



УДК 541.(64+127+183):577.151:542.952

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

© 1999 г. В. П. Зубов[#], А. Е. Иванов, Л. С. Жигис, Е. М. Рапопорт, Е. А. Марквичева, Ю. В. Лукин, С. Ю. Зайцев

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 29.04.99 г. Принята к печати 06.07.99 г.

Настоящий обзор посвящен достижениям в области новых полимерных материалов биомедицинского назначения, разработанных в лаборатории “Полимеры для биологии” ИБХ РАН. Сюда относятся композиционные твердокаркасные сорбенты для биохроматографии, полимерные дисперсии для иммуноанализа, полимерные гидрогели для иммобилизации ферментов и клеток, полимерные ультратонкие пленки как модели биомембран и материалы биосенсоров. Рассмотрены свойства и особенности новых материалов и моделей.

Ключевые слова: полимеры, привитые фазы адсорбированные и хемосорбированные; биосорбенты композиционные; иммобилизация ферментов и клеток; реагенты для иммуноанализа, мембраны полимерные ориентированные; биосенсоры.

ВВЕДЕНИЕ

Современный прогресс в биотехнологии, развитии биоаналитических и терапевтических методов во многом обязан использованию новых полимерных носителей (сорбенты, микроносители, гели, гранулы, мембраны, пленки и др.), функционирующих в контакте с растворами биополимеров, биологическими жидкостями, клетками и культурами тканей. Указанные материалы весьма разнообразны по своим физическим и химическим свойствам, однако их объединяет между собой не только назначение, но и способность специфически взаимодействовать с биологическими молекулами и частицами при минимуме неспецифических взаимодействий, денатурации и цитотоксичности. Создание подобных материалов можно рассматривать как новую область науки и техники – биологическое материаловедение, лежащую на стыке физико-химической биологии и химии полимеров. Практическая реализация фундаментальных научных достижений в виде конкретных биотехнологических процессов, лабора-

торных технологий, биоаналитических и терапевтических систем оказывается затруднительной, а порой и невозможной без создания специальных материалов (матриц), взаимодействующих с биологическими объектами и обеспечивающих направленное достижение поставленной задачи. Это позволяет считать биологическое материаловедение важной составной частью современной биологии.

Созданная в институте по инициативе академика Ю.А. Овчинникова 20 лет назад лаборатория “Полимеры для биологии” проводит исследования в некоторых областях биологического материаловедения с целью разработки соответствующих функциональных полимерных матриц. В настоящем кратком обзоре приводятся некоторые из полученных в последнее время результатов. Будут рассмотрены полимерсодержащие матрицы для процессов биосепарации (сорбенты для жидкостной хроматографии), биоаналитические системы (полимерные дисперсии для иммуноанализа), полимерные гранулы на основе обратимых термосаждаемых полимеров для капсулирования животных клеток и нестабильных ферментов и модели мембран на основе полимеризующихся липидов. Несмотря на различие химических и биологических объектов, рассматриваемых в предлагаемых примерах, эти исследования объединяет общий подход, основанный на оптимизации на молекулярном и надмолекулярном уровне взаимодействия биологических компонентов с синтетическими полимерными матрицами.

Сокращения: МАВ – моноклональные антитела; РНРА – поли-*n*-нитрофенилакрилат; СТАВ – цетилтриметиламмонийбромид; А-ПС – полисахарид стрептококков группы А; ИФА – иммуноферментный анализ; МА16 – полимеризующийся аналог СТАВ; МС-ПА – макропористое стекло с хемосорбированным РНРА; ПАЛМ – поверхностно-активные и липидоподобные мономеры; ПАМ – полиакролеиновые микросферы; ПВК – поли-*N*-винилкапролактан; ПХ – пероксидаза хрена; РЛАМ – реакция латексной агглютинации в микропланшете.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 336-06-00; факс: (095) 335-10-11; e-mail: zubov@ibch.siobc.ras.ru).

1. АДСОРБИРОВАННЫЕ И ХЕМОСОРБИРОВАННЫЕ ПОЛИМЕРЫ КАК ПРИВИТЫЕ ФАЗЫ БИОСОРБЕНТОВ

Адсорбция и хемосорбция полимеров представляет собой весьма эффективный метод направленного изменения поверхностных свойств различных твердых носителей. Одной из важных областей применения этих процессов является синтез хроматографических и иных сорбентов с заданной химической функциональностью и свойствами. Особое место среди этих материалов занимают биосорбенты, т.е. сорбенты, предназначенные для работы в контакте с растворами белков, нуклеиновых кислот, других веществ природного происхождения, а также с надмолекулярными частицами, такими, как вирусы, фаги, клеточные органеллы и др.

Основные направления исследований и результаты, достигнутые в этой области, были подробно обобщены нами в предшествующих обзорах [1, 2]. Цель настоящего раздела работы – рассмотрение взаимосвязи между фундаментальными аспектами адсорбции полимеров и практическими особенностями использования их поверхностных слоев в качестве привитых фаз биосорбентов.

Адсорбция полимеров, протекающая путем обратимого взаимодействия их сегментов с поверхностью носителя, уже много лет изучается как теоретически, так и экспериментально [3–5]. Адсорбция посредством необратимого связывания сегментов макромолекул изучена гораздо меньше [6–8]. Воспользуемся теоретической оценкой особенностей строения адсорбционных слоев полимеров, данной в работах [6, 7]. Одна из основных характеристик строения адсорбционного слоя – функция распределения сегментов макромолекул по нормали к поверхности носителя. На рис. 1 представлены примеры соответствующих функций распределения для полимеров, взаимодействующих с поверхностью различным образом: 1 – сильное притяжение при обратимом связывании сегментов (например, адсорбция полиэлектролита из солевого раствора), 2 – сильное притяжение при необратимом связывании (то же, из бессолевого раствора), 3 – слабое притяжение при необратимом связывании (хемосорбция незаряженного полимера). Из представленных зависимостей видно, что распределение сегментов в случае обратимого связывания является экспоненциально убывающим (подробно эта задача рассмотрена в работе [5]). В то же время для необратимой сорбции полимеров характерно образование более протяженных сегментов, экспонированных в раствор. Это могут быть как концевые фрагменты, хвосты, так и петли полимерных цепей. Физически адсорбированные полиэлектролиты располагаются существенно ближе к по-

верхности носителя и взаимодействуют с ним большим числом своих сегментов (кривые 1, 2).

Указанные особенности адсорбции полимеров имеют многообразные практические следствия. Например, для решения одной из основных проблем синтеза биосорбентов – устранения неспецифической сорбции белков – целесообразно использовать хемосорбцию нейтральных макромолекул с последующим блокированием их активных функциональных групп. Таким образом формируется полимерная фаза, не имеющая четкой границы с контактирующим раствором, а, следовательно, и большого избытка свободной энергии, локализованного на этой границе (кривая 3). Более того, протяженные петли и хвосты привитой фазы обладают значительным исключенным объемом и препятствуют адсорбции белков за счет эффектов взаимного отталкивания [9].

Изложенные теоретические представления были подтверждены многочисленными работами по синтезу биосорбентов путем хемосорбции полимеров (см. список литературы в обзорах [1, 2]), в том числе и авторами настоящей статьи. Путем хемосорбции сополимеров *N*-винилпирролидона и акрилоилхлорида (1 : 1) на реакционноспособных производных макропористых стекол и силикагелей были получены сорбенты для фракционирования ряда вирусов человека и животных методом эксклюзионной хроматографии [10–12], а также биоаффинные сорбенты для выделения вирусных антигенов [13] и белков системы комплемента человека [14]. Хроматографические выходы разделяемых белков и частиц близки к количественным, а их антигенные и иммуногенные активности сохранялись практически полностью [10, 13].

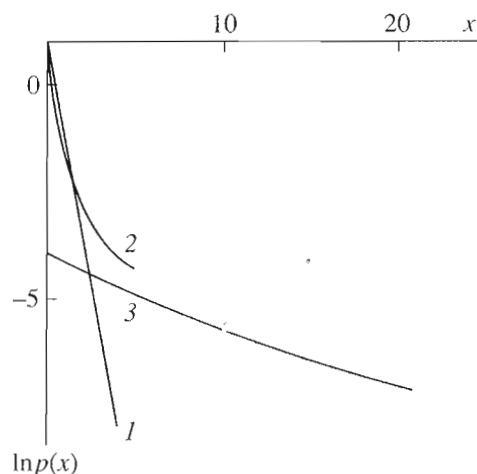


Рис. 1. Адсорбция макромолекул на поверхности носителя. Зависимость логарифма плотности сегментов ($p(x)$) от расстояния до поверхности носителя (x), рассчитанное для обратимой (1) и необратимой (2, 3) адсорбции макромолекул, в случае сильного (1, 2) и слабого (3) притяжения сегментов (по данным работы [6]).

