

Синтез монодисперсных функциональных полимерных микросфер для иммунодиагностических исследований

Н.И.Прокопов, И.А.Грицкова, В.Р.Черкасов, А.Е.Чалых

Московская академия тонкой химической технологии им. М.В.Ломоносова

117571 Москва, просп. Вернадского, 86, факс (095) 430–7983

Институт физической химии Российской академии наук

117915 Москва, Ленинский просп., 31, факс (095) 952–0714

Проанализированы способы синтеза функциональных полимерных суспензий с узким распределением частиц по размерам. Наиболее подробно описаны условия получения полимерных микросфер с альдегидными, карбоксильными, эпоксидными и аминогруппами на поверхности частиц, которые обладают комплексом свойств, позволяющим использовать их для биохимических исследований. Рассмотрены способы модификации функциональных групп полимерных суспензий, позволяющие осуществить ковалентное связывание поверхностных групп с биолигандами.

Библиография — 218 ссылок.

Оглавление

I. Введение	178
II. Синтез полимерных суспензий с функциональными группами на поверхности частиц	179
III. Активация функциональных групп на поверхности частиц полимерной суспензии	184

I. Введение

К полимерным суспензиям с узким распределением частиц по размерам (РЧР) обычно относят диспергированные в воде суспензии, содержащие частицы полимера строго сферической формы и одинакового диаметра.¹ Типичные значения коэффициента вариации (меры отклонения диаметров частиц от среднего значения) составляют 1–3% (для частиц с диаметром 0.1–10 мкм)^{2–4} и 10–30% (для частиц с диаметром менее 0.06 и более 10 мкм).^{2,5}

Полимерные микросферы с узким РЧР применяют в различных областях науки и техники, например, в качестве калибровочных эталонов в электронной и оптической микроскопии, светорассеивании, при подсчете аэрозольных частиц, при малоугловой рефракции рентгеновских лучей, для счета вирусных частиц, определения размеров пор фильтров и биологических мембран, для стимулирования клеточного продуцирования антител и их очистки,^{6–9} в качестве модельных коллоидных систем для изучения их реологии,^{10,11}

стабильности, седиментации¹¹ и т.д. В последние годы частицы монодисперсных функциональных суспензий нашли широкое применение в качестве носителей белков при создании иммунодиагностических тестов.²

Принцип работы тестов основан на иммунохимической реакции между антигеном (веществом, несущим признаки генетически чужеродной информации для данного вида организма) и антителами (белками, относящимися к классу иммуноглобулинов, продуцируемыми клетками иммунной системы организма в ответ на появление антигена) с образованием комплекса антиген–антитело.¹² Реакция образования такого комплекса является высокоиммуноспецифической, т.е. на появление в организме определенного антигена иммунная система вырабатывает антитело строго определенного строения, способные взаимодействовать только с этим антигеном. Вследствие того что и антиген, и антитело могут взаимодействовать одновременно с несколькими молекулами, образуются пространственные сетки, узлами которых служат молекулы антигена.

Образование сеток-агломератов, а следовательно, и обнаружение того или иного вида антигенов, может быть зарегистрировано различными методами, например, методами спектрофотометрии, турбидиметрии, нефелометрии, лазерной автокорреляционной спектроскопии и т.д. Использование для обнаружения комплекса антиген–антитело специального дорогостоящего оборудования создает заметные трудности для широкого применения указанных методов при диагностике заболеваний. В то же время связывание антигенов (антител) с полимерным носителем, который выполняет исключительно индикаторную функцию, позволяет даже невооруженным глазом обнаружить появление комплексов как скопление агломератов частиц носителя.

Первое сообщение об успешном применении поливинилтолуольных и полистирольных микросфер с узким РЧР для диагностики ревматоидного артрита появилось в 1956 г.¹³

Н.И.Прокопов. Кандидат химических наук, доцент той же кафедры МАТХТ. Область научных интересов: гетерофазная полимеризация.
И.А.Грицкова. Доктор химических наук, профессор той же кафедры МАТХТ. Область научных интересов: гетерофазная полимеризация.
В.Р.Черкасов. Кандидат химических наук, ассистент кафедры синтеза полимеров МАТХТ. Область научных интересов: гетерофазная полимеризация.
А.Е.Чалых. Доктор химических наук, профессор, заместитель директора ИФХ РАН, заведующий лабораторией электронной микроскопии и электронографии ИФХ РАН. Область научных интересов: физическая химия полимеров.

Дата поступления 14 июля 1995 г.

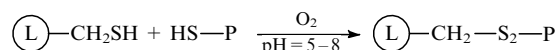
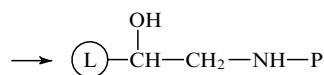
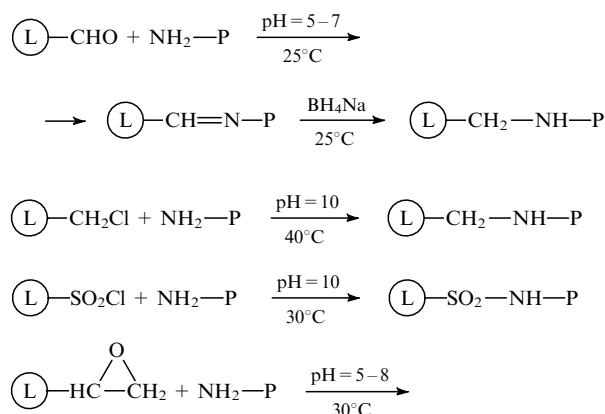
Сообщалось, что взаимодействие антигенов, находящихся в сыворотке крови пациента, с гамма-глобулином, адсорбированным на поверхности микросфер суспензии, привело к слипанию (агглютинации) полимерных частиц и образованию крупных агломератов, легко различимых невооруженным глазом. Вслед за этим появились публикации^{14–24} по использованию частиц полистирольных и полиметилметакрилатных суспензий в качестве носителей белка при получении диагностических тест-систем на другие типы заболеваний.

Однако использование частиц полимерных суспензий при создании иммунодиагностических тестов было ограничено невоспроизводимостью результатов анализа. По мнению авторов работы²⁴, это обусловлено тем, что белок, физически сорбированный поверхностью частиц, десорбируется в водную фазу при небольшом изменении условий (рН, ионной силы среды, температуры и т.п.), что снижает чувствительность тестов и приводит к неспецифическим реакциям с другими биообъектами.

Свободными от указанных недостатков оказались полимерные суспензии, содержащие гидрофильные частицы с функциональными группами на поверхности, способными к ковалентному связыванию биолигандов. Были синтезированы и успешно применены для создания иммунодиагностических тестов полимерные суспензии на основе сополимеров метилметакрилата (ММА), 2-гидроксиэтилметакрилата, акриловой и метакриловой кислот (МАК), акриламида, винилпиридина и т.д.^{24–29} Эти суспензии по сравнению с гидрофобными имели следующие преимущества:

- отсутствие неспецифической адсорбции биолигандов из-за высокой гидрофильности поверхности частиц;
- отсутствие десорбции белковых молекул с поверхности микросфер вследствие ковалентной связи между биолигандом и функциональными группами полимерной частицы;
- возможность ковалентного связывания антигенов и антител, плохо сорбирующихся на поверхности гидрофобных суспензий;
- появление возможности создания условий для оптимальной ориентации биомолекул на поверхности микросфер, обеспечивающей максимальную чувствительность и высокую специфичность синтезируемых диагностикумов.

Полимерные суспензии, используемые в иммунодиагностике, классифицируют по типу химических групп, находящихся на поверхности. По этому признаку они разделяются на два типа. К первому типу относятся суспензии, частицы которых содержат на поверхности группы, способные непосредственно реагировать с аминокислотными или сульфгидрильными группами биомолекул, например, хлорметильные,^{30–34} хлорсульфоновые,³¹ альдегидные,^{35–38} эпоксидные³⁹ и сульфгидрильные^{40, 41} группы. Такие группы реагируют с биомолекулами в водной среде при умеренной температуре.



Л — полимерная частица; Р — белок

Ко второму типу относятся суспензии с функциональными группами, которые не способны к прямому взаимодействию с белками, однако могут образовывать с ними химическую связь после относительно простой реакции активации. К этой группе относятся полимерные суспензии с карбоксильными,^{2,26,27,42–45} гидроксильными,^{24,46} аминными,^{24,27} амидными,^{27,47–50} гликолевыми^{51,52} и другими группами. Методы активации таких групп будут рассмотрены ниже.

В настоящее время в литературе описано значительное количество методов получения полимерных микросфер с теми или иными функциональными группами на поверхности (эмульсионная, суспензионная, дисперсионная, осадительная, безэмульгаторная, затравочная и т.д. полимеризации). При этом выбор метода синтеза определяется необходимостью получения суспензий с заданным комплексом свойств: диаметром частиц и их строением, узким распределением частиц по размерам, стабильностью в физиологических растворах и при хранении, наличием функциональных групп определенной природы и концентрации на поверхности частиц. Ниже приведен обзор методов синтеза функциональных полимерных суспензий с определенными функциональными группами на поверхности частиц.

II. Синтез полимерных суспензий с функциональными группами на поверхности частиц

1. Синтез полимерных суспензий с альдегидными группами на поверхности частиц

Полимерные суспензии с альдегидными группами на поверхности частиц получают гомополимеризацией ненасыщенных альдегидов (акролеин, формилстирол) и их сополимеризацией с мономерами различной природы.

Наиболее подробно изучена полимеризация акролеина. Описаны два способа получения полиакролеиновых микросфер с узким РЧР: анионная осадительная полимеризация в щелочных условиях³⁹ и радикальная эмульсионная полимеризация с использованием γ -излучения либо иницирующей окислительно-восстановительной системы.⁵³

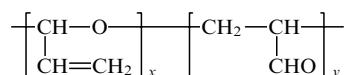
Радикальную эмульсионную полимеризацию акролеина проводили в водном растворе при концентрации мономера 10 об. % в присутствии полиэтиленоксида в качестве эмульгатора. Для иницирования полимеризации использовали окислительно-восстановительную систему персульфат калия–нитрат серебра. Процесс проводили в темноте при комнатной температуре и различной концентрации акролеина. Этим способом были получены полиакролеиновые микросферы с диаметрами 0.01–0.2 мкм (в зависимости от концентрации акролеина в системе) и коэффициентом вариации менее 10%. Отмечалось, что кинетические закономерности процесса полимеризации акролеина заметно отличаются от наблюдаемых для гидрофобных мономеров, что авторы⁵³ объясняют как хорошей растворимостью мономера в водной фазе (~20 мас. %), так и протекающими в полимерно-мономерных частицах (ПМЧ) процессами межмолекулярного сшивания.

γ -Иницированную радикальную полимеризацию проводили при комнатной температуре в течение 4 ч в водном

растворе смеси ионогенного (лаурилсульфат натрия) и неионного (полиэтиленоксид с молекулярной массой 100 000) ПАВ при их концентрациях 0–20 и 0–15% соответственно, в расчете на мономер и дозе облучения 0.4 Мрад. Отмечается, что в этом случае начальная скорость процесса полимеризации имеет первый порядок по мономеру, размер частиц и их РЧР сильно зависят от концентрации мономера и ПАВ. Размер частиц увеличивается с повышением концентрации мономера и уменьшением концентрации ПАВ. Варьируя указанные параметры, авторы получили полиакролеиновые микросферы с широким спектром размеров (от 0.01–0.02 до 5.0 мкм). Отмечается, что стабильные монодисперсные микросферы образуются при концентрации мономера не выше 15 мас. %

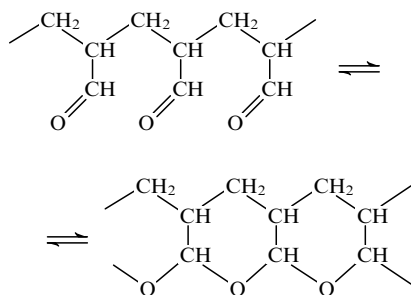
Полиакролеиновые суспензии с размерами частиц от 0.04 до 8.0 мкм и коэффициентом вариации менее 10% удалось получить осадительной гомополимеризацией акролеина в щелочной среде (pH > 11.0) при постепенном введении раствора щелочи в водный раствор акролеина только в присутствии специально синтезированного эмульгатора — продукта взаимодействия олигомеров полиглутарового альдегида с бисульфитом натрия.³⁹ Полимеризацию проводили в течение 10 ч при комнатной температуре.

Выполненные исследования показали, что строение полиакролеина существенно зависит от условий синтеза микросфер. Так, в работе⁴⁰ отмечается, что акролеин способен полимеризоваться как с раскрытием двойных связей, так и путем взаимодействия по альдегидным группам. Это свидетельствует о том, что полиакролеин содержит два типа повторяющихся звеньев.



