

«Умные» полимеры в биотехнологии и медицине

И.Ю.Галаев

Отдел биотехнологии, Химический центр, Лундский университет
22100 Лунд, Швеция, факс (464)610–4713

«Умные» водорастворимые полимеры и гидрогели способны обратимо реагировать на незначительные изменения свойств среды (рН, температура, ионная сила, присутствие определенных веществ, освещенность, электрическое поле), причем реакция системы легко видна невооруженным глазом (образование новой фазы в гомогенном до этого растворе, резкое набухание или сжатие гидрогеля). Рассмотрены свойства подобных полимеров и гидрогелей. Обсуждается использование «умных» полимеров и гидрогелей для концентрирования белковых растворов и обезвоживания суспензий, создания мембран с регулируемой проницаемостью, выделения и очистки биомолекул, иммобилизации биокатализаторов, создания сенсорных систем и систем контролируемого выделения лекарств. Библиография — 261 ссылка.

Оглавление

I. Введение	505
II. «Умные» полимеры	505
III. Области применения «умных» полимеров	511
IV. Заключение	520

I. Введение

В последние годы большое внимание исследователей привлекают так называемые «умные материалы» (smart or intelligent materials). Под этим названием объединяют материалы, способные реагировать на небольшие изменения во внешней среде заранее запрограммированным образом.¹ Появился даже специальный журнал *Journal of Intelligent Material Systems and Structures*, Technomic Publishing, в котором публикуются материалы по этой тематике.

Среди водорастворимых полимеров и гидрогелей «умными» могут быть названы системы, которые обратимо реагируют на незначительные изменения свойств среды (рН, температура, ионная сила, присутствие определенных веществ, освещенность, электрическое поле), причем ответ системы легко виден невооруженным глазом (образование новой фазы в гомогенном до этого растворе, резкое набухание или сжатие гидрогеля).

Привлекательность подобных систем для биотехнологии и медицины очевидна. Они дают в руки исследователей простой метод манипулирования системой. Нагревание/охлаждение на несколько градусов или небольшие изменения рН могут быть осуществлены быстро и легко, а это позволяет обратимо и многократно переходить от гомогенной системы к гетерогенной, изменять в десятки раз степень набухания гидрогелей. Такие системы уже находят практическое применение для выделения и очистки биологически активных веществ и иммобилизации биокатализаторов. Они могут быть использованы для контролируемого выделения лекар-

ственных веществ, в биосенсорах, для моделирования процессов регуляции в живой клетке, связанных с фазовыми переходами в мембранах.

Все живые организмы двигаются благодаря изотермическому превращению химической энергии в механическую работу, выражающемуся, например, в сокращении мышц, движении жгутиков или ресничек микроорганизмов. Для моделирования подобных систем могут быть использованы гидрогели на основе «умных» полимеров, способные сильно набухать (расширяться) или, наоборот, сжиматься в ответ на внешние стимулы в виде термической, химической или электрической энергии. История создания первых подобных систем в 50-е годы связана с такими известными в полимерной химии именами, как Кун и Качальский.^{2,3}

На секции полимерных гелей съезда Японского полимерного общества, состоявшегося в декабре 1991 г. в Тсукуба, были продемонстрированы приводимые в движение гелем микромотор, или машущее крыло, «жук» из геля, взбирающийся по наклонной плоскости, «палец» из геля, сгибающийся и разгибающийся на воздухе, а не в растворе, как в большинстве случаев.^{4,5}

Цель настоящего обзора — привлечь внимание химиков и биохимиков к некоторым интересным и полезным свойствам «умных» полимеров и стимулировать, с одной стороны, использование подобных систем в биохимических и биотехнологических исследованиях, а с другой — поиск и синтез новых гомо- и сополимеров, обладающих такими свойствами.

II. «Умные» полимеры

Чтобы полимерная система стала «умной», т.е. способной сильно реагировать на небольшие изменения внешней среды, в ней должен происходить фазовый переход первого рода, сопровождающийся резким уменьшением удельного объема макромолекулы. Теоретические основы подобных процессов были заложены Флори.⁶ Одним из основных условий проявления критических явлений в набухших полимерных сет-

И.Ю.Галаев. Кандидат химических наук, лектор отдела биотехнологии химического центра Лундского университета. Телефон: (464)610–8256, e-mail: Igor.Galaev@biotek.lu.se
Область научных интересов: биотехнология полимеров.

Дата поступления 11 ноября 1994 г.

ках, или линейных макромолекулах является наличие «плохого» растворителя. В таком растворителе силы притяжения между сегментами полимерной цепи могут преодолеть силы отталкивания, связанные с исключенным объемом, что приведет к коллапсу полимерной цепи.

Пространственную структуру макромолекул определяют четыре фундаментальных взаимодействия: силы Ван-дер-Ваальса, гидрофобные взаимодействия, электростатические взаимодействия и водородные связи. Электростатические взаимодействия между одноименными зарядами полимерной цепи являются наиболее эффективными силами отталкивания. Осмотическое давление внутри гидрогеля, возникающее за счет низкомолекулярных противоионов, также способствует набуханию гидрогелей. Силы Ван-дер-Ваальса, гидрофобные взаимодействия, водородные связи и взаимодействие ионов противоположного знака являются силами притяжения и обуславливают фазовые переходы в полимерных растворах или коллапс гидрогелей. Различия в природе взаимодействий, вызывающих фазовый переход, наиболее сильно проявляются в температурной зависимости набухания или коллапса гидрогелей.⁷ Если за коллапс гидрогеля ответственны силы Ван-дер-Ваальса (например, фазовый переход частично гидролизованного полиакриламидного геля в водно-ацетоновых смесях)⁸ или водородные связи (например, фазовый переход в геле, состоящем из взаимопроникающих сеток полиакриламида и полиакриловой кислоты),⁹ то гидрогель набухает при повышении температуры и сжимается при ее понижении. Напротив, если коллапс геля вызывают гидрофобные взаимодействия (например, фазовый переход в геле сополимера *N*-изопропилакриламида и акрилата натрия)¹⁰ или взаимодействие ионов противоположного знака (например, фазовый переход в геле сополимера акриламида, акрилата и триметил-*(N*-акрилоил-3-аминопропил)аммония),¹¹ то наблюдается обратная температурная зависимость — гель набухает при низкой температуре и сжимается при ее повышении. В некоторых гидрофильных гелях, например в геле сополимера акриламида и винилсульфоната натрия, возможны два фазовых перехода. В 65%-ном ацетоне при низких температурах гель находится в состоянии коллапса, но начинает резко набухать при температурах выше -10°C . До температуры 55°C гель остается в набухом состоянии и затем вновь происходит коллапс.¹²

Для сильно гидрофильных ионогенных полимеров растворитель может стать достаточно плохим за счет добавления к воде органического растворителя. Критические явления (осаждение полимера из раствора или коллапс полимерного геля) в присутствии 30–70%-ного ацетона, *n*-пропанола или этанола наблюдались как для синтетических полимеров (сополимеры акриламида с ионогенными сомономерами),^{11, 13–16} так и для природных (гиалуроновая кислота,¹⁷ ДНК,^{18–20} желатин,²⁰ агароза²⁰).

Для неионогенных полимеров, растворимость которых в воде обусловлена образованием водородных связей, вода становится худшим растворителем с повышением температуры. Например, при нагревании водных растворов гомополимеров окиси этилена и ее сополимеров с окисью пропилена выше нижней критической температуры растворения (НКТР) происходит расслоение раствора на две фазы — обогащенную полимером и водную, практически не содержащую полимера. Водные растворы полиэлектролитов при нейтрализации ионогенных групп также расслаиваются при нагревании (например, полиметакриловая кислота расслаивается при $\text{pH} \sim 3$ и температурах $> 50^{\circ}\text{C}$).²¹ Как правило, для подобных полимеров НКТР равна 60°C и выше (см., например, работы^{22, 23}), что мало приемлемо для биомолекул. Однако такие полимеры с успехом могут применяться для создания обратимо растворимых катализаторов гомогенных химических реакций. Так, на основе блок-сополимера окиси этилена и окиси пропилена (Плюроник, Pluronic) и комплекса родия создан гомогенный катализатор гидрирования, кото-

рый выпадает в осадок при нагревании до $50–60^{\circ}\text{C}$. После осаждения катализатор можно легко отделить от реакционной смеси, растворить при комнатной температуре и использовать повторно.²⁴

Для возникновения критических явлений в описанных выше системах необходимы экстремальные условия (высокая концентрация органического растворителя, высокая температура, низкие значения pH), приводящие к быстрой денатурации биомолекул, поэтому они пока не нашли применения в биотехнологии. Однако развитие энзимологии в неводных средах, разработка новых методов иммобилизации и стабилизации биокатализаторов могут сделать и подобные системы перспективными с точки зрения биотехнологии.

В настоящем обзоре рассмотрены полимеры и гидрогели, в которых критические явления наблюдаются в водных растворах при температурах не выше $40–45^{\circ}\text{C}$ и при слабо кислых или нейтральных значениях pH .

1. Полимеры, чувствительные к изменению pH

Нейтрализация заряженной макромолекулы в результате изменения pH среды приводит к тому, что вода становится плохим растворителем для нейтральной молекулы полимера; возникает возможность критических явлений. Как уже отмечалось выше, для таких сильно заряженных полиэлектролитов, как полиметакриловая кислота, критические явления происходят при экстремальных значениях pH и температур. Уменьшение заряда макромолекулы и увеличение ее гидрофобности за счет сополимеризации с гидрофобными сомономерами позволяет достичь критических явлений уже в приемлемой области pH . Для сополимеров (диметиламино)этилметакрилата с *n*-алкилметакрилатами коллапс гелей происходит при pH 6.0–6.5 и комнатной температуре. При увеличении содержания *n*-алкилметакрилата в геле разница в объеме сколлапсированного и набухшего геля уменьшается, и переход наблюдается при более низких значениях pH . Увеличение длины алкильного заместителя в *n*-алкилметакрилате также уменьшает разницу в объеме сколлапсированного и набухшего геля, однако не оказывает систематического влияния на pH перехода.²⁵

Водные растворы сополимеров метакриловой кислоты с метилметакрилатом и гидрофобизированные производные целлюлозы, содержащие карбоксильные группы (карбоксиметилэтилцеллюлоза, ацетат-фталат целлюлозы, фталат или ацетат-сукцинат оксипропилметилцеллюлозы), гомогенны при $\text{pH} > 4–5.5$, но расслаиваются на водную и полимерную фазы при подкислении.²⁶ Подобные полимеры выпускаются в промышленном масштабе, широко используются в производстве лекарственных средств (табл. 1). Оболочка таблетки из таких полимеров не будет растворяться в желудке при pH 1.4 и защитит лекарственное средство от вредного воздействия содержимого желудка. Попадая в кишечник (pH 6.7–7.4), оболочка таблетки растворится, что позволит лекарству быстро всосаться в кровь. Сополимер диэтиламиноэтилметакрилата с метилметакрилатом и бутилметакрилатом, напротив, нерастворим при нейтральных значениях pH , но растворяется в кислой среде. Оболочка из этого полимера защищает таблетку от растворения в слюне, при этом во рту не возникает неприятных ощущений от горьких лекарств.²⁷

В табл. 2 приведены мономеры, используемые в pH -чувствительных синтетических полимерах и гидрогелях. Для создания подобных систем применяют как мономеры, содержащие слабые кислотные или основные группы, так и сильные кислоты или основания. pH -Чувствительные гидрогели получают радикальной полимеризацией в присутствии сшивающего агента или химической сшивкой водорастворимого полимера с помощью бифункционального агента. Варьирование состава мономеров и содержания сшивающего агента

Таблица 1. Выпускаемые промышленностью полимеры, используемые в лекарственных препаратах

Сополимер	Молекулярная масса	Соотношение карбоксильных и эфирных групп	Торговая марка	Фирма-изготовитель	Страна
Метакриловая кислота – метилметакрилат	135 000 135 000 —	1 : 1 1 : 2 —	Eudragit L Eudragit S MPM-05, MPM-06	Röhm Pharma GMBH Röhm Pharma GMBH Tanabe Seiyaku Co. Ltd	Германия Германия Япония
Карбоксиметилэтил-целлюлоза	—	—	CMEC	Freund Sangyo Co. Ltd	Япония
Ацетат-фталат целлюлозы	—	—	CAP	Wako Pure Chemicals Ltd	Япония
Фталат оксипропил-метилцеллюлозы ²⁸	—	—	HP-50, HP-55	Shin-Etsu Chemical Co. Ltd	Япония
Ацетат-сукцинат оксипропилметил-целлюлозы ²⁸	—	—	AS-M, AS-H	Shin-Etsu Chemical Co. Ltd	Япония
Диэтиламиноэтил-метакрилат – метил-метакрилат (или бутил-метакрилат)	150 000	—	Eudragit E	Röhm Pharma GMBH	Германия

позволяет получать гидрогели с различными pH-чувствительностью и степенями набухания. Степень набухания гидрогелей, т.е. ответ системы на изменение внешних условий, зависит главным образом от заряда мономера, рК ионогенной группы, степени ионизации, концентрации ионного мономера в полимерной сетке, степени сшивки гидрогеля, pH и ионной силы окружающей среды.³⁰

Гидрогели, содержащие кислотные группы, набухают в слабощелочной среде, но коллапсируют в кислой среде. Напротив, гидрогели с основными группами набухают в кислой среде, но коллапсируют при повышении pH. Полиамфолитные гидрогели, полученные из сомономеров, один из которых растворим в щелочной среде, но нерастворим в кислой (например, метакриловая кислота), а другой, наоборот, растворим в кислой среде, но нерастворим в щелочной (например, 2-(*N,N*-диметиламино)этилметакрилат), макси-

мально набухают при нейтральных значениях pH. Подкисление или подщелачивание приводит к резкой дегидратации таких гелей.³⁴

Физико-химические модели набухания гидрогелей обычно учитывают изменение свободной энергии за счет трех факторов: 1) осмотического давления мобильных противоионов внутри геля (теория Доннана); 2) смешивания полимера с растворителем (теория Флори – Хаггинса); 3) вытягивания макромолекул, увеличивающего свободную энергию, которая в конечном счете и определяет предельную степень набухания. Так, увеличение энтропии в результате смешивания полимера с хорошим растворителем увеличивает набухание геля. Если растворитель плохой, то выигрыш энтропии недостаточен, и гель не набухает. Процесс вытягивания макромолекул при набухании полимерной сетки описывается теорией эластичности, предполагающей, что полимерная сетка состоит из поперечно сшитых полимерных цепей, находящихся в свободной гауссовской конформации.³³

Физико-химические модели набухания удовлетворительно описывают только набухание слабо заряженных гидрогелей с моновалентными противоионами при высоких степенях набухания.¹⁶ При низких степенях набухания или для гелей с высокой плотностью заряда теория плохо согласуется с экспериментом. Так, при высокой плотности заряда в геле активности ионов уже не равны их концентрации. В слабо набухом геле эффективная диэлектрическая проницаемость ниже, чем в окружающем растворе. Эта ситуация энергетически невыгодна для любого иона, и он будет стремиться выйти из геля. Указанная тенденция усиливается с увеличением радиуса гидратации иона. При низкой степени набухания значительная часть воды в геле находится в связанном с полимером состоянии. Способность таких молекул к сольватации противоионов значительно ниже. В сильно заряженном геле при высокой степени набухания уже нельзя пренебречь электростатическими взаимодействиями между фиксированными заряженными группами и мобильными противоионами, как это делается в теории Доннана. Электрический потенциал в геле перестает быть однородным, так как противоионы стремятся локализоваться вблизи заряженных групп. Кроме того, теория Доннана не учитывает специфические ионные эффекты, например, поперечную сшивку полимерных цепей поливалентными противоионами и комплексообразование.

