



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108064253 B

(45)授权公告日 2020.09.15

(21)申请号 201680039240.X

S.拉森

(22)申请日 2016.07.01

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108064253 A

代理人 肖靖泉

(43)申请公布日 2018.05.22

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

C08F 220/58(2006.01)

62/188,389 2015.07.02 US

C08F 230/08(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.01.02

C08F 222/38(2006.01)

C08F 220/70(2006.01)

C08F 8/12(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C08J 3/075(2006.01)

PCT/US2016/040755 2016.07.01

(56)对比文件

(87)PCT国际申请的公布数据

JP H0812490 B2,1996.02.07

W02017/004556 EN 2017.01.05

CN 104203964 A,2014.12.10

CN 104245745 A,2014.12.24

(73)专利权人 生命技术公司

Brett A. Helms, et al.High-Affinity
Peptide-Based Collagen Targeting Using

地址 美国加利福尼亚州

专利权人 生命科技公司

Synthetic Phage Mimics: From Phage

(72)发明人 G.福纳姆 S.M.门辰 T.M.戈克门

P.伦德伯格 P.K.特瓦尔 A.鲁伊

L.卢 W.欣茨 L.胡萨博

E.布赖沃尔德 A.E.莫尔特伯格

Display to Dendrimer Display.《JACS》.2009,
第133卷(第33期),

审查员 孙书轩

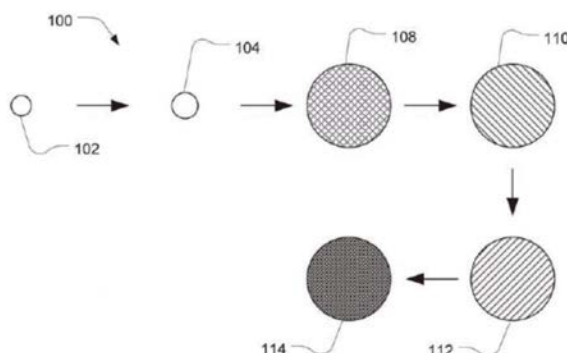
权利要求书3页 说明书20页 附图1页

(54)发明名称

由羧基官能丙烯酸酰胺形成的聚合物基质

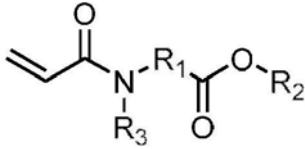
(57)摘要

本发明提供了一种由羧基官能单体形成的聚合物基质,所述聚合物基质诸如聚合物颗粒。在一个实例中,所述羧基官能单体具有取代所述羧基基团的所述OH的保护基团。一旦所述单体被聚合,则能够去除此类保护基团,提供具有羧基官能位点的聚合物网络。此类位点能够用于使其其它官能团附接到所述聚合物基质。



CN 108064253 B

1. 一种形成颗粒的方法,所述方法包括:
在水性悬浮液内的分散相中,使具有下式的多个单体聚合:



其中R₁为具有3至10个碳的亚烷基基团或具有1至10个醚单元的聚醚基团,其中R₂为具有3至8个碳的直链或支链烷基基团或甲硅烷基基团,并且其中R₃为氢或具有1至6个碳的烷基基团;