Отношение $x:y$ зависит от способа и условий получения микросфер и изменяется от 4:1 для «анионных» до 1:7 для «эмульсионных» микросфер. Отмечается, что условия синтеза полиакролеиновых суспензий определяют концентрацию функциональных альдегидных групп на поверхности частиц, а следовательно, и количество ковалентно связанных белковых молекул.

В работе⁴⁰ на основании спектрофотометрических исследований было предположено наличие следующих структурных фрагментов в молекулах полиакролеина, синтезированных путем γ -инициированной полимеризации:



Авторы отмечают, что вследствие дифункциональности акролеина, механизм формирования полимерных цепей является весьма сложным и структура макромолекул представляет собой комбинацию приведенных выше фрагментов. Таким образом, структура макромолекул, а следовательно, и другие свойства полимерных суспензий (размер, РЧР, концентрация альдегидных групп на поверхности частиц и т.д.) могут значительно варьироваться в зависимости от условий полимеризации, в связи с чем процесс является плохо воспроизводимым. Указанный эффект в наибольшей степени проявляется при осадительной полимеризации. Радиацион-

ная полимеризация имеет ряд преимуществ перед осадительной: лучший контроль и воспроизводимость процесса, большая концентрация реакционноспособных групп на поверхности частиц.

О плохой воспроизводимости процессов осадительной полимеризации акролеина сообщается также в работах^{39,53}. Кроме того, отмечается, что в частицах полиакролеиновых суспензий всегда содержится некоторое количество олигомерного продукта, наличие которого обусловлено особенностями механизма осадительной полимеризации. С течением времени такие олигомерные молекулы могут диффундировать из объема частиц на их поверхность, что приводит к заметному изменению свойств микросфер в процессе хранения.

Для устранения указанных недостатков был предложен ряд методов, позволяющих заметно повысить химическую стабильность полиакролеиновых микросфер, снизить физическую адсорбцию белковых молекул на их поверхности и повысить выход целевого продукта.^{54–57} Так, в работе⁵⁶ описан синтез полиакролеиновых суспензий в водно-щелочной среде в присутствии радикальных инициаторов, взятых в количестве 3–6% от массы мономера. Полимеризацию проводили в двух температурных режимах: при 5–35°C в течение 1.5–2.5 ч и при 40–90°C в течение 2–3 ч. Полученные таким путем полиакролеиновые микросферы имели диаметр 0.2–6.0 мкм и узкое РЧР (коэффициент вариации около 10%). Они отличались более высокой химической стабильностью от микросфер, образующихся в результате традиционной анионной осадительной полимеризации, по-видимому, из-за дополнительного сшивания полимера радикальными инициаторами.

Аналогичный эффект был достигнут при проведении анионной осадительной полимеризации акролеина в водно-щелочной среде в присутствии водорастворимых краун-эфиров⁵⁷ при температуре 2–38°C и выдерживании реакционной системы в присутствии радикальных инициаторов (персульфата калия, пероксида бензоила, динитрила азобисомасляной кислоты — ДАК) при повышенной температуре 40–90°C. Частицы полиакролеиновой суспензии имели диаметр 0.04–6.0 мкм, коэффициент вариации 14–18%.

Более высокой стабильностью характеризуются полистирол-акролеиновые суспензии, которые получают безэмульгаторной сополимеризацией акролеина со стиролом.^{35,58} Соплимеризацию проводят при различном соотношении сомономеров в присутствии персульфата калия при температуре 55°C в течение 8 ч в атмосфере азота.

Было отмечено, что скорость сополимеризации зависит от молярной концентрации акролеина и ее оптимальное значение наблюдалось при мольном отношении сомономеров 1:1. Соплимерные полиакролеин-стирольные частицы имели средний диаметр в пределах 0.25–0.30 мкм и коэффициент вариации менее 3%. Концентрация альдегидных групп на поверхности полимерных микросфер линейно зависела от молярной концентрации акролеина и составляла от 0.08 (для 20 мол. % акролеина) до 0.17 мкмоль·г⁻¹ (для 90 мол. % акролеина).

Аналогичная картина наблюдалась и при сополимеризации акролеина с 2-гидроксиэтилметакрилатом (ГЕМА), инициируемой γ -излучением.³⁶ В этом случае смесь акролеина и ГЕМА предварительно диспергировали в 1%-ном водном растворе поливинилового спирта, после чего эмульсию мономеров быстро замораживали и проводили радиационную сополимеризацию при –78°C и дозе облучения 1 Мрад в течение 1 ч. Полученные микросферы размораживали и очищали от незаполимеризовавшегося мономера. В зависимости от условий проведения сополимеризации, концентрации сомономеров и их соотношения, сополимерные полиакролеин-2-гидроксиэтилметакрилатные микросферы имели диаметр от 0.6 до 4.0 мкм и узкое РЧР.

Существует способ получения полимерных микросфер с альдегидными группами на поверхности методом пост-радиационной привитой полимеризации акролеина из газовой фазы на матрицы, представляющие собой устойчивые полистирольные и полиметилметакрилатные частицы одинакового размера.⁵⁹

Так как условия синтеза полимерной суспензии (ПС) существенно влияют на свойства продукта модификации, в качестве матрицы при радиационно-химической привитой полимеризации акролеина использовали частицы суспензии, полученные как в присутствии эмульгатора, так и в его отсутствие.

В качестве ПАВ применяли растворимый в воде оксигликольный полипропиленгликоль (ПС(F-68)) и растворимый в мономерной фазе ди-*n*-толил-*o*-карбалкокисфенилкарбинол (ПС(ДТК)). Иницирование процесса полимеризации во всех случаях осуществляли персульфатом калия. Полимеризацию мономеров проводили до полной их конверсии, время полимеризации составляло 24 ч. Частицы полимерных суспензий с диаметром 0.2 и 0.45 мкм соответственно оказались устойчивыми при хранении и в физиологическом растворе и имели узкое распределение по размерам. Полученные полимерные суспензии подвергали лиофильной сушке, и порошки полимера использовали в качестве матриц.

Для определения дозы облучения, необходимой для проведения привитой сополимеризации акролеина методом ЭПР изучали накопление радикалов в полимере подложки. Была выбрана доза облучения 15 Мрад, при которой кривые накопления радикалов выходят на плато, что соответствует установлению в образцах стационарной концентрации радикалов.

Изучение сорбции паров акролеина частицами подложек при разных значениях давления паров акролеина показало, что концентрация акролеина в частицах существенно зависит от природы полимера, из которого изготовлены подложки, и используемого ПАВ.

По кинетическим кривым абсорбции акролеина на частицы подложки были рассчитаны константы скорости абсорбции и было показано, что выход привитого полиакролеина во времени на исследуемых подложках зависит от природы полимера.

Анализ ИК-спектров исходных и модифицированных полиакролеином полимеров показал, что в спектрах всех синтезированных полимеров присутствует полоса поглощения в области 1725 см^{-1} , которая соответствует колебанию карбонильной группы в алифатическом альдегиде. Увеличение степени прививки полиакролеина на полимерной матрице приводит к повышению интенсивности поглощения в этой области спектра.

В спектрах модифицированных полиакролеином полимеров имеется полоса поглощения в области 1100 см^{-1} , которая соответствует колебанию связей С—О в ацеталах. Данные связи могут образовываться или за счет протекания процесса полимеризации акролеина по карбонильной группе или за счет взаимодействия находящихся в гидратированной форме альдегидных групп образующегося полимера. Последнее возможно в силу того, что свободные альдегидные группы находятся в равновесии со своими гидратированными формами, поскольку получаемые полимеры акролеина даже в условиях сушки под глубоким вакуумом содержат определенное количество воды.

Для выяснения способа образования связей С—О в синтезированных полимерах была проведена их реакция с гидроксиламиногидрохлоридом. Предполагалось, что если полимер имеет альдегидные группы в свободной или гидратированной форме, то в результате этой реакции образуется полимер с оксимными группами. В противном же случае, т.е. если связь С—О входит в состав основной цепи, реакция не пойдет.

Анализ ИК-спектров показал, что в результате проведенной реакции интенсивность поглощения уменьшается не только в области 1725 см^{-1} , но и в области 1100 см^{-1} . Последнее говорит о том, что связь С—О получена за счет образования циклических ацеталей, способных раскрываться с образованием свободных альдегидных групп.

На основе полученных методом ИК-спектроскопии результатов авторы работы⁵⁹ сделали вывод о том, что радикальная полимеризация акролеина протекает в основном по винильной группе.

Главным фактором, определяющим количество свободных и связанных СНО-групп в полиакролеине, является условие его синтеза.

Так, для микросфер, полученных ионной полимеризацией акролеина, содержание альдегидных групп в полимере составляет 2.9 ммоль альдегида на 1 г микросфер, в то время как для микросфер, полученных радикальной полимеризацией акролеина, например, под действием радикальной окислительно-восстановительной системы, содержание альдегидных групп равно 12.0 ммоль на 1 г микросфер.

Расчеты показали, что на поверхности модифицированных полиакролеином микросфер, полученных методом безэмульгаторной полимеризации, ПС(ДТК) и микросфер сополимера ММА с МАК содержание альдегидных групп составляет соответственно 5.39; 4.80; 9.34 и 8.07 ммоль альдегида на 1 г привитого полиакролеина. Сравнение полученных результатов с литературными данными свидетельствует о том, что содержание альдегидных групп в микросферах, синтезированных методом пострадиационной полимеризации акролеина (даже в образце с самым низким содержанием акролеина) в 2 раза больше, чем их содержание в микросферах, полученных методом основного катализа.

Полимерные суспензии с альдегидными группами на поверхности можно синтезировать и методом дисперсионной полимеризации формилстирола в водно-этанольной среде с использованием в качестве инициатора ДАК,^{31, 60} а стабилизатора — поливинилбензойную кислоту. Полимеризацию проводили в течение 24 ч при температуре 70°C . Полученные частицы в зависимости от концентрации мономера имели диаметр от 0.5 до 2.0 мкм, коэффициент вариации 8–10% и концентрацию альдегидных групп на поверхности частиц — $0.1\text{--}0.2\text{ ммоль}\cdot\text{г}^{-1}$.

В литературе описаны способы полимеризации глутарового диальдегида и получения частиц с альдегидными группами на поверхности.^{38, 61, 62} Отмечается, что полиглутаральдегидные суспензии малоустойчивы (особенно в сильнощелочных средах) и не имеют заметных преимуществ перед рассмотренными выше. В связи с этим они нашли лишь ограниченное применение для маркировки клеточных рецепторов.

2. Синтез полимерных суспензий с хлорметильными группами на поверхности частиц

Полимерные суспензии с хлорметильными группами на поверхности получают осадительной^{30, 31, 63} и затравочной³³ полимеризацией хлорметилстирола и хлорметилметакрилата. Общим серьезным недостатком этого метода является высокая токсичность мономеров.

Осадительную полимеризацию хлорметилстирола иницируют ДАК и проводят в этанольной среде в присутствии стабилизатора (поливинилбензойной кислоты) при 70°C . Полимерные суспензии имеют диаметр от 0.5 до 2.0 мкм (в зависимости от концентрации мономера) и коэффициент вариации $\sim 10\%$. В процессе хранения полихлорметильных суспензий происходит частичный гидролиз реакционноспособных хлорметильных групп, что приводит к изменению свойств полимерной суспензии.

Более высокую стабильность при хранении имели полимерные суспензии, синтезированные путем затравоч-

ной сополимеризации хлорметилстирола со стиролом.³³ Затравочные полистирольные частицы получали дисперсионной полимеризацией стирола иницированной ДАК ($1 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$) в водно-этанольной среде при объемном отношении стирол:ДАК 1:4 в присутствии полиакриловой кислоты ($1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) в качестве стабилизатора. Затравочные частицы имели диаметр 1.9 мкм и коэффициент вариации менее 3%. Полимеризацию проводили в течение ~ 10 ч при температуре 70°C . Затем смесь, состоящую из затравочного латекса, стирола, хлорметилстирола и ДАК, взятых в определенном соотношении, смешивали и выдерживали при перемешивании в течение 24 ч при 0°C до набухания частиц затравочной суспензии, затем проводили полимеризацию в течение 24 ч при 70°C .

Полученные частицы суспензии имели диаметр 2.1 мкм и коэффициент вариации менее 3% и структуру «ядро–оболочка». Практически все хлорметильные группы находились на поверхности частиц суспензии.

В работах^{64,65} приведены данные по использованию стирол-хлорметильных сополимерных суспензий в иммунодиагностике.