Таблица 2. Мономеры, использованные в pH-чувствительных «умных» полимерах и гидрогелях

Тип гидрогеля	Мономер	pH-чувствительная группа	Ссылки
Кислотный	Метакриловая кислота	—COOH	27
	Акриловая кислота		29
	Малеиновая кислота		30
	<i>N</i> -Акрилоил- <i>n</i> -аминобензойная кислота		31
	Стиролсульфонат	—SO ₃ Na	32
	Сульфоксиэтилметакрилат	—SO ₃ H	32
Щелочной	Аминоэтилметакрилат	—NH ₂	32
	<i>N,N</i> -Диметиламиноэтилметакрилат	—NMe ₂	25
	<i>N,N</i> -Диэтиламиноэтилметакрилат	—NEt ₂	33
	Винилпиридин	—NC ₅ H ₄	32
	Винилбензилтри-метиламмоний хлорид	—NMe ₃ ⁺ Cl [−]	32

Перечисленные выше факторы объясняют отсутствие удовлетворительной общей теоретической модели набухания гидрогелей.³³

Изменение pH вблизи электрода используется для создания полимерных систем, реагирующих на электрический потенциал.³⁵ Так, столбик частично гидролизованного (20% амидных групп) полиакриламидного геля длиной 3 см в 50%-ном ацетоне под действием потенциала (> 1.15 В) сокращается в 200 раз. В электрическом поле протоны движутся к катоду, а отрицательно заряженные акрильные группы полимерной цепи стремятся к аноду. В толще геля возникает механическое напряжение, максимальное вблизи анода и минимальное вблизи катода, что в условиях плохого растворителя в конечном итоге приводит к коллапсу геля (в чисто водном растворе происходит лишь постепенное уменьшение размеров геля без коллапса). Коллапс геля обратим, и в отсутствие электрического поля гель снова набухает. Время ответа в подобной системе измеряется часами. Ускорить ответ можно за счет уменьшения размеров геля и увеличения напряженности электрического поля. Микрочастицы полиакрилата размером 150–300 мкм сокращаются в объеме на 90% за 50 с в электрическом поле с напряженностью 46 В (см.³⁶). При изменении потенциала полипиррольной пленки от -0.6 до 0.4 В значение pH вблизи нее меняется от 4 до 10. При этом микрочастицы геля полиакрилата кальция на поверхности пленки растворяются всего за 15 с. При возвращении к исходному потенциалу (-0.6 В) частицы микрогеля образуются вновь (за 10 с).³⁷

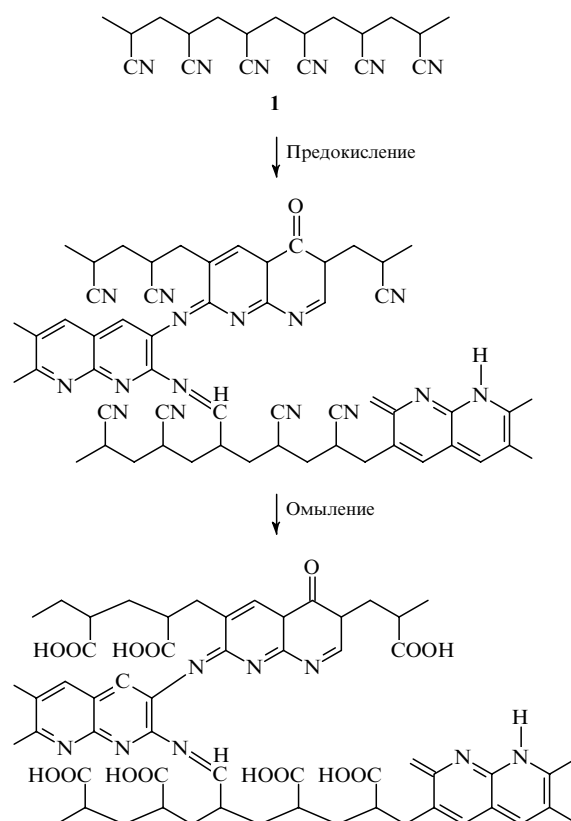
Биодеградируемый гель, обратимо набухающий при изменении pH, получен из сополимера *N,N*-диметилакриламида, *N*-трет-бутилакриламида, *n*-нитрофенилового эфира *N*-метакрилглицилглицина и акриловой кислоты при ковалентной сшивке с помощью *N,N'*-(ω -аминокапроил)-4,4'-диаминобензола.³⁸

Критические явления в сильно заряженных полиэлектролитах, происходящие при экстремальных значениях pH, представляют интерес с точки зрения возможности превращения химической энергии в механическую и моделирования биомеханических систем. В настоящее время подобные системы уже могут развивать усилия, достаточные, чтобы приподнять на 0.5 см автомобиль весом 800 кг,³⁹ а композитная пленка из сополимеров винилового спирта с акриловой кислотой и винилового спирта с акриловой кислотой и аллиламином способна изменять свой размер в ответ на смену растворителя (замена этанола на 0.01 N NaOH) в течение всего 40 с (см.⁴⁰). Еще более впечатляет модель искусственной мышцы, созданная в Токийском технологическом институте.⁴¹ Модификация путем частичного окисления и омыления выпускаемых промышленно полиакрилонитрильных волокон (1) придает им способность сильно набухать в щелочной среде (1 N NaOH) и сокращаться в кислой среде (1 N HCl). Удлинение достигает 80% за 2 с, развиваемое при этом усилие составляет $12 \text{ кгс} \cdot \text{см}^{-2}$. Для сравнения отметим, что скелетные мышцы удлиняются на 30% за 10^{-2} – 10^{-3} с, развивая усилие 4 – $10 \text{ кгс} \cdot \text{см}^{-2}$. Таким образом, искусственные мышцы по эффективности почти приблизились к биологическим.

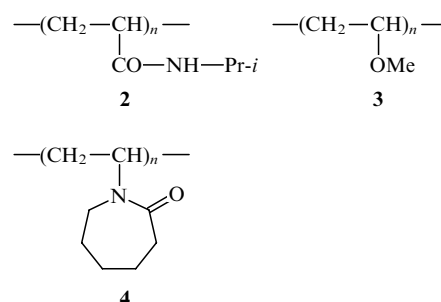
Детально механохимические системы, способные превращать различные виды химической энергии в механическую работу, рассмотрены в обширном обзоре Осады,³⁹ сотрудники которого много и успешно работают в этой области.

2. Полимеры, чувствительные к изменению температуры

В данном разделе рассмотрены термореактивные полимеры и гидрогели с НКТР ниже 40 – 45°C . Тэйлор и Церановский в своей классической работе⁴² вывели правило, согласно которому существует область, где полимерный раствор имеет НКТР.



В обзоре Галаева и Маттиасона⁴³ приведен один из наиболее полных списков полимеров, имеющих в водных растворах НКТР. Синтезированы полимеры с самыми различными НКТР.⁴⁴ В настоящее время активно изучается возможность применения некоторых из них в биотехнологии, в первую очередь это поли-*N*-изопропилакриламид (поли-НИПАА) (2) и другие поли-*N*-алкилакриламиды, а также поливинилметилэфир (ПВМЭ) (3). В последнее время внимание исследователей привлекают поли-*N*-винилкапролактамы (ПВК) (4) и сополимеры окиси этилена и окиси пропилена.



Наибольшее число публикаций посвящено поли-НИПАА. Гомо- и сополимеры НИПАА легко получают радикальной полимеризацией в водных⁴⁵ или органических растворителях.^{46, 47} Поли-НИПАА растворим в ацетоне, хлороформе, диоксане, тетрагидрофуране, низших спиртах, холодной воде; он образует отдельную фазу при температуре около 32°C , причем НКТР почти не зависит от молекулярной массы (*M*) полимера.⁴⁷ Поли-НИПАА не удается расфракционировать на узкомолекулярные фракции при расслаивании водного раствора полимера при нагревании. Для фракционирования применяют тщательно высушенную смесь ацетона и *n*-циклогексана.⁴⁸

Узкомолекулярные фракции поли-*N,N*-диэтилакриламида с очень узким распределением *M* (полидисперсность менее 1.2) удалось получить полимеризацией соответствующего мономера с переносом группы (живущей полимериза-

цией) в сухом тетрагидрофуране, инициируемой диметилкетметилтриметилсилацеталем и катализируемой ацетатом тетрабутиламмония.⁴⁹ Однако величина M для синтезированного полимера невелика и составляет всего 4700. Нижняя критическая температура растворения для поли- N,N -диэтилакриламида, синтезированного радикальной полимеризацией или живущей полимеризацией, составляет 30°C, а для синтезированного анионной полимеризацией — 40°C.^{50, 51}

Описаны синтез сополимеров НИПАА с акрилоксисукцинимидом (используемых для ковалентной иммобилизации белков),⁵² модификация поли-НИПАА с целью получения пористого стекла,⁵³ полимерных мембран,^{44, 54, 55} получение блок-сополимеров НИПАА с окисью этилена,⁵⁶ водные растворы которых при нагревании, в отличие от гомополимера поли-НИПАА, не расслаиваются на две фазы, а образуют гель.^{57, 58}

Свойства поли-НИПАА в водных растворах и фазовый переход при нагревании подробно изучались различными методами: турбодиметрическим,^{47, 48} вискозиметрическим,^{48, 49} калориметрическим^{48, 60, 61} методами светорассеивания,^{60, 61, 63} флуоресценции^{63–66} и ЭПР.⁶⁷ В работах^{59, 68–72} исследовано влияние поверхностно-активных веществ и включения гидрофобных или ионогенных сомономеров на НКТР поли-НИПАА, а в работе⁷³ — влияние фазового перехода на сорбцию поли-НИПАА на аэросилах различной гидрофобности.

Фазовое разделение водных растворов поли-НИПАА при повышении температуры обусловлено конформационным переходом макромолекулы из рыхлой глобулы в компактный клубок. Подобный переход сопровождается резким уменьшением размеров макромолекулы,⁶² уменьшением подвижности флуоресцентной дансильной метки, ковалентно-связанной с полимером,⁶⁴ и пятикратным увеличением безызлучательного переноса энергии между пиреновой и нафталиновой метками, ковалентно-связанными с макромолекулой.⁶⁵ Величина энтальпии перехода согласуется с потерей примерно одной водородной связи на каждое мономерное звено.⁴⁵ Теплоемкость поли-НИПАА понижается с повышением температуры. Уменьшение теплоемкости поли-НИПАА отражает коллапс полимерной цепи при нагревании, сопровождающийся уменьшением числа контактов полимерной молекулы с молекулами воды подобно тому, как это происходит при ренатурации белка после денатурации из-за охлаждения.⁶¹

Для гидрофобно модифицированных сополимеров НИПАА при температурах ниже НКТР наблюдается образование мультимолекулярных мицелл, состоящих из гидрофобного ядра, окруженного сольватированными цепями поли-НИПАА.⁶³ Обмен полимерными молекулами между мицеллами происходит очень медленно.⁶⁶ При НКТР сколлапсированные мицеллы агрегируют, и становится возможным эффективное перемешивание молекул сополимера.^{63, 66} Эндотермическая теплота фазового разделения тройных сополимеров НИПАА – бутилметакрилат – X, где X — гидрофильный, гидрофобный, катионный или анионный сомономер, линейно уменьшается с ростом НКТР. Таким образом, гидрофобные взаимодействия между боковыми группами полимера усиливаются с ростом температуры из-за уменьшения структурирования воды вокруг этих групп. Сделан вывод, что изменение НКТР, вызванное включением других сомономеров, определяется общим изменением гидрофильности сополимера, а не прямым влиянием гидрофильности или заряда сомономера на молекулы воды, структурированные вокруг гидрофобных групп.⁷¹

Поскольку гидрофобные взаимодействия являются основной движущей силой, вызывающей фазовое разделение, НКТР поли-НИПАА или его сополимеров можно регулировать, влияя на эффективность этих взаимодействий. Введение гидрофобных сомономеров снижает, а

гидрофильных — повышает НКТР полимера.⁷⁴ Нижняя критическая температура растворения поли-НИПАА снижается при повышении ионной силы раствора и повышается в присутствии ионных детергентов, образующих прочные комплексы с полимером.^{57, 68–70, 75} Смешивающиеся с водой органические растворители ослабляют гидрофобные взаимодействия боковых групп поли-НИПАА и повышают НКТР. Однако в присутствии 40–60 об. % некоторых растворителей (метанол, тетрагидрофуран) НКТР поли-НИПАА снижается до 0°C и ниже.⁷⁶

Гели поли-НИПАА и других N -алкилзамещенных полиакриламидов получают при добавлении в исходную реакционную смесь сшивающего агента (обычно N,N' -метиленбисакриламида), при радиационной полимеризации⁷⁷ или путем поперечной сшивки сополимера с помощью бифункционального агента.³⁸ Введение ионогенных сомономеров позволяет получить гидрогели, чувствительные как к изменению температуры, так и к изменению pH.^{78–80} Макропористые гели с большими скоростями набухания и дегидратации синтезированы при температурах выше НКТР поли-НИПАА.⁸¹ В гранулированной форме гель поли-НИПАА можно получить эмульсионной или суспензионной полимеризацией.^{82–84} Используя различные N -алкилзамещенные полиакриламиды, удается получить термореактивные гидрогели (ТГ) с НКТР от 5.5°C для геля поли- N -акрилоилпиперидина и 72°C для геля поли- N -этилакриламида.⁸⁵

Начало изучению фазовых переходов в гидрогелях поли-НИПАА^{86–97} и других N -алкилзамещенных полиакриламидов^{93, 98–101} было положено в работах Илавского и сотр.⁹⁸ и Танаки и сотр.¹⁰ Эти исследования продолжают интенсивно развиваться и в настоящее время. Зависимость времени, необходимого для фазового перехода, от размеров образца геля позволяет приблизительно описать фазовый переход как коллективный диффузионный процесс.⁹⁴ Важную роль при этом играет образование отдельных сколлапсированных участков или тонкой пленки сколлапсированного геля на поверхности образца.

Исследовано влияние поверхностно-активных веществ,^{75, 102, 103} органических растворителей,^{76, 101, 104} солей,¹⁰⁵ полиэтиленгликолей,¹⁰⁶ включения ионогенных сомономеров^{87, 89, 98, 100, 107} на коллапс и набухание гелей. Изучен безызлучательный перенос энергии¹⁰⁸ и механические напряжения,¹⁰⁹ возникающие при коллапсе гелей поли-НИПАА. Интересно отметить, что хлорид натрия в концентрации ~ 1 моль $\cdot$ л⁻¹ вызывает коллапс гидрогеля поли-НИПАА при комнатной температуре, в то время как другие соли оказывают типичное высаливающее действие — гель постепенно дегидратируется с повышением концентрации соли.¹⁰⁵ Сильное гидрофобное взаимодействие изопропильных групп поли-НИПАА с алкильным радикалом додецилсульфата натрия приводит к тому, что в присутствии детергента гель поли-НИПАА ведет себя как гель сополимера НИПАА с анионным мономером.^{102, 103}

Подробное теоретическое обсуждение моделей фазовых переходов в гелях поли-НИПАА можно найти в недавних обзорах^{110, 111}.

Поливинилметилэфир (3) получают катионной полимеризацией метилвинилового эфира, этот полимер производится промышленно.⁸⁵ Нижняя критическая температура растворения для водных растворов ПВМЭ составляет 34–38°C.^{85, 112} Гель ПВМЭ получают γ -облучением полимерных растворов.⁸⁵ Облучение при температурах выше НКТР¹¹³ или тщательный подбор условий (доза облучения, концентрация полимера)¹¹⁴ позволяют получить гели с большими скоростями набухания и дегидратации при изменении температуры. Фазовые переходы в растворах^{45, 112, 115} и гелях ПВМЭ^{85, 86, 113, 116–118} значительно менее изучены, чем в поли-НИПАА.

По-видимому, как и для поли-НИПАА, основную роль в фазовом переходе ПВМЭ играют гидрофобные взаимодействия.¹¹² Молярная теплота фазового перехода для ПВМЭ ниже, чем для поли-НИПАА,⁸⁶ однако фазовый переход в ПВМЭ также сопровождается потерей одной водородной связи на каждое мономерное звено,¹¹⁹ как и в поли-НИПАА.

Поливинилкапролакт (ПВК) (4) получают радикальной полимеризацией винилкапролактама в органическом растворителе¹²⁰ или в блоке.^{121, 122} Термодинамику фазового перехода в водных растворах ПВК исследовали Тагер и сотр.^{123–126} Нижняя критическая температура растворения водных растворов ПВК зависит от молекулярной массы полимера и меняется от 31°C для полимера с M 1 250 000 до 40°C для полимера с M 15 500 (см.⁴³). Энергия Гиббса, энтальпия и энтропия смешения ПВК с водой отрицательны во всей области составов. При повышении температуры экзотермичность смешения уменьшается. Предполагается, что в водных растворах ПВК происходит гидрофильная и гидрофобная гидратация полимера. В области температур и составов, близких к бинали, преобладает гидрофобная гидратация, вследствие чего взаимная смешиваемость полимера с водой уменьшается и имеет место фазовое разделение.¹²³

Производные целлюлозы, в частности, оксипропилметилцеллюлоза и этилоксиэтилцеллюлоза, также перспективны для использования в биотехнологии. Они отличаются высокой химической стабильностью и хорошей биологической совместимостью, НКТР водных растворов этих полимеров составляет 50–60°C, но в присутствии солей и поверхностно-активных веществ она понижается почти до 0°C.^{127–129}

Среди производных окиси этилена широкое применение в биотехнологии нашли неионные детергенты, особенно тритон X-114 (*n*-трет-октилфениловый эфир полиоксиэтилена со степенью полимеризации 7–8). В последнее время внимание исследователей привлекли также сополимеры окиси этилена и окиси пропилена. Водные растворы тритона X-114 имеют НКТР в области 18°C, они используются для экстракции гидрофобных белков в полимерную фазу (так называемая экстракция в точке помутнения — cloud point extraction). Однако, строго говоря, тритон X-114 (M 450–500) и подобные ему соединения относятся к олигомерам, а не к полимерам, поэтому их рассмотрение выходит за рамки настоящего обзора. Детально теоретические основы и практика применения экстракции в точке помутнения детергентов рассмотрены в блестящем обзоре Хинце и Прамауро.¹³⁰

Сополимер окиси этилена и окиси пропилена состава 50:50 с M 4000 (выпускается компанией Union Carbide под торговой маркой UCON 50-HB-5100) имеет НКТР 55°C. Однако в присутствии 0.2 М раствора сульфата натрия НКТР понижается до 40°C.¹³¹ Более гидрофобный сополимер, содержащий 80 мол.% окиси пропилена (M 2000), имеет более низкую НКТР (18°C).¹³²

Описанный выше сополимер метакриловой кислоты и метакрилата (Eudragit S 100),²⁷ водные растворы которого расслаиваются при подкислении, в нейтральной среде образует отдельную полимерную фазу при температуре 40°C в присутствии 50 ммоль·л⁻¹ Ca²⁺. Сополимер вновь растворяется при понижении температуры.^{133, 134}

Недавно появилось первое сообщение об обратимом гелеобразовании в неорганической системе. Гидрогель полифосфата алюминия растворяется при понижении температуры и вновь образуется при комнатной температуре.¹³⁵

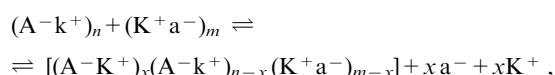
Интересными системами являются обратимо флокулирующие латексы. Минимальная концентрация NaCl, вызывающая флокуляцию, уменьшается с ростом температуры и достигает постоянного значения при температурах выше НКТР. При определенной концентрации NaCl латекс начинает флокулировать при достижении некоторой температуры, но может быть вновь диспергирован при охлаждении. Описано получение подобных латексов на основе поли-НИПАА^{136–140} и его сополимеров,^{77, 84, 141, 142} сополимеров

N-акрилоилпирролидина и *N*-акрилоилпиперидина,^{143, 144} эфиров метакриловой кислоты и олигомеров оксиэтилена со степенями полимеризации 1, 2, 4–5, 7–8 (см.¹⁴⁵).

