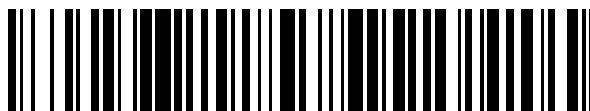


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 482 110**

51 Int. Cl.:

B01J 20/285	(2006.01)	C08L 51/00	(2006.01)
B01J 20/32	(2006.01)		
C08F 4/52	(2006.01)		
C08F 257/02	(2006.01)		
C08F 265/00	(2006.01)		
C08F 271/00	(2006.01)		
C08F 271/02	(2006.01)		
C08F 283/06	(2006.01)		
C08F 290/06	(2006.01)		
C08F 291/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2009** **E 09753608 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014** **EP 2285485**

54 Título: **Polimerización por injerto iniciada por ce(iv) en polímeros que no contienen grupos hidroxilo**

30 Prioridad:

30.05.2008 EP 08009923

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.08.2014

73 Titular/es:

MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es:

JOEHNCK, MATTHIAS

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 482 110 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polimerización por injerto iniciada por Ce(IV) en polímeros que no contienen grupos hidroxilo.

La invención se refiere a un procedimiento para la elaboración de un nuevo material de separación, así como a los materiales de separación elaborados y su aplicación en la separación de biopolímeros cargados de líquidos.

5 Estado de la técnica

Para el aislamiento de biopolímeros de líquidos, la cromatografía es uno de los métodos más adecuados. En particular, en la purificación de biofármacos se prefieren materiales cromatográficos basados en polímeros en comparación con materiales basados en sílica, puesto que los polímeros pueden elaborarse de forma que durante el procesamiento soporten la limpieza necesaria de la columna cromatográfica empaquetada mediante sosa cáustica.

A parte de la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés), la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés), la cromatografía de modo mixto y la cromatografía de afinidad, se utiliza muy a menudo la cromatografía de intercambio iónico (IEC, por sus siglas en inglés). Además, también se conocen otros tipos de cromatografía como, por ejemplo, la cromatografía en fase reversa. Se presenta un resumen de los distintos medios cromatográficos y métodos cromatográficos preparativos en, por ejemplo, "Bioseparation and Bioprocessing", 2007, Editor Ganapathy Subramanian, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.

Se conoce desde hace muchos años que para generar la funcionalidad deseada en los materiales cromatográficos son adecuados polímeros lineales que se obtienen mediante injerto de los correspondientes monómeros funcionalizados sobre una multitud de superficies distintas. Cuando en la funcionalización se trata de grupos iónicos enlazados químicamente, pueden emplearse los correspondientes materiales para la cromatografía de intercambio iónico (W. Müller, *J. Chromatography* **1990**, 510, 133-140). En las patentes EP 0 337 144 o US 5,453,186 se encuentran una gran cantidad de posibles estructuras de polímeros de injerto que están destinadas al fraccionamiento de biopolímeros. En la bibliografía de patentes también se conocen polímeros de injerto de más de un componente monomérico que se obtienen mediante copolimerización.

En la polimerización por injerto iniciada mediante iones Ce(IV) y conocida a partir de los documentos EP 0337144 o WO 9614151, se aprovecha la existencia de grupos hidroxilo en la superficie del material de soporte utilizado para crear enlaces covalentes en el soporte base con el polímero. Por eso, parece que este método solo es adecuado para materiales de soporte que presentan grupos hidroxilo en la superficie bajo las condiciones de reacción dadas, aunque no es adecuado para materiales que carecen de estos grupos. Por lo general, en el caso de los materiales de soporte empleados sobre los que se enlazan grupos cromatográficamente activos mediante una polimerización por injerto iniciada por Ce(IV) , se trata de materiales de soporte inorgánicos como, por ejemplo, SiO_2 , Al_2O_3 , MgO , TiO_2 o ZrO_2 . Para estos materiales, incluso es posible aumentar la cantidad de grupos OH que se encuentran en la superficie para lograr una distribución más densa con grupos reactivos en una reacción posterior (EP 1 051 254 B1). A causa de las variadas posibilidades de reacción de estos materiales de soporte inorgánicos oxidicos, por lo general los materiales cromatográficos obtenidos se elaboran mediante polimerización por injerto utilizando los correspondientes materiales de soporte inorgánicos oxidicos, en particular silicatos o geles de sílice adecuados.

Para los problemas más diversos de separación cromatográfica, es ventajoso que se utilicen materiales cromatográficos en cuya elaboración se empleen materiales de soporte orgánicos. Esto vale especialmente la pena cuando se desean elaborar sorbentes para la cromatografía estables frente a los álcalis así como frente a la presión que se puedan emplear a flujos elevados. Estas propiedades de los materiales de soporte orgánicos también deben permanecer constantes tras una derivatización y no deberían deteriorarse.

A partir de los documentos EP 0337144 A1 o WO 96/31549 A1, para las polimerizaciones por injerto iniciadas por Ce(IV) para la elaboración de intercambiadores iónicos, se conoce el uso de materiales de soporte, los cuales presentan grupos hidroxilo en la superficie de los soportes base poliméricos. En el documento EP 0337144 A1 se describen sorbentes para la cromatografía de intercambio iónico en cuya elaboración se utilizan como materiales base, entre otros, polímeros reticulados con metacrilato sustituidos con dioles, sobre los cuales se injertan monómeros de acrilamida derivatizados. Los intercambiadores iónicos que se preparan de este modo muestran buenas propiedades de separación y una buena estabilidad frente a la presión, aunque su estabilidad frente a soluciones alcalinas es limitada. A partir del documento WO 03/031062 se conoce, por otra parte, el uso de un polímero de vinilo reticulado que contiene grupos diol como material base sobre el cual se aplican polímeros en una reacción de polimerización iniciada por Ce(IV) .

Un inconveniente fundamental de las polimerizaciones por injerto sobre materiales de soporte consiste en que la cantidad de grupos OH accesibles en la superficie para la reacción es limitada. Si se quiere conseguir una mayor ocupación de las superficies con polímeros injertados, es necesario aumentar la cantidad de grupos OH reactivos mediante etapas de reacción adicionales y preparatorias, como se describe en el documento EP 1 051 254 B1.

- 5 A diferencia de esto, en el documento DE 41 29 901 A1 se describe el uso de partículas de poliamida como material base para materiales cromatográficos polimerizados por injerto. En este caso, la polimerización se realiza mediante inducción por radiación. Sin embargo, este procedimiento es caro y requiere tiempo para llevarse a cabo. Además, los materiales cromatográficos elaborados sobre esta base no son adecuados para todos los métodos de separación.

10 Objetivo a alcanzar

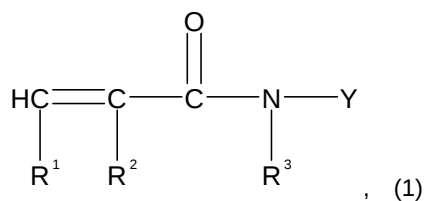
- Por tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento mediante el cual se ofrezca la posibilidad de elaborar de un modo sencillo y variado materiales cromatográficos polimerizados por injerto sobre la base de polímeros, los cuales en realidad no presentan grupos hidroxilo reactivos en la superficie pero se pueden derivatizar de forma sencilla mediante una reacción de polimerización por injerto iniciada por iones Ce(IV). El
- 15 objetivo de la presente invención también es proporcionar un procedimiento que se pueda llevar a cabo de un modo sencillo y económico, así como proporcionar materiales cromatográficos con un amplio espectro de aplicación, es decir, en cuanto a posibilidades de separación de mezclas de sustancias de distinta procedencia y también en cuanto a la estabilidad frente a la influencia de ácidos, bases, presión o condiciones de flujo.