3. Синтез полимерных суспензий, содержащих на поверхности эпоксидные группы

Полимерные суспензии, частицы которых содержат на поверхности эпоксидные группы, получают в основном безэмульгаторной сополимеризацией стирола с глицидилметакрилатом. По литературным данным^{66–77} оптимальные условия сополимеризации стирола с глицидилметакрилатом реализуются при ионной силе водной фазы $0–0.02 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$, концентрации персульфата калия, равной $0.011–0.02 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$, и общей концентрации мономеров — $3.7 \cdot 10^{-3} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$. Полимеризацию проводят в течение 5–10 ч при температуре 65°C . В этих условиях получают микросферы со средним диаметром 220–400 нм и коэффициентом вариации 2–6%. В процессе синтеза стирол-глицидилметакрилатных сополимерных суспензий часть эпоксидных групп на поверхности частиц теряется вследствие гидролиза. Однако их количество на поверхности частиц остается достаточным, чтобы путем ковалентного связывания обеспечить необходимую концентрацию биолиганда.

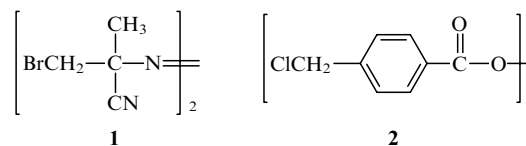
Для уменьшения гидролиза эпоксидных групп в процессе синтеза суспензии рекомендуют проводить полимеризацию в условиях постепенного дозирования функционального мономера в полимеризующую систему.^{39,76} Этим способом удается получить частицы со структурой типа «ядро–оболочка». В качестве примера описан синтез частиц, у которых «ядро» является сополимером *n*-бутилакрилата с бутилметакрилатом. Такие частицы получали эмульсионной сополимеризацией мономеров в присутствии додецилсульфата натрия и окислительно-восстановительной системы персульфат калия–тиосульфат натрия. Полимеризацию проводили при 20°C в течение 20 мин, а затем в систему вводили смесь мономеров с глицидилметакрилатом.

Полученные микросферы имели диаметр 150–300 нм и коэффициент вариации $< 10\%$. В этом случае, согласно данным авторов работы³⁹, удается сохранить до 90% эпоксидных групп, причем практически все они распределены в тонком ($\sim 150 \text{ \AA}$) слое на поверхности частиц.

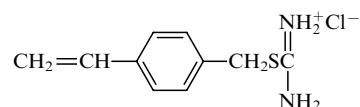
4. Синтез полимерных суспензий в присутствии поверхностно-активных функциональных инициаторов и ПАВ

В литературе описано применение полифункциональных инициаторов и ПАВ для синтеза полимерных суспензий с узким РЧР, используемых в иммунодиагностике. Однако их применение ограничено из-за их высокой стоимости и отсутствия промышленно разработанного способа производства.

Среди полифункциональных инициаторов, позволяющих получать на поверхности частиц суспензии активные функциональные группы, способные ковалентно связываться с биомолекулами, можно назвать динитрил азоизобромкапроновой кислоты (1) и ди-(4-хлорметилбензоил)пероксид (2).⁷⁸



Полифункциональными эмульгаторами служат соли изотомочевин, в частности гидрохлорид(4-этилфенил)метилизотомочевин.⁴¹



Последний является катиоактивным эмульгатором, способным к сополимеризации с виниловыми мономерами. В его присутствии, в частности, были синтезированы полистирольные микросферы с диаметром 0.15–0.19 мкм и коэффициентом вариации 2.7%, содержащие на поверхности группы изотомочевин, в результате гидролиза которых в мягких условиях ($\text{pH} = 10–11$, 25°C , 10 мин) образуются меркаптановые группы.⁴¹ Было обнаружено, что в процессе гидролиза средний диаметр частиц и их РЧР практически не изменяются.

Полимерные суспензии, частицы которых содержат на поверхности альдегидные группы, можно синтезировать путем модификации других функциональных групп. Например, частицы полистирольных суспензий, полученные в присутствии полисахарида — декстрана, или аммонийной соли глицироизинозой кислоты в качестве стабилизатора, содержат на поверхности гликозидные группы.⁷⁹ При периодатном окислении в мягких условиях в углеводной молекуле происходит расщепление α -гликольных группировок и образование реакционноспособных групп, непосредственно реагирующих с аминокетонами белка.

И в том и в другом случае подбирают условия для синтеза полимерных суспензий с узким РЧР, стабильных при хранении и в физиологических растворах. Концентрация альдегидных групп на поверхности частиц суспензии, в свою очередь, определяется концентрацией стабилизатора и условиями окисления.

5. Синтез полимерных суспензий с карбоксильными группами на поверхности частиц

Основным и наиболее изученным методом получения полимерных суспензий с карбоксильными группами на поверхности частиц является сополимеризация гидрофобных мономеров с различными ненасыщенными кислотами (акриловой, метакриловой, итаконовой и т.д.), которую проводят в присутствии или в отсутствие эмульгатора. Наличие на поверхности микросфер легко диссоциирующих карбоксильных групп сообщает частицам дополнительную стабилизацию, повышенную устойчивость к механическим воздействиям и к низкой температуре (к замораживанию).^{11, 80–83}

Весьма важным вопросом при синтезе карбоксилсодержащих полимерных суспензий является распределение карбоксильных групп между водной фазой, поверхностью и объемом полимерных частиц. При исследовании безэмульгаторной сополимеризации стирола с тремя различными по гидрофильности ненасыщенными кислотами — акриловой

(АК), метакриловой (МАК) и итаконовой (ИК) было установлено,^{84, 85} что АК сконцентрируется в поверхностной зоне частиц, более гидрофобная МАК распределяется в объеме микросфер и на их поверхности, а наиболее гидрофильная ИК преимущественно гомополимеризуется в водной фазе. Эти особенности распределения акриловых мономеров между фазами эмульсионной системы определяют свойства полученных суспензий.

Аналогичные сведения приведены в работах^{86, 87}, посвященных изучению распределения карбоксильных групп в частицах суспензии, полученных путем сополимеризации акриловых мономеров со стиролом и бутадиеном. Было обнаружено, что функциональные группы распределены между водной фазой, поверхностью микросфер и их объемом в отношении 2:3:1 для акриловой и 0.1:1:1 для метакриловой кислот.

Таким образом, очевидно, что обычный способ проведения сополимеризации гидрофобных мономеров с ненасыщенными кислотами приводит к полимерным суспензиям, в частицах которых функциональные группы распределены по различным фазам полимеризационной системы.

Распределение карбоксильных групп между поверхностью частиц и их объемом можно изменить путем постепенного введения функционального мономера в реакционную систему. Было показано,^{88, 89} что при добавлении итаконовой кислоты на начальной стадии сополимеризации стирола на поверхности сополимерных частиц содержится только 12% звеньев итаконовой кислоты, а при введении ее на стадии, когда конверсия стирола достигает уже 80 и 95%, приводит к возрастанию концентрации функционального сомономера на поверхности частиц до 60 и 80% соответственно.

Другой метод получения полимерной суспензии с высокой концентрацией карбоксилсодержащего сомономера на поверхности частиц — затравочная безэмульгаторная сополимеризация стирола и бутадиена с ненасыщенными кислотами (АК, МАК и ИК)⁹⁰ при изменяющемся в процессе синтеза pH среды. На первой стадии, проводимой при низком значении pH, вводят все ингредиенты (включая кислоту) и лишь часть основных мономеров. Затем повышают pH затравочного латекса, вследствие чего происходит ионизация карбоксильных групп, расположенных в поверхностном слое частиц. На второй стадии проводят затравочную сополимеризацию оставшихся мономеров.

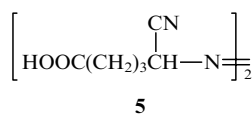
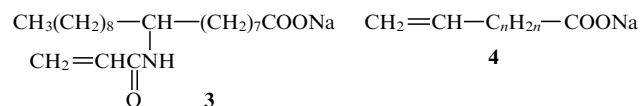
Возможным методом увеличения концентрации карбоксильных групп на поверхности полимерных микросфер некоторые авторы (см., например,⁹¹) считают нагревание суспензии при высоких pH для обеспечения миграции ионизованных карбоксильных групп, находящихся в объеме частиц, на границу с водной фазой.

Наличие МАК или АК в смеси мономеров предполагает получение эмульсий, характеризующихся более высокой дисперсностью, чем эмульсии гидрофобных мономеров из-за более низкого значения межфазного натяжения (σ_{12}). Выполненные в работе⁹² исследования показали, что МАК снижает поверхностное натяжение на границе стирольный раствор МАК — вода до $22 \text{ мН} \cdot \text{м}^{-1}$ при концентрации МАК, равной 2 мас.% в расчете на стирол. Дисперсный анализ стирол-метакриловых эмульсий, полученных при концентрациях МАК, равных 0.2 и 3.0 мас.% в расчете на стирол, показал, что в первом случае эмульсия мономеров состоит из капель размером 1–5 мкм, а во втором — из капель, размером 0.2–1.0 мкм.

Дисперсность исходной эмульсии мономера отражается на распределении ПМЧ. Так, при иницировании сополимеризации стирола и МАК персульфатом калия при концентрации МАК в эмульсии, равной 0.2 мас.% в расчете на стирол, образуется полимерная суспензия, 90% частиц которой имеет средний диаметр 0.6 мкм, а при концентрации МАК, равной 3 мас.% в расчете на стирол, 85% частиц имеют средний диаметр 0.3 мкм. При сополимеризации

стирола и МАК в тех же условиях, но в присутствии ди-*n*-толилкарбалкоксифенилкарбинола — стабилизатора, нерастворимого в воде, — удалось получить полимерные суспензии с более узким распределением частиц тех же размеров. Данные суспензии характеризовались устойчивостью в физиологическом растворе и при хранении в течение 6 мес.

Синтез функциональных микросфер с карбоксильными группами на поверхности также осуществляют путем полимеризации и сополимеризации поверхностно-активных мономеров,^{93–103} например, акриламидостеарата натрия (3)⁹³ и солей винилалкилкарбоновых кислот 4;⁷⁸ или поверхностно-активных инициаторов, например, 5,5'-азобис-5-цианпентаановой кислоты (5).⁷⁸



Однако ввиду высокой стоимости эти полифункциональные компоненты не нашли широкого применения.

Новым интересным методом синтеза полимерных суспензий с карбоксильными группами на поверхности частиц является полимеризация стирола в присутствии ПАВ, нерастворимых в воде и содержащих карбоксильные группы. К таким ПАВ относятся: ДТК, олигомерные пероксиэфир, α -(карбоксизтил)- ω -(триметилсилокси)полидиметилсилоксан (ПДС).⁹⁵

В работах^{94, 95} высказана гипотеза о том, что образование ПМЧ происходит из капель мономера, причем ПМЧ имеют структуру, подобную наблюдаемой в частицах типа «ядро-оболочка», где оболочка представляет собой ПАВ, вытесненное полимером на границу раздела фаз. Показано, что прочность межфазного слоя зависит от молекулярной массы образующегося полимера, концентраций инициатора (в данном случае персульфата калия) и ПАВ.⁹⁵

Распределение частиц по размерам в полимерных суспензиях, полученных в присутствии нерастворимых в воде ПАВ, значительно уже, чем у суспензий, полученных в присутствии ПАВ, растворимых в воде. Это, в первую очередь, исключает возможность образования ПМЧ из мицелл эмульгатора или клубков молекул ПАВ в водной фазе эмульсии.

В присутствии нерастворимых в воде ПАВ были получены полистирольные, полиметилметакрилатные, полихлоропреновые и полистиролметакрилатные суспензии с узким распределением частиц по размерам. Например, полистирольные микросферы имели диаметры в интервале от 0.2 до 0.9 мкм (содержание сухого вещества в суспензии колебалось от 8 до 33% при концентрации ПАВ и персульфата калия соответственно 1–4 и 0.5–1.0 мас.% в расчете на стирол). Синтезированные полимерные суспензии отличались высокой устойчивостью в физиологическом растворе и при хранении, они нашли широкое применение в иммунохимических исследованиях.⁹⁶

6. Синтез полимерных суспензий с амидными группами на поверхности частиц

Для синтеза амидсодержащих полимерных суспензий чаще всего применяют безэмульгаторную сополимеризацию стирола с амидами акриловой и метакриловой кислот.^{2, 25, 104–106}

Наиболее подробно изучена безэмульгаторная сополимеризация стирола и акриламида (АА), взятого в количестве

0.1–0.5 мас.% (в расчете на стирол) при pH = 9 (см.¹⁰⁶). Авторы разделяют процесс сополимеризации на три стадии: 1) сополимеризация мономеров в водной фазе с образованием олигомеров; 2) полимеризация стирола в частицах, образованных из этих олигомеров; 3) сополимеризация АА с растворенным в водной фазе стиролом.