3. Полимерные комплексы

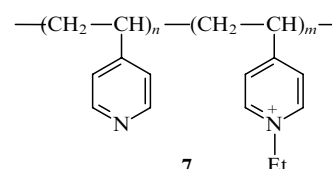
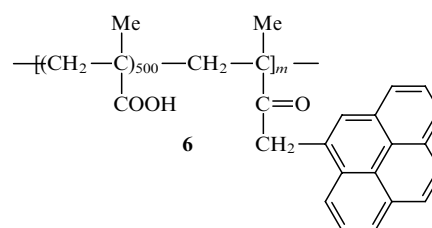
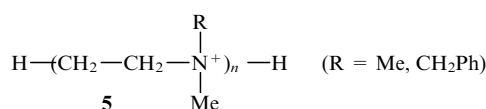
Полимерные комплексы, т.е. комплексы, образованные двумя различными полимерами или полимером и низкомолекулярным соединением, привлекают в последнее время все большее внимание исследователей.¹⁴⁶

Процесс образования полиэлектролитного комплекса в общем виде описывается схемой¹⁴⁷



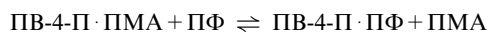
где A^- и K^+ — анионные и катионные группы в составе полимера, a^- и k^+ — низкомолекулярные противоионы. Степень превращения (Θ) определяется как отношение числа образованных межмолекулярных связей к максимальному ($\Theta = x/m$ при $n \geq m$ или $\Theta = x/n$ при $m \geq n$). Растворимость поликомплексов в воде зависит от доли заряженных ионогенных групп z и от относительной длины противоположно заряженных полиионов, а также от рН и ионной силы раствора. Поликомплексы, образованные полимерами с $z = 1$, обладают минимальной растворимостью при $\Theta \rightarrow 1$. Нестехиометрические полиэлектролитные комплексы, в которых преобладает один из полиионов, можно представить себе как необычный блок-сополимер, состоящий из заряженного гидрофильного блока, содержащего одну полимерную цепь, и нейтрального гидрофобного блока, содержащего две полимерные цепи.

Кооперативный характер взаимодействия между полиионами делает такие поликомплексы исключительно стабильными уже при достаточно малых степенях полимеризации полиионов. Например, константа диссоциации поликомплексов полиметакриловой кислоты с кватернизованными олигоэтиленiminaми (5) становится пренебрежимо малой уже для октамеров.¹⁴⁷



Несмотря на большую прочность поликомплексов, они обладают способностью к обмену полиионами. Природа и длина цепи полииона имеют принципиальное значение в реакциях обмена.¹⁴⁸ Комплекс полиметакрилата (6, ПМА, степень полимеризации 4100), содержащий флуоресцентную метку (одну метку на каждые 500 мономерных звеньев) с частично кватернизованным поливинил-4-пиридином (7, ПВ-4-П, степень полимеризации 170), способен к реализации

обмена с полифосфатами (ПФ) с различной степенью полимеризации (от 20 до 230):



Равновесие этой реакции в 0.3 М NaCl полностью сдвинуто вправо в случае полифосфатов большой длины и, напротив, влево для самого короткого полифосфата. При фиксированной степени полимеризации полифосфата ($n = 70$), равновесие реакции полностью сдвинуто вправо в 0.3 М LiCl, а влево — в 0.3 М KCl, и равновесие сохраняется в 0.3 М NaCl. Подобные явления не имеют аналогов в неполимерных системах и могут служить полезной моделью регуляции процессов в живой клетке с помощью биополимеров.¹⁴⁸

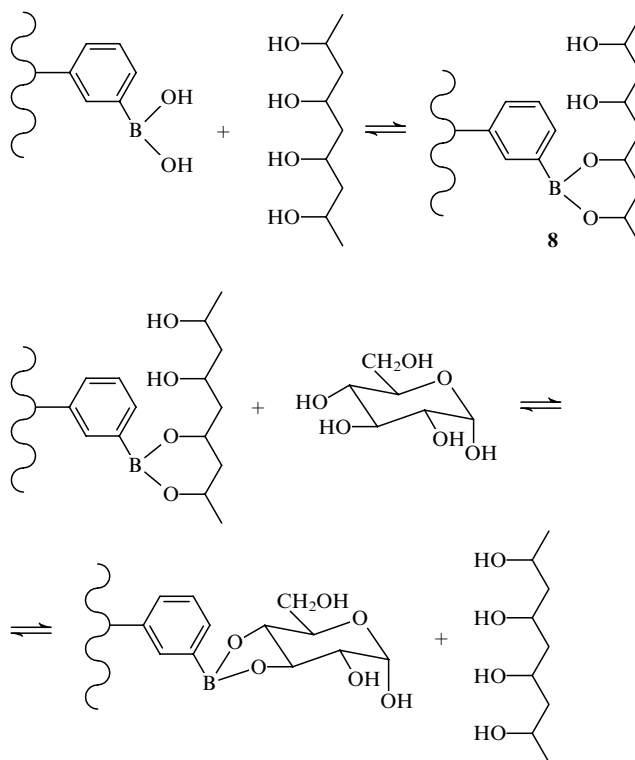
К «умным» полимерным комплексам можно отнести системы, способные сильно, но обратимо изменять свои свойства в ответ на небольшие изменения среды. К перспективным для биотехнологии системам относятся в первую очередь нестехиометрические полиэлектролитные комплексы (НПК), образующиеся при взаимодействии поликатиона, например поли-*N*-этил-4-винилпиридинийбромид, и избытка полианиона, например полиметакриловой кислоты.^{149–151} Привлекает способность подобных комплексов переходить количественно из раствора в осадок при изменении pH всего на 0.3 единицы.¹⁴⁹

Другой интересной группой являются комплексы между незаряженными полимерами, которые получают в результате многочисленных слабых взаимодействий, например, за счет водородных связей между полиакриловой кислотой и полиакриламидом.⁹ Прочность водородных связей возрастает с понижением температуры. Так, гель, образованный взаимопроникающими полимерными сетками полиакриловой кислоты и полиакриламида, при охлаждении до температуры $\sim 20^\circ\text{C}$ коллапсирует, а при нагревании вновь набухает.⁹

В работах Кабанова и сотр.^{152, 153} обнаружено комплекссообразование между полиметакриловой кислотой и полиоксиэтиленом (ПОЭ). Комплексы высокомолекулярного полиметакрилата (или полиакрилата) с ПОЭ образуются в том случае, когда молекулярная масса последнего превышает определенное критическое значение, равное 2000 для комплекса с полиметилметакрилатом и 6000 для комплекса с полиакрилатом. Комплекс ПОЭ с полиметакрилатом стабилизирован за счет гидрофобных взаимодействий, его прочность возрастает с повышением температуры, в то время как прочность комплекса ПОЭ с полиакрилатом мало зависит от температуры.

Важная роль гидрофобных взаимодействий (в которых, по-видимому, участвует α -метильная группа полиметакрилата) в стабилизации комплекса полиоксиэтилена с полиметакрилатом обнаружена и при исследовании влияния природы растворителя. Так, критическая молекулярная масса ПОЭ, необходимая для образования комплекса ПОЭ с полиметакрилатом, резко возрастает при переходе к более гидрофобным водно-метанольным смесям, в то время как для полиакрилатного комплекса она практически остается постоянной.¹⁵⁴ Сильная обратимая зависимость комплексобразования полиметакрилата с полиоксиэтиленом от температуры в интервале $25–45^\circ\text{C}$ делает подобные системы интересными для биотехнологического использования.^{39, 155, 156}

Борная кислота дает прочные комплексы с полиольными соединениями. Комплекс поливинилового спирта с сополимером *N*-винилпирролидона с *m*-акрилоиламидофенилборной кислотой образуется за счет взаимодействия борной кислоты с оксигруппами полиола, однако в присутствии избытка другого полиола (например, глюкозы) поликомплекс разрушается. Удаление глюкозы (например, диализом) вновь приводит к комплексу **8** (см.^{157, 158}), следовательно, комплексобразование обратимо зависит от присутствия глюкозы, т.е. данная система может быть использована как детектор на наличие или отсутствие глюкозы.



Среди изученных комплексов полимеров с низкомолекулярными соединениями следует отметить комплекс, образуемый гелем поли-2-акриламида-2-метилпропансульфоно-вой кислоты с *n*-додецилпиридинийхлоридом. Подобная система реагирует на изменение электрического потенциала изменением формы геля.¹⁵⁹

III. Области применения «умных» полимеров

1. Концентрирование белковых растворов и обезвоживание суспензий

При коллапсе гидрогеля сжимаются в объеме до 1000 раз.⁸⁶ Их способность поглощать до нескольких сот грамм воды на один грамм геля, а затем отдавать поглощенную воду после незначительного изменения условий используется в процессах обезвоживания суспензий и концентрирования белковых растворов. В основе таких процессов лежит цикл, представленный на рис. 1.¹⁶⁰

Предварительно дегидратированный гель набухает в исходном растворе, «забирая» воду. Низкомолекулярные вещества, способные проникать в поры геля, диффундируют внутрь геля. Напротив, высокомолекулярные вещества, не способные проникать в поры, остаются в сконцентрированном виде в растворе. Набухший гель отделяют от раствора и регенерируют, вызывая коллапс (нагревают до температуры выше критической или изменяют pH и ионную силу раствора). Гель коллапсирует и выделяет поглощенную ранее воду с растворенными в ней низкомолекулярными веществами. После отделения фильтрацией или центрифугированием дегидратированный гель вновь готов для концентрирования новой порции исходного раствора. Регулируя состав и степень сшивки геля, можно менять его селективность по отношению к молекулярной массе и заряду сорбируемых растворенных веществ.^{161–164} При использовании коллапсирующих гелей для концентрирования и обезвоживания (swell process или gel dewatering process) удается удачно сочетать высокую производительность жидкостной экстракции и селективность мембранных методов.¹⁶²

Сама идея концентрирования белковых растворов за счет адсорбирования воды твердыми частицами появилась уже в

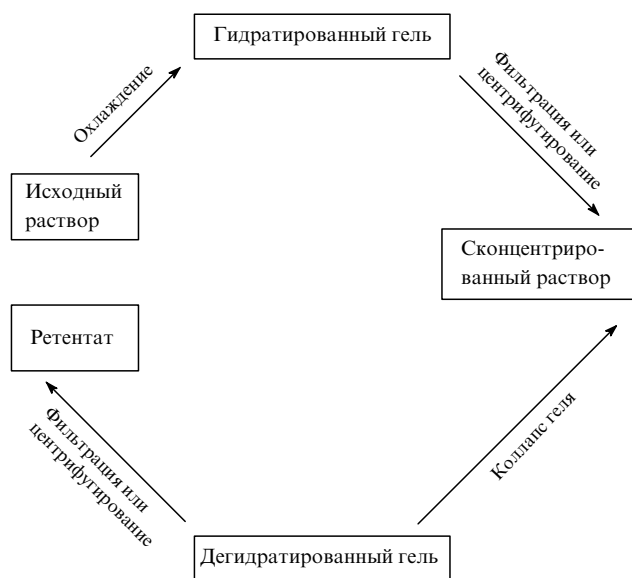


Рис. 1. Процесс обезвоживания суспензий и концентрирования белковых растворов¹⁶⁰

60-е годы.¹⁶⁵ Однако внимание уделялось лишь стадии адсорбции без регенерации геля, т.е. левой части цикла, представленной на рис. 1. Только с появлением «умных» гидрогелей стало возможным экономично осуществить весь цикл.

С помощью геля из сульфированного полистирола, сшитого дивинилбензолом (гель регенерировали концентрированным раствором соли), растворы казеина и бычьего сывороточного альбумина были сконцентрированы в 4,6–4,8 раза, выход белка при этом составил 95–99%.¹⁶²

Появление термореактивных гидрогелей (ТГ), коллапсирующих при нагревании, сделало подобный процесс еще привлекательнее. Термореактивный гидрогель НИПАА был использован для концентрирования целлюлаз из культуральной жидкости *Trichoderma reesei*.¹⁶²

Кусслер с сотр.¹⁶⁶ разработали промышленный процесс получения соевого белка путем дегидратации маточной жидкости с помощью поли-НИПАА-ТГ (рис. 2).

Соевые бобы после экстракции соевого масла размельчают, и экстрагируют белки водой при pH 8.5. Маточную жидкость отделяют центрифугированием. По традиционной технологии белки осаждают кислотой. При этом наиболее ценные из них — альбуминоподобные — не осаждаются и теряются, а осаждаются токсичные фитины. Белковый осадок растворяют при pH ~7 и сушат на распылительной сушке. Из 100 кг исходного сырья получают 33 кг продукта.

Согласно предложенной технологии маточную жидкость при 5°C обрабатывают сколлапсированным поли-НИПАА-ТГ, при этом гель набухает, адсорбируя 40% воды. Набухший гель отделяют центрифугированием, а ретентат разводят водой и вновь обрабатывают сколлапсированным гелем (эту процедуру повторяют 2–4 раза), что позволяет отделить белок от низкомолекулярных примесей. После этого ретентат, содержащий 15% сухих веществ, передают на распылительную сушку. Из 100 кг исходного сырья получают 45 кг продукта. Выход по белку превышает 80%.¹⁶⁶

Новый процесс не лишен недостатков, один из них — адсорбция белка на поверхности частиц геля. Однако он имеет существенные достоинства: больший выход продукта за счет сохранения альбуминоподобных белков, отсутствие стадии осаждения при подкислении, что позволяет сохранить больше белков в нативной форме, лучшие потребительские качества продукта за счет отсутствия токсичных фитинов и более высокого содержания белка. Экономический анализ, проведенный на промышленной установке, показал, что капитальные затраты на производство белка окупаются за 3,2 года.¹⁶⁰

Термореактивный гидрогель на основе ПВМЭ применяется для обезвоживания суспензий, в частности, культуральных жидкостей микроорганизмов.^{167, 168} Подобный процесс позволяет преодолеть ряд недостатков традиционной фильтрации. Так, площадь фильтрации может быть легко увеличена за счет увеличения количества частиц ТГ; образующийся на поверхности частиц «пирог» из микроорганизмов постоянно разрушается за счет увеличения геометрических размеров частиц ТГ при набухании; сильно сокращается путь воды из объема суспензии на фильтрующую поверхность.

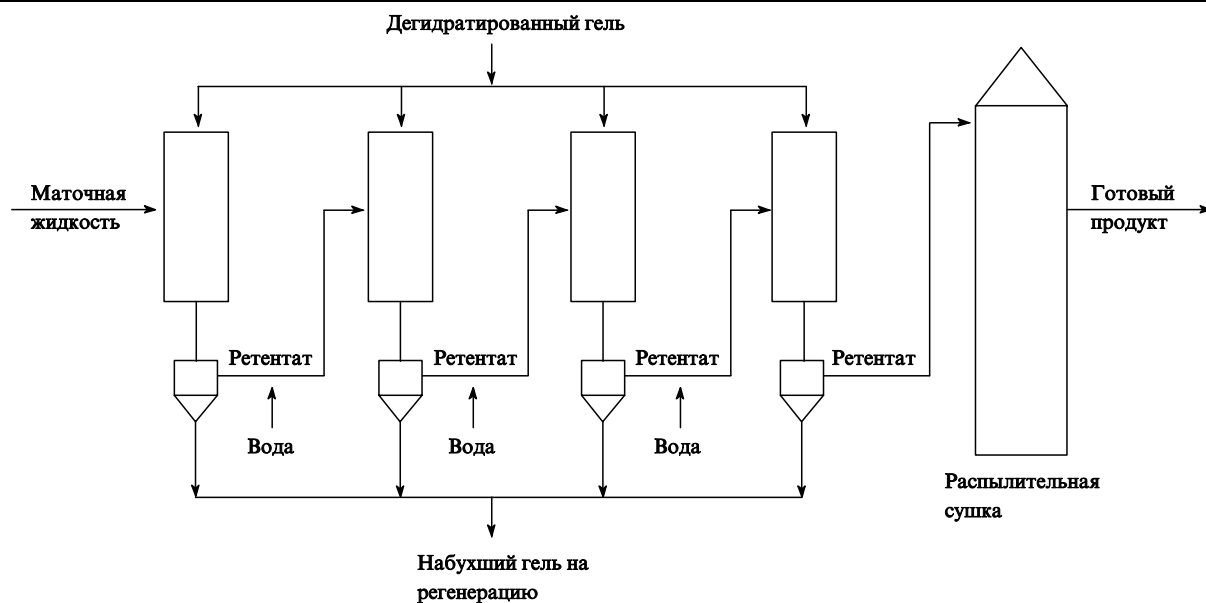


Рис. 2. Промышленный процесс получения соевого белка¹⁶⁰

Инженерные расчеты показывают, что необходимо иметь 7–8 кг сухого ПВМЭ-ТГ для получения 1 кг сухих веществ. Чтобы конкурировать с наиболее производительными ленточными фильтрами, частицы ТГ должны выдерживать по крайней мере 2000 циклов, поэтому повышение механической прочности частиц ПВМЭ-ТГ является первоочередным условием успешного внедрения ТГ в практику.¹⁶⁸

2. Мембраны с регулируемой проницаемостью

Способность «умных» полимеров резко переходить из развернутой глобулы в компактный клубок использована для создания мембран с контролируемой проницаемостью. Принцип действия такой мембраны иллюстрирует рис. 3. В развернутой конформации полимерные молекулы, иммобилизованные на поверхности, не препятствуют проникновению растворенных веществ внутрь пор. В компактной конформации полимерные молекулы блокируют или сильно затрудняют доступ растворенных веществ внутрь пор.