Objeto de la invención

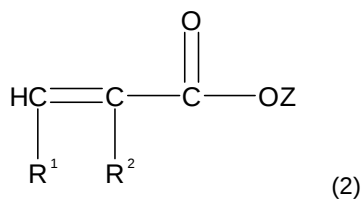
- 20 La resolución de los presentes objetivos se consigue mediante un nuevo procedimiento para la elaboración de materiales cromatográficos polimerizando por injerto materiales base poliméricos orgánicos, los cuales no presentan grupos OH en la superficie, en presencia de un iniciador de Ce(IV). Como material base polimérico pueden utilizarse polímeros en forma de partícula, compuestos de homo- o copolímeros, los cuales pueden formarse mediante la polimerización de monómeros que contienen grupos vinilo y los cuales no contengan grupos
- 25 hidroxilo libres. Para ello, monómeros adecuados que contienen grupos polivinilo pueden ser, por ejemplo, divinilbenceno, trivinilbenceno, diviniltolueno, divinilpiridina, divinilnaftaleno, etilenglicoldimetacrilato, polietilenglicoldimetacrilato, polipropilenglicoldimetacrilato, N,N-metilen-bis-acrilamida, N,N-diviniletilenurea y N,N-divinilpropilenurea. Monómeros que contienen grupos monovinilo como, por ejemplo, metilmetacrilato, etilmetacrilato, propilmetacrilato, butilmetacrilato, metilacrilato, etilacrilato, propilacrilato, butilacrilato, acrilonitrilo, N-
- 30 vinilpirrolidona, N-metil-N-vinilacetamida, cloroestireno o aminoestireno, se transforman únicamente en combinación con uno de los compuestos polivinílicos mencionados previamente para la elaboración de los copolímeros adecuados correspondientes a esta publicación. En una reacción posterior, estas partículas poliméricas, las cuales no presentan grupos hidroxilo, se polimerizan por injerto de una forma adecuada.

- Los materiales base utilizados que no contienen grupos hidroxilo constan preferentemente de partículas con un
- 35 diámetro de partícula medio en el intervalo de 20 nm hasta 1000 µm. Sin embargo, la polimerización por injerto también puede realizarse sobre la superficie de cuerpos poliméricos modelados o sobre la superficie de cuerpos poliméricos porosos monolíticos, como columnas de separación monolíticas. Según la invención, sorprendentemente es posible derivatizar la superficie de los materiales poliméricos descritos mediante la polimerización por injerto inducida por Ce(IV). La derivatización puede realizarse tanto en las correspondientes
- 40 partículas poliméricas como en los correspondientes cuerpos poliméricos monolíticos modelados. En particular, es posible derivatizar uniformemente la superficie porosa interna tanto de los macroporos como de los mesoporos de los materiales de soporte y, de hecho, también la superficie porosa interna de las partículas poliméricas. Incluso las membranas de separación poliméricas pueden tratarse de esta forma.

- La derivatización de las superficies que no contienen grupos hidroxilo puede realizarse mediante polímeros de
- 45 injerto, los cuales se forman o bien a partir de monómeros del mismo tipo o bien a partir de al menos dos unidades monoméricas distintas. Preferentemente la elaboración del polímero de injerto unido covalentemente a la superficie del material de separación se lleva a cabo utilizando unidades monoméricas solubles en agua de fórmula general (1)



o de fórmula general (2)



en las que

5 Y representa $\text{R}^4\text{-SO}_3\text{M}$

R^1 y R^2 representan, independientemente entre sí, H, alquilo lineal o ramificado de 1 hasta 6 átomos de C, carboxilo, carboximetilo

R^3 representa H, alquilo lineal o ramificado de 1 hasta 6 átomos de C, Y

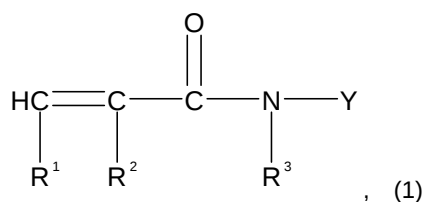
10 R^4 representa alquileo lineal o ramificado de hasta 8 átomos de C, dado el caso, sustituido una o varias veces con grupos alcoxi o carboxi y/o arileno de hasta 10 átomos de C, dado el caso, sustituido una o varias veces con grupos alquilo, alcoxi o carboxi o metileno, etileno, propileno, hexileno, isopropileno, isobutileno o fenileno

y

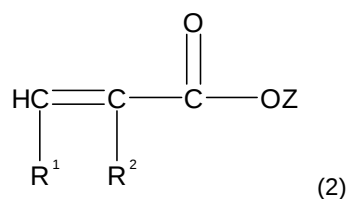
M representa H, Na, K o NH_4 y

15 Z representa Y.

Asimismo, un polímero de injerto de este tipo unido covalentemente puede prepararse utilizando al menos una unidad monomérica soluble en agua de fórmula general (1)



o de fórmula general (2)



en las que

Y representa R^5 -COOM

R^1 y R^2 representan, independientemente entre sí, H, alquilo lineal o ramificado de 1 hasta 6 átomos de C, carboxilo, carboximetilo

5 R^3 representa H, alquilo lineal o ramificado de 1 hasta 6 átomos de C, Y

R^5 representa alquilenos lineal o ramificado de hasta 8 átomos de C, dado el caso, sustituido una o varias veces con grupos alcoxi o carboxi y/o arileno de hasta 10 átomos de C, dado el caso, sustituido una o varias veces con grupos alquilo, alcoxi o carboxi o metileno, etileno, propileno, hexileno, isopropileno, isobutileno o fenileno

10 y

M representa H, Na, K o NH_4 y

Z representa M o Y.

15 Presentan unas propiedades especialmente ventajosas los materiales de separación con polímeros de injerto que se elaboran utilizando al menos un compuesto seleccionado del grupo de las metacrilamidas, las acrilamidas o los ácidos carboxílicos insaturados.

20 También son objeto de la presente invención materiales de separación con polímeros de injerto como los descritos previamente para cuya elaboración se utiliza al menos un compuesto seleccionado del grupo de los sulfoalquilacrilatos, como 3-sulfopropilacrilato o 2-sulfoetilacrilato, ácido vinilsulfónico, ácido estirensulfónico, ácido alilsulfónico y ácido viniltoluenesulfónico o del grupo de los sulfoalquilmetacrilatos, como 2-sulfoetilmetacrilato o 3-sulfopropilmetacrilato.

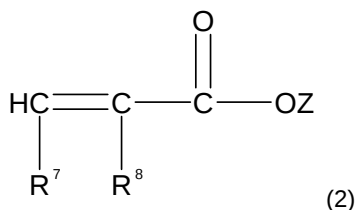
Sin embargo, según la invención también puede utilizarse para la elaboración de materiales de separación derivatizados adecuados al menos un compuesto seleccionado del grupo de ácido maleico, ácido cinámico, ácido itacónico, ácido citracónico, ácido mesacónico o ácido fumárico o del grupo de los carboxialquilacrilatos, como carboxietilacrilato, o de los carboxialquilmetacrilatos.