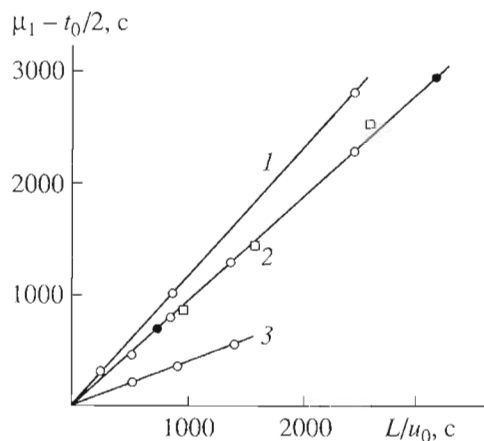


Рис. 2. Зависимость первых статистических моментов μ_1 хроматограмм *n*-нитроанилина (1), сывороточного альбумина (2), суспензии вируса гриппа (3) от времени элюции на колонке. Колонка 1 × 12 см, сорбент – макропористое стекло с привитой фазой на основе сополимера *N*-винилпирролидона и *N*-(2-гидроксиэтил)акриламида (1 : 1), t_0 – время ввода пробы, L – длина колонки, μ_1 рассчитывали как указано в работе [16]. t – время элюции. Элюент – 0.05 М фосфат калия, pH 7.0; температура: 10 (●), 25 (○), 37°C (□).

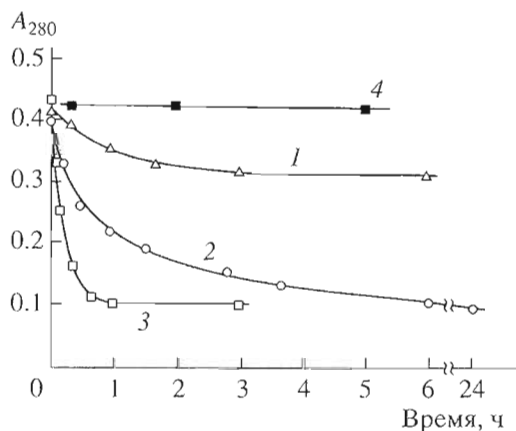


Рис. 3. Кинетика сорбции моноклональных антител на биоаффинных сорбентах с иммобилизованным гаптенем (Gal α 1-3 (Fuc α 1-2)-Gal β 1-O(CH $_2$) $_3$ NH $_2$, аминопропилгликозид трисахарида с групповой специфичностью крови В) в статистическом режиме. Носители: Affi-Gel 10 (1); BrCN-сефароза 4В (2); МС-ПА (3); МС-ПА, не содержащее гаптен (4). Условия сорбции описаны в работе [20].

Структура полученных привитых фаз во многом соответствует предсказаниям теории и характеризуется малой долей сегментов сополимера в контакте с поверхностью (0.08 при молекулярной массе 35000) и значительной долей сегментов в виде протяженных петель и хвостов [13] (см. кривую 3 на рис. 1). Необратимая адсорбция белков на сорбентах этого типа пренебрежимо мала (по крайней мере в несколько раз меньше, чем на глицидилсилильных производных неорганичес-

ких носителей и в десятки раз меньше, чем на исходных пористых стеклах и силикагелях [13]). Как видно из рис. 2, элюция сывороточного альбумина, стандартного белка для тестирования биосорбентов, происходит в пределах полного объема колонки (прямая 2, тангенс угла наклона меньше 1) и не зависит от температуры [15, 16]. Это свидетельствует о нулевой теплоте сорбции, т.е. об отсутствии обратимых адсорбционных взаимодействий белка с исследованной привитой фазой. В этих условиях суспензия вируса гриппа элюируется с исключенным объемом колонки (прямая 3), а низкомолекулярный *n*-нитроанилин немного удерживается, по-видимому, за счет электростатических взаимодействий с кремнеземным носителем (прямая 1) [16].

Изложенный выше метод хемосорбции полимеров был использован нами для получения ряда гидрофобных [17], ионообменных [18, 19] и биоаффинных сорбентов [20, 21] с использованием поли-*n*-нитрофенилакрилата (PNPA) в качестве модификатора поверхности [22] и реакции амидирования сложноэфирных групп PNPA для введения соответствующих функциональных групп и лигандов. Хемосорбция указанного полимера, как и хемосорбция сополимеров акрилоилхлорида, характеризуется высоким содержанием сегментов в виде петель и хвостов, удаленных от поверхности носителя на расстояния в десятки ангстрем [18].

Интересно сопоставить свойства материалов, полученных различными путями: 1) хемосорбцией нейтральных полимеров, 2) физической сорбцией полиэлектролитов с их последующей химической сшивкой. С этой целью на одной и той же кремнеземной основе было синтезировано два вида сорбентов, содержащих третичные аминогруппы: во-первых, путем амидирования хемосорбированных слоев PNPA диметиламиноэтиламино, во-вторых, по известной методике [23] путем алкилирования адсорбционных слоев разветвленного полиэтиленimina триглицидиловым эфиром глицерина. При близких сорбционных емкостях, полученных для сывороточного альбумина, сорбенты сильно отличались по условиям, необходимым для десорбции белка: элюция белка на материале первого рода достигалась при меньших значениях ионной силы элюента и при этом наблюдалась более высокая степень разрешения хроматографических пиков. Путем проведения хроматографии белка в изократических условиях и изучения его элюции растворами с различной концентрацией хлорида натрия, было найдено, что количество элементарных зарядов, участвующих в связывании альбумина с анионообменником, примерно в 1.5 раза выше для сорбента второго рода [19]. Это может быть следствием высокой поверхностной плотности сшитого полиэлектролита (см. кривую 1 на рис. 1), а также малой по-

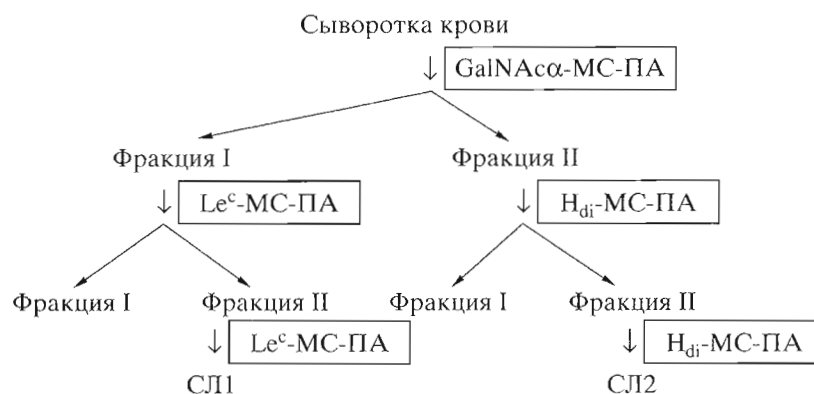


Рис. 4. Схема выделения лектина СЛ2 из сыворотки крови человека.

движности его сегментов, что приводит к снижению скоростей массообмена в частицах со сшитой полимерной фазой.

Весьма наглядным примером, демонстрирующим необычно высокую реакционную способность лигандов, иммобилизованных на хемосорбированных слоях РNPA, дает сравнительное изучение кинетики связывания моноклональных антител с высокоспецифическим олигосахаридным гаптеном, иммобилизованным на трех различных носителях: ВгСN-сефарозе 4В, Affi-Gel 10 и макропористом стекле с хемосорбированным РNPA (МС-ПА). На рис. 3 представлены соответствующие кинетические зависимости. Расчет показывает, что биоаффинная сорбция антител на этом сорбенте происходит в 10 и более раз быстрее, чем на указанных сшитых гелях агарозы [20]. Высокие скорости взаимодействия иммобилизованных олигосахаридных лигандов с белками, в сочетании с высокими емкостями полученных сорбентов дают возможность использовать их для препаративного выделения и очистки различных антител и лектинов [20, 21, 24].