- 由此形成包含多个疏水性保护基团的聚合物颗粒;以及
使所述聚合物颗粒转化为亲水性颗粒。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述亲水性颗粒为水凝胶颗粒。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,还包含所述分散相中的亲水性单体,其中所述亲水性单体包括丙烯酰胺单体。
4. 根据权利要求1-2中任一权利要求所述的方法,其中所述分散相还包括具有疏水性保护基团的二丙烯酰胺交联剂。
5. 根据权利要求1-2中任一权利要求所述的方法,其中转化所述聚合物颗粒包括从所述聚合物颗粒中去除所述多个R₂基团中的至少一部分。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中去除所述多个R₂基团中的至少一部分包括从所述聚合物颗粒中酸裂解所述多个R₂基团中的至少一部分。
7. 根据权利要求1-2中任一权利要求所述的方法,还包括促进种子颗粒在所述水性悬浮液中形成所述分散相。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述单体:种子颗粒质量比在150:1至1:1的范围内。
9. 根据权利要求7所述的方法,其中所述种子颗粒包括种子聚合物。
10. 根据权利要求9所述的方法,还包括在转化所述聚合物颗粒之后提取所述种子聚合物。
11. 根据权利要求9所述的方法,其中所述种子聚合物是疏水性的。
12. 根据权利要求9所述的方法,其中所述种子聚合物包括苯乙烯类聚合物、丙烯酸类聚合物、丙烯酰胺类聚合物、或它们的组合。
13. 根据权利要求7所述的方法,其中促进所述种子颗粒包括使溶剂和促进剂与所述种子颗粒混合。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述促进剂包括二辛酰过氧化物或己二酸二辛酯或具有低于20kD的分子量的聚苯乙烯。
15. 根据权利要求1-2中任一权利要求所述的方法,其中所述分散相还包括丙烯酰胺、羟烷基丙烯酰胺或它们的组合,所述丙烯酰胺或羟烷基丙烯酰胺与所述多个单体聚合。
16. 根据权利要求1-2中任一权利要求所述的方法,其中使所述多个单体聚合还包括使交联剂与所述多个单体混合。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中混合所述交联剂包括以在15:1至1:2范围内的单

体:交联剂质量比混合所述交联剂。

18. 根据权利要求16所述的方法,其中所述交联剂为二乙烯基交联剂。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述二乙烯基交联剂包括二丙烯酰胺。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述二丙烯酰胺包括N,N'-(乙烷-1,2-二基)双(N-(2-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)乙基)丙烯酰胺、N,N'-(2-羟基丙烷-1,3-二基)二丙烯酰胺、或它们的组合。

21. 根据权利要求19所述的方法,其中所述二丙烯酰胺包括N,N'-(乙烷-1,2-二基)双(N-(2-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)乙基)丙烯酰胺、N,N'-(N-(2-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)丙烷-1,3-二基)二丙烯酰胺、N,N'-(乙烷-1,2-二基)双(N-(2-((三乙基甲硅烷基)氧基)乙基)丙烯酰胺、N,N'-(N-(2-((三乙基甲硅烷基)氧基)丙烷-1,3-二基)二丙烯酰胺、N,N'-(2,3-双((三乙基甲硅烷基)氧基)丁烷-1,4-二基)二丙烯酰胺或它们的组合。

22. 根据权利要求16所述的方法,其中所述交联剂包括乙二醇二甲基丙烯酸酯、二乙烯基苯、六亚甲基双丙烯酰胺、三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯或它们的组合。

23. 根据权利要求1-2中任一权利要求所述的方法,其中使所述多个单体聚合包括使致孔剂混合到所述分散相中。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述致孔剂为芳香族致孔剂。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述芳香族致孔剂包括甲苯、二甲苯、均三甲苯、乙酸苯乙酯或苯甲酸乙酯。

26. 根据权利要求1-2中任一权利要求所述的方法,还包括活化所述亲水性颗粒。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中活化包括将琥珀酰亚胺基化合物应用于所述亲水性颗粒。

28. 根据权利要求26所述的方法,还包括使寡核苷酸结合到所述活化的亲水性颗粒。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中结合包括亲核取代,并且所述寡核苷酸为亲核体封端的寡核苷酸。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述亲核体封端的寡核苷酸的亲核体为胺基。

31. 根据权利要求28所述的方法,还包括使多核苷酸与所述寡核苷酸杂交。

32. 根据权利要求31所述的方法,还包括使所述多核苷酸扩增为多个多核苷酸,并且使所述多个多核苷酸的至少一部分附接至所述活化的亲水性颗粒,由此生成包括多个附接的多核苷酸的水凝胶颗粒。

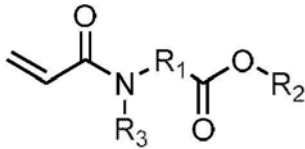
33. 根据权利要求31所述的方法,还包括通过延伸所述寡核苷酸使所述多核苷酸扩增为多个互补多核苷酸,由此生成包括多个附接的多核苷酸的水凝胶颗粒。