25 Para el propósito según la invención, además se pueden elaborar materiales de separación bien adecuados si los polímeros de injerto se elaboran utilizando al menos un compuesto seleccionado del grupo de carboximetilacrilamida, carboxietilacrilamida, ácido acrilil-gamma-aminobutírico y acililfenilalanina, ácido acrílico, ácido metacrílico y ácido etacrílico.

30 También son objeto de la presente invención los correspondientes materiales de intercambio aniónico, los cuales se obtienen igualmente mediante polimerización por injerto de monómeros adecuados sobre materiales base poliméricos orgánicos, los cuales no presentan grupos OH en la superficie.

Los monómeros para la elaboración de materiales de intercambio aniónico según la invención puede llevar, por ejemplo, grupos amino primarios, secundarios o terciarios o ser sales de amonio cuaternarias.

Monómeros adecuados con grupos amino son, por ejemplo, acrilatos de fórmula general (2)

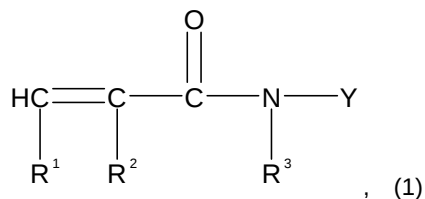


35

con $Z = R^4-NR^9R^{10}$,

donde R⁷ y R⁸, independientemente entre sí, pueden significar hidrógeno o alquilo de hasta 6 átomos de C, preferentemente hidrógeno o metilo y donde R⁴ puede ser un grupo alquileo lineal de 1 hasta 8 átomos de C como, por ejemplo, metileno, etileno, propileno o hexileno, o un grupo alquileo ramificado de 1 hasta 8 átomos de C como, por ejemplo, isopropileno o isobutileno, y donde R⁹ y R¹⁰, independientemente entre sí, significan hidrógeno, alquilo, fenilo o alquilfenilo como, por ejemplo, metilo, etilo o bencilo. Se mencionan a modo de ejemplo los aminoalquilacrilatos, como 2-(dietilaminoetil)acrilato, 2-(dimetilaminoetil)acrilato o 2-(dimetilaminopropil)acrilato, y los aminoalquilmetacrilatos, como 2-(dietilaminoetil)metacrilato, 2-(dimetilaminoetil)-metacrilato o 3-(dietilaminopropil)metacrilato.

Preferentemente se utilizan las acrilamidas de fórmula (1)



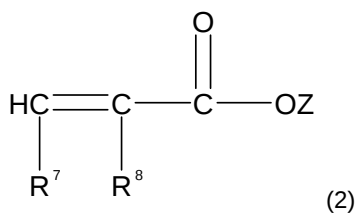
con R³ = R⁴-NR⁹R¹⁰,

donde R¹, R² e Y, independientemente entre sí, significan hidrógeno o alquilo de hasta 6 átomos de C, preferentemente hidrógeno o metilo, y donde

R⁴ puede ser un grupo alquileo lineal de 1 hasta 8 átomos de C como, por ejemplo, metileno, etileno, propileno o hexileno, o un grupo alquileo ramificado de 1 hasta 8 átomos de C como, por ejemplo, isopropileno o isobutileno, y donde

R⁹ y R¹⁰, independientemente entre sí, significan hidrógeno, alquilo, fenilo o alquilfenilo como, por ejemplo, metilo, etilo o bencilo. Como acrilamidas adecuadas se mencionan aquí a modo de ejemplo 2-(dietilaminoetil)acrilamida, 2-(dimetilaminoetil)acrilamida, 3-(dietilamino-propil)acrilamida o 3-(dietilaminopropil)acrilamida y como metacrilamidas adecuadas se mencionan aquí, a modo de ejemplo, 2-(dietilamino-etil)metacrilamida, 2-(dimetilaminoetil)metacrilamida, 3-(dietilamino-propil)metacrilamida o 3-(dietilaminopropil)metacrilamida.

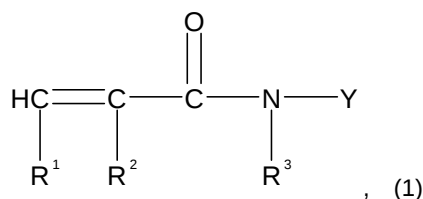
Monómeros adecuados que son sales de amonio cuaternarias, son por ejemplo acrilatos de fórmula (2)



con Z = R⁴-NR⁹R¹⁰R¹¹X, donde

R⁷ y R⁸, independientemente entre sí, pueden significar hidrógeno o alquilo de hasta 6 átomos de C, preferentemente hidrógeno o metilo y donde R⁴ puede ser un grupo alquileo lineal de 1 hasta 8 átomos de C como, por ejemplo, metileno, etileno, propileno o hexileno, o un grupo alquileo ramificado de 1 hasta 8 átomos de C como, por ejemplo, isopropileno o isobutileno, y donde R⁹, R¹⁰ y R¹¹, independientemente entre sí, significan hidrógeno, alquilo, fenilo o alquilfenilo como, por ejemplo, metilo, etilo o bencilo. X es un anión y se selecciona de modo que el monómero sea soluble en agua y puede ser, por ejemplo, cloruro o yoduro. A modo de ejemplo, se mencionan las sales de acriloxiamonio, como cloruro de [2-(acriloxi)etil]trimetilamonio y sales de metacriloxiamonio, como cloruro de [2-(metacriloxi)etil]trimetilamonio.

Preferentemente se utilizan las acrilamidas de fórmula general (1)



donde

R^1 , R^2 e Y, independientemente entre sí, pueden significar hidrógeno o alquilo de hasta 6 átomos de C, preferentemente hidrógeno o metilo y donde R^3 puede ser un grupo alquileo lineal de 1 hasta 8 átomos de C como, por ejemplo, metileno, etileno, propileno o hexileno, o un grupo alquileo ramificado de 1 hasta 8 átomos de C como, por ejemplo, isopropileno o isobutileno, y donde R^4 , R^{10} y R^{11} , independientemente entre sí, significan hidrógeno, alquilo, fenilo o alquilfenilo como, por ejemplo, metilo, etilo o bencilo. X es un anión y se selecciona de modo que el monómero sea soluble en agua y puede ser, por ejemplo, cloruro, yoduro o metilsulfato. Como acrilamidas adecuadas se mencionan aquí a modo de ejemplo cloruro de 2-(acriloilaminoetil)trimetilamonio y cloruro de 3-(acriloilaminopropil)trimetilamonio y como metacrilamidas adecuadas se mencionan aquí a modo de ejemplo cloruro de 2-(metacriloilaminoetil)trimetilamonio y cloruro de 3-(acriloilaminopropil)trimetilamonio.