Композиционные биосорбенты в процессах препаративного выделения и анализа галактозосвязывающих лектинов

В последнее время появилось немало работ, посвященных выделению из сыворотки крови лектинов, которые проявляют иммуномодулирующую активность [25], участвуют в активации системы комплемента [26, 27] и обладают свойствами опсоинов [28]. Сведения о лектинах, циркулирующих в крови, довольно ограничены. Структура определена для маннансвязывающих лектинов [29], сывороточного амилоидного компонента Р, С-реактивного белка [30] и селектинов [31]. Практически ничего не известно о галактозосвязывающих лектинах сыворотки крови. Биологическая роль сывороточных лектинов выяснена лишь частично, для них не определена клетка-мишень и не

выявлен специфический рецептор. В связи с этим обнаружение новых, циркулирующих в крови лектинов, экспрессия которых резко возрастает при воспалительных процессах, представляет как фундаментальный, так и практический интерес.

Ранее нами были выделены из сыворотки крови человека два лектина с использованием дисахаридов Le^c и H_{di} , иммобилизованных на макропористом стекле с хемосорбированным РNPA (Le^c -МС-ПА и H_{di} -МС-ПА) [21, 24]. Полученные лектины, названные СЛ1 и СЛ2, соответственно были охарактеризованы по своим физико-химическим свойствам и углеводной специфичности [32]. Так, СЛ1 проявлял максимальную активность по отношению к дисахариду $Gal\beta 1-3GalNAc\beta$ в виде 4-нитрофенилгликозида, а СЛ2 – к $GalNAc\alpha$ и его производным.

В настоящее время нами проводится изучение биологической активности выделенных лектинов и определение их аминокислотной последовательности.

С целью обеспечения наиболее полного извлечения лектинов из сыворотки крови в качестве первой стадии в схему очистки была включена аффинная хроматография на $GalNAc\alpha$ -МС-ПА, так как по данному определению углеводной специфичности СЛ2 проявлял наибольшую аффинность по отношению к $GalNAc\alpha$ (рис. 4, 5). Согласно данной схеме, из 500 мл крови в результате трехстадийной хроматографии было выделено 0.36 мг СЛ1 и 0.24 мг СЛ2, степень очистки составляет 10 600 раз для СЛ1 и 15 900 – для СЛ2. Данные результаты показывают, что фракционирование белков сыворотки крови характеризуется количественным выходом всех разделяемых компонентов, т.е. отсутствует их необратимая сорбция на композиционных сорбентах.

Как было показано выше, на специфичность взаимодействия иммобилизованных углеводных лигандов с белками существенное влияние оказывает природа полимера-носителя. Нами была

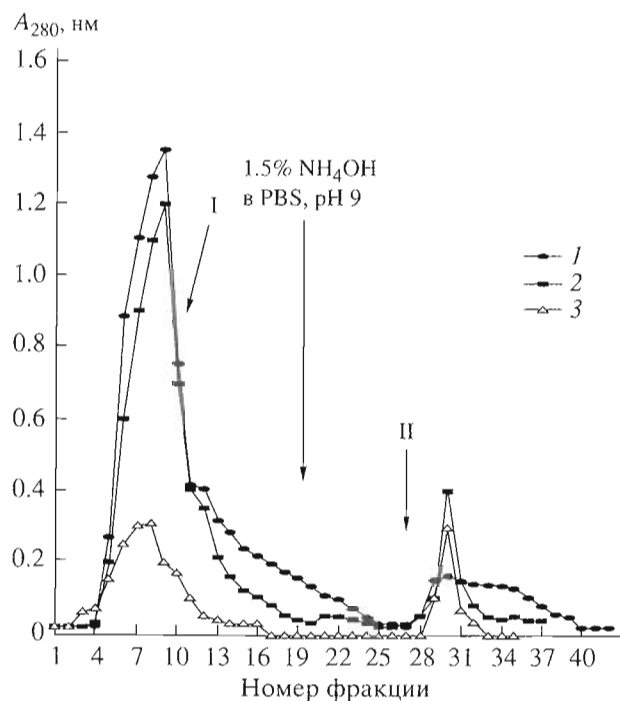


Рис. 5. Аффинная хроматография сыворотки крови человека на колонках GalNAc α -МС-ПА (3 \times 12 см) (1) и хроматография фракции I на Le^c-МС-ПА (3 \times 5 см) (2) и фракции II на H_{di}-МС-ПА (3 \times 10 см) (3). Элюцию проводили 1.5% NH₄OH в 10 мМ растворе PBS (рН 9) со скоростью 180 мл/ч, объем фракций – 3 мл.

предпринята попытка воспроизвести схему очистки лектинов (рис. 4) с использованием сорбента H_{di}-Affi-Gel 202 вместо H_{di}-МС-ПА. Полученный таким способом препарат белка в отличие от СЛ2 обладал сродством не только к специфическим, но и к другим углеводным и даже неуглеводным лигандам [33]. Это свидетельствует о том, что наряду со специфическим связыванием лектинов с H-дисахаридом наблюдается их неспецифическое взаимодействие с полисахаридной матрицей Affi-Gel 202. Использование композиционных сорбентов с N-замещенным полиакриламидным покрытием имеет в данном случае явное преимущество и дает возможность получить белки с высокой степенью очистки.

2. ПОЛИМЕРНЫЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ ПОЛИ-N-ВИНИЛКАПРОЛАКТАМА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ И КЛЕТОК

В настоящее время полимерные гидрогели широко используются для включения в них (иммобилизации) ферментов и клеток. В то время как список синтетических полимеров для иммобилизации микроорганизмов и ферментов достаточно велик (полиакриламид, полиизопропила-

криламид, различные полиметакрилаты, полиуретан, поливиниловый спирт), в литературе описано только несколько синтетических полимеров, предложенных для иммобилизации клеток животных. Объясняется это тем, что большинство методов иммобилизации в синтетические полимеры сопряжено с жесткими термическими или химическими воздействиями на живые клетки, что совершенно недопустимо в случае клеток животных. В то же время существует ряд нестабильных ферментов (например, тромбин, карбоксипептидаза В и др.), которые не удается иммобилизовать путем ковалентного связывания с полимерным носителем, так как при этом значительно падает ферментативная активность [34, 35]. Так ковалентное связывание некоторых модифицированных форм тромбина с носителем позволяет сохранить не более 5–10% ферментативной активности нативного фермента [35]. В отличие от ковалентного связывания метод включения ферментов в полимерные гели обеспечивает достаточно свободное положение фермента в полимерной матрице без жесткой фиксации молекулы белка.

Способ получения полимерных гидрогелей на основе поли-N-винилкапролактама (ПВК) основан на уникальном сочетании свойств этого водорастворимого обратимо термоосаждаемого полимера формировать гидрогели в интервале физиологических температур и рН с одновременным включением в них белков или клеток. Поэтому предложенные нами полимерные гидрогели на основе ПВК представляются перспективными для включения как животных клеток, так и нестабильных ферментов.

Разработка полимерных покрытий с иммобилизованным тромбином для терапии ран

Терапия ран заключается в ускорении биологических процессов, обуславливающих восстановление тканей. Лечение ран может быть выполнено путем стимулирования процессов заживления с помощью эндогенных факторов роста. Среди этих ростовых факторов тромбин, многофункциональная сериновая протеиназа – перспективное ранозаживляющее средство. Тромбин вовлекается в воспалительную и пролиферативную фазы заживления ран, при этом стимулирует адгезию тромбоцитов, полиморфно-ядерных лейкоцитов, моноцитов и Т-лимфоцитов к эндотелиальным клеткам и агрегацию клеток; повышает проницаемость монослоя эндотелиальных клеток и стимулирует пролиферацию клеток эндотелия, фибробластов и Т-лимфоцитов. Однако, как было показано ранее, введение тромбина следует строго контролировать, чтобы предотвратить нежелательные эффекты. Кроме того, тромбин является крайне нестабильным ферментом и быстро инактивируется. Чтобы обеспечить сохранение