Контролируемая изменением pH проницаемость достигнута при иммобилизации поли-4-винилпиридина или поли(мет)акриловой кислоты на поверхности мембран наилоновых капсул. В первом случае проницаемость повышается с понижением pH, а во втором — с его повышением.¹⁶⁹ При изменении pH от 6 до 3 проницаемость полиметакрилатной мембраны для флуоресцентно-меченого декстрана (M 10 000) изменяется в 85 раз.¹⁷⁰

Температурная регуляция проницаемости достигнута при иммобилизации на поверхности пор поли-НИПАА или других поли-*N*-алкилакриламидов.^{44, 54, 55, 171} Изменение эффективного размера пор за счет перехода иммобилизованных молекул НИПАА из развернутой конформации в компактную позволяет контролировать гель-проникающую хроматографию за счет изменения температуры элюирования.⁵³

Если мембрана целиком состоит из полимерного гидрогеля, то ее проницаемость сильно меняется при изменении степени набухания геля. Проницаемость инсулина через мембрану из сополимера 4-акрилоилпиперидина (НКТР равна 5.5°C), 2-оксиэтилметакрилата и стирола резко меняется с температурой. В зависимости от состава сополимера проницаемость либо повышается, либо понижается с ростом температуры.¹⁷² Изменение pH или электрического поля обратимо меняет проницаемость полиметилметакрилатной мембраны в 50 раз.¹⁷³ Комплексообразование между полиоксиэтиленом и полиметилметакрилатной мембраной можно использовать как для повышения проницаемости мембраны, имеющей фиксированные геометрические размеры (изометрический режим), так и для уменьшения проницаемости свободно закрепленной мембраны (изотонический режим) (рис. 4). В обоих случаях промывание мем-

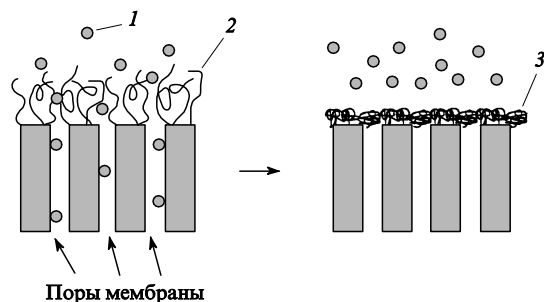


Рис. 3. Регулируемая проницаемость мембраны при изменении конформации полимера.

1 — Растворенное вещество; 2 — полимер в развернутой конформации; 3 — полимер в компактной конформации

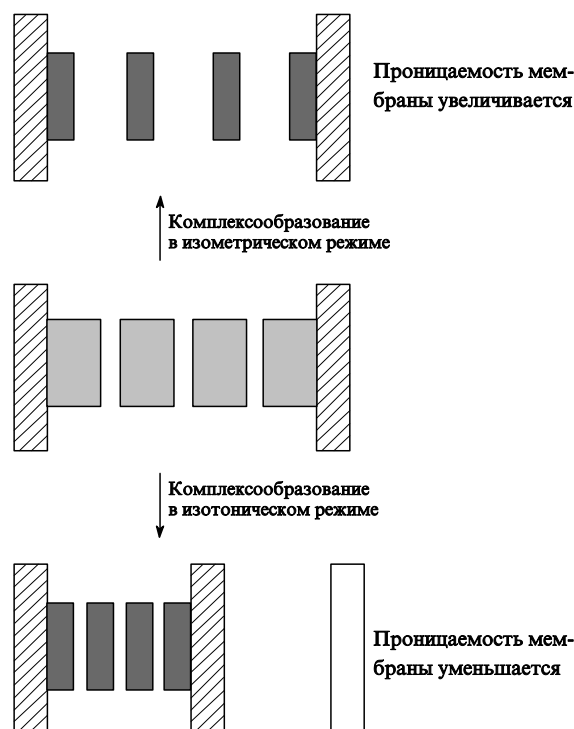


Рис. 4. Поведение полиметилметакрилатной мембраны при комплексообразовании с полиоксиэтиленом в изометрическом и изотоническом режимах³⁹

браны слабощелочным раствором приводит к диссоциации комплекса и восстановлению исходной проницаемости.^{39, 156}

Гидрогель сополимера акриламида и акриловой кислоты, иммобилизованный на пористом стекле, находится в изометрических условиях. Такая мембрана пропускает водные растворы полиоксиэтилена только с $M < 4000$. Коллапс гидрогеля в 50%-ном ацетоне приводит к резкому увеличению проницаемости мембраны: она уже способна пропускать полиоксиэтилен с $M = 80\,000$ (см.^{111, 174, 175}).

Таким образом, мембраны на основе «умных» полимеров могут использоваться для создания различных систем с обратной связью.

3. Выделение и очистка биомолекул

Способность «умных» полимеров в водном растворе образовывать отдельную фазу при незначительном изменении условий использована для выделения и очистки белков. Общая схема этого процесса, получившего название «аффинное осаждение» (affinity precipitation), проиллюстрирована на рис. 5.

К исходной смеси, содержащей целевой белок, добавляют конъюгат «умного» полимера с лигандом, обладающим сродством к данному белку, который образует комплекс с целевым белком. При изменении условий (изменение pH, температуры, ионной силы, добавление специфических комплексообразователей) полимерный конъюгат вместе с целевым белком выделяется в виде отдельной полимерной фазы, а примеси остаются в растворе. Полимерную фазу отделяют от супернатанта. Далее целевой белок либо элюируют из полимерной фазы, либо полимерную фазу вновь растворяют, меняя условия так, чтобы вызвать диссоциацию комплекса, и вновь осаждают полимерный конъюгат, но уже без целевого белка, который остается в растворе.

Впервые подобный подход был использован в работе Шнейдера и др.³¹ для выделения трипсина. Экстракт подже-

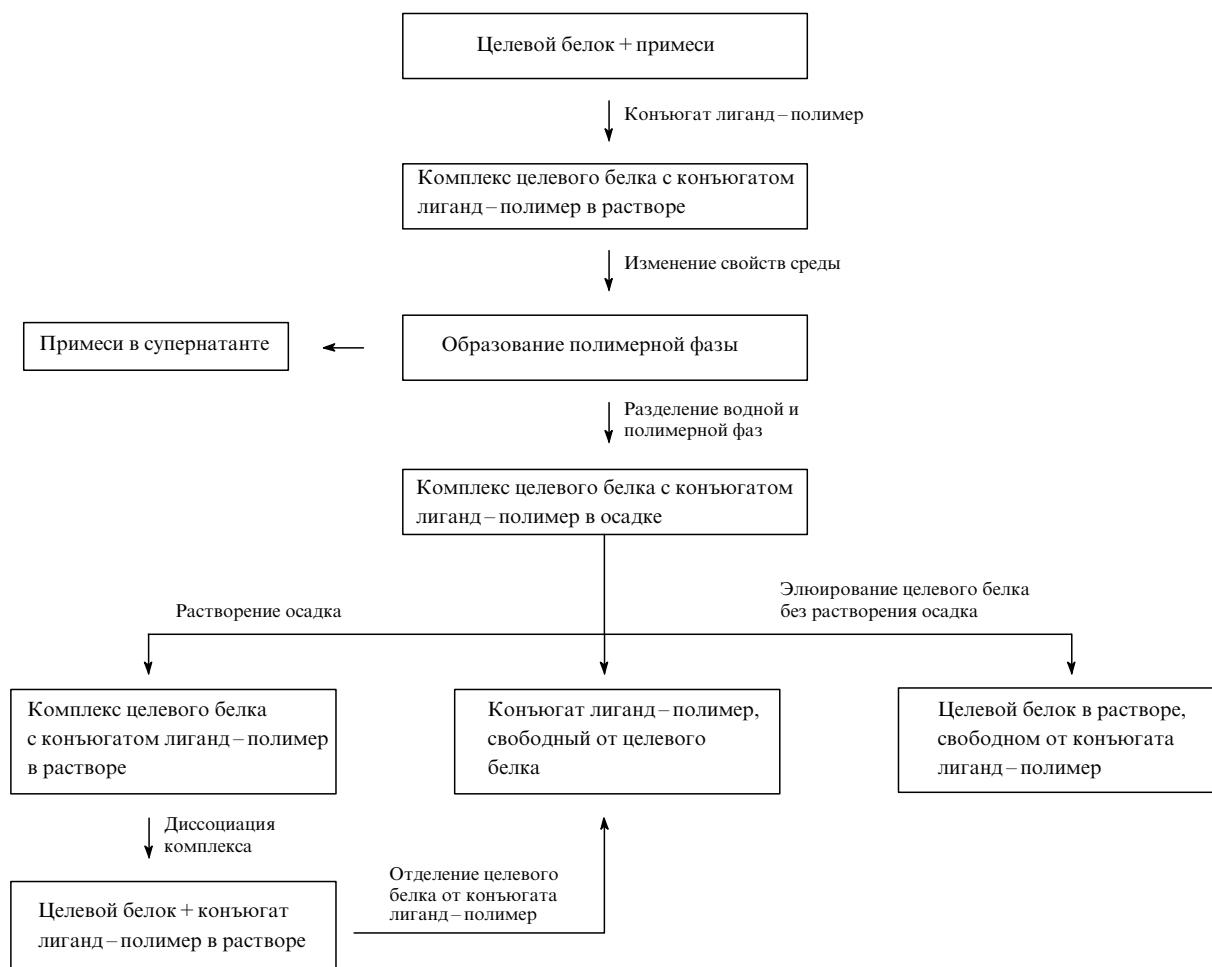


Рис. 5. Общая схема методов аффинного осаждения

лудочной железы обрабатывали сополимером акриламида и *N*-акрилоил-*n*-аминобензойной кислоты, содержащим *m*-аминобензамидиновые лиганды, обладающие высоким сродством к трипсину. Подкислением раствора до pH 4 осаждали комплекс трипсин–сополимер. Осадок отделяли, промывали и вновь растворяли при pH 8. Затем полимер осаждали уже при pH 2 (известно, что в кислой среде комплекс трипсин–полимер не образуется), трипсин при этом оставался в растворе. После лиофильной сушки раствор содержал 90% трипсина. Сополимер регенерировали (на 93%) и использовали повторно.³¹

Помимо осаждения для очистки биомолекул может быть использовано обратимое флокулирование. Для этой цели применяют частицы латекса сополимера стирола, НИПАА и глицидилметакрилата и метакриловой кислоты. Так, антитела к бычьему сывороточному альбумину были выделены из сыворотки с помощью латекса с иммобилизованным на его поверхности бычьим сывороточным альбумином.¹⁴²

В табл. 3 собраны примеры успешного использования методов аффинного осаждения для выделения и очистки различных биомолекул. Большой вклад в развитие этих методов внес Маттиассон с сотр.^{176, 179, 185–190}

Традиционно используемые методы очистки белков осаждением сульфатом аммония, полиоксэтиленом или органическими растворителями отличаются простотой и высокой производительностью. Недостаток этих методов — в их низкой специфичности. Аффинное осаждение позволяет сочетать простоту и высокую производительность процессов

осаждения белков с высокой специфичностью методов аффинной хроматографии. В принципе для аффинного осаждения могут быть использованы те же лиганды, что и для аффинной хроматографии. Разница в том, что аффинное осаждение проводится в батч-режиме, что исключает возможность многократного взаимодействия белка с лигандом, как в хроматографии. Поэтому для аффинного осаждения предпочтительны лиганды с высоким сродством к выделяемому белку, что несколько ограничивает выбор используемых систем.¹⁸⁹ Для аффинного осаждения применяются как синтетические, так и природные полимеры.

Интересным случаем является сродство целевого белка к полимеру (например, *эндо*-полигалактуроназы к альгинату,¹⁸⁷ агглютинина к хитозану,¹⁷⁶ D-лактатдегидрогеназы из *Lactobacillus bulgaricus*¹⁸⁶ или ксиланазы¹⁸⁵ к сополимеру метакриловой кислоты и метилметакрилата), что позволяет избежать сложной процедуры получения полимера, содержащего специфический лиганд.

Следует отметить, что выбор полимера имеет очень большое значение для успешной реализации аффинного осаждения. Образующаяся полимерная фаза не должна быть слишком гидрофобной, чтобы не создавать нежелательное окружение выделяемым белковым молекулам.¹⁹⁰ В то же время слишком гидрофильная полимерная фаза с трудом отделяется от супернатанта, что приводит к значительному неспецифическому захвату посторонних белков, т.е. к снижению степени очистки и выхода целевого белка.¹⁷⁹ Наиболее успешные результаты достигнуты при использова-

Таблица 3. Условия, необходимые для образования полимерной фазы

Целевой продукт	Лиганд	Полимер	Метод образования полимерной фазы	Ссылки
Агглютинин зародыша пшеницы	См. ^a	Хитозан	Изменение pH	176
Трипсин	Ингибитор трипсина из соевых бобов	»	То же	177
	<i>n</i> -Аминобензамидин	Сополимер НИПАА и <i>N</i> -акрилоилуксисукцин-имида	Изменение температуры	178
	Ингибитор трипсина из соевых бобов	Альгинат	Добавление Ca ²⁺	179
	То же	ПВК	Изменение температуры	180
Протеин А	IgG	Ацетат-сукцинат оксипропилметилцеллюлозы	Изменение pH	181
IgG человека	Протеин А	Галактоманнан	Добавление тетрабората	182
Щелочная протеаза	<i>n</i> -Аминобензамидин	НИПАА	Изменение температуры	183
β-Глюкозидаза	См. ^a	Хитозан	Изменение pH	184
Рестрикционная эндонуклеаза <i>Hind III</i>	ДНК λ-фага	НИПАА	Изменение температуры	183
Ксиланаза <i>Trichoderma viridis</i>	Ca. ^a	Eudragit S 100	Изменение pH	185
D-лактатдегидрогеназа из <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	См. ^a	»	То же	186
Эндополигалактуро-наза из <i>Aspergillus niger</i>	См. ^a	»	»	187
D-лактатдегидрогеназа из <i>Leuconostock mesenteroides ssp. cremoris</i>	Сибакрон голубой	»	»	188
Лактатдегидрогеназа, пируваткиназа из мышц свиньи	»	»	Изменение температуры	133
Алкогольдегидрогеназа из пекарских дрожжей	»	»	То же	134

^a Целевой белок обладает сродством к самому полимеру.

нии сополимера метакриловой кислоты и метилметакрилата (Eudragit S 100, табл. 3). Оптимальный выбор условий позволяет достичь 10-кратной степени очистки белка при выходах 70–80%.^{133, 134}

Водные растворы полиоксиэтилена и декстрана образуют две несмешиваемые полимерные фазы — гидрофильную и гидрофобную — содержащие более 80–95% воды. Гидрофильная фаза образована декстраном, а гидрофобная — полиоксиэтиленом. Различное распределение веществ между этими двумя фазами широко используется для выделения и очистки ряда биомолекул.¹⁹¹ Одной из проблем такого подхода является необходимость отделения целевого продукта от фазообразующего полимера после механического разделения фаз. Удобный путь решения этой проблемы предложен в работах Тьернелда и сотр.^{131, 132, 192, 193}

Принцип предложенного метода проиллюстрирован на рис. 6. В качестве гидрофильной фазы использован раствор декстрана или оксиэтилкрахмала, а в качестве гидрофобной — сополимеры окиси этилена и окиси пропилена, водные растворы которых при нагревании расслаиваются на водную

и полимерную фазы. При добавлении в двухфазную полимерную систему осветленного гомогената пекарских дрожжей ферменты, обладающие сродством к гидрофобной фазе (глюко-6-фосфатдегидрогеназа, 3-фосфоглицераткиназа и гексокиназа), экстрагируются в эту фазу. Экстракция целевого продукта в гидрофобную фазу облегчается за счет добавления в систему конъюгата гидрофобного мономера с лигандом, обладающим сродством к целевому белку (для глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы таким лигандом служит краситель Прочион желтый).¹⁹³ После механического разделения фаз в центрифуге гидрофобную фазу нагревают до 24°C. При этом сополимер попадает в отдельную концентрированную полимерную фазу, а очищенные ферменты остаются в водной фазе. Степень очистки и выход составили для глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы 5.3 и 50%, для гексокиназы — 15.3 и 67%, а для 3-фосфоглицераткиназы — 15.4 и 72% соответственно.¹³² Полученные результаты вполне сравнимы с результатами хроматографической очистки белков традиционными методами.