Puesto que para la separación de determinadas biomoléculas puede ser ventajoso que ocurra una reacción de intercambio con una parte hidrófoba del material de separación, también se prefieren materiales de separación que presenten polímeros de injerto unidos covalentemente en la superficie y que, por otra parte, se preparen utilizando al menos una unidad monomérica con una parte hidrófoba marcada en forma de al menos un grupo alquilo o arilo con la cantidad adecuada de átomos de carbono y al menos otra unidad monomérica que lleve una carga. Este tipo de materiales de separación han resultado ser especialmente eficaces, puesto que pueden interaccionar con el biopolímero a separar tanto con la parte hidrófoba como con la parte cargada del polímero de injerto.

Por lo tanto, vale especialmente la pena una derivatización utilizando al menos una unidad monomérica con una parte hidrófoba seleccionada del grupo de alquilvinilcetonas, arilvinilcetonas, arilalquilvinilcetonas, estireno, alquilacrilatos, arilacrilatos, arilalquilacrilatos, alquilarilacrilatos, alquilmetacrilatos, arilmetacrilatos, arilalquilmetacrilatos y alquilarilmetacrilatos.

También pueden elaborarse materiales de separación especialmente eficaces utilizando al menos una unidad monomérica de fórmula general (1) con una parte hidrófoba,

en la que $\text{Y} = \text{R}^6$

y en la que

R^1 y R^2 representan, independientemente entre sí, H, alquilo lineal o ramificado de hasta 6 átomos de C

R^3 y/o R^6 representan, independientemente entre sí, H, alquilo lineal o ramificado, arilo, alquilarilo, arilalquilo,

donde los grupos alquilo pueden llevar grupos oxo, donde los grupos alquilo y/o arilo pueden estar sustituidos una o varias veces con grupos alcoxi, fenoxi, ciano, carboxi, acetoxi o acetamino,

y donde R^3 y R^6 juntos llevan al menos 6 átomos de C.

Por tanto, los materiales de separación según la presente invención pueden elaborarse utilizando el menos una unidad monomérica de fórmula general (1) con una parte hidrófoba, en la que

R^3 , R^6 representan, independientemente entre sí, H, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, 2-, 3-, o 4- oxapentilo, 2-, 3-, 4- o 5- oxaheptilo, 2-, 3-, 4-, 5- o 6- oxaheptilo, 3-butoxiopropilo, isopropilo, 3-butilo, isobutilo, 2-metilbutilo, isopentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-oxa-3-metilbutilo, 2-metil-3-oxahexilo, 2-fenil-2-oxoetilo, fenoxietilo, fenilo, bencilo, feniletilo y fenilpropilo y donde R^3 y R^6 juntos llevan al menos 6 átomos de C.

Por consiguiente, los materiales de separación según la invención también se elaboran utilizando al menos una de estas unidades monoméricas con un grupo funcional con carga y al menos una unidad monomérica que presenta un grupo hidrófobo que confiere al copolímero, a parte de la carga, un carácter hidrófobo, así como, dado el caso, al menos una unidad monomérica neutra que puede ser hidrófila.

- 5 En especial se prefieren aquellos materiales de separación que se elaboran utilizando al menos una unidad monomérica neutra de fórmula general (1) que puede ser hidrófila,

con $Y = R^6$ y donde

R^1, R_2, R_3, R_6 representan, independientemente entre sí, H o metilo independientemente entre sí, H, alquilo, alcoxilalquilo, cada uno de hasta 4 átomos de C.

- 10 Se prefieren muy especialmente los materiales de separación con al menos una unidad monomérica neutra que puede ser hidrófila de fórmula general (1)

con $Y = R^6$, donde

R^1, R^2, R^3, R^6 representan, independientemente entre sí, H o metilo independientemente entre sí, H, metilo, etilo, butilo, isopropilo, 3-butilo, isobutilo, metoxietilo o etoxietilo.

- 15 Para la elaboración del polímero de injerto también puede utilizarse al menos una unidad monomérica neutra seleccionada del grupo acrilamida (AAM), dimetilacrilamida, metacrilamida, isopropilacrilamida, metoxietilacrilamida y etoxietilacrilamida o del grupo metilacrilato y metilmetacrilato, así como utilizando dos o tres monómeros seleccionados del grupo ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico, ácido acrílico, N-arilalquilacrilamidas, como bencilacrilamida y acriloilfenilalanina, N-carboxialquilacrilamidas, como ácido acriloil-gamma-aminobutírico, y N-alquilacrilamidas.

En particular, también son objeto de la presente invención materiales de separación con polímeros de injerto como los descritos anteriormente en los que la proporción de las unidades que llevan carga respecto a las unidades con grupos aromáticos se encuentra en un intervalo de entre 99:1 y 10:90, especialmente en un intervalo de entre 96:4 y 40:60.

- 25 La propia reacción de polimerización por injerto según la invención se inicia mediante iones Ce(IV) en superficies que no contienen grupos hidroxilo. Normalmente esta reacción tiene lugar en ácidos minerales diluidos, seleccionados del grupo compuesto por ácido nítrico, ácido sulfúrico y ácido clorhídrico. En ácido nítrico diluido los monómeros hidrófobos son poco solubles o no lo son en absoluto. La reacción se puede llevar a cabo también en ácido sulfúrico o ácido clorhídrico diluidos. Sin embargo, se trabaja preferentemente en ácido nítrico diluido y en una concentración en el intervalo de 1 hasta 0,00001 mol/l. Mediante la adición de un solubilizador o un cosolvente, preferentemente dioxano, puede disolverse e injertarse un monómero hidrófobo. Preferentemente se utilizan 0,05 – 100 mol de monómero por litro de material de soporte sedimentado.

Preferentemente la realización del procedimiento según la invención para la elaboración de los materiales de separación se lleva a cabo

- 35 a) disolviendo un monómero en agua, el cual, dado el caso, se mezcla con otro monómero,
- b) mezclando la solución obtenida con el material de soporte de forma que se utilicen de 0,05 hasta 100 mol de monómero total por litro de material polimérico sedimentado,
- c) añadiendo a la suspensión obtenida sal de Ce(IV) disuelta en un ácido mineral, por lo cual se ajusta un valor de pH en el intervalo 0 – 5, y
- 40 d) polimerizando por injerto la mezcla de reacción en el transcurso de un periodo de tiempo de 0,5 hasta 72 horas.

Por tanto, también es objeto de la presente invención el material de separación así obtenido, el cual puede presentarse en forma de una columna cromatográfica y el cual se ha derivatizado mediante polimerización por injerto según la invención.

