinragen. Der zentrische Einbau von oben in den Reaktorbehälter ist im allgemeinen bevorzugt, da die Abdichtung der Rührerwelle relativ einfach durchgeführt werden kann.

Aus Ullmanns, Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5. Auflage, Volume B2, Kapitel 25 sind unterschiedlichste Rührer, beispielsweise Propellerrührer, Scheibenrührer, Ankerrührer, Impellerrührer, Blattrührer, MIG-Rührer, usw. bekannt.

Erfindungsgemäß bevorzugt wird der Suspensionsvorgang mit Hilfe eines konventionellen Propellerrührers bewerkstelligt. Um die gewünschten Teilchengrößen von 1 bis 30  $\mu\text{m}$  zu erhalten, werden Rührgeschwindigkeiten zwischen 1000 und 4000 U/Min. benötigt, wobei eine direkte Proportionalität zwischen der Rührgeschwindigkeit und der Feinheit der Teilchen gegeben ist. So lassen sich Teilchengrößen von  $<10 \mu\text{m}$  durchweg mit Rührgeschwindigkeiten von  $>2000 \text{ U/Min.}$  und solche  $>10 \mu\text{m}$  mit Rührgeschwindigkeiten von  $<1000\text{-}2000 \text{ U/Min.}$  erzielen.

Als erfindungsgemäß einsetzbare weitere Bestandteile f) kommen insbesondere Schutzkolloide, Polymerisationsbeschleuniger oder Emulgatoren in Betracht. Diese sind aus dem Stand der Technik bekannt und können durch den Fachmann je nach Bedarf der Reaktion zugesetzt werden.

Ein wesentliches Merkmal der vorliegenden Erfindung besteht in der Möglichkeit, die gewünschten Eigenschaften der Beads wie Molekülbindungsverhalten, magnetische Eigenschaften, Funktionalität durch die Zusammensetzung der Ausgangsmischung festzulegen. So wird die Porosität der Teilchen, die ein unmittelbarer Einflußparameter für die Biomolekül-Bindungskapazitäten darstellt, in entscheidendem Maße durch die Konzentration des Vernetzers b) in dem Monomeransatz festgelegt. In der Regel enthält der Monomeransatz zwischen 0,5 und 10 Gew.-% Vernetzeranteil, vorzugsweise zwischen 0,5 und 2 Gew.-%. Je geringer der Vernetzeranteil im Reaktionsansatz ist, desto größer werden die Poren der polymerisierten Partikel.

Dies stellt einen weiteren überraschenden Vorteil der vorliegenden Erfindung dar, denn bei üblichen Suspensionspolymerisationsverfahren muß man, um eine große innere Oberfläche zu erzielen, einen geringen Vernetzungsgrad wählen. Durch Einlagern von Lösungsmittelmolekülen werden die Kettenabstände aufgeweitet und die Polymere werden sehr weich (Gel-Typen) und sind somit mechanisch sehr instabil, was für viele Anwendungen, insbesondere im Bereich der Separation von Biomolekülen, unerwünscht ist. Wenn größere mechanische Stabilität gefordert wird, benötigt man permanent makroporöse Polymere. Diese werden bei der

üblichen Suspensionspolymerisation durch Anwesenheit geeigneter Porenbildner (meist ein inertes Lösungsmittel) in der dispersen Phase gebildet. Das Porogen soll ein thermodynamisch gutes Lösungsmittel für das Monomer, aber ein schlechtes Lösungsmittel für das Polymer sein. Ein "gutes" Porogen führt zu sehr später Phasenseparation und damit zu kleinen Poren, ein "schlechtes" Porogen führt zu früherer Phasentrennung und großen Poren. Aufgrund der hohen Vernetzungsgrade sind solche Polymerträger nur sehr wenig quellbar, haben aber gute mechanische Eigenschaften.

Im Gegensatz dazu ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren die Steuerung der Porosität direkt über die Vernetzerkonzentration.

Außerdem werden - im Gegensatz zu den aus dem Stand der Technik bekannten Suspensionsphasen - für das erfindungsgemäße Verfahren keine zusätzlichen oberflächenaktiven Stabilisatoren für die organische Phase benötigt. Dieser Umstand erleichtert die anschließenden Waschprozeduren, da beim Entfernen der Ölphase keine restlichen Stabilisatoren auf der Oberfläche der Beads verbleiben können.

Die erfindungsgemäß erhaltenen Polymerpartikel sind in Abhängigkeit von Art und Anzahl der polaren Funktionen, die sie einpolymerisiert enthalten, zur Aufreinigung von Biomolekülen, Mikroorganismen oder Zellen geeignet.