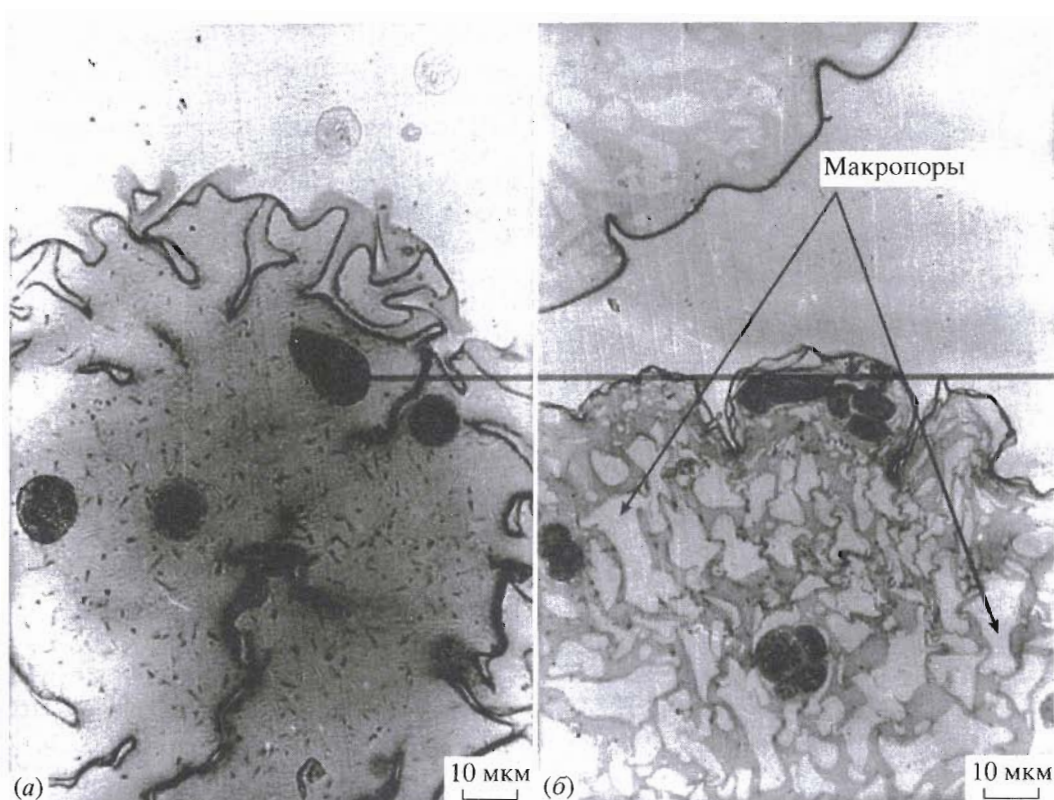


Рис. 6. Структура гранулы на основе альгината кальция (а) и композитной макропористой гранулы на основе ПВК-альгината кальция (б) (тонкие срезы) с иммобилизованными в них гибридными клетками ЛНКБ-2, продуцирующими моноклональные антитела к рекомбинантному интерлейкину-2 человека. Третьи сут после иммобилизации.

активности и контролируемое высвобождение тромбина, могут быть предложены такие системы, как липосомы, полимерные гранулы/капсулы или пленки.

В процессе разработки метода иммобилизации тромбина в полимерные пленки, были исследованы несколько вариантов полимерных матриц на основе альгината, хитозана, их композитов, однако только введение в матрицу поли-*N*-винилкапролактама позволило создать полимерные системы, в которые удалось включить значительные количества фермента [36]. Следует особо отметить, что именно свойство ПВК давать гидрогели при повышении температуры до 37–40°C с одновременным захватом в них тромбина и было использовано при получении композитных пленок. При этом сама процедура иммобилизации тромбина в пленки очень простая и мягкая (рН 7, температура 37–40°C), выполняется в течение 10–15 мин, что позволяет максимально сохранить активность тромбина. Разработанный метод иммобилизации обеспечивает как высокую активность тромбина после включения в полимерную пленку, так и сохранение активности в течение нескольких месяцев при комнатной температуре. Эффект инкапсулированного тромбина на процесс репарации ткани был изучен в модели на кры-

сах [37]. Образцы грануляционной ткани из ран были исследованы методом световой радиоавтографии на 3-и и 7-е сут ранозаживления. На 7-е сут размер раны сократился приблизительно в 2 раза для экспериментальных животных и практически не изменился для контрольных крыс. Таким образом, было показано, что наложение на раны полимерных пленок с иммобилизованным в них тромбином стимулирует заживление ран, о чем свидетельствовало ускорение пролиферации фибробластов и неоваскуляризации, а также значительное уменьшение размера ран. Предложенный подход представляется перспективным для терапии ран.

*Иммобилизация и культивирование клеток животных в макропористых композитных гидрогелях на основе поли-*N*-винилкапролактама*

Культивирование иммобилизованных в гели гибридом обеспечивает некоторые важные преимущества перед обычными суспензионными культурами, в частности защиту от механического стресса, получение более высоких концентраций моноклональных антител (МАб) благодаря более высоким концентрациям клеток (порядок

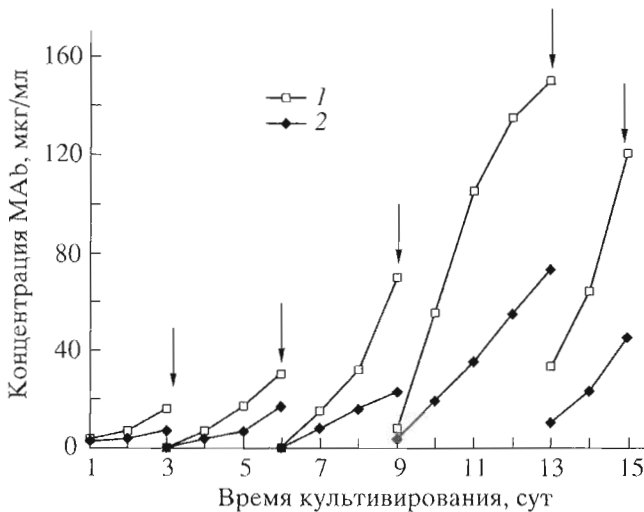


Рис. 7. Накопление в среде МАб, секретируемых гибридными клетками ЛНКБ-2, иммобилизованными в гранулы альгината кальция (CaAlg) (1) и композитные гранулы на основе ПВК-альгината кальция (ПВК-CaAlg) (2) [41]. Полную замену среды проводили через каждые 3 сут культивирования, указанные периоды времени обозначены стрелками.

10^7 кл/мл), более простые и дешевые процессы сепарации и очистки МАб [38]. Более того, в работе [39] показана возможность увеличения удельной продукции моноклональных антител с помощью иммобилизованных гибридных клеток. Известно, что продукция МАб зависит от пролиферации иммобилизованных в гель клеток [39]. В связи с этим в настоящее время особое внимание уделяется созданию макропористых гидрогелей для иммобилизации животных клеток [40]. Макропористая структура гранулы обеспечивает снижение диффузионных ограничений, которые могут возникнуть внутри плотных кластеров растущих клеток в случае культивирования последних в полых капсулах. Из рис. 6 видно, что при использовании предложенных нами композитных гелей на основе ПВК и альгината кальция, можно получить макропористую структуру гранулы, в которой имеются несшитые ионами кальция зоны (макропоры). Именно в этих зонах можно наблюдать активный рост и пролиферацию клеток. Метод культивирования гибридных клеток в макропористых композитных гранулах был использован нами для получения чистых (не загрязненных белками сыворотки) МАб к рекомбинантному интерлейкину-2 человека при культивировании гибридных клеток в бессывороточной среде [41]. Известно, что использование бессывороточной (или безбелковой) среды при наработке антител *in vitro* существенно повышает чистоту полученных МАб и снижает затраты на их очистку. С другой стороны, показано, что длительное культивирование в бессывороточной среде истощает клетки, повышая их чувствительность к механическому стрессу. Та-

ким образом, культивирование иммобилизованных в макропористые ПВК-альгинатные гидрогели клеток позволило 1) защитить клетки от разрушения при механическом перемешивании; 2) увеличить пролиферацию клеток и продукцию ими МАб по сравнению с культивированием в классическом кальций-альгинатном геле (рис. 7); 3) получить чистые МАб непосредственно из супернатанта без какой-либо предварительной очистки. Единственной примесью в полученных препаратах был трансферрин (5%), который входил в добавку SPITE, вносимую в среду для культивирования вместо сыворотки.

В заключение следует отметить, что создание описанных носителей на основе композитных гидрогелей (в виде гранул или пленок) для иммобилизации различных ферментов и клеток позволило нам, с одной стороны, существенно стабилизировать ферменты; с другой – обеспечить высокий уровень продукции МАб.

3. РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ИММУНОАНАЛИЗА НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРНЫХ ДИСПЕРСИЙ

Синтетические полимерные дисперсные частицы, содержащие функциональные группы, с которыми можно легко связывать белки и лиганды, представляют большой интерес при их использовании в качестве носителей в различных иммунохимических тестах. По сравнению с биологическими носителями (эритроциты, вирусы, белки и т.д.) полимерные частицы обладают повышенной стабильностью, иммунологической инертностью, доступностью в практически неограниченных количествах. Кроме того, с помощью химического синтеза можно легко получить частицы требуемых размеров, содержащие различные функциональные группы и наполнители (красители, флуорофоры, магнитные частицы, сцинтилляторы). Использование таких полимерных частиц в качестве носителей и/или меток в некоторых методах иммуноанализа позволяет существенно улучшить аналитические характеристики последних, а в ряде случаев приводит к созданию новых методов анализа, например сцинтилляционного анализа с приближением или магнитносепарационного анализа [42].

Нами был разработан метод синтеза монодисперсных окрашенных полиакролеиновых микросфер (ПАМ) с диаметром в диапазоне 0.05–5.0 мкм, коэффициентом вариации не более 8% и содержанием альдегидных групп от 1.5 до 4.5 ммоль/г [43, 44]. Белки и другие лиганды можно легко иммобилизовать на ПАМ путем ковалентного связывания первичных аминогрупп белков с поверхностными альдегидными группами частиц в одну стадию без предварительной активации микросфер [44].

На основе синтезированных окрашенных полиакролеиновых носителей получены новые им-

Определение концентрации антигенов полисахаридов *Streptococcus* методами латексной агглютинации (РЛАМ), иммуноферментного анализа (ИФА) и иммунофилтратационного дот-анализа с использованием латексного (ПАМ-IgG) и пероксидазного (ПХ-IgG) конъюгатов [57]

Группа стрептококков	Минимальная определяемая концентрация антигена							
	Очищенные полисахариды (нг/мл)				Лизаты клеток (КОЕ*/мл)			
	РЛАМ	ИФА	Дот-анализ		РЛАМ	ИФА	Дот-анализ	
			ПАМ-IgG	ПХ-IgG			ПАМ-IgG	ПХ-IgG
A	0.05	0.50	50	50	10^4	5×10^5	10^6	10^6
B	>100	>100	>5000	>5000	5×10^6	5×10^7	> 10^7	> 10^7
C	>100	>100	>5000	>5000	5×10^6	5×10^7	> 10^7	> 10^7
G	>100	>100	>5000	>5000	5×10^6	5×10^7	> 10^7	> 10^7
Время анализа	1.5 ч	2.5 ч	3 мин	5 мин	1.5 ч	2.5 ч	3 мин	5 мин

* КОЕ – колониеобразующие единицы.

мунореагенты, которые были испытаны в некоторых неинструментальных методах анализа, таких как реакция латексной агглютинации в микропланшете (РЛАМ) и иммунофилтратационный дот-анализ. С помощью метода РЛАМ были разработаны латексные тест-системы для серологической диагностики ряда инфекций человека (легионеллез [45], лепра [46], корь [47] и др.) и животных (туберкулез [48], бруцеллез крупного рогатого скота [49]), а также диагностикумы для определения интерлейкина-2 [50], гербицида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты [51, 52], *d*-биотина [53] и других биологически активных соединений. Разработанные тест-системы характеризовались высокой чувствительностью и методической простотой при постановке и учете реакции. ПАМ, наполненные флуоресцентным красителем (родамин Ж) и сенсibilизированные стрептавидином, успешно использованы в качестве полимерной метки в гибридизационном анализе ДНК [54].

ПАМ были также исследованы в качестве твердофазного суспензионного носителя в количественном иммунорадиометрическом анализе ферритина в сравнении с традиционным твердофазным носителем – микрокристаллической целлюлозой [55]. Данная работа рассмотрена ниже более подробно.

На примере исследования методов РЛАМ и дот-анализа [56, 57] для определения А-ПС [56, 57], являющегося специфическим антигеном *Streptococcus pyogenes*, также будут более подробно показаны преимущества ПАМ в качестве носителя в сравнении с ИФА.

Имунорадиометрический анализ ферритина

Монодисперсные ПАМ с диаметром частиц 0.8 мкм были ковалентно сенсibilизированы поликлональными антителами к ферриту в одну

стадию. Полученный иммуносorbент, ПАМ-IgG, характеризовался высокой емкостью (до 75 мкг белка на мг полимера) и высокой эффективностью (60–80% иммобилизации белка). Это позволило, в частности, на порядок расширить динамический диапазон анализа ферритина в области его высоких концентраций по сравнению с микрокристаллической целлюлозой, а также в 15–20 раз снизить рабочую концентрацию сорбента. Эффективные константы ассоциации для сорбентов на основе ПАМ и микрокристаллической целлюлозы составили, соответственно, 4.5×10^9 и $4.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. В данной иммунорадиометрической системе минимально определяемая концентрация ферритина составляла $0.7\text{--}0.9 \times 10^{-13} \text{ M}$ для обоих иммуносorbентов.

Реакция латексной агглютинации в микропланшете для определения А-ПС

Окрашенные ПАМ с размером частиц 1.8 мкм, сенсibilизированные антителами против А-ПС, были использованы в качестве носителя/маркера в методе РЛАМ [56]. Минимально определяемая концентрация А-ПС в данном методе составила 0.05 нг/мл или 10^4 клеток/мл (таблица). Сравнение с методом ИФА показало, что чувствительность РЛАМ на порядок выше, а продолжительность анализа на 1 ч меньше. При этом очищенные полисахариды клеток *Streptococcus*, не относящиеся к группе А, не давали перекрестных реакций, что указывало на специфичность реакции [56].

Имунофилтратационный дот-анализ А-ПС

Сэндвич-дот-иммуноанализ в микрофилтратационном варианте был предложен как простой и быстрый метод анализа А-ПС и лизатов клеток с помощью окрашенных ПАМ с диаметром частиц 0.35 мкм, сенсibilизированных антителами про-

тив А-ПС [57]. В данном анализе использовали специальную микроячейку для быстрой фильтрации реагентов через нитроцеллюлозную мембрану, на которой иммобилизованы антитела. При нанесении на мембрану раствора антигена с последующей промывкой буфером и проявлением дотов с помощью латексного или пероксидазного (ПХ) маркеров на мембране появлялось окрашенное пятно, которое отсутствовало при отрицательной реакции. Перекрестные реакции при анализе гетерологических клеточных лизатов *Streptococcus* отсутствовали [57]. Чувствительность анализа для обоих маркеров была практически одинакова (таблица).

Из данных, представленных в таблице, видно, что РЛАМ – наиболее чувствительный неинструментальный метод, позволяющий получать результаты в одну стадию за 1.5 ч. Иммунофильтрационный анализ является быстрым (3–5 мин), но его чувствительность примерно на три порядка ниже, чем РЛАМ. Преимуществом латексного маркера по сравнению с фермент-субстратным является отсутствие необходимости применять субстрат, что позволяет исключить одну стадию и сократить время анализа с 5 до 3 мин.

Таким образом, было показано, что ПАМ различных размеров могут найти широкое применение в качестве иммунореагентов как для инструментальных (иммунорадиометрический анализ), так и для визуальных (РЛАМ, дот-анализ) иммунохимических методов.

4. ПОЛИМЕРНЫЕ УЛЬТРАТОНКИЕ ОРИЕНТИРОВАННЫЕ ПЛЕНКИ НА ОСНОВЕ ЛИПИДОПОДОБНЫХ МОНОМЕРОВ И БЕЛКОВ КАК МОДЕЛИ БИОМЕМБРАН И МАТЕРИАЛЫ БИОСЕНСОРОВ

Полимерные ультратонкие ориентированные пленки (прежде всего моно- и бислои) на основе липидоподобных мономеров и биологически активных соединений являются удобными моделями для структурно-функционального исследования биомембран, особенно процессов самоорганизации биологически активных молекул, молекулярного узнавания и транспорта [58–61]. Такие системы дают уникальную информацию при изучении химических реакций (полимеризации, гидролиза, окисления, фотоизомеризации), протекающих на границе раздела фаз [62–64]. Использование этих систем позволяет получать полимеры с заданной структурой и свойствами. Кроме того, супрамолекулярные системы перспективны для применения в биосенсорных устройствах, молекулярной электронике, голографии и медицинской диагностике [65–69]. Существенный прогресс в данной области достигнут в последнее время в основном благодаря работам групп под руководством Фендле-

ра [60], Ринсдорфа [61, 62], Куна [65], Мевальда и Мебиуса [66], Петти [67] и ряда других [68, 69]. Однако ни одна из этих групп не занимается комплексным исследованием монослоев различных классов полимеров и биологически активных соединений.