- La presente invención abarca asimismo el uso de los materiales de separación según la invención para la separación de biopolímeros de medios líquidos, en particular para la separación de proteínas de medios líquidos o para la separación de anticuerpos de medios líquidos. La separación se desarrolla de un modo especialmente selectivo cuando el biopolímero interacciona con los grupos iónicos, hidrófilos y, dado el caso, con los grupos hidrófobos del polímero de injerto enlazado covalentemente a la superficie del material de soporte. En este caso, el biopolímero se adsorbe interaccionando tanto con la parte cargada del polímero de injerto como con la parte hidrófoba. La posterior liberación del biopolímero adsorbido y separado del líquido puede realizarse volviendo a desorber el biopolímero enlazado al material de separación mediante interacción con los grupos iónicos y, dado el caso, hidrófobos, bien mediante
- 5 a) aumento de la fuerza iónica y/o
- b) mediante cambio de pH
- de la solución
- y/o
- c) mediante un eluyente adecuado con una polaridad distinta a la del tampón de adsorción.
- 15 Los materiales de separación polimerizados por injerto descritos según la invención también pueden describirse como polímeros provistos de efectores de separación. Pueden utilizarse para
- la unión o adsorción selectiva, relativamente selectiva o no selectiva de uno o varios componentes objetivo con el propósito de separarlos de una matriz
 - la unión o adsorción selectiva, relativamente selectiva o no selectiva de uno o varios componentes secundarios con el propósito de separar los componentes secundarios de una matriz
 - la separación de una mezcla de sustancias sin unión o adsorción de uno o varios componentes únicamente por el tamaño molecular según cromatografía de exclusión por tamaño
 - el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de biopolímeros a partir de fuentes naturales
 - el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de biopolímeros a partir de fuentes recombinantes
 - el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de biopolímeros a partir de líneas celulares inmortalizadas, así como sus sobrenadantes de cultivo
 - el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de biopolímeros a partir de líneas de células B y sus derivados, linfocitos y líneas de hibridomas y sus sobrenadantes de cultivo
 - el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de proteínas y péptidos
 - el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de enzimas
 - el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de anticuerpos monoclonales y policlonales y fragmentos de anticuerpos de procedencia natural o recombinante
 - el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de péptidos/proteínas fosforilados y ácidos nucleicos
 - el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de aditivos alimentarios
 - el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de mono- y polisacáridos
 - el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de proteínas glicosiladas

- el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de ADN de una o dos hebras
- el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de ADN de plásmido
- el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de ARN
- el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de virus
- 5 - el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de proteínas de célula huésped
- el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de oligo- y polinucleótidos
- el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de liposomas
- el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de productos de la sangre y la leche
- 10 - el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de principios activos farmacéuticos de bajo peso molecular (API: *active pharmaceutical ingredient*)
- la separación de un API de un vehículo farmacéutico-API (por ejemplo, un aducto API-liposoma o un aducto API-nanopartícula)
- el aislamiento, enriquecimiento y/o reducción de concentración de enantiómeros

Según el tipo de efectores de separación, el uso de los polímeros según la invención se corresponde, por ejemplo, con la cromatografía de afinidad, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de interacción hidrófoba, la cromatografía de exclusión por tamaño, la cromatografía quiral o la cromatografía de modo mixto o la cromatografía de partición líquido-líquido.

Los polímeros provistos de efectores de separación según la invención conforme a la aplicación deseada pueden utilizarse en procedimientos cromatográficos conocidos en los cuales se utiliza un sorbente. En principio, estos procedimientos se dividen en procedimientos discontinuos y continuos. Se mencionan ejemplos de procedimientos discontinuos en el libro "Preparative Chromatography" (Ed. H. Schmidt-Traub, Wiley-VCH Verlag Weinheim, 2005, ISBN 3-527-30643-9, págs. 183-189). Otros ejemplos son la cromatografía rápida (o flash), la cromatografía en lecho expandido, entre otros. Además, los polímeros según la invención pueden utilizarse, en su forma original o provistos de efectores de separación según la aplicación, en procedimientos continuos como, por ejemplo, la cromatografía en lecho simulado. Se describen otros ejemplos de procedimientos discontinuos en el libro "Preparative Chromatography" (Ed. H. Schmidt-Traub, Wiley-VCH Verlag Weinheim, 2005, ISBN 3-527-30643-9, págs. 190-204).

Tanto los procedimientos continuos como los discontinuos pueden realizarse según el objetivo, tanto de forma isocrática como utilizando la técnica del gradiente. Los especialistas saben cómo emplear el sorbente según la invención, original o provisto de efectores de separación, para el objetivo deseado en uno de los procedimientos mencionados.

Los polímeros según la invención también pueden utilizarse en la cromatografía de capa fina.

Descripción detallada de la invención

Sorprendentemente, mediante experimentos se descubrió que la polimerización por injerto iniciada por Ce(IV) también puede realizarse con eficacia en polímeros que no contienen grupos hidroxilo de modo que pueden prepararse materiales cromatográficos novedosos polimerizados por injerto con propiedades mejoradas.

Los materiales cromatográficos polimerizados por injerto según la invención con propiedades mejoradas se han preparado, por ejemplo, llevando a cabo una polimerización por injerto iniciada por Ce(IV) sobre cuerpos base de poli(metilmecacrilato-co-etilenglicoldimetacrilato) (poli(MMA/EGDMA), compuesto MMA/EGDMA-SO₃ compuesto 06MJ-DZ109) o sobre cuerpos base de poli(1-vinil-2-pirrolidona-co-1,3-divinilimidazolin-2-ona) (poli(NVP/DVH), DVH-SO₃ compuesto 07MJ-DZ077) o sobre cuerpos base de poli(etileno-co-divinilbeneno) (poli(ES/DVB)). Los intercambiadores iónicos así obtenidos pueden utilizarse del mismo modo que los intercambiadores iónicos que se

han preparado sobre soportes base que contienen grupos hidroxilo. En particular, pueden utilizarse como materiales cromatográficos. En este caso, son especialmente adecuados para la separación de biomoléculas, dado el caso, cargadas, de líquidos.

Los materiales de soporte utilizados para llevar a cabo de polimerización por injerto pueden utilizarse en forma de partícula o como cuerpos modelados monolíticos. Es importante en este contexto, que los materiales de soporte presenten una estructura porosa. En este contexto, es especialmente deseable una estructura porosa bimodal en la que las partículas, en especial, no obstante, los cuerpos modelados monolíticos, presenten tanto macroporos como mesoporos. Para la preparación de los materiales de separación según la invención se utilizan preferentemente partículas poliméricas correspondientes con un diámetro medio de partícula en el intervalo de 20 nm hasta 1000 μm . Como cuerpos modelados poliméricos, porosos y monolíticos pueden utilizarse cuerpos modelados con un diámetro desde pocos milímetros hasta varios centímetros y una longitud correspondiente para la polimerización por injerto según la invención. Es fundamental en este caso en particular una estructura porosa bimodal, pudiéndose derivatizar los materiales correspondientes con macroporos de un diámetro medio de 200 nm hasta 100 μm , preferentemente de 500 nm hasta 10 μm , y con mesoporos de un diámetro medio de 1 hasta 50 nm, preferentemente de 2 hasta 20 nm mediante la polimerización por injerto según la invención para obtener materiales de separación con buenos rendimientos de separación. En particular, se prefiere emplear como materiales base partículas poliméricas orgánicas correspondientes con una superficie media de partícula en el intervalo de 20 hasta 1200 m^2/g , preferentemente de 100 hasta 600 m^2/g .