При изучении процесса сополимеризации стирола и АА особое внимание уделяют распределению амидных групп между водной и полимерной фазами (вследствие высокой гидрофильности АА в водной среде всегда присутствует значительное количество водорастворимого гомополимера).^{107, 108} Частицы полученных полимерных суспензий имеют диаметр в интервале от 0.2 до 0.5 мкм и коэффициент вариации < 3%.

7. Синтез полимерных суспензий с гидроксильными группами на поверхности частиц

Полимерные суспензии с гидроксильными группами на поверхности частиц получают безэмульгаторной сополимеризацией стирола с 2-гидроксиэтилметакрилатом и 2-гидроксиэтилакрилатом.^{106–108} Важным свойством указанных мономеров является отсутствие у них ионизирующихся групп, что позволяет изменять гидрофильные свойства поверхности полимерных микросфер без изменения ее заряда. Это особенно удобно при подборе оптимальных условий связывания биомолекул.^{109–111}

Полимерные микросферы с высокой концентрацией функциональных групп на поверхности получают методом затравочной сополимеризации с постепенным введением смеси стирола и ГЕМА, взятых в определенном соотношении.^{112–114} В качестве затравочной суспензии используют полистирольные частицы с диаметром 0.3–0.9 мкм и узким РЧР. Этим способом получают полимерные суспензии с размерами частиц 0.6–1.1 мкм и коэффициентом полидисперсности 1.0003–1.0006.

8. Синтез полимерных суспензий с аминогруппами на поверхности частиц

Синтез аминоксодержащих полимерных суспензий путем полимеризации таких функциональных мономеров, как аминостирол,¹¹⁵ 2-аминоэтилакрилат, 2-диметиламиноэтилметакрилат и аллиламин,⁶⁶ применяется достаточно редко. Это связано с высокой стоимостью мономеров и низкой устойчивостью полимерных микросфер, полученных на их основе, а также с трудностью получения узкого распределения частиц по размерам вследствие высокой гидрофильности мономеров.^{116–124}

Значительно легче получить аминоксодержащие полимерные суспензии путем модификации готовых суспензий с гидроксильными, хлорметильными, амидными и другими группами. В качестве примера приведем синтез полимерных суспензий с аминогруппами на поверхности частиц методом дисперсионной каталитической полимеризации *n*-аминостирола. Полимеризацию *n*-аминостирола проводят в присутствии минеральных и органических кислот (с $pK_a \leq 4.76$) и органических растворителей (в количестве 10–80% в расчете на воду), которые смешиваются с водой и имеют диэлектрическую проницаемость меньшую, чем у воды.¹¹⁵ В результате полимеризации получают полиаминостирольные микросферы с диаметром от 0.6 до 10.0 мкм и узким распределением частиц по размеру.

Полимерные микросферы с диаметрами 0.2–3.5 мкм и коэффициентом полидисперсности не более 1.08 были также получены методом дисперсионной катионной полимеризации *n*-аминостирола в водно-метанольной среде при объемном отношении мономер:вода, равном 1:9, концентрации цетилпиридинийбромид — 1 мас.% в расчете на мономер,

концентрации катализатора (хлористого водорода) — 10 мас.% в расчете на мономер и температуре 60°C.

III. Активация функциональных групп на поверхности частиц полимерной суспензии

Методы активации функциональных групп на поверхности частиц полимерной суспензии, которые будут рассмотрены в этом разделе, широко используются в биохимии и биологии, в частности для получения сорбентов для аффинной хроматографии.^{89,90} Однако при получении высокочувствительного диагностикума эти методы активации должны удовлетворять следующим требованиям:²

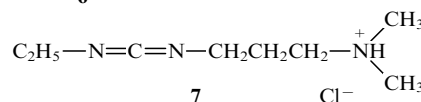
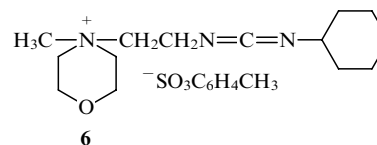
— проходить необратимо и количественно по возможности в более мягких условиях;

— не уменьшать стабильность суспензий и не оказывать заметного влияния на их диаметр и РЧР;

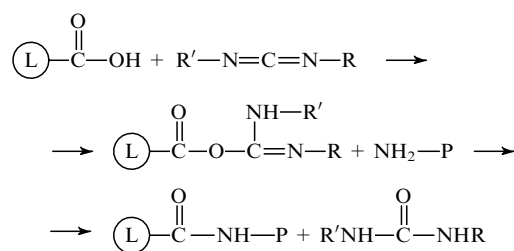
— не влиять на биохимическую активность молекул биолганда, ковалентно связанного с функциональными группами на поверхности частиц суспензии.

1. Методы активации карбоксильных групп

Карбоксильные группы на поверхности частиц суспензии могут вступать во взаимодействие с аминогруппами биополимера в присутствии водорастворимых карбодиимидов (ВРК).⁸⁰ Наиболее часто используемыми ВРК являются: толуолсульфонат 1-циклогексил-3-(2-(*N*-метилморфолино)-этил)карбодиимида (6) и гидрохлорид 1-(3-диметиламино-пропил)-3-этилкарбодиимида (7).



Реакция активации протекает по следующей схеме:

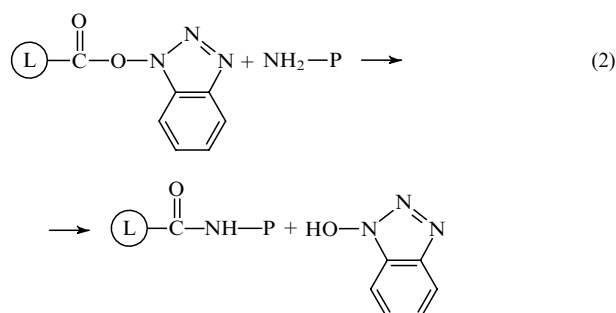
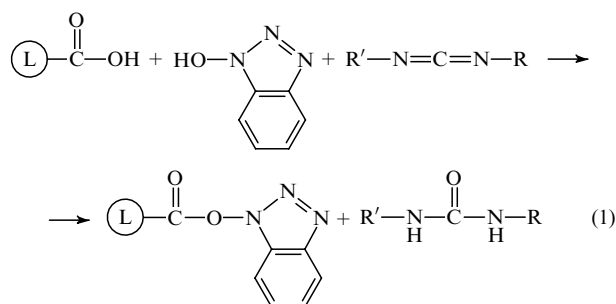


Реакцию проводят при температуре 4–6°C и pH 6–7 в течение 2–4 ч в отсутствие или присутствии инертного буфера типа *N*-2-гидроксиэтилпиперазин-*N*-этансульфоновой кислоты.

К преимуществам данного способа активации функциональных групп следует отнести его простоту. Однако из-за того, что белковые молекулы содержат как карбоксильные, так и аминогруппы, возможно протекание меж- и внутримолекулярного сшивания, что снижает иммунохимическую активность биолганда.^{26, 104, 125–128}

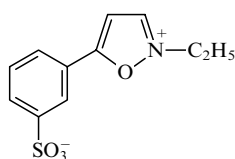
В значительной степени этот недостаток устраняется путем использования двухстадийных методов активации: на первой стадии карбоксильные группы переводят в активную (но стабильную) форму и микросферы отделяются от дисперсионной среды с оставшимися в ней непрореагировавшими компонентами, а на второй стадии проводят ковалентное связывание с биолгандами.

Среди наиболее распространенных двухстадийных методов активации функциональных групп можно привести так называемый метод «активированных эфиров». ^{2, 48, 129} Схема протекания процесса активации в этом случае выглядит следующим образом:



Кроме *N*-гидроксисбензтриазола могут быть использованы *N,N*-диалкилгидроксиламины и др. Условия реакции на первой стадии аналогичны описанным выше для «карбодиимидного» метода. После первой стадии проводится очистка суспензии от побочных продуктов. Вторая стадия протекает при температуре 4°C и pH = 7–7.5 в течение 2–3 дн, после чего проводят полную очистку полученного диагностикума от примесей.

Другим возможным способом проведения активации по двухступенчатой схеме может быть использование реактива Вудворда: *N*-этил-5-фенилизоксазолин-3'-сульфоната. ¹³⁰



В этом случае первую стадию проводят при pH 8.5 и температуре 3°C в течение 3 ч, полученные суспензии с активированными карбоксильными группами на поверхности частиц очищают от побочных продуктов и затем связывают с биолигандами при pH = 7, температуре 5°C в течение 3 ч.

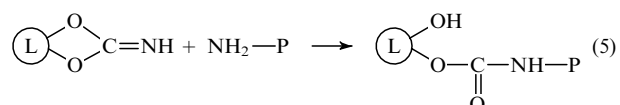
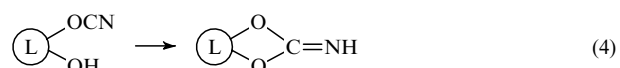
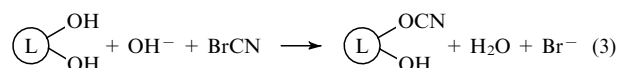
Общим недостатком перечисленных выше методов является высокая стоимость и малая стабильность при хранении используемых реактивов, что делает процесс связывания биомолекул с функциональными группами микросфер плохо воспроизводимым. Кроме того, при использовании указанных методов биомолекулы оказываются расположенными вблизи поверхности полимерных частиц, что может привести к изменению конформации и уменьшению их биохимической активности.

В связи с этим распространение получил метод введения спейсера в результате реакции карбоксильных групп частиц суспензии с различными диаминами (1,6-диаминогексаном, 1,7-диаминогептаном): ^{47, 131–133} на первой стадии проводят связывание карбоксильных групп на поверхности микросфер

с диамином в присутствии ВРК, после чего проводят активацию образовавшихся аминогрупп одним из методов, которые описаны ниже.

2. Методы активации гидроксильных групп

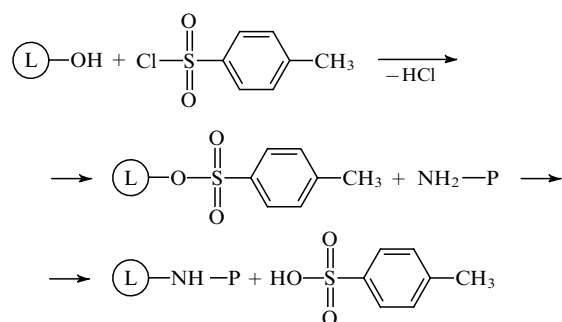
«Цианоген-бромидный» метод активации гидроксильных групп заключается в первоначальном взаимодействии их с бромцианом в сильнощелочных средах (pH 10–11) с последующим связыванием с аминогруппами белковых молекул. ¹³⁴



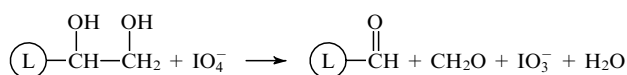
Первые две стадии — (3) и (4) — протекают при 25°C в течение 15 мин с периодическим добавлением 2 N раствора гидроксида натрия для поддержания щелочного pH, после чего проводят очистку суспензии от побочных продуктов. Стадию (5) проводят в 0.1 М боратном буфере при pH 8.0–8.5 и температуре 4°C в течение 4 ч. Непрореагировавшие активированные гидроксильные группы связывают, добавляя 0.1 М глицинового буфера с pH 8.5, и проводят полную очистку суспензии.

Этот метод активации может быть использован только для ковалентного связывания биомолекул, устойчивых в сильнощелочных средах. К недостаткам метода следует отнести высокую токсичность бромциана и заметную агрегацию полимерных микросфер в процессе связывания биолигандов с функциональными группами.

Для активации гидроксильных групп могут быть применены и другие реактивы: тозилхлорид (см. ²), 2,2,2-трифторэтансульфонилхлорид ^{135, 136} и карбонилдидимидазол. ^{137, 138} Ниже для примера приведена схема активации гидроксильных групп с использованием тозилхлорида.



Весьма удобным методом активации гидроксильных групп является окисление гликольных групп, которые могут быть легко получены при гидролизе эпоксидных групп или окислении двойных связей в полидиенах (см. ниже). Микросферы с гликольными группами на поверхности микросфер получают, как это было сказано ранее, при полимеризации стирола в присутствии декстринов в качестве функциональных ПАВ. ¹³⁹ Окисление проводят иодной кислотой или ее солями при комнатной температуре и нейтральном pH в течение 30–60 мин в темноте. ^{50, 140, 141} В реакцию вступают только гликоли с первичными и вторичными гидроксильными группами, при этом происходит разрыв связи C–C с образованием двух альдегидных групп.

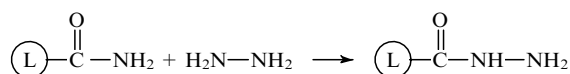


Побочные продукты отделяются на стадии очистки полимерных микросфер.