Поверхностно-активные и липидоподобные мономеры

В течение последних 10 лет нами был проведен направленный синтез широкого круга поверхностно-активных липидоподобных мономеров (ПАЛМ), которые можно классифицировать по следующим основным признакам: 1) природе головной группы (катионная, анионная, неионная), 2) положению полимеризующейся группы в гидрофильной или гидрофобной частях молекулы, 3) количеству полимеризующихся групп в одной молекуле ПАЛМ (одна или две), 4) количеству гидрофобных цепей в одной молекуле ПАЛМ (одна, две или три) [64]. Наиболее широко нами исследованы липидоподобные цвиттер-ионные мономеры, содержащие полимеризующиеся группы (акриловые, метакриловые) а) в гидрофильной головке, б) на конце алифатической цепи или (диеновые, диеновые, кетеновые), в) в середине алифатической цепи. Детали синтеза, доказательства структур, а также подробное исследование поверхностно-активных свойств и особенностей полимеризации ПАЛМ в монослоях детально описаны в нашей экспериментальной работе [64]. Поэтому в данном разделе кратко описаны только наиболее важные и общие результаты.

Полимеризация ПАЛМ заметно стабилизирует определенные состояния монослоя, что проявляется в существенном увеличении тангенса угла наклона прямолинейной части изотерм и давления коллапса полимерного монослоя по сравнению с мономерным. После полимеризации ПАЛМ в монослое наблюдается уменьшение площади, приходящейся на мономерное звено полимера (по сравнению с площадью на молекулу соответствующего мономера), и существенное увеличение поверхностного давления, что свидетельствует о высокой жесткости и прочности полимерных монослоев [70]. Общая скорость полимеризации ПАЛМ в монослое значительно больше, чем обычно наблюдаемая при полимеризации этих или аналогичных ПАЛМ в объеме (в растворе или в массе) [71, 72]. Это объясняется меньшей энергией активации реакции полимеризации ПАЛМ в ориентированном состоянии на поверхности раздела фаз. Установлено, что зависимость скорости полимеризации от давления с одним резким максимумом универсальна для всех ПАЛМ, содержащих полимеризующиеся группы различной природы в середине длинных алкильных цепей [71]. Для монослоев ПАЛМ, содержа-

щих полимеризующуюся группу на конце гидрофильной части молекулы, скорость полимеризации имеет дополнительный минимум в области низких давлений и широкий максимум при высоких давлениях, что связано с различным вкладом эффекта ориентации мономера и эффекта упаковки головок-хвостов [70]. Такой широкий набор синтезированных и изученных ПАЛМ позволил определить наиболее удачные структуры для последующей полимеризации и иммобилизации биологически активных соединений.

Ультратонкие сенсорные мембраны с ферментами

Наиболее активные исследования по биосенсорам в настоящее время сконцентрированы в области создания электродов с иммобилизованными ферментами [73]. Однако получить стабильные монослои ферментов на границе раздела вода–воздух долгое время не удавалось вследствие их высокой растворимости в водной субфазе и быстрой денатурации на границе раздела фаз [73]. Только недавно несколько групп исследователей [74–78] добились успеха в получении адсорбционных слоев глюкозооксидазы на поверхности липидных монослоев и создании на их основе ферментных электродов.

Показано, что этот фермент значительно сильнее адсорбируется на монослой положительно заряженных смесей липидов с цетилтриметиламмонийбромидом, чем на монослой цвиттер-ионных (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин) или отрицательно заряженных (фосфатидная кислота) липидов [74]. С целью улучшения параметров биосенсора использовали специально синтезированный полимеризующийся аналог цетилтриметиламмонийбромида (МА16) [78]. Этот положительно заряженный ПАЛМ способен образовывать стабильный монослой в отсутствие других липидов, что приводит к повышению суммарного положительного заряда монослоя ПАЛМ и увеличивает адсорбцию фермента на такой монослой. При использовании МА16 амперометрический сигнал биосенсора увеличивался на порядок (рис. 8) по сравнению с наилучшими результатами для смеси фосфатидилхолин–цетилтриметиламмонийбромид, что объясняется увеличением концентрации фермента на единицу площади электрода. После полимеризации монослоя МА16 с адсорбированным ферментом, улучшается воспроизводимость измерений и увеличивается срок службы биосенсора за счет того, что жесткий полимерный монослой липида предотвращает постепенное вымывание фермента с поверхности электрода [78]. Обнаружена линейная зависимость амперометрического сигнала биосенсора от концентрации глюкозы в области 0.5–4.0 мМ (рис. 8). Данный сигнал зависит также от числа

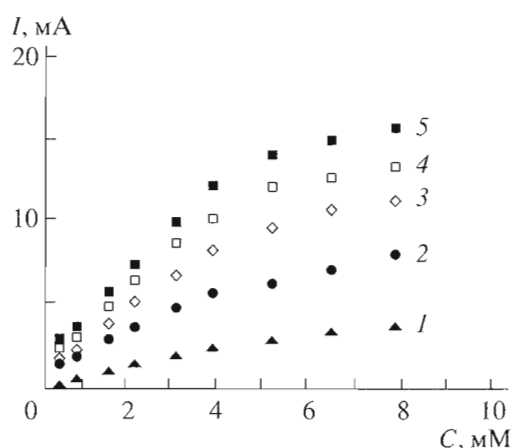


Рис. 8. Зависимость амперометрического отклика от концентрации глюкозы в электрохимической ячейке с платиновым электродом, покрытым двумя (1), четырьмя (2), шестью (3), восемью (4) и десятью (5) монослоями МА16 с иммобилизованной глюкозооксидазой [78].

нанесенных на электрод липид-белковых монослоев и от величины поверхностного давления, при котором осуществлялся перенос липид-белковых монослоев на электрод. Указанные эффекты связаны с изменением количества фермента на электроде при данных условиях. Таким образом, тонкопленочной технологией впервые получен полимерный биосенсор, способный измерять глюкозу в физиологической области концентраций.

Мембранные светочувствительные белки

Нами разработан метод получения стабильных монослоев бактериородопсина и белков реакционных центров из фотосинтетических бактерий [59] на границе раздела фаз. Из данных, полученных методами брюстеровского рассеяния [79], атомно-силовой микроскопии (данные не опубликованы) и малоуглового рентгеновского рассеяния [80] следует, что монослои таких мембранных белков являются адекватной моделью нативных биомембран, так как соответствуют толщине липидного бислоя [59]. Полученные линейные зависимости оптического поглощения мультислойных пленок бактериородопсина при 560 нм (максимум поглощения белка) [81] и величины стационарных фотоиндуцированных изменений при 420 нм (в полосе поглощения относительно стабильного интермедиата M_{412} фотоцикла бактериородопсина) от числа перенесенных монослоев в пленке [82] свидетельствуют о полном сохранении фоточувствительных свойств бактериородопсина в монослой и высоком качестве полученных ленгмюровских пленок. При этом адгезия пленок к использованным подлож-

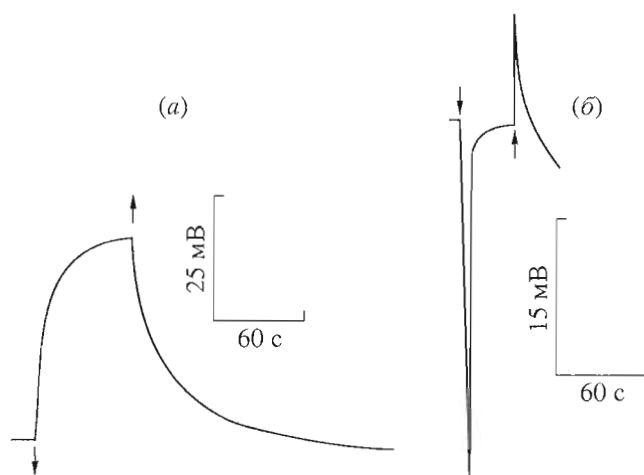


Рис. 9. Фотоэлектрический потенциал лентмюровских пленок, состоящих из 10 монослоев белков реакционных центров и *N*-акрилоилфосфатидилэтанол-амин (1 : 10, моль/моль) (а) и 25 монослоев белков реакционных центров и тетракоза-11,13-диинной кислоты (1 : 100, моль/моль) (б) при фотоактивации (↓ – включение, ↑ – выключение облучения).

кам и их устойчивость, особенно после полимеризации, достаточно высоки.