La polimerización por injerto según la invención se realiza en presencia de un catalizador de Ce. Aunque distintas sales de Ce(IV) como, por ejemplo, también el sulfato de amonio y Ce(IV), han demostrado ser adecuadas como catalizadores para este uso, se utiliza con especial preferencia como catalizador el nitrato de amonio y Ce(IV) para las polimerizaciones por injerto. Para llevar a cabo la polimerización por injerto, por lo general, se utiliza el catalizador en una cantidad adecuada respecto a la cantidad total de la cantidad introducida de monómeros y se añade el catalizador a la suspensión del material de soporte y de los monómeros introducidos, cuando se polimeriza por injerto un material de soporte en forma de partícula. En este caso, se añade preferentemente el catalizador en una solución acuosa ácida a la suspensión de los reactivos. Para evitar reacciones secundarias con el oxígeno del aire, la propia polimerización por injerto se realiza bajo gas inerte. Preferentemente se trabaja bajo atmósfera de nitrógeno. En este caso, la reacción se lleva a cabo con mezclado constante de la mezcla de reacción, en particular bajo agitación constante. La realización de la polimerización eleva un poco la temperatura. La reacción se realiza, como ya se ha mencionado, en presencia de al menos un ácido inorgánico seleccionado del grupo de ácido nítrico, ácido sulfúrico y ácido clorhídrico. Preferentemente se trabaja en presencia de ácido nítrico o ácido sulfúrico. En especial se prefiere utilizar ácido nítrico. Como disolvente se utiliza preferentemente agua. De forma ventajosa, la reacción se lleva a cabo en presencia de un cosolvente. Un cosolvente especialmente ventajoso ha resultado ser el dioxano. Aunque también pueden utilizarse otros disolventes orgánicos, como distintos alcoholes. Un alcohol adecuado es, por ejemplo, el dodecanol. Sin embargo, también pueden emplearse alcoholes con polaridad similar.

Para llevar a cabo la reacción de polimerización se ajusta el valor de pH en la suspensión preparada mediante la adición de ácidos y una base, preferentemente NaOH o KOH, con especial preferencia NaOH, a un valor en el intervalo de 5,5 hasta 6,1, preferentemente en el intervalo de 5,7 hasta 5,9.

La solución obtenida con el material de soporte se mezcla con una cantidad preparada de solución de monómero de tal manera que resulte una proporción de 0,05 hasta 100 mol de monómero total por litro de material polimérico sedimentado. A esta suspensión preparada se añade sal de Ce(IV) disuelta en un ácido mineral, con lo cual se ajusta el valor de pH en un intervalo de 0 – 5. La mezcla de reacción resultante se polimeriza por injerto en el transcurso de 0,5 hasta 72 horas. Durante este tiempo la mezcla de reacción se agita con intensidad.

En principio, la reacción catalizada por iones Ce(IV) también se produce en presencia de al menos un ácido inorgánico. Aunque preferentemente se trabaja en presencia de ácido nítrico, podrían añadirse a la reacción de polimerización los ácidos previamente mencionados e incluso mezclados.

Como material de soporte en forma de partícula se utiliza un polimerizado sedimentado sin grupos hidroxilo.

Como “polimerizado sedimentado” o material de soporte sedimentado se entiende un material de soporte húmedo que se obtiene por sedimentación a partir de una suspensión de la que se elimina el solvente sobrenadante. Por lo general, el material de soporte correspondiente se almacena en estado húmedo. Para el uso según la invención, se succiona previamente el solvente sobrenadante. A continuación, para llevar a cabo la derivatización se suspende un volumen medido o una cantidad pesada (material húmedo de la filtración) en un volumen adecuado o en una

cantidad adecuada de disolución de monómero y se somete a la polimerización por injerto. En el caso del material de soporte según la invención, se trata de un material de soporte polimérico, orgánico y sin grupos hidroxilo.

Para polimerizar por injerto un cuerpo modulado poroso, monolítico y orgánico se modifica el procedimiento descrito y los cuerpos modulados se bañan con una solución de polimerización correspondiente y se almacenan durante un periodo de tiempo adecuado.

Al efectuarse la polimerización por injerto, el material de separación obtenido se lava varias veces con soluciones diluidas ácidas o básicas y puede introducirse directamente después del pretratamiento adecuado en una columna de separación y utilizarse para la separación de sustancias.

La presente descripción permite a los especialistas utilizar y ejecutar la invención en todo su alcance. Por eso, incluso sin otras explicaciones, se asume que un especialista puede utilizar la descripción anterior en el alcance más amplio.

En el caso de posibles faltas de claridad, es evidente que se deben consultar las publicaciones y patentes citadas.

Para una mejor comprensión y para ilustrar la invención, a continuación se presentan ejemplos que se encuentran dentro del alcance de protección de la presente invención. Estos ejemplos también sirven para ilustrar posibles variantes. Sin embargo, a causa de la validez general del principio de la invención descrito, los ejemplos no son apropiados para reducir el alcance de protección de la presente solicitud únicamente a éstos.

Además, para los especialistas es evidente que, tanto en los ejemplos dados como en el resto de descripción, las cantidades de componentes presentes en las composiciones siempre suman como máximo 100% en peso o en mol respecto a la composición total y no pueden superar esta cantidad, incluso si se pudieran obtener valores más elevados a partir de los intervalos de porcentaje indicados. Si no se indica otra cosa, los valores en % son % en peso o en mol, excepto las proporciones, que se indican en volumen, como por ejemplo, los eluyentes para cuya preparación se utilizan disolventes en mezcla en determinadas proporciones en volumen.

Las temperaturas indicadas en los ejemplos y la descripción, así como en las reivindicaciones, se dan siempre en °C.

Ejemplos

Ejemplo 1

Síntesis del soporte base poli-MMA/EGDMA (*interno: EGDMA-L01*)

En 1200 ml de agua se disuelven 2,4 g de alcohol polivinílico 40-88 (Merck), 5,28 g de sulfato de sodio (Merck), 0,36 g de tributilfosfato (Merck) y 0,48 g de emulsionante E30 (Leuna Tenside). Esta fase acuosa se calienta a 40 °C. En 120 g de tolueno (Merck), 160 g de n-heptanol (Merck), 1 g de metilmetacrilato (MMA, Merck) y 120 g de etilenglicoldimetacrilato (EGDMA, Merck) se disuelven a temperatura ambiente 2,4 g de AIBN (Merck) (fase orgánica). La fase orgánica se añade ininterrumpidamente a la fase acuosa en un recipiente de polimerización inertizado bajo agitación intensa. Se calienta a 65 °C en el transcurso de 50 min. Se mantiene esta temperatura 2 h, a continuación se polimeriza otras 4 h a 80 °C. Se elimina en gran parte el disolvente orgánico mediante destilación al vapor. El polimerizado formado se lava en un embudo Büchner con acetona y agua. La superficie del polimerizado asciende a 488 m²/g.

Ejemplo 2

Síntesis del soporte base poli-NVP/DVH (*interno: DVH-L06*)

En 1200 ml de agua se disuelven 36 g de alcohol polivinílico 40-88 (Merck), 36 g de cloruro de sodio (Merck) y 0,48 g de emulsionante E30 (Leuna Tenside). Esta fase acuosa se calienta a 40 °C. En 260 g de butilacetato (Merck), 1 g de N-vinilpirrolidona (NVP, Merck) y 140 g de 1,3-divinilimidazolin-2-ona (BASF) se disuelven a temperatura ambiente 1,2 g de AIBN (Merck) (fase orgánica). La fase orgánica se añade ininterrumpidamente a la fase acuosa en un recipiente de polimerización inertizado bajo agitación intensa. Se calienta a 65 °C en el transcurso de 50 min. Se mantiene esta temperatura 2 h, a continuación se polimeriza otras 4 h a 80 °C. El

polimerizado formado se lava en un embudo Büchner con acetona y agua. La superficie del polimerizado asciende a 408 m²/g.