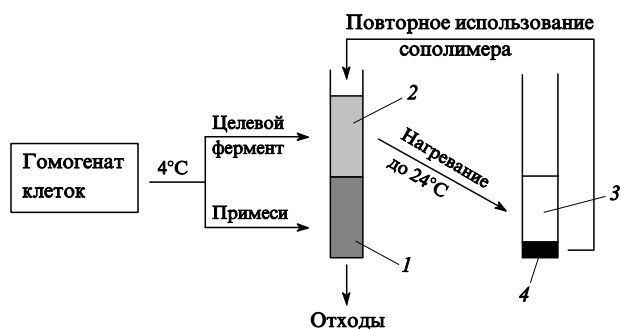


Рис. 6. Очистка ферментов в двухфазной системе с отделением от фазообразующего полимера при температуре выше НКТР.¹³²

1 — Гидрофильная фаза — декстран или оксипропилкрахмал; 2 — гидрофобная фаза — сополимер при температуре ниже НКТР; 3 — водная фаза, содержащая очищенный фермент; 4 — концентрированная полимерная фаза — сополимер при температуре выше НКТР

Другой путь отделения целевого белка от фазообразующего полимера заключается в сочетании экстракции в полимерной двухфазной системе с аффинным осаждением.^{194, 195} В полимерную двухфазную систему полиоксиэтилен–оксипропилкрахмал добавляют конъюгат сополимера Eudragit S 100 с аффинным лигандом, иммуноглобулин (IgG) человека (при очистке рекомбинантного протеина А)¹⁹⁴ или Сибакрон голубой (при очистке лактатдегидрогеназы).¹⁹⁵ Комплекс целевого белка с конъюгатом благодаря гидрофобности полимера экстрагируется в гидрофобную фазу, которую затем отделяют центрифугированием, осаждают комплекс целевого белка с конъюгатом подкислением. В результате рекомбинантный белок А очищается в 26 раз (выход — 80%),¹⁹⁴ а лактатдегидрогеназа — в 12 раз (выход — 50%).¹⁹⁵

Интересный пример использования «умного» полимера на основе ПВК продемонстрирован в работе Галаева и др.¹⁹⁶ Поливинилкапролактан образует прочные комплексы с красителями, в том числе с Сибакроном голубым, и хорошо сорбируется на хроматографическом носителе, содержащем подобные лиганды (например, Сефароза голубая). При температурах выше НКТР полимер находится в компактной конформации, каждая молекула полимера может взаимодействовать лишь с немногими молекулами лиганда, оставляя остальные доступными для взаимодействия с молекулами фермента. При понижении температуры ПВК переходит в развернутую, более гибкую конформацию. Сегменты полимерных молекул приобретают возможность взаимодействовать с большим числом молекул красителя и начинают конкурировать с сорбированным ферментом за лиганд, в конце концов вытесняя его.

Подобная система — первый пример успешной очистки фермента элюированием лишь за счет изменения температуры без какого-либо изменения состава буфера. Колонку с Сефарозой голубой обрабатывали раствором ПВК при комнатной температуре и промывали до отсутствия следов полимера в элюате. При 45°C на эту колонку наносили неочищенный экстракт мышц свиньи и промывали буфером до полного отсутствия белка в элюате, затем охлаждали колонку до комнатной температуры и тем же самым буфером элюировали гомогенную лактатдегидрогеназу. Достигнута 17-кратная очистка с выходом 90%.¹⁹⁶

Описанные примеры демонстрируют широкие возможности использования «умных» полимеров для повышения эффективности традиционных методов очистки белков и создания новых.

4. Иммобилизация биокатализаторов

Способность полимеров в водном растворе образовывать отдельную фазу при незначительном изменении внешних условий может быть использована для создания обратимо растворимых биокатализаторов, если молекула фермента ковалентно связана с полимером. Обратимо растворимый биокатализатор приобретает достоинства иммобилизованных ферментов (простота отделения от реакционной смеси и возможность многократного использования), но при этом позволяет преодолеть такие недостатки иммобилизованных в твердых матрицах ферментов, как диффузионные затруднения транспорта субстратов и продуктов (особенно высокомолекулярных), невозможность использования в реакциях с нерастворимыми субстратами или продуктами.

Обратимо растворимые при изменении pH катализаторы получены при ковалентном связывании лизоцима с альгинатом,¹⁹⁷ трипсина с сополимером акролеина и акриловой кислоты,²⁹ целлюлазы,¹⁹⁸ амилазы,²⁶ α-химотрипсина и папаина¹¹⁹ с сополимерами метакриловой кислоты и метилметакрилата, карбоксиметилцеллюлозой, фталатом оксипропилметилцеллюлозы, ацетат-фталатом целлюлозы. Обратимо растворимый кофактор получен при ковалентном связывании НАД с альгинатом с помощью диэпоксидоктана.¹⁹⁹

В работах Марголина и др.^{149, 151} детально исследовано поведение α-химотрипсина, пенициллинамидазы, алкогольдегидрогеназы и уреазы, ковалентно связанных с полианионом или поликатионом в составе нестехиометрического полимерного комплекса полиметакриловой кислоты и модифицированного поли-N-этил-4-винилпиридинийбромидом. Ферменты в составе поликомплексов легко осаждаются из раствора при подкислении от pH 6.1 до pH 5.7 и отделяются центрифугированием. Полимерный осадок вновь растворяется в буферном растворе с pH 6.1, при этом иммобилизованный фермент может быть использован многократно. В осадке ковалентно связанный с полианионом α-химотрипсин полностью доступен для высокомолекулярного ингибитора, в отличие от химотрипсина, связанного с поликатионом, который доступен лишь на 20%. Связанный с поликатионом фермент находится внутри гидрофобного ядра комплекса; он хорошо защищен благодаря такому окружению, что повышает его термостабильность.¹⁴⁹

Обратимо растворимые при изменении температуры ферменты получены при ковалентном связывании α-химотрипсина и пенициллинамидазы с ПВК,²⁰⁰ трипсина,⁷⁴ щелочной фосфатазы¹⁷⁸ и термолизина²⁰¹ с поли-НИПАА; липазы и зародышей пшеницы с графт-сополимером НИПАА с сополимером акриламида и акриловой кислоты.²⁰² Для получения обратимо растворимых (точнее, обратимо диспергируемых) биокатализаторов так же как и при аффинном осаждении, использована обратимая флокуляция латексов. Так были получены препараты трипсина²⁰³ и папаина.¹⁴¹

Обратимо растворимые при изменении концентрации Ca^{2+} ферменты образуются при ковалентном связывании фосфоглицеромутазы, енолазы, пероксидазы и пируваткиназы с α_{s1}-казеином. Конъюгат фермент–казеин растворим при концентрации Ca^{2+} ниже 20 ммоль·л⁻¹, но полностью выпадает в осадок при концентрации Ca^{2+} выше 50 ммоль·л⁻¹. После добавления ЭДТА, связывающей Ca^{2+} , осадок вновь растворяется.²⁰⁴

Практический интерес представляет использование обратимо растворимых биокатализаторов в реакциях, которые трудно или невозможно провести с помощью ферментов, иммобилизованных на нерастворимых матрицах, например, для гидролиза высокомолекулярных субстратов казеина,^{141, 201} декстрина и крахмала,²⁶ для гидролиза нерастворимых субстратов целлюлозы¹⁹⁸ и неочищенного крахмала (кукурузной муки),^{26, 205–208} для получения нерастворимых бензилового эфира бензилоксикарбонил-L-тирозил-N^ω-нитро-L-аргинина¹¹⁹ и фенилглицина.²⁰⁹

При гидролитическом расщеплении кукурузной муки до глюкозы под действием амилазы продукт реакции — глюкоза — ингибирует гидролиз. Использование обратимо растворимого конъюгата амилазы повышает эффективность гидролиза. Гидролиз проводили при pH 5, когда конъюгат амилазы растворим. Каждые 24 ч величину pH понижали до 3.5, отделяли центрифугированием непрогидролизированный твердый остаток и выпавший в осадок конъюгат, который вновь растворяли в свежей порции субстрата с pH 5, и продолжали гидролиз. При 5-кратном повторении цикла из 150 г (30×5) неочищенного крахмала получен 101 г глюкозы. Активность амилазы после 5-го цикла составила 96% от исходной.²⁰⁵

Циклическое осахаривание неочищенного крахмала было использовано для ферментации этанола.^{205, 207, 208} Ферментацию дрожжами в присутствии биокатализатора проводили при pH 5 в реакторе с коническим дном. Ферментационную жидкость периодически подкисляли до pH 4, при этом клетки дрожжей флоккулировали и биокатализатор выпадал в осадок. Осадок с непрогидролизированным субстратом отделяли отстаиванием в течение 10 мин, после чего к нему добавляли свежую порцию субстрата. Из супернатанта (80% исходного объема) получали этанол. После пяти циклов из 150 г неочищенного крахмала получен 61 г этанола; производительность составила $0.85 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ (см.^{205, 207}).

Обратимо растворимая амилаза была использована и для превращения (в режиме непрерывной ферментации) неочищенного крахмала в этанол²⁰⁸ или в молочную кислоту.²⁰⁶ При получении этанола ферментация, отделение клеток и биокатализатора и их повторное суспендирование проводилось в трех отдельных реакторах. Непрерывный режим ферментации позволил повысить производительность до $2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ (см.²⁰⁸). При получении молочной кислоты использован биореактор с иммобилизованным в геле к-каррагенана клетками *Lactobacillus casei*. Отделение конъюгата амилазы и его повторное суспендирование проводилось в двух других реакторах. Достигнута производительность $3.1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$, что в 3 раза выше, чем для циклических батч-ферментаций.²⁰⁶

Образование полимерами нерастворимой в воде полимерной фазы представляет собой удобный метод иммобилизации ферментов и клеток. Этот процесс осуществляют следующим образом: при температуре ниже НКТР в концентрированном водном растворе полимера растворяют фермент или суспендируют клетки, затем исходный раствор по каплям добавляют в водный раствор, находящийся при температуре выше НКТР. Образующаяся в капле нерастворимая полимерная фаза «захватывает» фермент или клетки. При добавлении в исходный раствор стабилизаторов (овальбумин, яичный порошок, α -карбоксиметилцеллюлоза, таннин) полимерные частицы приобретают достаточную стабильность и не слипаются при перемешивании. Этим путем в геле ПВК были иммобилизованы трипсин и карбоксипептидаза В (предварительно стабилизированные ковалентным связыванием с сополимером винилпирролидона и акролеина),²¹⁰ клетки грибов и бактерий,²¹¹ гибридные клетки.²¹²

Сополимер НИПАА с винилферроценом (13 : 1) одновременно был использован и как медиатор переноса заряда в ферментном электроде, а также для иммобилизации глюкозооксидазы на поверхности электрода.^{213–215} При температуре ниже 22°C пленка полимерного геля на поверхности электрода находится в набухшем состоянии. Поры в геле достаточно велики для проникновения внутрь молекул глюкозооксидазы, и гель можно «нагрузить» ферментом. При температуре выше 35°C гель коллапсирует, поры резко сужаются, фермент уже не может диффундировать из геля, но гель остается проницаем для низкомолекулярного субстрата глюкозы. В этих условиях с помощью электрода

измеряют концентрацию глюкозы. Достоинства подобного электрода в возможности быстро и удобно заменить инактивированный фермент свежим. Для этого достаточно при температуре ниже 22°C промыть электрод для удаления инактивированного фермента, нагрузить свежим ферментом и вызвать коллапс геля, нагрев его до температуры выше 35°C.²¹³

Термореактивные гидрогели впервые были использованы для иммобилизации биокатализаторов Хоффманом с сотр.^{216–218} Так, β -D-галактозидаза была иммобилизована в гранулах поли-НИПАА-ТГ (размер гранул — 200–400 мкм в набухшем состоянии; критическая температура — 37–40°C). Общая производительность биореактора с иммобилизованным ферментом при 35°C незначительно отличается от его производительности при 30°C (обе температуры ниже критической). Однако циклическое нагревание и охлаждение реактора между этими двумя температурами со скоростью 1°C в минуту увеличивает производительность реактора во много раз. Набухание при охлаждении и сжатие при нагревании гранул ТГ интенсифицирует массоперенос субстрата и продуктов внутри гранул, при этом ТГ работает как насос, приводимый в движение за счет изменения температуры и обеспечивающий лучшую доставку субстрата и удаление продуктов.²¹⁷ Аналогичное повышение производительности обнаружено и для иммобилизованных в поли-НИПАА-ТГ клеток *Arthrobacter simplex*, катализирующих превращение гидрокортизона в преднизолон.²¹⁸

Если циклическое нагревание–охлаждение между двумя температурами, лежащими ниже критической, увеличивает производительность биореактора, то нагревание до температур выше критической приводит к полной остановке ферментативной реакции. Активность β -D-галактозидазы, иммобилизованной в поли-НИПАА-ТГ падает практически до нуля при температуре 50°C несмотря на то, что это оптимальная температура для растворимого фермента.²¹⁹

α -D-1,4-глюкозидаза была иммобилизована в ПВМЭ-ТГ с критической температурой 38°C. Следует отметить, что проницаемость ТГ для субстрата уменьшается на пять порядков при нагревании от 32 до 42°C, при этом реакция практически полностью останавливается. При охлаждении ТГ до 32°C реакция возобновляется.²²⁰ Подобный эффект обнаружен и для α -химотрипсина, включенного в ПВМЭ-ТГ (см.²²¹).

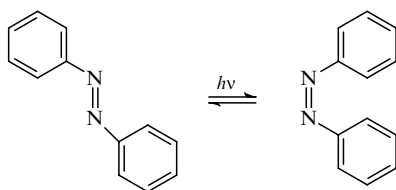
При коллапсе ТГ полимерные цепи сближаются друг с другом, гидрофобность среды внутри ТГ возрастает. Оба эти фактора ограничивают подвижность макромолекул, включенных в гель и, как следствие, увеличивают термостабильность иммобилизованного фермента при температурах выше критической.²²² Формально-кинетическое описание поведения α -химотрипсина, включенного в сшитый поли-НИПАА-ТГ, дано в работах^{223–225}. Температурная зависимость активности иммобилизованного α -химотрипсина перестает подчиняться закону Аррениуса при температурах, близких к температурам коллапса НИПАА-ТГ. Это выражается в появлении в координатах Аррениуса участка с кажущейся отрицательной энергией активации. Увеличение концентрации сшивающего агента приводит к сдвигу точки излома в координатах Аррениуса в область более высоких температур и к менее резкому падению активности фермента.²²⁴

Таким образом, биокатализаторы, полученные при иммобилизации ферментов и клеток с помощью «умных» полимеров, приобретают новые необычные свойства. Они могут сочетать достоинства гомогенных и гетерогенных катализаторов, служить удобными «химическими выключателями», чувствительными к небольшим изменениям внешних условий, отличаться более высокой производительностью за счет работы «термического насоса».

5. Сенсорные системы

Растворы и гидрогели «умных» полимеров чувствительны к небольшим изменениям свойств внешней среды, т.е. представляют собой уже готовые сенсоры этих свойств. Например, набор растворов полимеров с различными НКТР может служить как термометр. Ответ полимеров на изменение свойств среды обусловлен изменением баланса гидрофобных и гидрофильных взаимодействий. Ковалентное связывание с полимером молекул-акцепторов, способных изменять свою гидрофобность в присутствии детектируемого агента (определенное вещество или свет), приводит к возникновению двух состояний полимера — в отсутствие детектируемого вещества (характеризуется критической температурой T_1) и в его присутствии (характеризуется критической температурой T_2). Обычно $T_2 > T_1$. Если зафиксировать температуру $T_1 < T < T_2$, то переход из одного состояния полимера в другое можно осуществить изотермически с помощью детектируемого агента. Детектируемый агент вызывает видимое изменение раствора или гидрогеля, что и положено в основу создания сенсорных систем.²²⁶

По действием УФ-света происходит *транс*–*цис*-изомеризация азобензольного хромофора.



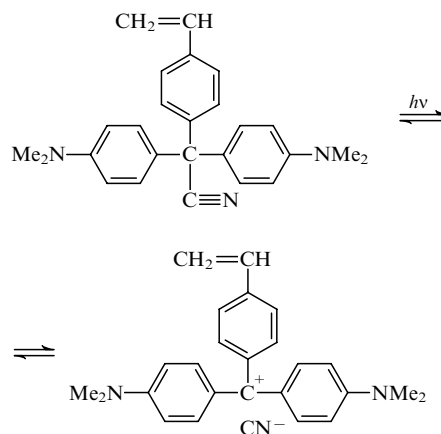
Этот переход сопровождается возрастанием дипольного момента с 0.5 (для *транс*-формы) до 3.1 Д (для *цис*-изомера), что свидетельствует об увеличении гидрофильности полимера. Включение гидрофобного сомономера *N*-(4-фенилазо-фенил)акриламида (2.7 мол.%) в сополимер с НИПАА снижает НКТР до 19.4°C, а УФ-облучение увеличивает ее до 26.0°C (благодаря переходу азобензольного хромофора в более гидрофильную *цис*-форму).²²⁶

Рассмотрим теперь систему диметилакриламид–4-фенилазофенилакрилат (7.5 мол.%).²²⁷ При температуре чуть выше НКТР в отсутствие УФ-облучения (видимый свет) раствор мутный из-за образования нерастворимой полимерной фазы. УФ-Облучение повышает НКТР (с 14 до 21°C), и сополимер, находясь при температуре ниже НКТР, постепенно растворяется (система становится прозрачной). При прекращении УФ-облучения НКТР снижается, сополимер опять образует нерастворимую полимерную фазу, и система вновь становится мутной. Из сказанного видно, что водные растворы таких сополимеров представляют собой сенсор, реагирующий на УФ-облучение.²²⁶

Следует отметить, что фазовый переход сополимеров становится чувствительным к УФ-облучению при строго определенном содержании сомономера-акцептора. Это еще раз подчеркивает, что для проявления критических явлений в полимерных растворах необходимо соблюдение очень тонкого баланса между гидрофобными и гидрофильными взаимодействиями.