Es können jedoch auch bestimmte Liganden („Fängermoleküle“) an die Polymerhülle chemisch gekoppelt werden, die die Biomoleküle, Mikroorganismen oder Zellen selektiv zu binden vermögen. Zur Herstellung dieser Liganden werden die Polymerpartikel (nach erfolgter Suspensionspolymerisation) vorzugsweise mit Monomeren umgesetzt, die reaktive Gruppen enthalten. Bevorzugte Monomere mit reaktiven Gruppen sind ausgewählt unter Glycidylmethacrylaten, Glycidylacrylaten, Halogenalkylmethacrylaten, Halogenalkylacrylaten, Maleinsäureanhydrid, Acrylsäurechlorid, Acrylsäureanhydrid, Methacrylsäurechlorid und Methacrylsäureanhydrid. Diese Monomere mit reaktiven Gruppen werden vorzugsweise mit Nucleophilen wie z.B. Aminen, im besonderen mit

Polyaminen und besonders bevorzugt mit Polyethyleniminen nachträglich umgesetzt. Hierdurch wird eine Modifizierung der Partikeloberfläche mit den erwünschten Liganden bewirkt.

Ganz besonders bevorzugt ist die Verwendung von Monomeren, die über alkylierende Reagenzien modifiziert werden können wie Aminoalkyl(meth)acrylate, Hydroxyalkyl(meth)acrylate.

Weitere voneinander unabhängige Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind: Perl- bzw. kugelförmige magnetische Partikel auf Acrylsäurebasis zur Aufreinigung biologischer Substanzen, erhältlich nach dem erfindungsgemäßen Verfahren sowie die Verwendung perl- bzw. kugelförmiger magnetischer Partikel auf Acrylsäurebasis, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten wurden, zur Aufreinigung biologischer Substanzen.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung, ohne sie jedoch darauf einzuschränken.

### **Beispiel 1**

10 ml einer wäßrigen Mischung bestehend aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid (34:1) werden mit 10 ml 2-Dimethylaminoethyl-methacrylat und 118 mg Magnetit-Kolloid (Bayferrox, Fa. Bayer) vermischt und 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt (500 W). Der Mischung werden sodann 2 ml 0,4 %ige Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) und 1 ml N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) zugesetzt. Nach Zugabe des TEMEDs wird der Polymeransatz 30 Sekunden vorpolymerisiert und sodann in 300 ml Pflanzenöl, Viskosität 84 Centipoise, unter Rühren (1500 U/Min.) für 4 Min. suspendiert. Man läßt die Mischung danach für weitere 10 Min. ohne Rühren weiter polymerisieren. Der Suspension werden ca. 100 ml Petroläther zugesetzt; die Ölphase läßt sich sodann durch Anlegen eines Handmagneten abtrennen. Es folgt mehrfaches Waschen der Polymerphase mit Petroläther, Aceton und Äthanol. Danach wird die Polymerphase mehrere Stunden in aqua dest aufbewahrt. Es werden Polymerpartikel mit einer mittleren Teilchengröße von 27 µm gewonnen.

### **Beispiel 2**

Ein Magnetit-Kolloid wird analog der Vorschrift von Kondo et al., Appl. Microbiol. Biotechn., Vol. 41, 1994, 99-105, hergestellt. 5 ml des wäßrigen Kolloids werden für 30 Sekunden mit einem Hochleistungsultraschallfinger (Fa. Dr. Hielscher) beschallt. Dieses Kolloid wird sodann einer Mischung, bestehend aus 10 ml Acrylamid (30%ige wäßrige Lösung), 2 ml 2-Hydroxyethyl-methacrylat und 1 ml N,N'-Methylenbisacrylamid (30%ige wäßrige Lösung) und 15 ml 2-Dimethylaminoethyl-methacrylat, zugesetzt. Nach Zugabe von 2 ml APS und 1 ml TEMED wird die Mischung in 40 ml Pflanzenöl (Viskosität 105 Centipoise) unter Rühren (2200 U/Min) für 4 Minuten dispergiert.

Danach wird die Suspension für 15 Minuten auf 60°C ohne Rühren aufgeheizt. Die Ölphase wird sodann nach Absetzen der Polymerphase abdekantiert und diese mehrfach abwechselnd analog Beispiel 1 mit Petroläther, Aceton und Äthanol gewaschen. Die gewonnene Fraktion wird mehrere Stunden in Wasser aufbewahrt. Man erhält Polymerpartikel mit einer mittleren Teilchengröße von 13 µm.