Ejemplo 3

Síntesis del soporte base poli-ES/DVB

- 5 En 1050 ml de agua se disuelven 19,8 g de hidróxido de magnesio (Merck), 32 g de sulfato de sodio (Merck) y 0,189 g de emulsionante E30 (Leuna Tenside). Esta fase acuosa se calienta a 50 °C. En 185 g de tolueno (Merck), 63 g de divinilbenceno (Aldrich) y 37 g de etilestireno (Aldrich) se disuelven a temperatura ambiente 1,05 g de AIBN (Merck) (fase orgánica). La fase orgánica se añade ininterrumpidamente a la fase acuosa en un recipiente de polimerización inertizado bajo agitación intensa. Se calienta a 72 °C en el transcurso de 50 min. Se mantiene esta
10 temperatura 2 h, a continuación se polimeriza otras 4 h a 80 °C. Se elimina en gran parte el disolvente orgánico mediante destilación al vapor. El polimerizado formado se lava en un embudo Büchner con acetona y agua. La superficie del polimerizado asciende a 596 m²/g.

Ejemplo 4

- 15 Síntesis de un intercambiador catiónico fuerte según la invención basado en el soporte base poli-MMA/EGDMA elaborado según el Ejemplo 1 (*interno: 06MJ-DZ109*)

- En un balón de tres bocas de 250 ml (embudo de adición, tubo de introducción de gas y agitador de vidrio de precisión) se introducen 6,22 g de ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico (AMPS, Merck) y 17 g de agua desionizada. Se enfría el balón a 8 °C (para ello, ligera corriente de nitrógeno para evitar un enriquecimiento en oxígeno del aire en la solución). A esto, se añaden 2 ml de sosa cáustica 2 M (Merck) y se ajusta con ácido nítrico
20 (65%, Merck) un valor de pH de 5,8. Se deja calentar el balón de nuevo a TA y se continúa purgando con nitrógeno. A esta solución se añaden 20 ml de polimerizado sedimentado por gravedad durante la noche, preparado según el Ejemplo 1. Se enrasa con agua desionizada a un volumen total de 60 ml. Se vuelve a ajustar el valor de pH a 5,8. A esto se añaden todavía 16 µl de dodecanol. En un vaso de precipitados se mezclan 1,4 g de agua desionizada con 0,29 g de ácido nítrico al 65%. En esta solución se disuelven 0,66 g de nitrato de amonio y Ce(IV) (Merck). La
25 suspensión se calienta en un matraz a 42 °C. La solución de nitrato de amonio y Ce(IV) se añade a la suspensión ininterrumpidamente bajo agitación enérgica. Tras la adición de la solución de nitrato de amonio y Ce(IV) la velocidad de agitación se reduce de inmediato de forma que la suspensión se mantenga justo en suspensión. Se agita 3 h a estas revoluciones. A continuación, se lava la torta de filtración con 3 x 125 ml de agua, 5 x 15 ml de ácido sulfúrico 1 M/ácido ascórbico 0,2 M, 3 x 15 ml de agua desionizada, 5 x 15 ml de NaOH 1 M, 3 x 15 ml de
30 agua desionizada, 3 x 15 ml de HCl 1 M y 3 x 15 ml de agua desionizada sobre un filtro 3.3 de borosilicato de 125 ml. Al análisis CHNS del producto seco da un contenido en azufre de 2,0 % en peso.

Ejemplo 5

Síntesis de un intercambiador catiónico fuerte según la invención basado en el soporte base poli-NVP/DVH elaborado según el Ejemplo 2 (*interno: 07MJ-DZ078*)

- 35 En un balón de tres bocas de 250 ml (embudo de adición, tubo de introducción de gas y agitador de vidrio de precisión) se introducen 3,73 g de ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico (AMPS, Merck) y 25 g de agua desionizada. Se enfría el balón a 8 °C (para ello, ligera corriente de nitrógeno para evitar un enriquecimiento en oxígeno del aire en la solución). A esto, se añaden 2 ml de sosa cáustica 2 M (Merck) y se ajusta con ácido nítrico (65%, Merck) un valor de pH de 5,8. Se deja calentar el balón de nuevo a TA y se continúa purgando con nitrógeno.
40 A esta solución se añaden 15 ml de polimerizado sedimentado por gravedad durante la noche, preparado según el Ejemplo 2. Se enrasa con agua desionizada a un volumen total de 90 ml. Se vuelve a ajustar el valor de pH a 5,8. A esto se añaden todavía 24 µl de dodecanol. En un vaso de precipitados se mezclan 1,0 g de agua desionizada con 0,44 g de ácido nítrico al 65%. En esta solución se disuelven 0,49 g de nitrato de amonio y Ce(IV) (Merck). La suspensión se calienta en un matraz a 42 °C. La solución de nitrato de amonio y Ce(IV) se añade a la suspensión
45 ininterrumpidamente bajo agitación enérgica. Tras la adición de la solución de nitrato de amonio y Ce(IV) la velocidad de agitación se reduce de inmediato de forma que la suspensión se mantenga justo en suspensión. Se agita 3 h a estas revoluciones. A continuación, se lava la torta de filtración con 3 x 125 ml de agua, 5 x 15 ml de ácido sulfúrico 1 M/ácido ascórbico 0,2 M, 3 x 15 ml de agua desionizada, 5 x 15 ml de NaOH 1 M, 3 x 15 ml de agua desionizada, 3 x 15 ml de HCl 1 M y 3 x 15 ml de agua desionizada sobre un filtro 3.3 de borosilicato de 125
50 ml. El análisis CHNS del producto seco da un contenido en azufre de 2,2 % en peso.

Ejemplo 6

Síntesis de un intercambiador catiónico fuerte basado en el soporte base poli-ES/DVB elaborado según el Ejemplo 3 (*interno: 07MJ-PP005*)

En un balón de tres bocas de 250 ml (embudo de adición, tubo de introducción de gas y agitador de vidrio de precisión) se introducen 15,55 g de ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico (AMPS, Merck) y 34 g de agua desionizada. Se enfría el balón a 8 °C (para ello, ligera corriente de nitrógeno para evitar un enriquecimiento en oxígeno del aire en la solución). A esto, se añaden 3 g de sosa cáustica al 32 % (Merck) y se ajusta con ácido nítrico (65%, Merck) un valor de pH de 5,8. Se deja calentar el balón de nuevo a TA y se continúa purgando con nitrógeno. A esta solución se añaden 50 ml de polimerizado sedimentado por gravedad durante la noche, preparado según el Ejemplo 3. Se enrasa con agua desionizada a un volumen total de 120 ml. Se vuelve a ajustar el valor de pH a 5,8. A esto se añaden todavía 32 µl de dodecanol. En un vaso de precipitados se mezclan 6,75 g de agua desionizada con 0,725 g de ácido nítrico al 65%. En esta solución se disuelven 1,65 g de nitrato de amonio y Ce(IV) (Merck). La suspensión se calienta en un matraz a 42 °C. La solución de nitrato de amonio y Ce(IV) se añade a la suspensión ininterrumpidamente bajo agitación enérgica. Tras la adición de la solución de nitrato de amonio y Ce(IV) la velocidad de agitación se reduce de inmediato de forma que la suspensión se mantenga justo en suspensión. Se agita 4 h a estas revoluciones. A continuación, se lava la torta de filtración con 3 x 125 ml de agua, 5 x 100 ml de ácido sulfúrico 1 M/ácido ascórbico 0,2 M, 3 x 100 ml de agua desionizada, 5 x 100 ml de NaOH 1 M, 3 x 100 ml de agua desionizada, 3 x 100 ml de HCl 1 M y 3 x 100 ml de agua desionizada sobre un filtro 3.3 de borosilicato de 125 ml. El análisis CHNS del producto seco da un contenido en azufre de 2,8 % en peso.