Другим молекулярным акцептором квантов света является триарилметиланид (лейкопроизводное трифенилметана), обратимо диссоциирующий при УФ-облучении. Сополимер НИПАА, содержащий 1 мол.% лейконитрильных лигандов, имеет НКТР, равную 29.2°C. После УФ-облучения гидрофильность сополимера возрастает настолько, что он утрачивает способность к четко выраженному образованию полимерной фазы при повышении температуры.²²⁷ Однако при включении в состав поли-НИПАА-ТГ лейконитрильных лигандов критическая температура коллапса повышается с 30°C в отсутствие УФ-облучения до 32.6°C (УФ-

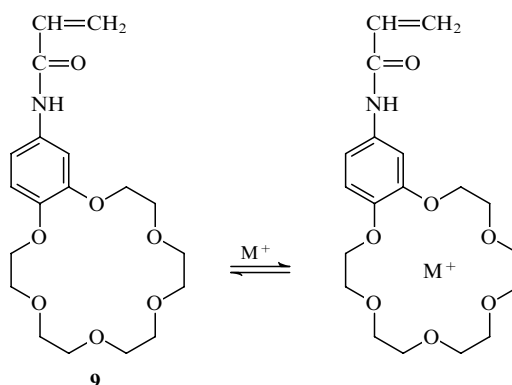
облучение). При 32°C УФ-облучение вызывает обратимый переход геля из сколлапсированного состояния в набухшее, при этом степень набухания геля меняется почти в 10 раз.²²⁸



Напротив, изменение гидрофильности азобензольного хромофора при УФ-облучении недостаточно, чтобы спровоцировать коллапс. Гель поли-НИПАА, содержащий 10.8 мол.% хромофора, не коллапсирует, а постепенно дегидратируется при повышении температуры. УФ-Облучение вызывает увеличение степени набухания лишь на ~25%,²²⁶ однако изменение полярности внутри гидрогеля и связанное с этим изменение проницаемости геля для субстратов позволяют регулировать активность ферментов, иммобилизованных в полиакриламидных гелях, содержащих светочувствительные лиганды.^{229–231}

Другой подход заключается в использовании тепла от поглощаемого света для нагревания ТГ, приводящего к коллапсу геля. Так, при освещении поли-НИПАА-ТГ, содержащего в качестве хромофора Си-хлорофиллин при мощности освещения, превышающей 85 мВт, при 31.5°C происходит коллапс геля.²³²

Изменение гидрофобности молекулы акцептора, необходимое для изотермического перехода полимера из одного состояния в другое, может быть вызвано не только УФ-облучением, но и введением различных добавок.^{226, 233} Так, сополимер НИПАА с краун-эфиром **9** (11.6 мол.%) имеет НКТР, равную 31.5°C. В присутствии Na^+ значение НКТР повышается до 33.0°C, а в присутствии K^+ — до 38.9°C. Таким образом, введение катионов Na^+ и K^+ приводит к растворению сополимера при 32°C, который в их отсутствие нерастворим, при 37°C такой эффект вызывает только добавка катионов K^+ . Аналогичный эффект наблюдается и для поли-НИПАА-ТГ, содержащего 12 мол.% краун-эфира. Сколлапсированный при 33.8°C термореактивный гидрогель набухает в 10 раз в присутствии 30 ммоль·л⁻¹ сульфата калия.



Термореактивный гидрогель может быть переведен из одного состояния в другое и под действием продуктов реакции, катализируемой ферментом, иммобилизован в ТГ. Например, ТГ сополимера НИПАА и акриловой кислоты с иммобилизованной уреазой коллапсирует при 32.4°C, при добавлении мочевины к коллапсированному гелю (33.4°C) в результате ферментативной реакции происходит образование аммиака, который повышает pH среды. В этих условиях НКТР сополимера возрастает и гель набухает, увеличиваясь в объеме в 7 раз за 15 мин.²³⁴ В буфере, не содержащем мочевины, ТГ вновь коллапсирует.

Эстераза из печени кролика гидролизует аполярный этилбутират до более полярных продуктов — этанола и масляной кислоты. Происходящее при этом изменение полярности среды достаточно, чтобы вызвать набухание коллапсированного поли-НИПАА-ТГ (см.²³⁵).

Иммобилизованный в поли-НИПАА-ТГ конканавалин А (лектин) способен связывать различные углеводы, в том числе отрицательно заряженный декстрансульфат и нейтральный α -метил-D-маннопиранозид. Декстрансульфат, связанный конканавалином А, увеличивает набухание коллапсированного геля в 5 раз за счет взаимного отталкивания отрицательных зарядов декстрансульфата. Вытеснение декстрансульфата нейтральным α -метил-D-маннопиранозидом вновь вызывает коллапс геля. Цикл набухание–сжатие можно повторять многократно с прекрасной воспроизводимостью.²³⁵

Приведенные выше примеры демонстрируют широкие возможности использования «умных» полимеров для создания исключительно простых, надежных и достаточно чувствительных сенсорных систем. Однако этим не исчерпываются все возможности. Фазовый переход в растворах таких полимеров использован Хоффманом и сотр.^{237–239} для создания нового метода преципитационного иммуноанализа (precipitation immunoassay, PRECIPRIA). Суть этого метода

поясняет рис. 7. *N*-Изопропилакриламид сополимеризовали с моноклональными антителами к к-цепи иммуноглобулина G (IgG) человека, модифицированными *N*-оксисукцинимидилакриламидом. Полимерный конъюгат инкубировали 1 ч при комнатной температуре с анализируемым раствором IgG, поли-НИПАА (для облегчения термоосаждения конъюгата) и моноклональными антителами к γ -цепи IgG человека, меченными флуоресцеином или фикоэритрином. Температуру повышали до 45°C, отделяли образовавшуюся полимерную фазу центрифугированием, растворяли в холодном буфере и измеряли флуоресценцию.

Данная система не уступает по чувствительности традиционным гетерогенным методам иммуноанализа, но позволяет преодолеть их существенный недостаток — необходимость многочасового инкубирования, вызванную диффузионными затруднениями взаимодействию антигена с антителом, иммобилизованным на нерастворимой матрице. Однако поскольку взаимодействие антиген–антитело при преципитационном иммуноанализе происходит в растворе, время инкубирования удастся сократить всего до 1 ч.^{237–239}

6. Контролируемое выделение лекарств

Эффективный лекарственный препарат — это не просто химическое вещество, а вещество, доставленное в определенное время в определенное место в организме. Создание систем направленного транспорта и контролируемого выделения лекарственных веществ — одна из горячих точек современной фармакохимии. Не последняя роль в этом отводится полимерам.^{68, 240, 241} Выше уже говорилось о промышленном использовании обратимо растворимых полимеров для получения защитной оболочки пероральных лекарств.

В основе использования гидрогелей для контролируемого выделения лекарств лежит их способность резко изме-

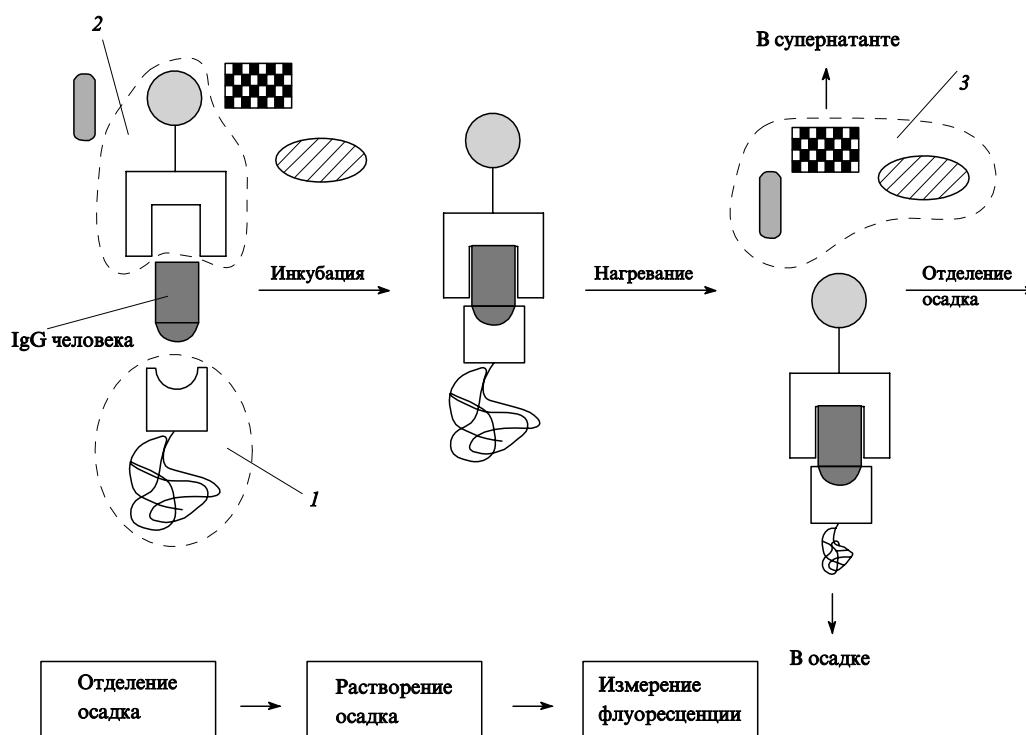


Рис. 7. Метод преципитационного иммуноанализа.²³⁷

1 — Конъюгат поли-НИПАА с моноклональными антителами к к-цепи IgG человека; 2 — моноклональные антитела к γ -цепи IgG человека с флуоресцентной меткой; 3 — посторонние белки

нять степень набухания, а следовательно, и проницаемость в ответ на изменения среды. Протекающие в организме патологические процессы, как правило, связаны с изменением pH, температуры, концентрации определенных веществ. Таким образом, становится возможным создание систем с обратной связью, когда патологический процесс инициирует выделение лекарственного вещества.

Гель в набухшем состоянии «нагружают» лекарством. В сколлапсированном состоянии гель не отдает лекарство, диффузия становится возможной лишь при набухании геля. Переход геля из сколлапсированного состояния в набухшее может быть вызван различными факторами. Так, изменение pH среды от 5 до 7 приводит практически к полной остановке выделения кофеина из геля на основе сополимера кетилметакрилата и 2-(*N,N*-диметиламино)этилметакрилата.³³ УФ-Облучение, наоборот, ускоряет диффузию *n*-аминобензоата из поли-2-оксиэтилметакрилатного геля, содержащего азобензольный хромофор.²⁴² Образование комплекса с переносом заряда между триэтиламином и сополимером 2-окси-этилметакрилата с метакрилоил-β-оксиэтил-3,5-динитробензоатом повышает набухание полимерной мембраны в воде и, как следствие, выделение из нее метилового оранжевого.²⁴³ Электрический потенциал в 3–6 В инициирует выделение эдрофонийхлорида из геля на основе сополимера бутилметакрилата и 2-акриламида-2-метилпропансульфоновой кислоты. В отсутствие электрического поля положительно заряженное лекарство не выделяется из-за взаимодействия с отрицательно заряженным полимером.²⁴⁴

Выделение глюкозы, инсулина или индометацина из ТГ на основе сополимеров НИПАА и алкилметакрилатов полностью прекращается при повышении температуры от 20 до 30°C и восстанавливается при последующем охлаждении до 20°C. Критическую роль в регулировании процесса диффузии играет тонкая пленка сколлапсированного полимера, образующаяся на поверхности гранул ТГ при повышении температуры выше критической.^{92, 244–250} Аналогичный эффект резкого замедления диффузии в результате образования на поверхности пленки из сколлапсированного геля обнаружен и для ТГ на основе взаимопроникающих полимерных сеток полиакриловой кислоты и сополимера акриламида с бутилметакрилатом.²⁵¹ Изменяя природу ТГ, например, используя взаимопроникающие полимерные сетки поли-НИПАА и полиметиленгликолевого эфира различного состава, можно регулировать кинетику выделения лекарства, меняя порядок от нулевого до первого.^{252, 253} При быстром коллапсе ТГ возможно образование заполненных раствором полостей, содержимое которых не обменивается с окружающей средой.⁹²

Для контролируемого температурой выделения веществ может быть использована обратимая сорбция на поверхности частиц латекса. До 65% флуоресцентно-меченого декстрана (М 70 000), сорбированного латексом поли-НИПАА, выделяется в раствор при нагревании. При понижении температуры весь десорбированный декстран вновь связывается латексом.¹³⁸

Наиболее интересен подход, разработанный Хоффманом и сотр.^{254, 255} Авторы использовали гидрогели, чувствительные как к изменению pH, так и температуры. При 37°C и pH 1.4 (условия внутри желудка) ТГ на основе сополимеров НИПАА с акриловой кислотой и полидиметилсилоксаном находятся в сколлапсированном состоянии. Индометацин или амилаза, включенные в гранулы ТГ, практически не диффундируют наружу. При 37°C и pH 7.4 (условия внутри кишечника) ТГ сильно набухает и включенные вещества быстро выделяются во внешнюю среду: за 5 ч выделяется более 90% индометацина. Таким образом, была создана система с направленным транспортом и пролонгированным выделением лекарственного вещества.

Создание искусственной поджелудочной железы, т.е. устройства, выделяющего инсулин в ответ на изменения

концентрации глюкозы, позволит решить серьезные проблемы лечения многочисленных больных сахарным диабетом, поэтому разработка таких систем вызывает неослабный интерес.²⁵⁶ Определенные успехи на этом пути были достигнуты при использовании «умных» полимеров. Обычно в качестве сенсора глюкозы применяют фермент глюкозооксидазу, окисляющий глюкозу до глюконовой кислоты. Эта реакция сопровождается понижением pH, которое и инициирует выделение инсулина. Технически это реализуется различным образом, например, применяют мембрану, состоящую из сополимера 2-оксиэтилакрилата, *N,N*-диэтиламинометакрилата и 4-триметилсилилстирола состава 60:20:20. В набухшем состоянии такая мембрана содержит 30% воды при pH 6.3 и 53% — при pH 6.15, проницаемость ее для инсулина в этом случае увеличивается в 42 раза. Капсулы из такого сополимера, содержащие глюкозооксидазу и инсулин, через 2–3 ч в присутствии 0.2 М глюкозы выделяли инсулин примерно в 5 раз быстрее. При удалении глюкозы скорость выделения инсулина снижалась до исходной.²⁵⁷

Набухание геля в присутствии глюкозы использовано в механическом устройстве, состоящем из двух отделений. В первом отделении находился чувствительный к глюкозе гель, а во втором — раствор инсулина. Раствор инсулина просто выдавливался набухшим гелем из устройства через клапан.³³

В качестве сенсора глюкозы вместо глюкозооксидазы можно использовать комплекс поливинилового спирта с сополимером винилпирролидона и *m*-акриламидофенилборной кислоты.¹⁵⁷ В этом случае гидроксильные группы глюкозы вытесняют гидроксильные группы поливинилового спирта, в результате чего полимерный комплекс распадается. При удалении глюкозы комплекс образуется вновь. Совсем недавно появилось сообщение о создании искусственной поджелудочной железы, работающей на подобном принципе.²⁵⁸

Интересный подход к использованию «умных» полимеров для контролируемого выделения лекарств предложен Тиррелом.²⁵⁹ Среди многочисленных полиэлектролитов полиэтилакриловая кислота обладает довольно уникальным свойством изменять конформацию в физиологическом интервале pH 7.4–6.5. Переход из развернутой конформации в компактную сопровождается усилением взаимодействия полимера с липидными мембранами.²⁶⁰ Полиэтилакриловая кислота, ковалентно иммобилизованная на поверхности везикул, образованных фосфатидилхолином, при переходе в компактную конформацию вызывает реорганизацию крупных везикул, переводя их в более компактные мицеллы. При этом содержимое везикул выделяется во внешнюю среду.

IV. Заключение

Автор надеется, что ему удалось показать широкие возможности использования «умных» полимеров в различных областях биотехнологии и медицины. Несомненно, приведенные примеры не исчерпывают всех возможностей. Эта область динамично развивается, судя по постоянно растущему числу публикаций. Совсем недавно, например, появилось сообщение²⁶¹ о том, что графт-сополимеризация НИПАА позволяет превращать гидрофильную (при температуре ниже НКТР) поверхность в гидрофобную (при температуре выше НКТР). Это может быть использовано для направленного транспорта микрочастиц с лекарством в организме или для выделения и очистки биомолекул (гидрофобная хроматография). Клетки микроорганизмов также по-разному взаимодействуют с гидрофильными и гидрофобными поверхностями.