### **Beispiel 3**

8 ml N,N'-Methylenbisacrylamid, 85 ml 2-Hydroxyethyl-methacrylat und 95 ml 2-Dimethylaminoethyl-methacrylat werden vermischt. 8,5 g Bayferrox 318 M-Pulver (Fa. Bayer), das zuvor mit 5 ml Polyethylenglykol (Mw 400) vermischt wurden, werden der Monomermischung zugesetzt. Die Mischung wird sodann 10 Sekunden mit einer Ultraschall-Sonotrode analog Beispiel 2 beschallt. Es erfolgt die Zugabe von 18 ml APS. Die Mischung wird anschließend in 2,5 Liter Pflanzenöl gemäß Beispiel 1 unter Rühren (1500 U/Min) dispergiert. Nach 30 Sekunden erfolgt die Zugabe von 10 ml TEMED. Nach 3minütiger Dispersion unter Rühren läßt man die Mischung weitere 15 Minuten ohne Rühren bei Raumtemperatur stehen. Es erfolgt die Abtrennung der Ölphase. Nach mehrmaligem Waschen mit Petroläther wird die Polymerphase mehrfach abwechselnd mit Aceton und Äthanol nachgewaschen. Danach wird die Polymerphase mehrere Stunden in 500 ml aqua dest aufbewahrt. Es werden Polymerpartikel mit einer mittleren Teilchengröße von 22 µm gewonnen.

**Patentansprüche:**

1. Verfahren zur Herstellung perlförmiger magnetischer Partikel auf Acrylsäurebasis zur Aufreinigung biologischer Substanzen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine Mischung umfassend
  - a) mindestens ein polares Acrylat-Monomer,
  - b) mindestens einen Vernetzer mit mindestens zwei nicht konjugierten, ethylenisch ungesättigten Doppelbindungen,
  - c) gegebenenfalls mindestens ein zusätzliches, copolymerisierbares wasserunlösliches monoethylenisch ungesättigtes Monomer,
  - d) mindestens einen Polymerisationsinitiator,
  - e) mindestens eine magnetische Komponente sowie
  - f) gegebenenfalls weitere Bestandteilein einer mit Wasser nicht mischbaren organischen Phase suspendiert und zu perlförmigen Polymerpartikeln radikalisch vernetzt.
  
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das polare Acrylat-Monomer a) ein ionisches Acrylat-Monomer, vorzugsweise ein kationisches Acrylat-Monomer ist, insbesondere ein Acrylat-Monomer, das ausgewählt ist unter Methacrylsäure-2-dimethylaminoethylester, Acrylsäure-[2-(dimethylamino)-ethylester], Acrylsäure-[3-(dimethylamino)-propylester] oder Methacrylsäure-2-diethylaminoethylester.
  
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die organische Phase ausgewählt ist unter
  - a) Mineralölen,
  - b) Ölen tierischen Ursprungs, insbesondere technischen Fischölen, wie Capelinöl, Heringsöl, Makrelenöl, Orange-Roughy-Öl, Sardinöl, Thunfischöl und anderen, sowie
  - c) Ölen pflanzlichen Ursprungs, insbesondere Aprikosenkernöl, Arganöl, Avocadoöl, Babassuöl, Baumwollsaatöl, Boragesamenöl, Calendulaöl, Camolinaöl, Erdnussöl, Frittieröl, Hagebuttenkernöl, Hanföl, Haselnussöl, Johannisbeersamenöl, Johanniskrautöl, Jojobaöl, Kakaobutter,

Knoblauchöl, Kokosöl, Kürbiskernöl, Kukuinussöl, Leinöl, Lorbeeröl, Maiskeimöl, Makadamianussöl, Mandelöl, Mangofett, M.C.T.-Öl, Mohnöl, Nachtkerzenöl, Olivenöl, Palmkernöl, Palmöl, Paranussöl, Pekannussöl, Perillaöl, Pfirsichkernöl, Pistazienkernöl, Rain Forest Öle, Reiskeimöl, Rizinusöl, Gemischen aus Rüböl / Rapsöl, Gemischen aus Safloröl / Distelöl, Sanddornfruchtfleischöl, Schwarzkümmelöl, Senföl, Sesamöl, Sheabutter, Sojaöl, Sonnenblumenöl, Traubenkernöl, Walnussöl und Weizenkeimöl,