Ejemplo 7

Capacidad estática de enlace a proteínas de un intercambiador iónico fuerte preparado según la descripción del Ejemplo 4

Para determinar la capacidad estática de enlace a proteínas, el intercambiador iónico fuerte, preparado según el Ejemplo 4, se lava con una mezcla de tampones, compuesta por fosfato 25 mM y acetato 25 mM, ajustada a un valor de pH de 5,0. Se cargan 100 µl de gel con 1 ml de una solución de 12,5 mg/ml de lisozima en fosfato 25 mM y acetato 25 mM, pH 5,0, y se incuban durante 120 min en un sacudidor. A continuación se lava el gel con una mezcla de tampones de fosfato 25 mM y acetato 25 mM, ajustada a un valor de pH de 5,0, para eliminar la lisozima no enlazada. La proteína enlazada al intercambiador iónico fuerte se eluye con una mezcla de tampones de fosfato 25 mM, acetato 25 mM y NaCl 1 M, pH 7,0. La concentración de proteína en el eluato se determina mediante absorción UV a 254 nm. Por cada ml de intercambiador iónico fuerte se obtiene una capacidad de enlace de 67,3 mg de proteína.

Ejemplo 8

Capacidad estática de enlace a proteínas de un intercambiador iónico fuerte preparado según la descripción del Ejemplo 5

Para determinar la capacidad estática de enlace a proteínas, el intercambiador iónico fuerte preparado según el Ejemplo 5 se lava con una mezcla de tampones, compuesta por fosfato 25 mM y acetato 25 mM, ajustada a un valor de pH de 5,0. Se cargan 100 µl de gel con 1 ml de una solución de 12,5 mg/ml de lisozima en fosfato 25 mM y acetato 25 mM, pH 5,0, y se incuban durante 120 min en un sacudidor. A continuación se lava el gel con una mezcla de tampones de fosfato 25 mM y acetato 25 mM, ajustada a un valor de pH de 5,0, para eliminar la lisozima no enlazada. La proteína enlazada al intercambiador iónico fuerte se eluye con una mezcla de tampones de fosfato 25 mM, acetato 25 mM y NaCl 1 M, pH 7,0. La concentración de proteína en el eluato se determina mediante absorción UV a 254 nm. Por cada ml de intercambiador iónico fuerte se obtiene una capacidad de enlace de 67,5 mg de proteína.

Ejemplo 9

Capacidad estática de enlace a proteínas de un intercambiador iónico fuerte preparado según la descripción del Ejemplo 6

Para determinar la capacidad estática de enlace a proteínas, el intercambiador iónico fuerte, preparado según el Ejemplo 6, se lava con una mezcla de tampones, compuesta por fosfato 25 mM y acetato 25 mM, ajustada a un valor de pH de 5,0. Se cargan 100 µl de gel con 1 ml de una solución de 12,5 mg/ml de lisozima en fosfato 25 mM y

- 5 acetato 25 mM, pH 5,0, y se incuban durante 120 min en un sacudidor. A continuación se lava el gel con una mezcla de tampones de fosfato 25 mM y acetato 25 mM, ajustada a un valor de pH de 5,0, para eliminar la lisozima no enlazada. La proteína enlazada al intercambiador iónico fuerte se eluye con una mezcla de tampones de fosfato 25 mM, acetato 25 mM y NaCl 1 M, pH 7,0. La concentración de proteína en el eluato se determina mediante absorción UV a 254 nm. Por cada ml de intercambiador iónico fuerte se obtiene una capacidad de enlace de 57,6 mg de proteína.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la elaboración de materiales cromatográficos caracterizado porque materiales base poliméricos orgánicos, los cuales no presentan grupos OH en la superficie, se polimerizan por injerto en solución acuosa en presencia de un catalizador de Ce(IV) y al menos un ácido inorgánico seleccionado del grupo de ácido nítrico, ácido sulfúrico y ácido clorhídrico.
2. Proceso según la reivindicación 1 caracterizado porque como material base polimérico se utiliza un polímero en forma de partícula o un polímero modelado, el cual se prepara mediante polimerización o copolimerización de monómeros seleccionados del grupo de monómeros que contienen grupos polivinilo divinilbenceno, trivinilbenceno, diviniltolueno, divinilpiridina, divinilnaftaleno, etilenglicoldimetacrilato, polietilenglicoldimetacrilato, polipropilenglicoldimetacrilato, N,N-metilen-bis-acrilamida, N,N-diviniletilenurea y N,N-divinilpropilenurea y monómeros que contienen grupos monovinilo como, por ejemplo, metilmetacrilato, etilmetacrilato, propilmetacrilato, butilmetacrilato, metilacrilato, etilacrilato, propilacrilato, butilacrilato, N-vinilpirrolidona, N-metil-N-vinilacetamida, acrilonitrilo, cloroestireno y aminoestireno.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2 caracterizado porque como material base se utilizan partículas con un diámetro medio de partícula en el intervalo de 20 nm hasta 1000 μm .
4. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 3 caracterizado porque como material base se utilizan partículas con una superficie media de partícula en el intervalo de 20 hasta 1200 m^2/g , preferentemente con una superficie media de partícula en el intervalo de 100 hasta 600 m^2/g .
5. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2 caracterizado porque se polimeriza por injerto un polímero base en forma de un cuerpo monolítico.
6. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 5 caracterizado porque la polimerización por injerto se realiza en presencia de nitrato de amonio y Ce(IV) como catalizador.
7. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 6 caracterizado porque la polimerización por injerto se realiza en un disolvente prótico.
8. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 7 caracterizado porque se utiliza agua como disolvente.
9. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 8 caracterizado porque
 - a) se disuelve en agua un monómero hidrófilo, el cual, dado el caso, se mezcla con otros monómeros,
 - b) la solución obtenida se mezcla con el material de soporte de forma que se utilizan de 0,05 hasta 100 mol de monómero total por litro de material polimérico sedimentado,
 - c) a la suspensión obtenida se añade sal de Ce(IV) disuelta en un ácido mineral, con lo cual se ajusta un valor de pH en el intervalo de 0 – 5, y
 - d) la mezcla de reacción se polimeriza por injerto en el transcurso de un periodo de tiempo de 0,5 hasta 72 horas.
10. Materiales de separación elaborados según un procedimiento según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 9.
11. Columna cromatográfica que contiene un material de separación según la reivindicación 10.
12. Uso de los materiales de separación según la reivindicación 10 en una columna cromatográfica.
13. Uso de los materiales de separación según la reivindicación 10 para la separación de biopolímeros de medios líquidos.