Литература

1. K.R.C.Gisser, M.J.Geselbracht, A.Capellari, L.Hunsberger, A.B.Ellis, J.Perepezko, G.C.Lisensky. *J. Chem. Educ.*, **71**, 334 (1994)
2. I.Z.Steinberg, A.Oplatka, A.Katchalsky. *Nature*, **210**, 568 (1966)
3. W.Kuhn, B.Hargitay, A.Katchalsky, H.Eisenberg. *Nature*, **165**, 514 (1950)
4. K.Kajiwar, S.B.Ross-Murphy. *Nature*, **355**, 208 (1992)
5. T.Kurachi, T.Shiga, Y.Hirose, A.Okada. In *Polymer Gels. Fundamentals and Biomedical Applications*. (Eds D.DeRossi, K.Kajiwar, Y.Osada, A.Yamauchi). Plenum, New York, 1991. P.237
6. B.Erman, P.J.Flory. *Macromolecules*, **19**, 2342 (1986)
7. T.Tanaka. In *Polyelectrolyte Gels. Properties, Preparation, and Applications*. (Eds R.S.Harland, R.K.Prud'homme). American Chemical Society, Washington, DC, 1992. P.1
8. T.Tanaka, D.J.Fillmore, S.-T.Sun, I.Nishio, G.Swislow, A.Shah. *Phys. Rev. Lett.*, **45**, 1636 (1980)
9. F.Ilm, T.Tanaka, E.Kokufuta. *Nature*, **349**, 400 (1991)
10. S.Hirotsu, Y.Hirokawa, T.Tanaka. *J. Chem. Phys.*, **87**, 1392 (1987)
11. S.Katayama, A.Myoga, Y.Akahori. *J. Phys. Chem.*, **96**, 4698 (1992)
12. S.Katayama. *Polym. Commun.*, **32**, 558 (1991)
13. Y.Hirokawa, T.Tanaka, E.Sato. *Macromolecules*, **18**, 2782 (1985)
14. S.Katayama, A.Ohata. *Macromolecules*, **18**, 2781 (1985)
15. I.Ohmine, T.Tanaka. *J. Chem. Phys.*, **77**, 5725 (1982)
16. J.Ricka, T.Tanaka. *Macromolecules*, **17**, 2916 (1984)
17. C.B.Shah, S.M.Barnett. *J. Appl. Polym. Sci.*, **45**, 293 (1992)
18. C.B.Post, B.H.Zimm. *Biopolymers*, **21**, 2123 (1982)
19. C.B.Post, B.H.Zimm. *Biopolymers*, **21**, 2139 (1982)
20. T.Amiya, T.Tanaka. *Macromolecules*, **20**, 1162 (1987)
21. J.Eliassaf, A.Silberberg. *Polymer*, **3**, 555 (1962)
22. K.Pandya, K.Lad, P.Bahadur. *J. Macromol. Sci.- Pure Appl. Chem.*, **A, 30**, 1 (1993)
23. A.Louai, D.Sarazin, G.Pollet, J.Francois, F.Moreaux. *Polymer*, **32**, 713 (1991)
24. D.E.Bergbreiter, L.Zhang, V.M.Mariagnanam. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 9295 (1993)
25. R.Siegel, B.A.Firestone. *Macromolecules*, **21**, 3254 (1988)
26. M.Taniguchi, K.Hoshino, Y.Netsu, M.Fujii. *J. Chem. Eng. Jpn.*, **22**, 313 (1989)
27. *Eudragit. Röhm Pharma GMBH Information Materials*, 1993
28. M.Fujii, M.Taniguchi. *Trends Biotechnol.*, **9**, 191 (1991)
29. E.VanLeemputten, M.Horisberger. *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 587 (1976)
30. J.Heller. In *Pulsed and Self-Regulated Drug Delivery*. (Ed. J.Kost). CRC Press, Boca Raton, 1990. P.94
31. M.Schneider, C.Guillot, B.Lamy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **369**, 257 (1981)
32. H.Bronsted, J.Kopecek. In *Polyelectrolyte Gels. Properties, Preparation, and Applications*. (Eds R.S.Harland, R.K.Prud'homme). American Chemical Society, Washington DC, 1992. P.285
33. R.A.Siegel. In *Pulsed and Self-Regulated Drug Delivery*. (Ed. J.Kost). CRC Press, Boca Raton, 1990. P.130
34. A.Dupommier, L.Merle-Aubry, Y.Merle, E.S'igny. *Makromol. Chem.*, **187**, 211 (1986)
35. T.Tanaka, I.Nishio, S.-T.Sun, S.Ueno-Nishio. *Science*, **218**, 467 (1982)
36. R.Kishi, Y.Osada. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **85**, 655 (1989)
37. H.Shinohara, M.Yaoita, Y.Ikariyama, M.Aizawa. In *Polymer Gels. Fundamentals and Biomedical Applications*. (Eds D.DeRossi, K.Kajiwar, Y.Osada, A.Yamauchi). Plenum, New York, 1991. P.147
38. P.-Y.Yeh, P.Kopeckova, J.Kopecek. *J. Polym. Sci., A, Polym. Chem.*, **32**, 1627 (1994)
39. Y.Osada. In *Polymer Physics*. Springer-Verlag, Berlin, 1987. P.3
40. M.Suzuki. *Bioarheology*, **23**, 274 (1986)
41. S.Umemoto, N.Okui, T.Sakai. In *Polymer Gels. Fundamentals and Biomedical Applications*. (Eds D.DeRossi, K.Kajiwar, Y.Osada, A.Yamauchi). Plenum, New York, 1991. P.257
42. L.D.Taylor, L.D.Ceranowski. *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **13**, 2551 (1975)
43. I.Yu.Galaev, B.Mattiasson. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **15**, 354 (1993)
44. Y.Okahata, H.Noguchi, T.Seki. *Macromolecules*, **19**, 493 (1986)
45. H.G.Schild, D.A.Tirrell. *J. Phys. Chem.*, **94**, 4352 (1990)
46. S.Fujishige, K.Kubota, I.Ando. *J. Phys. Chem.*, **93**, 3311 (1989)
47. K.Kubota, S.Fujishige, I.Ando. *Polym. J.*, **22**, 15 (1990)
48. S.Fujishige. *Polym. J.*, **19**, 297 (1987)
49. M.Eggert, R.Freitag. *J. Polym. Sci. A, Polym. Chem.*, **32**, 803 (1994)
50. R.Freitag, T.Baltes, M.Eggert, K.Schiigerl, U.Bahr. *Bioseparation*, **4**, 353 (1994)
51. R.Freitag, T.Baltes, M.Eggert. *J. Polym. Sci. A, Polym. Chem.*, **32**, 3019 (1994)
52. H.J.Yang, C.-A.Cole, N.Monji, A.S.Hoffman. *J. Polym. Sci. A, Polym. Chem.*, **28**, 219 (1990)
53. M.Gewehr, K.Nakamura, N.Ise. *Makromol. Chem.*, **193**, 249 (1992)
54. T.Nonaka, T.Ogata, S.Kurihara. *J. Appl. Polym. Sci.*, **52**, 951 (1994)
55. H.Kubota, N.Nagaoka, R.Kataki, M.Yoshida, H.Omichi, Y.Hata. *J. Appl. Polym. Sci.*, **51**, 925 (1994)
56. H.Yoshioka, M.Mikami, Y.Mori. *J. Macromol. Sci.-Pure Appl. Chem.*, **A, 31**, 109 (1994)
57. H.Yoshioka, M.Mikami, Y.Mori. *J. Macromol. Sci.-Pure Appl. Chem.*, **A, 31**, 121 (1994)
58. H.Yoshioka, M.Mikami, Y.Mori. *J. Macromol. Sci.-Pure Appl. Chem.*, **A, 31**, 113 (1994)
59. K.C.Tam, X.Y.Wu, R.H.Pelton. *J. Polym. Sci. A, Polym. Chem.*, **31**, 963 (1993)
60. M.Heskins, J.E.Guillet. *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A, 2**, 1441 (1968)
61. E.I.Tiktopulo, V.E.Bychkova, J.Ricka, O.B.Ptysin. *Macromolecules*, **27**, 2879 (1994)
62. K.Kubota, S.Fujishige, I.Ando. *J. Phys. Chem.*, **94**, 5154 (1990)
63. F.M.Winnik, A.D.Davidson, G.H.Hamer, H.Kitano. *Macromolecules*, **25**, 1876 (1992)
64. T.Binkert, J.Oberreich, M.Meews, R.Nyffenegger, J.Ricka. *Macromolecules*, **24**, 5806 (1991)
65. F.M.Winnik. *Polymer*, **31**, 2125 (1990)
66. H.Ringsdorf, J.Simon, F.M.Winnik. *Macromolecules*, **25**, 7306 (1992)
67. I.C.Kwon, Y.H.Bae, T.Okano, B.Berner, S.W.Kim. *Makromol. Chem. Makromol. Symp.*, **33**, 265 (1990)
68. H.Schild, D.Tirrell. *Langmuir*, **6**, 1676 (1990)
69. H.Schild, D.Tirrell. *Langmuir*, **7**, 665 (1991)
70. H.G.Schild, D.A.Tirrell. *Makromol. Chem. Makromol. Symp.*, **64**, 159 (1992)
71. H.Feil, Y.H.Bae, J.Fejen, S.W.Kim. *Macromolecules*, **26**, 2496 (1993)
72. H.Feil, Y.H.Bae, J.Fejen, S.W.Kim. *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **14**, 465 (1993)
73. T.Tanahashi, M.Kawaguchi, T.Honda, A.Takahashi. *Macromolecules*, **27**, 606 (1994)
74. K.Steinke, K.D.Vorlop. In *The 4th European Congress on Biotechnology (Abstracts of Reports)*. (Eds O.M.Neijssel, R.R.v.d.Meer, K.C.A.M.Luyben). Elsevier, Amsterdam, 1987. P.185
75. C.S.Cho, J.H.Jung, Y.K.Sung, Y.M.Lee. *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **15**, 727 (1994)
76. H.G.Schild, M.Muthukumar, D.A.Tirrell. *Macromolecules*, **24**, 948 (1991)
77. T.Nagaoka, A.Safrani, M.Yoshida, H.Omichi, H.Kubota, R.Katakai. *Macromolecules*, **26**, 7386 (1993)
78. T.G.Park, A.S.Hoffman. *J. Appl. Polym. Sci.*, **46**, 659 (1992)
79. H.Feil, Y.H.Bae, J.Fejen, S.W.Kim. *Macromolecules*, **25**, 5528 (1992)
80. S.Beltran, J.P.Baker, H.H.Hooper, H.W.Blanch, J.M.Prausnitz. *Macromolecules*, **24**, 549 (1991)
81. X.S.Wu, A.S.Hoffman, P.Yager. *J. Polym. Sci. A, Polym. Chem.*, **30**, 2121 (1992)
82. S.Takeuchi, M.Oike, C.Kowitz, C.Shimasaki, K.Hasegawa, H.Kitano. *Makromol. Chem.*, **194**, 551 (1993)
83. T.G.Park, A.S.Hoffman. *Biotechnol. Prog.*, **10**, 82 (1994)
84. H.Yu, D.W.Grainger. *Macromolecules*, **27**, 4554 (1994)
85. O.Hirasa, S.Ito, A.Yamauchi, S.Fujishige, H.Ichijo. In *Polymer Gels. Fundamentals and Biomedical Applications*. (Eds D.DeRossi, K.Kajiwar, Y.Osada, A.Yamauchi). Plenum, New York, 1991. P.247
86. K.Otake, H.Inomata, M.Konno, S.Saito. *Macromolecules*, **23**, 283 (1990)

87. Y.Hirose, T.Amiya, Y.Hirokawa, T.Tanaka. *Macromolecules*, **20**, 1342 (1987)
88. S.Hirotsu. *J. Chem. Phys.*, **88**, 427 (1988)
89. N.Wada, Y.Yagi, H.Inomata, S.Saito. *J. Polym. Sci. A, Polym. Chem.*, **31**, 2647 (1993)
90. Y.Yagi, H.Inomata, S.Saito. *Macromolecules*, **25**, 2997 (1992)
91. M.J.Snowden, B.Vincent. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1103 (1992)
92. T.G.Park, A.S.Hoffman. *J. Appl. Polym. Sci.*, **52**, 85 (1994)
93. H.Inomata, S.Goto, S.Saito. *Macromolecules*, **23**, 4887 (1990)
94. E.S.Matsuo, T.Tanaka. *J. Chem. Phys.*, **89**, 1695 (1988)
95. K.Otake, H.Inomata, M.Konno, S.Saito. *J. Chem. Phys.*, **91**, 1345 (1989)
96. M.Kawaguchi, W.Saito, T.Kato. *Macromolecules*, **27**, 5882 (1994)
97. M.Shibayama, T.Tanaka, C.C.Han. *J. Chem. Phys.*, **97**, 6829 (1992)
98. M.Ilavsky, J.Hrouz, I.Havlicek. *Polymer*, **26**, 1514 (1985)
99. Y.H.Bae, T.Okano, S.W.Kim. *J. Polym. Sci. B, Polym. Phys.*, **28**, 923 (1990)
100. K.F.Mueller. *Polymer*, **33**, 3470 (1992)
101. S.Katayama, Y.Hirokawa, T.Tanaka. *Macromolecules*, **17**, 2641 (1984)
102. H.Inomata, S.Goto, S.Saito. *Langmuir*, **8**, 1030 (1992)
103. E.Kokufuta, Y.-Q.Zhang, T.Tanaka, A.Mamada. *Macromolecules*, **26**, 1053 (1993)
104. T.Amiya, Y.Hirokawa, Y.Hirose, Y.Li, T.Tanaka. *J. Chem. Phys.*, **86**, 2375 (1987)
105. T.G.Park, A.S.Hoffman. *Macromolecules*, **26**, 5045 (1993)
106. T.Ishida, M.Akagi, H.Sugimoto, Y.Iwai, Y.Arai. *Macromolecules*, **26**, 7361 (1993)
107. H.Yu, D.W.Gainger. *J. Appl. Polym. Sci.*, **49**, 1553 (1993)
108. Y.Kajima, Y.Yagi, H.Inomata, S.Saito. *Polym. Gels Networks*, **1**, 127 (1993)
109. M.Shibayama, M.Marimoto, S.Nomura. *Macromolecules*, **27**, 5060 (1994)
110. M.Shibayama, T.Tanaka. In *Responsive gels: Volume transitions I*. (Ed. K.Dusek). Springer-Verlag, Berlin, 1993. P.3
111. S.Saito, M.Konno, H.Inomata. In *Responsive gels: Volume transitions I*. (Ed. K.Dusek). Springer-Verlag, Berlin, 1993. P.208
112. R.A.Horne, J.P.Almeida, A.F.Day, N.-T.Yu. *J. Colloid Interface Sci.*, **35**, 77 (1971)
113. M.Suzuki, O.Hiraza. In *Responsive Gels: Volume transitions II*. (Ed. K.Dusek). Springer-Verlag, Berlin, 1993. P.242
114. B.G.Kabra, M.K.Akthar, S.H.Gerke. *Polymer*, **33**, 990 (1992)
115. D.P.Gundlach, K.A.Burdett. *J. Appl. Polym. Sci.*, **51**, 731 (1994)
116. X.Huang, H.Unno, T.Akehata, O.Hirasa. *J. Chem. Eng. Jpn.*, **20**, 123 (1987)
117. X.Huang, H.Unno, T.Akehata, O.Hirasa. *J. Chem. Eng. Jpn.*, **21**, 10 (1988)
118. X.Huang, H.Unno, T.Akehata, O.Hirasa. *J. Chem. Eng. Jpn.*, **21**, 651 (1988)
119. M.Fujimura, T.Mori, T.Tosa. *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 747 (1987)
120. Ф.П.Сидельковская. *Химия N-винилпирролидона и его полимеров*. Наука, Москва, 1970
121. O.F.Solomon, M.Corciovei, C.Boghina. *J. Appl. Polym. Sci.*, **12**, 1843 (1968)
122. O.F.Solomon, M.Corciovei, C.Boghina. *J. Appl. Polym. Sci.*, **12**, 1835 (1968)
123. A.A.Тaгeр, A.П.Сафронов, С.В.Шарина, И.Ю.Галаев. *Высокомолекулярные соединения*, **32A**, 529 (1990)
124. A.A.Тaгeр, A.П.Сафронов, Е.А.Березюк, И.Ю.Галаев. *Высокомолекулярные соединения*, **32B**, 571 (1991)
125. A.A.Tager, A.P.Safronov, E.A.Berezyuk, I.Y.Galaev. *Colloid Polym. Sci.*, **272**, 1234 (1994)
126. A.A.Tager, A.P.Safronov, S.V.Sharina, I.Y.Galaev. *Colloid Polym. Sci.*, 271, (1993)
127. E.Doelker. In *Biopolymers I*. (Eds N.A.Peppas, R.S.Langer). Springer-Verlag, Berlin, 1993. P.200
128. A.Carlsson, G.Karlström, B.Lindmann. *Colloid Polym. Sci.*, **266**, 1031 (1988)
129. G.Karlström, A.Carlsson, B.Lindmann. *J. Phys. Chem.*, **94**, 5005 (1990)
130. W.L.Hinze, E.Pra Mauro. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **24**, 133 (1993)
131. P.A.Harris, G.Karlström, F.Tjerneld. *Bioseparation*, **2**, 237 (1991)
132. P.A.Alred, A.Kozlowski, J.M.Harris, F.Tjerneld. *J. Chromatogr. A*, **659**, 289 (1994)
133. D.Guoqiang, M.A.N.Benhura, R.Kaul, B.Mattiasson. *Biotechnol. Prog.*, (in the press, 1995)
134. D.Guoqiang, A.Lali, R.Kaul, B.Mattiasson. *J. Biotechnol.*, **37**, 23 (1994)
135. E.C.O.Lima, F.Galembeck. *J. Colloid Interface Sci.*, **166**, 309 (1994)
136. W.McPhee, K.C.Tam, R.Pelton. *J. Colloid Interface Sci.*, **156**, 24 (1993)
137. R.H.Pelton, P.Chibante. *Colloids Surf.*, **20**, 247 (1986)
138. M.J.Snowden. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 803 (1992)
139. H.Ohshima, K.Makino, T.Kato, K.Fujimoto, T.Kondo, H.Kawaguchi. *J. Colloid Interface Sci.*, **159**, 512 (1993)
140. K.Makino, S.Yamamoto, K.Fujimoto, H.Kawaguchi, H.Ohshima. *J. Colloid Interface Sci.*, **166**, 251 (1994)
141. A.Kondo, K.Imura, K.Nakama, K.Higashitani. *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 241 (1994)
142. A.Kondo, T.Kaneko, K.Higashitani. *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 1 (1994)
143. F.Hoshino, T.Fujimoto, H.Kawaguchi, Y.Ohtsuka. *Polym. J.*, **19**, 241 (1987)
144. F.Hoshino, H.Kawaguchi, Y.Ohtsuka. *Polym. J.*, **19**, 1157 (1987)
145. F.Hoshino, M.Sakai, H.Kawaguchi, Y.Ohtsuka. *Polym. J.*, **19**, 383 (1987)
146. *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*. (Eds P.L.Dubin, J.Bock, R.M.Davies, D.N.Schulz, C.Thies). Springer-Verlag, Berlin, 1994
147. V.A.Kabanov. In *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*. (Eds P.L.Dubin, J.Bock, R.M.Davies, D.N.Schulz, C.Thies). Springer-Verlag, Berlin, 1994. P.151
148. V.A.Izumrudov, T.K.Bronich, O.S.Saburova, A.B.Zezin, V.A.Kabanov. *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **9**, 7 (1988)
149. A.L.Margolin, S.V.Sherstyuk, V.A.Izumrudov, A.B.Zezin, V.A.Kabanov. *Eur. J. Biochem.*, **146**, 625 (1985)
150. A.L.Margolin, V.A.Izumrudov, V.K.Svedas, A.B.Zezin, V.A.Kabanov, I.V.Berezin. *Biochim. Biophys. Acta*, **660**, 359 (1981)
151. A.L.Margolin, V.A.Izumrudov, V.K.Svedas, A.B.Zezin. *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 237 (1982)
152. V.A.Kabanov. *IUPAC Macromol. Chem.*, **8**, 121 (1973)
153. И.М.Паписов, А.Д.Антипина, В.А.Кабанов. *Докл. АН СССР*, **199**, 1364 (1971)
154. T.Ikawa, K.Abe, K.Honda, E.Tsuchida. *J. Polym. Sci. A, Polym. Chem.*, **13**, 505 (1975)
155. E.Tsuchida, K.Abe. In *Interactions between macromolecules in solution and intermolecular complexes*. (Eds H.-J.Cantow, G.Dall'Asta, K.Dusek). Springer-Verlag, Berlin, 1982. P.3
156. Y.Osada, Y.Takeuchi. *J. Polym. Sci., Polym. Lett.*, **19**, 303 (1981)
157. S.Kitano, Y.Koyama, K.Kataoka, T.Okano, Y.Sakurai. *J. Control. Release*, **19**, 162 (1992)
158. S.Kitano, K.Kataoka, Y.Koyama, T.Okano, Y.Sakurai. *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **12**, 227 (1991)
159. Y.Osada, H.Okuzaki, H.Hori. *Nature*, **355**, 242 (1992)
160. K.L.Wang, J.H.Burban, E.L.Cussler. In *Responsive Gels: Volume transitions II*. (Ed. K.Dusek). Springer-Verlag, Berlin, 1993. P.68
161. E.Vasheghani-Frahani, D.G.Cooper, J.H.Vera, M.E.Weber. *Chem. Eng. Sci.*, **47**, 31 (1992)
162. M.V.Badiger, M.G.Kulkarni, R.A.Mashelkar. *Chem. Eng. Sci.*, **47**, 3 (1992)
163. R.F.S.Freitas, E.L.Cussler. *Chem. Eng. Sci.*, **42**, 97 (1987)
164. S.H.Gehrke, G.P.Andrews, E.L.Cussler. *Chem. Eng. Sci.*, **41**, 2153 (1986)
165. P.Flodin, B.Gelotte, J.Porath. *Nature*, **188**, 493 (1960)
166. S.J.Trank, D.W.Johnson, E.L.Cussler. *Food Technol.*, **43**, 78 (1989)
167. X.Huang, T.Akehata, H.Unno, O.Hirasa. *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 102 (1989)
168. H.Unno, X.Hiang, T.Akehata, O.Hirasa. In *Polymer Gels. Fundamentals and Biomedical Applications*. (Eds D.DeRossi, K.Kajiwar, Y.Osada, A.Yamauchi). Plenum, New York, 1991. P.183
169. Y.Okahata, K.Ozaki, T.Seki. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 519 (1984)
170. A.J.Grodzinsky, P.E.Grimshaw. In *Pulsed and Self-Regulated Drug Delivery*. (Ed J.Kost). CRC Press, Boca Raton, 1990. P.48