3. Методы активации амидных групп

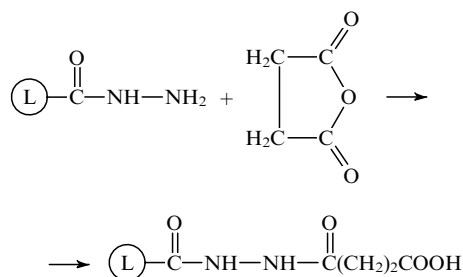
Хотя амидные группы непосредственно не взаимодействуют с белковыми молекулами, существует ряд методов полимер-аналогичных превращений, позволяющих получить на основе амидосодержащих полимерных суспензий микросферы с другими легкоактивируемыми группами.

Так, широко используется модификация амидогрупп до гидразидных.^{27, 46} Реакция протекает при температуре 50–80°C в течение 7–10 ч по схеме:

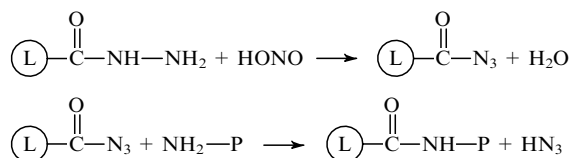


Образующиеся в результате реакции гидразиновые группы могут быть переведены либо в карбоксильные, которые требуют дальнейшей активации, либо в азидные, способные непосредственно взаимодействовать с биомолекулами.

Первая реакция может быть осуществлена путем взаимодействия гидразидных групп с янтарным ангидридом.^{142, 143}



Для получения азидосодержащих полимерных суспензий используется реакция диазотирования, протекающая в присутствии азотистой кислоты при пониженной температуре (2–5°C).²⁷ После чего возможно непосредственное взаимодействие биомолекул с азидными группами на поверхности микросфер (pH 7.0–9.5, время — 4 ч).



Следует отметить, что гидразиновые группы могут быть активированы теми же способами, что и аминогруппы.

Другим возможным способом модификации амидосодержащих полимерных суспензий является перевод амидогрупп в первичные аминогруппы под действием гипохлорита натрия в щелочных условиях (реакция Гофмана^{139, 140}). В работах^{143, 144} были исследованы факторы, влияющие на этот процесс. Показано, что кроме превращения амидогрупп в аминогруппы, в заметной степени протекает гидролиз с образованием карбоксильных групп, причем степень гидролиза увеличивается при повышении температуры и уменьшении соотношения NaOCl:полиамид. Определены оптимальные условия, позволяющие получить максимальное количество аминогрупп на поверхности частиц суспензии: соотношение концентраций гипохлорита

и амидных групп — 0.6–0.9; температура — 5–10°C и время проведения процесса — 1–2 ч. Показано, что при этих условиях модификации функциональных групп практически не изменяют диаметр частиц суспензии и их РЧР. Данный метод был применен для ковалентного связывания амидных групп, расположенных на поверхности частиц акриламид-стирольных сополимерных суспензий с ферментами (с использованием глутарового альдегида для активации полувившихся аминогрупп).¹⁰⁴

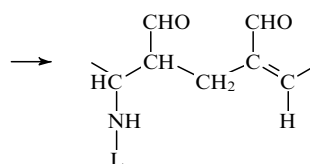
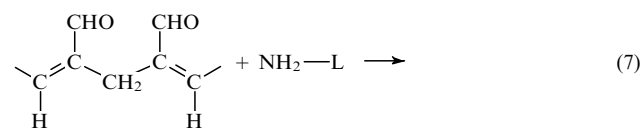
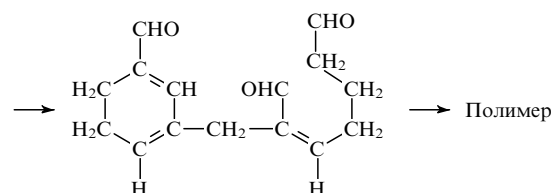
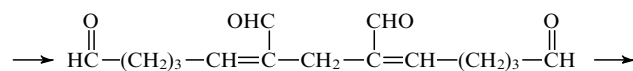
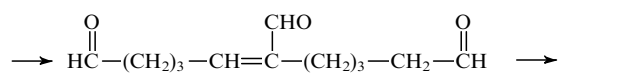
Перевод амидогрупп в карбоксильные, который бывает необходим для повышения стабильности микросфер, может быть осуществлен их гидролизом в щелочной среде в мягких условиях (30°C, 3–4 ч).¹⁴⁴ Степень гидролиза, а следовательно, и концентрация карбоксильных групп на поверхности частиц суспензии, может варьироваться в зависимости от времени проведения процесса, что дает возможность получать частицы с различной концентрацией карбоксильных групп на поверхности.

Наконец, полимерные дисперсии с гидроксильными группами могут быть получены исходя из амидосодержащих суспензий путем их гидроксиметилирования. Реакция протекает в течение 1 ч при 50°C и pH ≥ 12.0. На примере безэмульгаторной сополимеризации стирола и акриламида, взятых в отношении 9:1 (по массе) с последующей модификацией амидных групп в гидроксильные показано, что получают устойчивые монодисперсные микросферы диаметром 220 нм с концентрацией гидроксильных групп на поверхности частиц, равной 4.58 OH-групп на 1 нм² (см.¹⁴⁴).

4. Методы активации аминогрупп

Полимерные суспензии, содержащие первичные аминогруппы на поверхности микросфер вследствие высокой реакционной способности аминогрупп могут быть легко активированы различными дифункциональными соединениями.

Наибольшее распространение получил метод активации при помощи глутарового альдегида, что связано как с легкостью проведения реакции активации, так и с доступностью самого реактива. Первичная аминогруппа взаимодействует с глутаровым альдегидом по следующей схеме:^{145, 146}



Активация может осуществляться в одну или две стадии.¹⁴⁷ При одностадийном способе активации связывание биолиганда с аминогруппами частиц осуществляется при избытке глутарового альдегида. Хотя метод является весьма простым, в процессе активации наблюдается заметная агрегация полимерных микросфер вследствие их сшивания.

Более предпочтительной является двухстадийная активация. На первой стадии происходит олигомеризация глутарового альдегида (6) и взаимодействие с аминогруппами на поверхности полимерных микросфер (7). После очистки суспензии от побочных продуктов реакции происходит ковалентное связывание с биолигандами. Первую стадию проводят при температуре 20–25°C в 0.01 М фосфатном буфере (pH 7.0) в течение 1 ч.²⁴ После удаления избытка непрореагировавшего глутарового альдегида путем диализа (24 ч против системы 0.01 М фосфатный буфер — 0.01 М солевой буфер, pH 7.0) молекулы биолиганда связывают с функциональными группами микросфер в течение 5 ч при 25°C. После этого непрореагировавшие альдегидные группы на поверхности микросфер блокируют 0.1 моль · л⁻¹ раствором глицина при pH 7.0 и очищают полученную тест-систему. Этот метод активации позволяет избежать меж- и внутримолекулярных сшиваний биолигандов, а также предотвратить агрегацию функциональных микросфер.²⁴

Вместо глутарового альдегида могут быть также использованы другие бифункциональные соединения: 1,5-дифтор-2,4-динитробензол, 4,4'-дифтор-3,3'-динитрофенилсульфон, 2,4-дихлор-6-карбоксиметилсульфон.^{148, 149} Недостатками этих методов является высокая стоимость реагентов, а также длительное время проведения реакции ковалентного связывания функциональных групп с биомолекулами (4–7 дн).² В то же время указанные методы позволяют получать тест-системы с более воспроизводимыми свойствами по сравнению с тест-системами с использованием глутарового альдегида, свойства которых определяются условиями и сроком его хранения (возможно протекание полимеризации).

Следует отметить, что возможным способом связывания антител и ферментов, имеющих полисахаридные остатки, с аминогруппами на поверхности частиц полимерной суспензии является активация не аминогрупп, а обработка самого биолиганда иодной кислотой или ее солями.¹⁰⁴ В результате окисления гликолевых группировок полисахаридов в структуре биомолекул появляются реакционноспособные альдегидные группы, которые в дальнейшем могут вступать во взаимодействие с аминогруппами на поверхности полимерных микросфер. Показано,¹⁰⁴ что при использовании этого метода для связывания ферментов глюкозооксидазы и глюкопероксидазы удается сохранить до 40% их активности (по сравнению с 10% активности для других методов, в частности карбодиимидного).

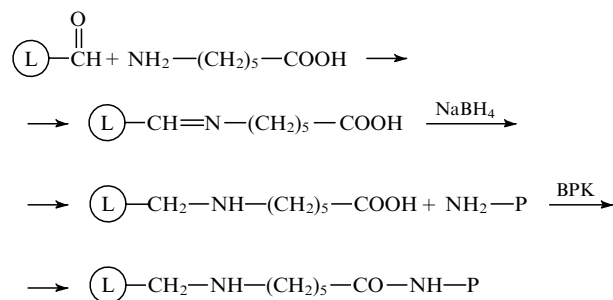
5. Методы модификации хлорметильных, эпоксидных и альдегидных групп

В данном разделе будут рассмотрены полимераналогичные превращения с участием функциональных групп, способных к непосредственному взаимодействию с биолигандами. Проведение таких реакций часто бывает необходимым либо для введения дополнительной спейсерной группы между полимерной частицей и биомолекулой для сохранения биохимической активности последней, либо для генерации на поверхности частиц суспензии химических групп, которые могут сохранять свою реакционную способность в процессе получения и хранения микросфер (например, перевод эпоксидных и хлорметильных групп в альдегидные).

Модификацию альдегидных групп чаще всего проводят для введения спейсера. Для этой цели используют реакцию с диаминами и последующую активацию групп NH₂ глутаровым альдегидом. Следует отметить, что образующееся в

результате взаимодействия первичной аминной и альдегидной групп основание Шиффа, содержащее фрагмент CH=N, является нестабильным при низких значениях pH. Поэтому его часто восстанавливают до CH₂NH действием мягких восстановителей типа борогидрида натрия (25°C, 30 мин).^{37, 38}

Для модификации альдегидсодержащих суспензий используют также реакцию альдегидных групп с аминокислотами (например, 6-амино-*n*-капроновой кислотой).^{35, 150} В этом случае в результате реакции на поверхности полимерных микросфер появляются карбоксильные группы.



Модификацию хлорметильных групп необходимо осуществлять как для введения спейсера, так и для предотвращения реакции гидролиза, протекающей в заметной степени при высоких значениях pH (см.³¹). В первом случае могут быть использованы те же способы, что и для альдегидных групп.^{28, 29, 34} Реакцию проводят в нейтральных или слабощелочных средах при температуре 30–40°C в течение 1–2 ч.

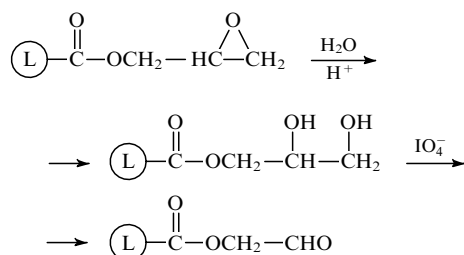
Хлорметильные группы являются весьма реакционноспособными с выраженными электрофильными свойствами,³² что позволяет проводить полимераналогичные превращения для придания функциональным микросферам дополнительных ценных свойств: стабильность при хранении, гидрофильность поверхности и т.д.¹⁵¹ Чаще всего хлорметильные группы превращают в альдегидные. Функциональные группы, находящиеся на поверхности частиц полимерной суспензии, модифицируют иодатами в водном растворе хромовой кислоты,^{117, 151–153} а также окислительным алкилированием под действием натриевой соли 2-нитропропана.^{154–156}

В последнем случае метилат натрия и 2-нитропропан постепенно добавляют к поли(стиролхлорметильной) сополимерной суспензии. Реакция идет при комнатной температуре в течение 2 ч, после чего модифицированные сополимерные микросферы очищают от непрореагировавших компонентов и побочных продуктов реакции. Показано, что в этих условиях практически все хлорметильные группы окисляются до альдегидных, причем модификация практически не сказывается на диаметре и РЧР конечных полимерных частиц. Сравнение реакционной способности исходных хлорметильных и полученных альдегидных групп в реакции связывания иммуноглобулина G человека, показало, что последние лучше связывают антитела и обеспечивают большую чувствительность диагностикума.

Как уже отмечалось, эпоксидные группы могут гидролизаться, особенно при низких значениях pH. Эпоксидные группы подвергают дальнейшей модификации как с целью получения более стабильных групп на поверхности частиц, так и для введения дополнительной спейсерной группировки.