Анализ данных изотерм монослоев белков реакционных центров [83], спектров гигантского комбинационного рассеяния [84] и фотоэлектрических измерений мультислоев белков реакционных центров и их смесей с липидами [85, 86] указывает на сохранение активности и высокую степень ориентации белка в модельных мембранах (рис. 9). Использование специально синтезированных ПАЛМ позволяет существенно влиять на ориентацию белков реакционных центров в смешанных монослоях и увеличивать стабильность этих монослоев [85, 86], что открывает новые перспективы для создания фоточувствительных материалов на их основе.

Исключительно важны для практического применения следующие свойства полученных фотохромных материалов на основе бактериородопсина: высокая чувствительность и цикличность, узкие и неперекрывающиеся области поглощения исходной и фотоиндуцированной форм, высокая разрешающая способность [87]. Одно из наиболее ценных свойств полученных фотохромных материалов – возможность регулирования времени жизни промежуточного возбужденного состояния бактериородопсина (до 10^3 раз), а следовательно, и времени хранения оптической информации на таком материале как подбором соответствующей полимерной матрицы, так и введением специальных полимерных модифицирующих добавок. Полученные фотохромные материалы были также использованы как фоторефрактивные элементы в голографической виброметрии для бесконтакт-

ной регистрации ультразвуковых вибраций объектов [88].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны С.В. Белову, Е.А. Барышниковой, В.П. Верещетину, Н.А. Калабиной, А.А. Клямкину, А.Н. Генераловой, И.С. Павловой, С.П. Марцеву, Л.Д. Румшу, Н.Е. Ткачук, С.В. Купцовой, А.А. Вихрову, В.А. Несмеянову, Т.Ю. Мареевой, Н.В. Бовину, Е.Ю. Корчагиной, а также Е.П. Лукашеву, С.М. Струковой и Т.Н. Дугиной (МГУ, биофак) за помощь в работе и Российскому фонду фундаментальных исследований (гранты № 98-03-33318а, № 98-03-32359, № 98-04-48217, № 97-03-32781а, № 98-04-48613) за финансовую поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванов А.Е., Сабуров В.В., Zubov В.П. // ЖВХО им. Д.И. Менделеева. 1989. Т. 34. С. 368–377.
2. Ivanov A.E., Saburov V.V., Zubov V.P. // Adv. Polymer. Sci. 1992. V. 104. P. 135–175.
3. Липатов Ю.С., Сергеева Л.М. Адсорбция полимеров. Киев: Наукова думка, 1972.
4. Адсорбция из растворов на поверхности твердых тел: Пер. с англ. / Ред. Г. Парфит, К. Рочестер. М.: Мир, 1986.
5. Гросберг А.Ю., Хохлов А.Р. Статистическая физика макромолекул. М.: Наука, 1989.
6. Barford W., Ball R.C., Nex C.C.M. // J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1. 1986. V. 82. P. 3233–3244.
7. Barford W., Ball R.C. // J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1. 1987. V. 83. P. 2515–2523.
8. Cosgrove T., Prestidge C.A., King S.M., Vincent B. // Langmuir. 1992. V. 8. P. 2206–2209.
9. Nagaoka S., Mori Y., Takiuchi H., Yokota K., Tanzawa H., Nishiumi S. // Polymers as Biomaterials / Ed. S.W. Shalaby. N. Y.: Plenum, 1984. P. 361–374.
10. Иванов А.Е., Жигис Л.С., Туркин С.И., Решетов П.Д., Zubov В.П. // Авт. свид. СССР № 1165751. Открытия и изобретения, № 25, 1985.
11. Иванов А.Е., Жигис Л.С., Турчинский М.Ф., Копьев В.П., Решетов П.Д., Zubov В.П., Кастрикина Л.Н., Лонская Н.И. // Мол. генетика, микробиол. вирусол. 1987. № 11. С. 39–46.
12. Копьев В.П., Жигис Л.С., Решетов П.Д., Бабурина Т.М., Брылина В.И., Пантелеев Ю.В., Сюрин В.Н. // Вопр. вирусол. 1989. № 6. С. 760–765.
13. Иванов А.Е., Жигис Л.С., Чеховских Е.А., Решетов П.Д., Zubov В.П. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. С. 1527–1532.
14. Козлов Л.В., Сизой М.Н., Зинченко А.А., Иванов А.Е., Zubov В.П. // Биоорганич. химия. 1984. Т. 10. С. 1629–1638.
15. Arnold F.H., Blanch H.W., Wilke C.R. // Chem. Eng. J. 1985. V. 30. B25–B36.
16. Иванов А.Е., Zubov В.П. // Журн. физ. химии. 1996. Т. 70. С. 1874–1878.

17. Иванов А.Е., Верховская Л.В., Хилько С.Н., Зубов В.П. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 1028–1039.
18. Иванов А.Е., Белов С.В., Зубов В.П. // Высокомолекул. соед. А. 1994. Т. 36. С. 334–339.
19. Белов С.В., Иванов А.Е., Зубов В.П. / 16-й Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Химия живого. Рефераты докладов и сообщений № 4. М., 1998. С. 12–13.
20. Ivanov A.E., Bovin N.V., Korchagina E.Yu., Zubov V.P. // Biomed. Chromatogr. 1992. V. 6. P. 39–42.
21. Rapoport E.M., Zhigis L.S., Ivanov A.E., Korchagina E.Yu., Ovchinnikova T.V., Zubov V.P., Bovin N.V. // IJBC. 1997. V. 3. P. 57–67.
22. Иванов А.Е., Белов С.В., Зубов В.П. // Высокомолекул. соед. А. 1993. Т. 35. С. 1320–1325.
23. Alpert A.J., Regnier F.E. // J. Chromatogr. 1979. V. 185. P. 375–390.
24. Рапопорт Е.М., Жигис Л.С., Корчагина Е.Ю., Овчинникова Т.В., Зубов В.П., Бовин Н.В. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 353–357
25. Bowman V.H. // Hepatic Plasma Proteins. Mechanism of Function and Regulation. San Diego: Acad. Press. Inc., 1993. P. 47–71.
26. Ikeda K., Sannoh T., Kawasaki N., Kawasaki T., Yamashina I. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 7451–7454.
27. Mold C., Gewurz H. // J. Immunol. 1981. V. 127. P. 2079–2082.
28. Kuhlman M., Joiner K., Ezekowitz R.A.B. // J. Exp. Med. 1989. V. 169. P. 1733–1745.
29. Weis W.I., Drickamer K., Hendrickson W.A. // Nature. 1992. V. 360. P. 127–134.
30. Pepys M.B., Baliz M.L. // Adv. Immunol. 1983. V. 34. P. 141–212.
31. Vajorath Ju., Aruffo A. // Biochem. Biophys. Res. Com. 1995. V. 216. P. 1018–1023.
32. Бовин Н.В., Землянухина Т.В., Чагаишвили Ц.Н., Хорлин А.Я. // Химия природн. соед. 1988. № 6. С. 777–785.
33. Рапопорт Е.М. Лектины: разработка методов выделения, первичная структурная характеристика и углеводная специфичность. Дис. ... к.х.н. М.: ИБХ РАН, 1997. С. 64–65
34. Sudi P., Dala E., Szayani B. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1989. V. 22. P. 31–43.
35. Wu H.-P. // Thromb. Res. 1992. V. 67. P. 419–428.
36. Струкова С.М., Дугина Т.Н., Чистов И.В., Марквичева Е.А., Купцова С.В., Колокольчикова Е.Г., Румш Л.Д., Зубов В.П., Глаза Е. // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. С. 288–292.
37. Markvicheva E.A., Kuptsova S.V., Mareeva T.Yu., Vikhrov A.A., Dugina T.N., Strukova S.M., Belokon Yu.N., Kochetkov K.A., Baranova E.N., Parmar V.S., Kumar R., Zubov V.P., Poncelet D., Rumsh L.D. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1999 (in press).
38. Tuo M.A., Spier R.E. // Enzyme Microb. Technol. 1987. V. 9. P. 514–520.
39. Lee G.M., Gray J.J., Palsson B.O. // Biotechnol. Techniq. 1991. V. 5. P. 295–298.
40. Seifert D. B., Phillips J. A. // Biotechnol. Prog. 1997. V. 13. P. 569–576.
41. Vikhrov A.A., Markvicheva E. A., Mareeva T.Yu., Khaidukov S.V., Nesmeyanov V.A., Manakov M.N., Goergen J.-L., Marc A., Zubov V.P. // Biotechnol. Techn. 1998. V. 12. P. 11–14.
42. Bangs L.B. // Pure and Appl. Chem. 1996. V. 68. P. 1873–1879.
43. Лукин Ю. В., Бахарев В.Н., Заиченко А.С., Воронов С.А., Зубов В.П., Грицкова И.А., Праведников А.Н. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. С. 159–161.
44. Lukin Yu. V., Erokhin E.P., Avdeev D.N., Zubov V.P. // Reactive Polymers. 1991. V. 15. P. 248.
45. Ерохин Е.П., Тартаковский И.С., Радченко О.В., Лукин Ю.В., Авдеев Д.Н., Мисуренко Н.К., Зубов В.П., Прозоровский С.В. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1991. № 11. С. 41–43.
46. Dyachina M.N., Lukin Yu.V., Zubov V.P., Bovin N.V. // Int. J. Leprosy. 1992. V. 60. P. 575–579.
47. Александр С.К., Фидлер М.Н., Лукин Ю.В., Юминова Н.В., Краснова В.П., Ляшенко В.А. // Вопр. вирусологии. 1992. № 5–6. С. 259–261.
48. Воробьева З.Г., Лазовская А.Л., Лукин Ю.В. // Ветеринария. 1996. № 4. С. 27–28.
49. Булашев А.К., Боровиков С.Н., Лукин Ю. В., Зубов В.П., Несмеянов В.А., Ромахов В.А. // Вестник с.-хоз. науки Казахстана. 1991. № 4. С. 41–43.
50. Lunev V.E., Lukin Yu.V., Kazennykh N.A., Belyaev S.V., Zubov V.P., Nesmeyanov V.A. // Biomed. Science. 1990. V. 1. P. 68–72.
51. Lukin Yu.V., Dokuchaev I.M., Polyak I.M., Eremin S.A. // Anal. Letters. 1994. V. 27. P. 2973–2982.
52. Lukin Yu.V., Generalova A.N., Tyrtsh T.V., Eremin S.A. // Immunochemical Technology for Environmental Applications. ACS Symposium Series 657/ Ed. Diana S. Aga et al. Wash.: American Chemical Society. DC, 1997. Chapter 8. P. 97–105.
53. Павлова И.С., Любавина И.А., Лукин Ю.В., Цибульская М.И., Королев П. Н. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 223–227.
54. Vener T.I., Turchinsky M.F., Knorre V.D., Lukin Yu.V., Shcherbo S.N., Zubov V.P., Sverdlov E.D. // Anal. Biochem. 1991. V. 198. P. 308–311.
55. Жоров О.В., Прейгерзон В.А., Лукин Ю.В., Зубов В.П., Марцев С.П. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 261–267.
56. Павлова И.С., Лукин Ю.В., Коваленко В.А., Авдеев Д.Н., Кульшин В.А., Зубов В.П. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 731–739.
57. Lukin Yu.V., Pavlova I.S., Generalova A.N., Zubov V.P., Zhorov O.V., Martsev S.P. // J. Molecular Recognition. 1998. V. 11. P. 185–187.
58. Lehn J.-M. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1990. T. 29. С. 1304–1319.
59. Овчинников Ю.А. Биорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. С. 570–580.
60. Fendler J.H. Membrane-Mimetic Approach to Advanced Materials. Berlin: Springer-Verlag, 1994.