171. T.Tsuiji, M.Konno, S.Sato. *J. Chem. Eng. Jpn.*, **23**, 447 (1990)
172. Y.H.Bae, T.Okano, S.W.Kim. *J. Control. Release*, **9**, 271 (1989)
173. A.M.Weiss, A.J.Grodzinsky, M.L. Yarmuth. *AIChE Symp. Ser.*, **82**, 85 (1986)
174. T.Tsuiji, K.Otake, M.Konno, S.Saito. *J. Appl. Polym. Sci.*, **41**, 1990 (1990)
175. K.Otake, T.Tsuiji, M.Konno, S.Saito. *J. Chem. Eng. Jpn.*, **21**, 443 (1988)
176. C.Senstad, B.Mattiasson. *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 387 (1989)
177. C.Senstad, B.Mattiasson. *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 216 (1989)
178. A.L.Nguyen, J.H.T.Luong. *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1186 (1989)
179. E.Linn-Larsson, B.Mattiasson. *Biotechnol. Tech.*, **8**, 51 (1994)
180. I.Yu.Galaev, B.Mattiasson. *Biotechnol. Tech.*, **6**, 353 (1992)
181. M.Taniguchi, M.Kobayashi, K.Natsui, M.Fujii. *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 32 (1989)
182. A.P.Bradshaw, R.J.Sturgeon. *Biotechnol. Tech.*, **4**, 67 (1990)
183. M.Pécs, M.Eggert, K.Scügerl. *J. Biotechnol.*, **21**, 137 (1991)
184. T.Homma, M.Fujii, J.Mori, T.Kawakami, K.Kuroda, M.Taniguchi. *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 405 (1993)
185. M.N.Gupta, D.Guoqiang, R.Kaul, B.Mattiasson. *Biotechnol. Tech.*, **8**, 117 (1994)
186. D.Guoqiang, R.Kaul, B.Mattiasson. *Bioseparation*, **3**, 33 (1993)
187. M.N.Gupta, D.Guoqiang, B.Mattiasson. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **18**, 321 (1993)
188. H.-C.Shu, D.Guoqiang, R.Kaul, B.Mattiasson. *J. Biotechnol.*, **34**, 1 (1994)
189. R.Kaul, B.Mattiasson. *Bioseparation*, **3**, 1 (1992)
190. I.Y.Galaev, B.Mattiasson. *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 1101 (1993)
191. *Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Theory, Methods, Uses, and Application to Biotechnology*. (Eds H.Walter, D.E.Brooks, D.Fisher). Academic Press, London, 1985
192. R.F.Modlin, P.A.Alred, F.Tjerneld. *J. Chromatogr. A*, **668**, 229 (1994)
193. P.A.Alred, F.Tjerneld, A.Kozlowski, J.M.Harris. *Bioseparation*, **2**, 363 (1992)
194. M.Kamihira, R.Kaul, B.Mattiasson. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 1381 (1992)
195. D.Guoqiang, R.Kaul, B.Mattiasson. *J. Chromatogr. A*, **668**, 145 (1994)
196. I.Y.Galaev, C.Warrol, B.Mattiasson. *J. Chromatogr. A*, **684**, 37 (1994)
197. M.Charles, R.W.Coughlin, F.X.Hasselberger. *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 1553 (1974)
198. M.Taniguchi, M.Kobayashi, M.Fujii. *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1092 (1989)
199. R.W.Coughlin, M.Aizawa, M.Charles. *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 199 (1976)
200. Ю.Э.Кирш, И.Ю.Галаев, Т.М.Карапугадзе, А.Л.Марголин, В.К.Швядас. *Биотехнология*, 184 (1987)
201. F.Liu, G.Tao, R.Zhuo. *Polym. J.*, **25**, 561 (1993)
202. S.Takeuchi, I.Omodaka, K.Hasegawa, Y.Maeda, H.Kitano. *Makromol. Chem.*, **194**, 1991 (1993)
203. H.Kitano, C.Yan, K.Nakamura. *Makromol. Chem.*, **192**, 2915 (1991)
204. K.Okumura, K.Ikura, M.Yoshikawa, R.Sasaki, H.Chiba. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2435 (1984)
205. K.Hoshino, M.Taniguchi, H.Marumoto, M.Fujii. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1961 (1989)
206. K.Hoshino, M.Taniguchi, H.Marumoto, K.Shimizu, M.Fujii. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 479 (1991)
207. K.Hoshino, M.Taniguchi, Y.Netsu, M.Fujii. *J. Chem. Eng. Jpn.*, **22**, 54 (1989)
208. K.Hoshino, M.Taniguchi, H.Marumoto, M.Fujii. *J. Ferment. Bioeng.*, **69**, 228 (1990)
209. Ю.В.Галаев. *Прикл. биохимия и микробиология*, **30**, 139 (1994)
210. E.A.Markvicheva, A.S.Bronin, N.E.Kudryavtseva, L.D.Rumsh, Y.E.Kirsh, V.P.Zubov. *Biotechnol. Tech.*, **8**, 143 (1994)
211. M.V.Donova, I.F.Kuz'kina, A.Y.Arinasarova, I.I.Pashkin, E.A.Markvicheva, T.G.Balashova, G.V.Sukhodolskaya, V.V.Fokina, Y.E.Kirsh, K.A.Koshcheyenko, V.P.Zubov. *Biotechnol. Tech.*, **7**, 415 (1993)
212. E.A.Markvicheva, I.F.Kuz'kina, I.I.Pashkin, T.N.Plechko, Y.E.Kirsh, V.P.Zubov. *Biotechnol. Tech.*, **5**, 223 (1991)
213. T.Tatsuma, K.Saito, N.Oyama. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1853 (1994)
214. N.Oyama, T.Tatsuma, K.Takahashi. *J. Phys. Chem.*, **97**, 10504 (1993)
215. T.Tatsuma, K.Saito, N.Oyama. *Anal. Chem.*, **66**, 1002 (1994)
216. L.C.Dong, A.S.Hoffman. *J. Control. Release*, **4**, 223 (1986)
217. T.G.Park, A.S.Hoffman. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **19**, 1 (1988)
218. T.G.Park, A.S.Hoffman. *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 152 (1990)
219. T.G.Park, A.S.Hoffman. *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**, 21 (1990)
220. E.Kokufuta, O.Ogane, H.Ichijo, S.Watanabe, O.Hirasa. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 416 (1992)
221. F.Liu, R.X.Zhuo. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **18**, 57 (1993)
222. T.G.Park. *Biotechnol. Lett.*, **15**, 57 (1993)
223. Н.И.Еремеев, Л.В.Сиголаева, Н.Ф.Казанская. *Вестн. МГУ, Сер. 2, Химия*, **47**, 94 (1992)
224. Л.В.Сиголаева, Н.Л.Еремеев, Н.Ф.Казанская. *Биотехнология*, 36 (1993)
225. Л.В.Сиголаева, Н.Л.Еремеев, Н.Ф.Казанская. *Биоорг. химия*, **20**, 268 (1994)
226. M.Irie. In *Responsive Gels: Volume transitions II*. (Ed. K.Dusek). Springer-Verlag, Berlin, 1993. P.50
227. R.Kröger, H.Menzel, M.L.Hallensleben. *Macromol. Chem. Phys.*, **195**, 2291 (1994)
228. A.Mamada, T.Tanaka, D.Kungwachakun, M.Irie. *Macromolecules*, **23**, 157 (1990)
229. I.Willner, S.Rubin, R.Shatzmiller, T.Zor. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 8690 (1993)
230. I.Willner, S.Rubin, T.Zor. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4013 (1991)
231. I.Willner, S.Rubin. *React. Polym.*, **21**, 177 (1993)
232. A.Suzuki, T.Tanaka. *Nature*, **346**, 345 (1990)
233. M.Irie, Y.Misumi, T.Tanaka. *Polymer*, **34**, 4531 (1993)
234. E.Kokufuta. In *Responsive gels: Volume transitions II*. (Ed. K.Dusek). Springer-Verlag, Berlin, 1993. P.159
235. E.Kokufuta, T.Tanaka. *Macromolecules*, **24**, 1605 (1991)
236. E.Kokufuta, Y.-Q.Zhang, T.Tanaka. *Nature*, **351**, 302 (1991)
237. A.S.Hoffman. *J. Control. Release*, **6**, 297 (1987)
238. N.Monji, A.S.Hoffman. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **14**, 107 (1987)
239. A.S.Hoffman. *MRS Bull.*, 42 (1991)
240. D.Bellu. *J. Macromol. Sci.-Pure Appl. Chem.*, **31A**, 1355 (1994)
241. *Pulsed and Self-Regulated Drug Delivery*. (Ed. J.Kost). CRC Press, Boca Raton, 1990
242. K.Ishihara, N.Hamada, S.Kato, I.Shinohara. *J. Polym. Sci. A, Polym. Chem.*, **22**, 881 (1984)
243. K.Ishihara, N.Muramoto, I.Shinohara. *J. Appl. Polym. Sci.*, **29**, 211 (1984)
244. F.M.Winnik, M.F.Ottaviani, S.H.Bossmann, M.Garcia-Garibay, N.J.Turro. *Macromolecules*, **25**, 6007 (1992)
245. Y.H.Bae, R.Hsu, T.Okano, S.W.Kim. *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **8**, 481 (1987)
246. T.Okano, Y.H.Bae, H.Jacobs, S.W.Kim. *J. Control. Release*, **11**, 255 (1990)
247. T.Okano, R.Yoshida, Y.Sakurai. In *Polymer Gels.Fundamentals and Biomedical Applications*. (Eds D.DeRossi, K.Kajiwar, Y.Osada, A.Yamauchi). Plenum, New York, 1991. P.299
248. T.Okano, Y.H.Bae, S.W.Kim. In *Pulsed and Self-Regulated Drug Delivery*. (Ed. J.Kost). CRC Press, Boca Raton, 1990. P.18
249. Y.H.Bae, T.Okano, S.W.Kim. *Pharm. Res.*, **18**, 624 (1991)
250. Y.H.Bae, T.Okano, S.W.Kim. *Pharm. Res.*, **18**, 531 (1991)
251. H.Kitano, K.Sanui, N.Ogata, T.Okano, Y.Sakurai. *Polym. J.*, **23**, 1179 (1991)
252. R.Yoshida, K.Sakai, T.Okano, Y.Sakurai. *J. Biomater. Sci. Eng.*, **3**, 243 (1992)
253. R.Yoshida, K.Sakai, T.Okano, Y.Sakurai. *Polym. J.*, **23**, 1111 (1991)
254. L.C.Dong, A.S.Hoffman. *J. Control. Release*, **15**, 141 (1991)
255. L.C.Dong, Q.Yan, A.S.Hoffman. *J. Control. Release*, **19**, 171 (1992)
256. G.Albin, T.A.Horbett, B.D.Ratner. In *Pulsed and Self-Regulated Drug Delivery*. (Ed. J.Kost). CRC Press, Boca Raton, 1990. P.159
257. K.Ishihara, K.Matsui. *J. Polymer Sci., Polym. Lett.*, **24**, 413 (1986)
258. D.Shiino, K.Kataoka, Y.Koyama, M.Yokoyama, T.Okano, Y.Sakurai. *J. Control. Release*, **28**, 317 (1994)

259. D.A.Tirrell. In *Pulsed and Self-Regulated Drug Delivery*. (Ed. J.Kost). CRC Press, Boca Raton, 1990. P.110
260. S.Sugaj, K.Nitta, N.Ohno, H.Nakano. *Colloid Polym. Chem.*, **261**, 159 (1983)
261. Y.G.Takei, T.Aoki, K.Sanui, N.Ogata, Y.Sakurai, T.Okano. *Macromolecules*, **27**, 6163 (1994)

«SMART» POLYMERS IN BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

I.Yu.Galaev

*Department of Biotechnology, Chemical Center, Lund University
S-22100 Lund, Sweden, Fax (464)610-4713*

«Smart» water soluble polymers and hydrogels are able to respond to small changes in the medium properties (pH, temperature, ionic strength, presence of a given substances, light, electric field) in a pronounced and reversible manner. The response of the system is easily detected by the naked eye as a new phase formation of a drastic swelling/shrinking of the hydrogel. The properties of such polymers and hydrogels are briefly reviewed. The use of smart polymers for concentrating protein solutions, dewatering of slurries, for biocatalyst immobilization, in sensors, and for controlled drug release is discussed in detail. Bibliography — 261 references.

Received 11th November 1994