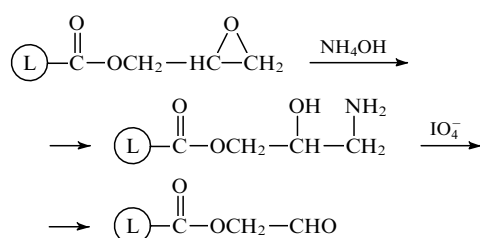
Вследствие высокой реакционной способности эпоксидные группы принимают участие в различных полимераналогичных превращениях.⁴⁰

Так, гидролиз эпоксидных групп при pH 2 и температуре 50°C приводит к гликолевым группам, которые затем легко превращаются в альдегидные под действием иодной кислоты.

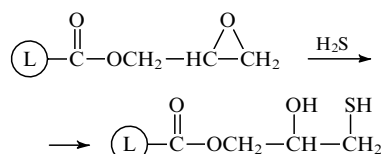


Следует отметить, что в результате гидролиза удастся получить до 60% гликолевых групп от теоретически возможного (исходя из концентрации эпоксидных групп на поверхности частиц суспензии), причем диаметр и РЧР частиц практически не изменяются: 440 нм и КВ = 3.9% для исходных и 475 нм и КВ = 5.8% для модифицированных частиц.

Еще легче протекает реакция эпоксигрупп с гидроксидом аммония (реакция аммонолиза) при 20°C.



Эпоксидные группы на поверхности частиц суспензии могут быть модифицированы до тиоловых реакцией с водным раствором сероводорода, проходящей в мягких условиях (20°C, 2–4 ч).



Однако в этом случае авторы отмечают заметную агломерацию модифицируемых частиц (коэффициент вариации 15.5%).

Возможна также модификация эпоксидных групп на поверхности микросфер путем введения спейсера при их взаимодействии с диаминами или аминокислотами (см. выше).

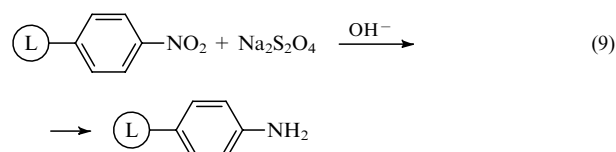
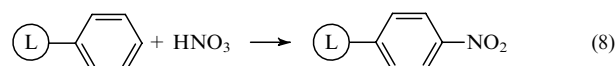
6. Методы получения полистирольных суспензий с узким распределением частиц по размерам и функциональными группами на поверхности частиц

Полистирольные суспензии нашли наиболее широкое применение в иммунодиагностических исследованиях. Это обусловлено тем, что полимеризация стирола наиболее хорошо изучена и поэтому микросферы требуемого диаметра с узким РЧР могут быть легко получены.^{3–5, 157–175} Здесь целесообразно рассмотреть способы синтеза функциональных полистирольных суспензий с частицами заданного диаметра и узким РЧР.

Полистирольные микросферы с гидроксильными группами на поверхности получают в две стадии: на первой стадии проводят безмульгаторную полимеризацию стирола, инициированную персульфатом калия, и получают монодисперсные устойчивые в физиологических растворах суспензии, частицы которых содержат на поверхности сульфатные группы. На второй стадии сульфатные группы превращают в гидроксильные путем гидролиза в щелочной среде (рН 9–10, 50–70°C, 2–5 ч).^{176, 177} Образующиеся в

результате реакции гидроксильные группы можно либо дальше модифицировать цианобромидным методом, либо окислять их в присутствии ионов Ag^+ (50°C, 5 ч)¹²⁷ до карбоксильных групп с последующей их активацией. Следует отметить, что гидролиз ионогенных сульфатных групп до недиссоциирующих гидроксильных сопровождается резким снижением устойчивости модифицированных микросфер вследствие уменьшения электростатического отталкивания между частицами. Поэтому для предупреждения возможной коагуляции следует вводить негидролизуемые сульфонатные группы.^{32, 175, 178}

Получение полистирольных частиц с аминогруппами на поверхности представляет собой еще более сложный и трудоемкий процесс.^{179, 180}



Первую стадию (8) проводят в ледяной уксусной кислоте при постепенном введении концентрированной азотной кислоты при комнатной температуре в течение 4 ч.

Затем полимерные частицы декантируют от нитрующей смеси и промывают. Вторую стадию (9) проводят в этаноле под действием дитионита натрия при 40°C в течение 2 ч. Полистирольные микросферы с аминогруппами на поверхности могут быть затем активированы одним из описанных выше способов. Очевидно, что во всех стадиях процесса существуют очень жесткие требования по устойчивости полистирольных суспензий, поэтому для описанного способа модификации могут быть использованы лишь частицы со сшитой структурой (сополимер стирола с 2–5% дивинилбензола) и диаметром не менее 0.8 мкм (они могут быть достаточно легко редиспергированы).²

Оригинальный способ связывания биоллигандов с полистирольными микросферами был предложен Баргом.¹³⁸ Этот метод позволяет избежать каких-либо химических воздействий на поверхность полистирольных частиц, и, таким образом, сохранить их стабильность. На первой стадии данного процесса на полистирольные частицы заданного диаметра с узким РЧР адсорбируют бычий сывороточный альбумин (БСА), а затем суспензию обрабатывают бифункциональными соединениями (глутаровым альдегидом, диэтиладипинимидатом и др.) с целью сшивания молекул белка и прочной их фиксации на поверхности микросфер. После этого возможно дальнейшее связывание биомолекул через amino- или карбоксильные группы БСА.

7. Методы активации полидиеновых микросфер

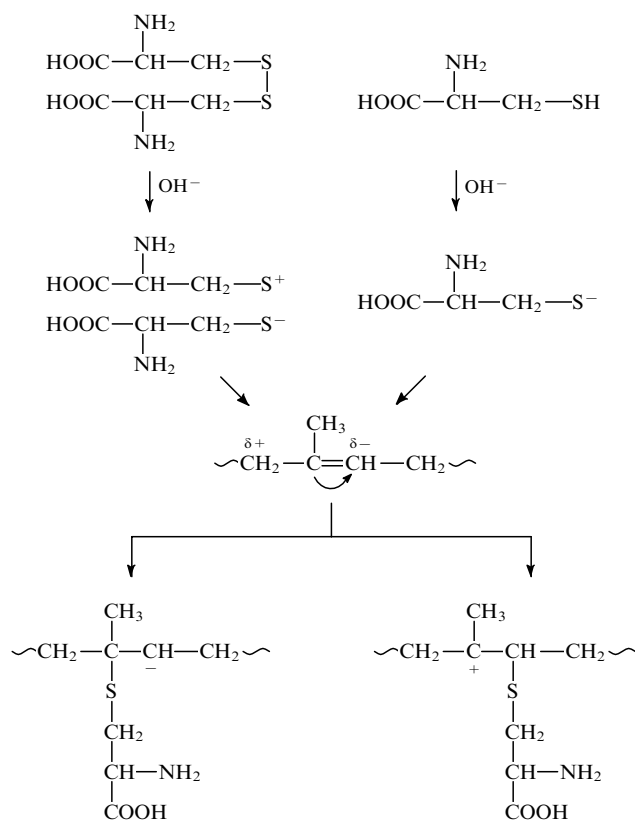
Основной особенностью полидиеновых микросфер является наличие двойных связей, которые могут подвергаться дальнейшей модификации.^{139, 140} Однако хорошая пленкообразующая способность диеновых полимеров обуславливает низкую устойчивость микросфер в процессе их очистки методами ультрафильтрации, микрофильтрации и центрифугирования.² В связи с этим для синтеза функциональных полимерных суспензий применяется сополимеризация диенов (бутадиена, изопрена и др.) со стиролом при их различных соотношениях.

Возможным способом введения гидроксильных групп в полидиен-стирольные микросферы (например, полиизопрен-стирольные) является окисление двойных связей полидиена с

использованием таких окислителей как перманганат калия и пероксид водорода.^{181–187} Окисление проходит в мягких условиях (pH 3–7; 5–10°C, 30 мин). Образующиеся в результате реакции гликолевые группы могут быть подвергнуты дальнейшей активации.

Большой интерес представляет реакция окисления двойных связей полибутадиена и полиизопрена до эпоксидных групп^{188,189} путем взаимодействия последних с надуксусной кислотой при пониженных температурах. Показано, что скорость и степень эпексидирования в значительной степени зависят от содержания полимера в суспензии и от концентрации надуксусной кислоты и не зависят от природы ПАВ, размера полимерных частиц и скорости перемешивания. Было найдено, что оптимальными условиями проведения окисления являются: концентрация полимера в суспензии — 15–30%, концентрация надуксусной кислоты — 2–3 мас.% при времени проведения реакции 2–3 ч. В литературе имеются также данные об эпексидировании непредельных полимеров смесью пероксида водорода и муравьиной кислоты.¹⁸⁹

Большой интерес с точки зрения модификации полидиеновых микросфер представляет использование тиосоединений, содержащих сульфгидрильную группу, легко взаимодействующую с двойными связями полидиеновых соединений. Известно,¹⁹⁰ что тиогликоли и тиоамины применяются для улучшения пластических свойств полибутадиеновых каучуков. В связи с этим привлекает внимание возможность модификации полидиеновых суспензий тиоловыми соединениями, содержащими различные функциональные группы, например, серосодержащими аминокислотами. Так, в литературе имеются данные¹⁹¹ по модификации искусственной дисперсии полиизопрена СКИ-3 серосодержащими аминокислотами. Показано, что такие аминокислоты, как цистин и цистеин, вследствие наличия у них реакционноспособных дисульфидной и сульфгидрильной групп, способны к непосредственному связыванию с частично поляризованными двойными связями 1,4-*цис*-полиизопрена, протекающему по ионному механизму.



Описано получение полимерных суспензий с аминогруппами на поверхности частиц путем их модификации серосодержащими аминокислотами.¹⁹² Предложен метод получения модифицированных суспензий, включающий три независимые стадии: на первой осуществляют синтез затравочных полистирольных частиц заданного диаметра с узким РЧР, на второй стадии проводят затравочную полимеризацию изопрена, обеспечивающую высокую концентрацию полиизопреновых звеньев на поверхности частиц, и на третьей стадии модифицируют полученные изопрен-стирольные полимерные суспензии со структурой «ядро–оболочка» цистеином.

Проведение всех стадий процесса в контролируемых условиях позволило получить полимерные суспензии с широким диапазоном диаметров (0.1–2.0 мкм), с узким РЧР (1–5%) и высокой концентрацией аминогрупп на поверхности частиц.

Показано, что варьируя условия проведения модификации, можно контролировать свойства получаемых суспензий, что особенно важно при подборе оптимальных условий иммобилизации белковых молекул и дальнейшем использовании модифицированных суспензий в иммунодиагностике.

* * *

Приведенные выше данные показывают, что при синтезе функциональных полимерных суспензий, пригодных для иммунодиагностических исследований, основным этапом является реакция гетерофазной полимеризации. Выбор условий ее проведения определяет стабильность суспензий, диаметр частиц и их распределение по размерам. Функциональные группы на поверхности микросфер получают как в процессе синтеза, так и путем модификации полученных полимерных суспензий.

Несмотря на большое количество предлагаемых способов получения функциональных суспензий, работы в этом направлении продолжают активно развиваться.^{193–218} Это обусловлено поиском условий технологически простого способа получения суспензий с применением доступных реагентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 94-03-08987).