oder Mischungen davon.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die organische Phase eine Viskosität im Bereich von 25 bis 150 mPa·s, insbesondere im Bereich von 30 bis 80 mPa·s aufweist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die magnetische Komponente e) Magnetit mit Partikelgrößen im Bereich von etwa 10 nm bis etwa 600 nm, insbesondere etwa 20 bis etwa 400 nm.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die magnetische Komponente e) Substanzen zugesetzt enthält, die emulsionsstabilisierende Eigenschaften besitzen, insbesondere Substanzen, die ausgewählt sind unter Poly-N-Vinylpyrrolidon, Celluloseacetatbutyrat, Serum-Albumin, aliphatischen und aromatischen Sulfonsäure-Derivaten, Gelatine oder Polyethylenglykolen oder Mischungen davon.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Monomer c) ausgewählt ist unter 2-Hydroxyethylmethacrylat, Acrylamid, 2-Hydroxyethylacrylat, Vinylacetat, (Meth)acrylamid, (Meth)acrylsäureester, vinylaromatischen Verbindungen und N-Vinylactamen, insbesondere N-Vinylpyrrolidon.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Monomer c) in Mengen von 0,5 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise 5 bis 50 Gew.-%, bevorzugt 5 bis 40 Gew.-%, besonders bevorzugt 5 bis 30 Gew.-% und ganz besonders bevorzugt 5 bis 20 Gew.-%, bezogen auf die insgesamt zur Polymerisation gelangenden Monomere, eingesetzt wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Monomerphase vor der Suspension in der organischen Phase etwa 5 bis etwa 180 Sekunden vorpolymerisiert wird.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Polymerisationsinitiator d) aus einer Mischung von Ammoniumpersulfat und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin besteht.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Ammoniumpersulfat-Zugabe zeitlich vor der N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin-Zugabe erfolgt.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man nach erfolgter Suspensionspolymerisation Liganden chemisch an die Polymerhülle koppelt, die Biomoleküle, Mikroorganismen oder Zellen selektiv zu binden vermögen.
13. Perlförmige magnetische Partikel auf Acrylsäurebasis zur Aufreinigung biologischer Substanzen, erhältlich nach einem der Ansprüche 1 bis 12 dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel eine Teilchengröße im Bereich von etwa 1 bis etwa 50  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 1 bis 30  $\mu\text{m}$ , insbesondere 1 bis 20  $\mu\text{m}$  aufweisen und
- a) mindestens ein polares Acrylat-Monomer,
  - b) mindestens einen Vernetzer mit mindestens zwei nicht konjugierten, ethylenisch ungesättigten Doppelbindungen,

- c) gegebenenfalls mindestens ein zusätzliches, copolymerisierbares wasserunlösliches monoethylenisch ungesättigtes Monomer,
  - d) mindestens eine magnetische Komponente sowie
  - e) gegebenenfalls weitere Bestandteile
- einpolymerisiert enthalten.

14. Verwendung von perlförmigen magnetischen Partikeln auf Acrylsäurebasis, wie in Anspruch 13 beschrieben, zur Aufreinigung biologischer Substanzen, insbesondere zur Aufreinigung von Nukleinsäuren, Nukleinsäurederivaten, eukaryotischen Zellen, Proteinen, Viren oder Bakterien.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No

PCT/EP 03/08032

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 7 C08F2/44 C08F220/34 C08F2/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 735 778 A (SOC. PROLABO S.A.) 27 December 1996 (1996-12-27)	
A	WO 80 02687 A (ICI AUSTRALIA LTD.) 11 December 1980 (1980-12-11)	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 December 2003

Date of mailing of the international search report

16/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cauwenberg, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/08032

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
FR 2735778	A	27-12-1996	FR 2735778 A1	27-12-1996
			AT 200901 T	15-05-2001
			CA 2198250 A1	09-01-1997
			DE 69612654 D1	07-06-2001
			DE 69612654 T2	08-11-2001
			DK 777691 T3	24-09-2001
			EP 0777691 A1	11-06-1997
			ES 2157448 T3	16-08-2001
			WO 9700896 A1	09-01-1997
			JP 10505630 T	02-06-1998
			NO 970792 A	07-04-1997
			US 5976426 A	02-11-1999
WO 8002687	A	11-12-1980	WO 8002687 A1	11-12-1980
			DE 3038751 C1	11-05-1989
			EP 0029443 A1	03-06-1981
			GB 2061293 A , B	13-05-1981
			JP 4009803 B	21-02-1992
			JP 56500656 T	14-05-1981

# INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/08032

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
 IPK 7 C08F2/44 C08F220/34 C08F2/14

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 7 C08F

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	FR 2 735 778 A (SOC. PROLABO S.A.) 27. Dezember 1996 (1996-12-27)	
A	WO 80 02687 A (ICI AUSTRALIA LTD.) 11. Dezember 1980 (1980-12-11)	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

8. Dezember 2003

16/12/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cauwenberg, C

## INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 03/08032

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR 2735778	A	27-12-1996	FR 2735778 A1	27-12-1996
			AT 200901 T	15-05-2001
			CA 2198250 A1	09-01-1997
			DE 69612654 D1	07-06-2001
			DE 69612654 T2	08-11-2001
			DK 777691 T3	24-09-2001
			EP 0777691 A1	11-06-1997
			ES 2157448 T3	16-08-2001
			WO 9700896 A1	09-01-1997
			JP 10505630 T	02-06-1998
			NO 970792 A	07-04-1997
			US 5976426 A	02-11-1999
			WO 8002687	A
DE 3038751 C1	11-05-1989			
EP 0029443 A1	03-06-1981			
GB 2061293 A ,B	13-05-1981			
JP 4009803 B	21-02-1992			
JP 56500656 T	14-05-1981			