61. Ahlers M., Mueller W., Reichert A., Ringsdorf H., Venzmer J. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1990. V. 29. P. 1269–1285.
62. Бадер Х., Дорн К., Хунфер Б., Рингдорф Х. // *Успехи химии*. 1987. Т. 56. С. 2028–2077.
63. Арсланов В.В. // *Успехи химии*. 1994. Т. 63. С. 3–42.
64. Зайцев С.Ю., Егоров В.В., Зубов В.П. // *Высокомолек. соед. А*. 1997. Т. 39. С. 90–103.
65. Kuhn H. // *Thin Solid Films*. 1989. V. 178. P. 1–16.
66. Moebius D., Moehwald H. // *Advanced Materials*. 1991. V. 3. P. 19–24.
67. Petty M.C. // *Thin Solid Films*. 1992. V. 210/211. P. 417–426.
68. Ulman A.A. *An Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir-Blodgett to Self-assembly*. Boston: Acad. Press, 1991.
69. Birdi K.S. *Lipid and Biopolymer Monolayers at Liquid Interfaces*. N. Y.: Plenum Press, 1989.
70. Егоров В.В., Зайцев С.Ю., Зубов В.П. // *Высокомолек. соед. А*. 1991. Т. 33. С. 1587–1608.
71. Зайцев С.Ю., Клямкин А.А., Плясова Е.П., Верещетин В.П., Зубов В.П. // *Высокомолек. соед. Б*. 1995. Т. 37. С. 1762–1764.
72. Себякин Ю.Л., Смирнова Ю.В., Клямкин А.А., Ксенофонтова О.Б., Зайцев С.Ю., Егоров В.В., Евстигнеева Р.П. // *Докл. АН СССР*. 1992. Т. 322. С. 929–934.
73. Moriizumi T. // *Thin Solid Films*. 1988. V. 160. P. 413–429.
74. Zaitsev S.Yu. // *Colloids and Surfaces*. 1993. V. 75. P. 211–216.
75. Sriyudthsak M., Yamagishi H., Moriizumi T. // *Thin Solid Films*. 1988. V. 160. P. 463–469.
76. Okahata Y., Tsuruta T., Ijiro K., Ariga K. // *Langmuir*. 1988. V. 4. P. 1373–1382.
77. Arizawa S., Yamamoto R. // *Thin Solid Films*. 1992. V. 210/211. P. 443–445.
78. Zaitsev S.Yu. // *Sensors and Actuators*. 1996. V. 24–25. P. 177–179.
79. Зайцев С.Ю., Маак Ю., Мебуис Д., Зубов В.П. // *Биол. мембраны*. 1994. Т. 11. С. 525–530.
80. Zaitsev S.Yu., Lvov Yu.M. // *Thin Solid Film*. 1995. V. 254. P. 257–262.
81. Лукашев Е.П., Зайцев С.Ю., Кононенко А.А., Зубов В.П. // *Докл. АН СССР*. 1989. Т. 308. С. 225–230.
82. Zaitsev S.Yu., Zubov V.P. // *Macromol. Symposia*. 1991. V. 46. P. 9–17.
83. Калабина Н.А., Зайцев С.Ю., Зубов В.П. // *Биол. мембраны*. 1994. Т. 11. С. 324–333.
84. Zaitsev S.Yu., Kalabina N.A., Zubov V.P., Chumanov G., Gaul D., Cotton T.M. // *Colloids and Surfaces*. 1993. V. 78. С. 211–219.
85. Zaitsev S.Yu., Kalabina N.A., Zubov V.P., Lukashev E.P., Kononenko A.A., Uphaus R.A. // *Thin Solid Films*. 1992. V. 210/211. P. 723–725.
86. Kalabina N.A., Zaitsev S.Yu., Zubov V.P., Lukashev E.P., Kononenko A.A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1996. V. 1284. P. 138–142.
87. Абдулаев Н.Г., Барменков Ю.О., Зайцев С.Ю., Зосимов В.В., Зубов В.П., Кожевников Н.М., Лямшев Л.М., Новикова М. Б. // *А.с. СССР № 1473563*, 1988.
88. Zaitsev S.Yu., Kozhevnikov N.M., Barmenkov Yu. O., Lipovskaya M.Yu. // *Photochemistry and Photobiology*. 1992. V. 55. P. 851–856.

Molecular Construction of Polymer Materials for Biotechnology and Medicine

V. P. Zubov[#], A. E. Ivanov, L. S. Zhigis, E. M. Rapoport,
E. A. Markvicheva, Yu. V. Lukin, and S. Yu. Zaitsev

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

This review describes new polymer materials for biomedical applications developed in the Polymers for Biology Laboratory of the Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences. These include composite rigid sorbents for biochromatography, polymer dispersions for immunoassay, polymer hydrogels for immobilization of enzymes and cells, and polymer ultra thin films as biomembrane models and materials for biosensors. Some general and specific properties of these new materials and models as well as examples of their applications are discussed.

Key words: polymers, adsorbed and chemisorbed grafted phases, composite biosorbents, immobilization of enzymes and cells, reagents for immunoassay, polymer oriented films, biosensors

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 336-06-00; fax: (095) 335-1011; e-mail: zubov@ibch.siobc.ras.ru.