Литература

1. R.E.Wachtel, V.R.La Mer. *J. Colloid Interface Sci.*, **17**, 531(1962)
2. *Uniform Latex Particles*. (Ed. L.B. Bang). Seradyn Inc., Indianapolis, 1984
3. J.Ugelstad, H.R.Mfutakamba, P.C.Mork, T.Ellingsen, R.Berge, L.Holm, R.Schinid, A.Jorgedal, F.K.Hansen, K.Nustad. *J. Polym. Sci., Polym. Symp.*, **72**, 225 (1985)
4. S.K.Ober, K.P.Lok, M.L.Hair. *J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.*, **23**, 103 (1985)
5. W.M.Brouwer. *J. Appl. Polym. Sci.*, **38**, 1335 (1989)
6. *Microspheres: Medical and Biological Applications*. (Eds A.Rembaum, Z.Tokes). CRC Press, Boca Raton, FL, 1988
7. *Polymeric Nanoparticles and Microspheres*. (Eds P.Guiot, P.Couvreur). CRC Press, Boca Raton, FL, 1986
8. L.Illum, S.D.Davis. *J. Parent. Sci. Tecnol.*, **36**, 242 (1982)
9. S.D.Davis, L.Illum. *Br. Polym. J.*, **15**, 160 (1983)
10. H.Zecha. *Makromol. Chem. Makromol. Symp.*, **31**, 169 (1990)
11. J.Hearn, M.C.Wilkinson, A.R.Goodall. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **14**, 173 (1981)
12. Н.П.Елинов. *Химическая микробиология*. Высшая школа, Москва, 1984
13. J.M.Singer, C.M.Plotz. *Am. J. Med.*, **21**, 888 (1956)
14. Пат. 3234096 США. (1966)
15. W.P.L.Severin. *J. Clin. Path.*, **25**, 1079 (1972)
16. M.Leinonen, E.Herva. *Scand. J. Infect. Dis.*, **26**, 187 (1977)
17. A.Bernard, J.Vyskogil, R.Lauwerys. *J. Clin. Chem.*, **27**, 832 (1982)

18. L.De Coster, S.Cambiaso, J.R.Masson. *The Riogenology*, **13**, 433 (1980)
19. J.M.Singer. *Am. J. Med.*, **31**, 766 (1961)
20. D.Collet-Cassard, M.Mareschall, R.Sindic, P.Tomassy, J.R.Masson. *Clin. Chem.*, **29**, 1127 (1983)
21. J.M.Singer, I.Oreskes, F.Hutterer, J.Ernst. *Ann. Rheumatic Dis.*, **22**, 424 (1963)
22. L.Bonacker, J.Staerk. *Prog. Immunol. Stand.*, **5**, 70 (1972)
23. Пат. 3992517 США (1976)
24. S.P.S.Yen, A.Rembaum, R.W.Molday, W.Dreyer. *Emulsion Polym.*, 236 (1976)
25. A.Rembaum, S.P.S.Yen, R. S. Molday. *J. Macromol. Sci.-Chem.*, **A13**, 603 (1979)
26. Пат. 3857931 США (1974)
27. Пат. 4046723 США (1977)
28. Пат. 4060597 США (1977)
29. Пат. 4226747 США (1980)
30. S.Margel, E.Nov, I.Fisher. *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.*, **29**, 347 (1991)
31. M.Shahar, H.Meshylam, S.Margel. *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.*, **24**, 203 (1986)
32. D.A.Upton. *J. Polym. Sci., Polym. Symp.*, **72**, 45 (1985)
33. M.Okubo, K.Ikegami, Y.Yamamoto. *Colloid Polym. Sci.*, **267**, 193 (1989)
34. C.H.Suen, H.Moravetz. *Macromolecules*, **17**, 1800 (1984)
35. Y.Changhong, X.Zhang, Z.Sun, H.Kitano, N.Ise. *J. Appl. Polym. Sci.*, **40**, 89 (1990)
36. M.Kumakura, I.Kaetsu. *Colloid Polym. Sci.*, **262**, 450 (1984)
37. S.Margel. *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **22**, 3521 (1984)
38. S.Margel, A.Rembaum. *Macromolecules*, **13**, 19 (1980)
39. B.Schlund, T.Pith, M.Lambla. *Macromol. Chem. Suppl.*, **10/11**, 419 (1985)
40. A.Rembaum, M.Chang, J.Richards, M.Li. *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **22**, 609 (1984)
41. E.Zurkova, K.Bouchal, D.Zdenkova, Z.Pelzbayer, F.Svec, J.Kalal, H.G.Batz. *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **21**, 2949 (1983)
42. K.Yamaguchi, S.Watanabe, S.Nakahama. *Macromol. Chem., Rapid Commun.*, **10**, 397 (1989)
43. Пат. 4140662 США (1979)
44. Пат. 15841 Европа (1980)
45. Пат. 2363459 Франция (1981)
46. Пат. 2378094 Франция (1982)
47. L.Johansen, K.Nustad, T.B.Orstavik, J.Ugelstad, A.Berge, T.Ellengsen. *J. Immunol. Methods*, **59**, 255, (1983)
48. R.S.Molday, W.J. Dreyer. *J. Cell. Biol.*, **64**, 75 (1975)
49. Пат. 4045384 США (1976)
50. C.Pichot. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **4**, 725 (1987)
51. Пат. 3847745 США (1974)
52. Пат. 2004892 Великобритания (1974)
53. S.Margel. *J. Eng. Chem. Prod. Res.*, **21**, 343 (1982)
54. Е.А. Дорохова. Дис. канд. хим. наук. МИТХТ, Москва, 1991
55. Ю.В.Лукин, И.А.Грицкова, А.Н.Праведников, В.И.Бахарев. *Докл. АН СССР*, **285**, 159 (1985)
56. А.с. 1565845 СССР (1990); *Бюл. изобрет.*, (19), 108 (1990)
57. А.с. 1565846 СССР (1990); *Бюл. изобрет.*, (19), 108 (1990)
58. А.с. 1685955 СССР (1991); *Бюл. изобрет.*, (39), 100 (1991)
59. D.Bastos, R.Santos, J.Forcada, R.Hidalgoalvarez, F.J.Delasnieves. *Colloid. Surf. A, Physicochem. Eng. Aspects*, **92**, 137 (1994)
60. I.A.Gritskova, S.A.Gusev, E.Grzywa, E.N.Teleshov, S.M.Shumanskii, S.M.Grzywa-Niksinska. *Polymey*, **36**, 229 (1991)
61. B.Charleux, P.Fanget, C.Pichot. *Makromol. Chem., Makromol. Chem. Phys.*, **193**, 205 (1992)
62. M.Okubo, Y.Kondo, M.Takahashi. *Colloid Polym. Sci.*, **271**, 109 (1993)
63. M.D.B.Oenick, A.Warshawsky. *Colloid Polym. Sci.*, **269**, 139 (1991)
64. S.Margel, E.Nov, I.Fisher. *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.*, **29**, 347 (1991)
65. Y.H.Huang, Z.M.Li, H.Moravetz. *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **23**, 795 (1985)
66. C.H.Suen, H.Moravetz. *Makromol. Chem.*, **186**, 255 (1985)
67. W.Funke. *Br. Polym. J.*, **21**, 107 (1989)
68. W.Funke. *J. Coat. Technol.*, **60**, 68 (1988)
69. S.Magnet, J.Guillot, A.Guyot, C.Pichot. *Prog. Org. Coat.*, **20**, 73 (1992)
70. C.Moberg, L.Rakos. *React. Polym.*, **16**, 171 (1992)
71. P.D.Verweij, D.C.Sherrington. *J. Mater. Chem.*, **1**, 371 (1991)
72. R.Arshady. *J. Chromatogr.*, **586**, 199 (1991)
73. D.Horak, F.Svec, T.B.Tennikova, M.Nahunek. *Angew. Makromol. Chem.*, **195**, 139 (1992)
74. M.Walenius, L.I.Kulin, P.Flodin. *React. Polym.*, **17**, 309 (1992)
75. S.M.Jovanovic, A.Nastasovic, N.N.Jovanovic, K.Jeremic, Z.Savic. *Angew. Makromol. Chem.*, **219**, 161 (1994)
76. T.Maehara, Y.Eda, K.Mitani, S.Matsuzawa. *Biomaterials*, **11**, 122 (1990)
77. A.Tuncel, R.Kahraman, E.Piskin. *J. Appl. Polym. Sci.*, **51**, 1485 (1994)
78. D.Horak, J.Straka, B.Schneider, F.Lednický. *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.*, **35**, 1195 (1994)
79. С.С. Иванчев. *Успехи химии*, **60**, 1368 (1991)
80. И.А.Грицкова, П.В.Нусс, Е.В.Дорохова, Д.А.Аль-Хаварин. *Коллоид. журн.*, **56**, 487 (1991)
81. В.И.Елисеева, Т.Р. Асламазова. *Успехи химии*, **60**, 398 (1991)
82. В.И.Елисеева. *Полимерные суспензии*. Химия, Москва, 1980
83. S.Muroi. *J. Appl. Polym. Sci.*, **10**, 713 (1966)
84. S.Muroi, K.Hosoi, T.Ishikawa. *J. Appl. Polym. Sci.*, **11**, 1963 (1967)
85. B.R.Vizayendran. *J. Appl. Polym. Sci.*, **23**, 893 (1979)
86. G.W.Ceska. *J. Appl. Polym. Sci.*, **18**, 427 (1974)
87. B.W.Greene. *J. Colloid Interface Sci.*, **43**, 449 (1973)
88. B.W.Greene. *J. Colloid Interface Sci.*, **43**, 462 (1973)
89. K.Sakota, T.Okaya. *J. Appl. Polym. Sci.*, **20**, 1235 (1976)
90. K.Sakota, T.Okaya. *J. Appl. Polym. Sci.*, **20**, 2583, (1976)
91. M.Okubo, K.Kanaida, T.Matsumoto. *J. Appl. Polym. Sci.*, **33**, 1511 (1987)
92. M.Okubo, D.H.Xu, K.Kanaida. *Colloid Polym. Sci.*, **265**, 246 (1987)
93. I.A.Gritskova, E.G.Grzywa. *Polymery*, **36**, 418 (1991)
94. B.W.Greene, D.P.Sheetz, T.D.Filer. *J. Colloid Interface Sci.*, **32**, 90 (1970)
95. Пат. 163091 Польша (1994)
96. И.А.Грицкова, О.В.Чирикова, О.И.Щеголихина, А.А.Жданов. *Докл. АН*, **334**, 57 (1994)
97. О.В.Чирикова. Дис. канд. хим. наук. МАТХТ, Москва, 1994
98. L.Rios, M.Hidalgo, J.Y.Cavaille, J.Guillot, A.Guyot, C.Pichot. *Colloid Polym. Sci.*, **269**, 812 (1991)
99. A.Kondo, S.Uchimura, K.Higashitani. *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 164 (1994)
100. J.Snuparek, P.Bradna, L.Mrkvickova, F.Lednický, O.Quadrat. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **58**, 2451 (1993)
101. P.Bajaj, M.Goyal, R.B.Chavan. *J. Appl. Polym. Sci.*, **53**, 1771 (1994)
102. M.C.Davies, R.A.P.Lynn, S.S.Davis, J.Hearn, J.F.Watts, J.C.Vickerman, D.Johnson. *Langmuir*, **10**, 1399 (1994)
103. A.Kondo, K.Yoshioka, K.Higashitani. *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **18**, 353 (1992)
104. K.Kjellqvist. *Prog. Org. Coat.*, **24**, 209 (1994)
105. H.Kawagushi, N.Koiwai, Y.Ohtsuka. *J. Appl. Polym. Sci.*, **35**, 743 (1988)
106. H.Kawagushi, N.Koiwai, T.Mita, Y.Ohtsuka, T.Takeuchi, S.Kobayashi. *J. Colloid Polym. Sci.*, **268**, 1167 (1990)
107. Y.Ohtsuka, H.Kawagushi, Y.Sugi. *J. Appl. Polym. Sci.*, **26**, 1637 (1981)
108. H.Tamai, A.Iida, T.Suzava. *J. Colloid Polym. Sci.*, **262**, 77, (1984)
109. H.Tamai, T.Murukami, T.Suzava. *J. Appl. Polym. Sci.*, **30**, 3857 (1985)
110. S.Kamei, M.Okubo, T.Matsuda, T.Matsumoto. *J. Colloid Polym. Sci.*, **264**, 743 (1986)
111. S.Kamei, M.Okubo, T.Matsumoto. *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **24**, 3109 (1986)
112. M.Okubo, Y.Yamamoto, M.Uno, S.Kamei. *J. Colloid Polym. Sci.*, **265**, 1061 (1987)
113. H.Shirahama, T. Suzava. *J. Appl. Polym. Sci.*, **29**, 3651, (1984)
114. T.Suzava, H.Shirahama, T.Fuimoto. *J. Colloid Interface. Sci.*, **86**, 144 (1982)
115. H.Shirahama, T.Suzava. *J. Colloid Interface. Sci.*, **104**, 416 (1985)
116. А.с. 1616927 СССР (1990); *Бюл. изобрет.*, (48), 85 (1990)
117. F.Twig, P.Piet, A.L.German. *Eur. Polym. J.*, **27**, 939 (1991)
118. B.Verriercharleux, C.Graillat, Y.Chevalier, C.Pichot, A.Revillon. *J. Colloid Polym. Sci.*, **269**, 398 (1991)

119. F.Twigt, J.Broekman, P.Piet, A.L.German. *Eur. Polym. J.*, **29**, 745 (1993)
120. J.J.Lee, W.T.Ford. *J. Org. Chem.*, **58**, 4070 (1993)
121. W.T.Ford, H.Yu, J.J.Lee, H.Elhamshary. *Langmuir*, **9**, 1698 (1993)
122. T.Delair, V.Marguet, C.Pichot, B.Mandrand. *J. Colloid Polym. Sci.*, **272**, 962 (1994)
123. T.Delair, C.Pichot, B.Mandrand. *J. Colloid Polym. Sci.*, **272**, 72 (1994)
124. J.J.Lee, W.T.Ford. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 3753 (1994)
125. P.Cousin, P.Smith. *J. Appl. Polym. Sci.*, **54**, 1631 (1994)
126. *Immobilized Enzymes*. (Ed. O.Zaborsky). CRS Press, Cleveland, 1978
127. *Affinity Chromatography and Biological Recognition*. (Eds I.Chaiken, V.Wilchek, I.Pakikh). Academic Press, New York, 1984
128. H.Kitano, Z.H.Sun, N.Ise. *Macromolecules*, **16**, 1306 (1983)
129. R.L.Schuaar. *Anal. Biochem.*, **143**, 1 (1984)
130. Ю.А.Овчинников. *Биоорганическая химия*. Просвещение, Москва, 1987
131. T.Wagner, C.J.Hsu, G.Kelleher. *Biochem. J.*, **108**, 892 (1968)
132. G.Quash, A.-M.Roch, A.Nivelian, J.Granger, T.Keolonanghot, J.Huppert. *J. Immunol. Methods*, **22**, 165 (1978)
133. R.P.Patel, S.Price. *Biopolymers*, **5**, 583 (1967)
134. P.V.Sundaram. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 667 (1974)
135. P.Cuatrecasas. *J. Biol. Chem.*, **245**, 3059 (1970)
136. K.Nilsson, K.Mosbach. *Eur. J. Biochem.*, **12**, 397 (1980)
137. K.Nilsson, K.Mosbach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 449 (1981)
138. K.Nustad, L.Johansen, R.Schmid, J.Ugelstad, T.Ellingsen, A.Berge. *Agents Actions Suppl.*, **9**, 207 (1982)
139. G.S.Bethell, J.S.Ayers, W.S.Hancock, M.T.W.Hearn. *J. Biol. Chem.*, **254**, 2572 (1979)
140. Л.Ю.Басырева. Дис. канд. хим. наук. МАТХТ, Москва, 1994
141. *Препаративная органическая химия*. (Под ред. Н.С.Вульфсона). Хим. лит., Москва, 1959
142. Вейганд-Хильгетаг. *Методы эксперимента в органической химии*. Химия, Москва, 1968
143. H.Kawaguchi, H.Hochino, Y.Ohtsuka. *J. Appl. Polym. Sci.*, **26**, 2015 (1981)
144. H.Tanaka. *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **17**, 1239 (1979)
145. H.Kawaguchi, H.Hochino, H.Amagasa, Y.Ohtsuka. *J. Colloid Interface Sci.*, **97**, 465 (1984)
146. *Electron Microscopy of Enzymes: Principles and Methods*. (Ed. L.Stenberger). Elsevier Scientific Publ., New York, 1973
147. F.Richards, J.Kuowles. *J. Mol. Biol.*, **37**, 231 (1968)
148. H.Otto, H.Takamiya, A.Vogt. *J. Immunol. Methods*, **3**, 137 (1973)
149. J.K.Inman, H.M. Dintzis. *Biochemistry*, **8**, 4074 (1969)
150. Пат. 4419543 США (1984)
151. H.Kitano, C.Yan, Y.Maeda, N.Ise. *Biopolymers*, **28**, 693 (1989)
152. М.Федтке. *Химические реакции полимеров*. Химия, Москва, 1990
153. R.Gopalan, K.Subbarayan. *J. Indian Chem. Soc.*, **56**, 669 (1979)
154. P.Ferrabochi, M.N. Azandi, E.Santaniella, S.Trave. *Synth. Commun.*, **16**, 43 (1986)
155. R.C.Kerber, G.W.Urry, N.Kornblum. *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 4520 (1965)
156. M.D.B.Oenick, A.Warshawsky. *Colloid Polym. Sci.*, **269**, 139 (1991)
157. M.D.Bale, S.J.Danielson, R.E.Goppert, R.C.Sutton. *J. Colloid Interface Sci.*, **132**, 176 (1989)
158. Z.Song, G.W. Poehlein. *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.*, **28**, 2365 (1989)
159. J.W.Goodwin, J.Hearn, C.C.Ho, R.H.Ottewill. *Colloid Polym. Sci.*, **252**, 464 (1974)
160. Y.Chung-li, J.W.Goodwin, R.H.Ottewill. *Prog. Colloid Polym. Sci.*, **60**, 163, (1976)
161. J.W.Goodwin, R.H.Ottewill, R.Pelton. *Colloid Polym. Sci.*, **257**, 62 (1979)
162. R.H.Ottewill, R. Satgurunathan. *Colloid Polym. Sci.*, **265**, 845 (1987)
163. D.Zou, V.Derlich, K.Gandhi, M.Park, L.Sun, D.Kriz, Y.D. Lee, G.Kim, J.J.Aklonis, R.Salovey. *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.*, **28**, 1909 (1990)
164. Y.Almong, S.Reich, M.Levy. *Br. Polym. J.*, **12**, 131 (1982)
165. C.M. Tseng, Y.Y. Lu, M.S. El-Aasser, J.W. Vanderhoff. *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.*, **24**, 2995 (1986)
166. M.Okubo, M.Shiozaki, M.Tsujihiro, Y.Tsukuda. *Colloid Polym. Sci.*, **269**, 222 (1991)
167. T.J.J.Van der Hoven, B.H.Bijterboch. *J. Colloid Interface Sci.*, **115**, 559 (1987)
168. W.M.Brouwer, R.L.J.Zsom. *Colloids Surf.*, **24**, 195 (1987)
169. J.H.Kim, M.S.El-Aasser, A.Klein, J.W. Vanderhoff. *J. Appl. Polym. Sci.*, **35**, 2117 (1988)
170. B.R.Paulke, W.Hartig, G.Bruckner. *Acta Polym.*, **43**, 288 (1992)
171. M.Antonietti, S.Lohmann, C.Vanniel. *Macromolecules*, **25**, 1139 (1992)
172. W.T.Ford, R.D.Badley, R.S.Chandran, S.H.Babu, M.Hassanein, S.Srinivasan, H.Turk, H.Yu, W.M.Zhu. In *Polymer Latexes*. (Eds E.S.Daniels, E.D.Sudol, M.S.El-Aasser). American Chemical Society, Washington, DC, 1992. P.422
173. E.Piskin, A.Tuncel, A.Denizli, H.Ayhan. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **5**, 451 (1994)
174. E.Piskin, A.Tuncel, A.Denizli, H.Ayhan, E.B.Denkbas, H.Cicek, K.T.Xu. *ACS Symp. Ser.*, **556**, 222 (1994)
175. J.M.Vanderhoff. *Chem. Eng. Sci.*, **48**, 203 (1993)
176. D.Hunkeler, F.Candau, C.Pichot, A.E.Hemielec, T.Y.Xie, J.Barton, V.Vaskova, J.Guillot, M.V.Dimonie, K.H.Reichert. *Adv. Polym. Sci.*, **112**, 115 (1994)
177. A.A. Kamel. Ph.D.Thesis. Lehigh University, Bethlehem, 1981
178. Y.C.Chen, V.Dimonie, M.S. El-Aasser. *Macromolecules*, **24**, 3779 (1991)
179. Пат. 158443 Европа (1985)
180. *Covalent Bonding of Antibodies to Polystyrene Latex Beads: a Concept*. (Eds H.J.Tenoso, D.B.Smith). NASA Tech. Brief., Washington, 1972
181. Пат. 493992 США (1974)
182. Л.М.Коган, В.А.Кроль. В кн. *Химическая модификация полимерных диенов*. ЦНИИТЭнефтехим, Москва, 1976. С.73
183. Л.М.Коган, В.А.Кроль. *Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д.И.Менделеева*, **26**, 272 (1981)
184. P.Reinholdsson, T.Hargitai, R.Isaksson, B.Tornell. *Angew. Makromol. Chem.*, **192**, 113 (1991)
185. Y.Yamamoto, M.Okubo, Y.Iwasaki. *Colloid Polym. Sci.*, **269**, 1126 (1991)
186. A.Guyot, P.Hodge, D.C.Sherrington, H.Widdecke. *React. Polym.*, **16**, 233 (1992)
187. K.Li, H.D.H.Stover. *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.*, **31**, 3257 (1993)
188. Т.Б.Гонсовская, Ф.Г.Пономарев, П.Т.Полужков, Л.К.Хватова. *Каучук и резина*, **1**, 23 (1971)
189. П.Т.Полужков, Т.Б.Гонсовская, Ф.Г.Пономарев, Ю.К.Гусев. *Высокомол. соединения*, **15A**, 606 (1973)
190. *Натуральный каучук. Т.2*. (Под ред. А. Робертса). Мир, Москва, 1990
191. Е.Г.Имнадзе. Дис. канд.хим.наук. МИТХТ, Москва, 1987
192. И.А.Гришкова, Н.И.Прокопов, В.Р.Черкасов. *Высокомол. соединения*, **37A**, 683 (1995)
193. В.Р.Черкасов. Дис. канд. хим. наук. МИТХТ, Москва, 1992
194. H.Tamai, T.Oyanagi, T.Suzawa. *Colloid Surf.*, **57**, 115 (1991)
195. I.Noda. *Nature (London)*, **350**, 143 (1991)
196. B.Vincent. *Chem. Eng. Sci.*, **48**, 429 (1993)
197. C.Graillat, B.Dumont, P.Depraetere, V.Vintenon, C.Pichot. *Langmuir*, **7**, 872 (1991)
198. J.S.Tan, D.E.Butterfield, C.L.Voycheck, K.D.Caldwell, J.T.Li. *Biomaterials*, **14**, 823 (1993)
199. M.Shiozaki, T.Tokuno. *Polym. Int.*, **30**, 217 (1993)
200. S.Rudt, H.Wesemeyer, R.H.Muller. *J. Control. Release*, **25**, 123 (1993)
201. S.Stolnik, S.E.Dunn, M.C.Garnett, M.C.Davies. *Pharm. Res.*, **11**, 1800 (1994)
202. S.Rudt, R.H.Muller. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **1**, 31 (1993)
203. N.Privitera, R.Naon, J.G.Riess. *Int. J. Pharm.*, **104**, 41 (1994)
204. A.Guyot, K.Tauer. *Adv. Polym. Sci.*, **111**, 43 (1994)
205. J.H.Kim, M.Chainey, M.S.El-Aasser, J.W.Vanderhoff. *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.*, **30**, 171 (1992)
206. F.J.Delasnieves, E.S.Daniels, M.S.El-Aasser. *Colloids Surf.*, **60**, 107 (1991)
207. C.Graillat, C.Pichot, A.Guyot. *Colloids Surf.*, **56**, 189 (1991)
208. M.Okubo, I.Azuma, H.Hattori. *J. Appl. Polym. Sci.*, **45**, 245 (1992)
209. D.Bastos, F.J.D.Nieves. *Colloid Polym. Sci.*, **271**, 860 (1993)

210. S.Watanabe, S.Nakahama, K.Yamaguchi. *Makromol. Chem., Makromol. Chem. Phys.*, **192**, 1891 (1992)
211. S.Watanabe, H.Ozaki, K.Mitsuhashi, S.Nakahama, K.Yamaguchi. *Makromol. Chem., Makromol. Chem. Phys.*, **193**, 2781 (1992)
212. E.Ruckenstein, X.Wang. *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 821 (1993)
213. M.T.Charreyre, P.Boullanger, T.Delair, B.Mandrand, C.Pichot. *Colloid Polym. Sci.*, **271**, 668 (1993)
214. M.C.Davies, R.A.P.Lynn, S.S. Davis, J.Hearn, J.F.Watts, J.C.Vickerman, A.J.Paul. *Langmuir*, **9**, 1637 (1993)
215. K.Sugiyama, K.Shiraishi, K.Ohga, H.Shirahama, H.Tamai, K.Kikukawa, H.Yasuda. *Polym. J.*, **25**, 521 (1993)
216. C.Li, D.J.Yang, L.R.Kuang, S.Wallace. *Int. J. Pharm.*, **94**, 143(1993)
217. K.Sugiyama, H.Aoki. *Polym J.*, **26**, 561 (1994)
218. K.Sugiyama, K.Ohga, K.Kikukawa. *Makromol. Chem., Makromol. Chem. Phys.*, **195**, 1341 (1994)

THE SYNTHESIS OF UNIFORM POLYMER FUNCTIONAL MICROSPHERES FOR IMMUNOASSAY

N.I.Prokopov, I.A.Gritskova, V.R.Cherkasov, A.E.Chalykh

Moscow State Academy of Fine Chemical Technology

86, Prosp. Vernadskogo, 117571 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)430-7983

Institute of Physical Chemistry, Russian Academy of Science

31, Leninskii Prosp., 117915 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)952-0714

The analysis of the methods of uniform functional polymeric microspheres preparation is presented. The preparation conditions of polymeric microspheres having aldehyde, carboxylic, epoxy and amino groups on its surface and possessing the special properties for them biochemical application are detaily described. The methods of polymeric microspheres modification for covalent binding of bioligand molecules are also reviewed.

Bibliography — 218 references.

Received 14th July 1995