34. 根据权利要求2所述的方法,其中所述水凝胶颗粒具有至少0.01微米且不大于3微米的平均粒度。

35. 根据权利要求2所述的方法,其中所述水凝胶颗粒具有在5微米至100微米范围内的平均粒度。

36. 根据权利要求1-2中任一权利要求所述的方法,其中所述聚合物颗粒具有正 $\log(p)$ 值,并且在转化后,所述亲水性颗粒具有负 $\log(p)$ 值。

37. 一种颗粒群,所述颗粒群具有不大于5%变异系数并且包含来源于具有下式的化合物的聚合的聚合物:



其中R₁为具有3至10个碳的亚烷基基团或具有1至10个醚单元的聚醚基团,其中R₂为具有3至8个碳的直链或支链烷基基团或甲硅烷基基团,并且其中R₃为氢或具有1至6个碳的烷基基团;并且

其中在去除R₂后,当暴露于水时,所述颗粒吸收基于所述聚合物重量至少300重量%且不大于10⁶重量%的水。

38. 根据权利要求37所述的颗粒群,其中所述聚合物还来源于受保护的丙烯酰胺或受保护的羟烷基丙烯酰胺与所述化合物的聚合。

39. 根据权利要求37或权利要求38所述的颗粒群,其中所述聚合物还来源于交联剂与所述化合物的聚合。

40. 根据权利要求39所述的颗粒群,其中所述交联剂包括二丙烯酰胺。

41. 根据权利要求40所述的颗粒群,其中所述二丙烯酰胺包括N,N'-(乙烷-1,2-二基)双(2-羟乙基)丙烯酰胺、N,N'-(2-羟基丙烷-1,3-二基)二丙烯酰胺或它们的组合。

42. 根据权利要求40所述的颗粒群,其中所述二丙烯酰胺包括N,N'-(乙烷-1,2-二基)双(N-(2-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)乙基)丙烯酰胺、N,N'-(N-(2-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)丙烷-1,3-二基)二丙烯酰胺、N,N'-(乙烷-1,2-二基)双(N-(2-((三乙基甲硅烷基)氧基)乙基)丙烯酰胺、N,N'-(N-(2-((三乙基甲硅烷基)氧基)丙烷-1,3-二基)二丙烯酰胺、N,N'-(2,3-双((三乙基甲硅烷基)氧基)丁烷-1,4-二基)二丙烯酰胺或它们的组合。

43. 根据权利要求37-38中任一权利要求所述的颗粒群,其中R₁为具有3至6个碳的亚烷基基团。

44. 根据权利要求43所述的颗粒群,其中R₁为具有3至5个碳的亚烷基基团。

45. 根据权利要求37-38中任一权利要求所述的颗粒群,其中R₁为具有2至6个单元的聚醚基团。

46. 根据权利要求37-38中任一权利要求所述的颗粒群,其中所述R₁的单元包括环氧乙烷或环氧丙烷单元。

47. 根据权利要求37-38中任一权利要求所述的颗粒群,其中R₂为具有3至8个碳的支链烷基基团。

48. 根据权利要求47所述的颗粒群,其中R₂为具有3至5个碳的支链烷基基团。

49. 根据权利要求48所述的颗粒群,其中R₂为具有4个碳的支链烷基基团。

50. 根据权利要求37-38中任一权利要求所述的颗粒群,其中R₃为氢。

51. 根据权利要求37-38中任一权利要求所述的颗粒群,其中R₃为甲基或乙基基团。

52. 根据权利要求37-38中任一权利要求所述的颗粒群,其中当暴露于水时,所述颗粒吸收基于所述聚合物重量至少1000重量%且不大于10⁶重量%的水。

53. 根据权利要求37-38中任一权利要求所述的颗粒群,其中所述颗粒具有不大于100微米的粒度。

由羧基官能丙烯酸酰胺形成的聚合物基质

技术领域

[0001] 本公开整体涉及羧基官能丙烯酸酰胺、由此类羧基官能丙烯酸酰胺形成的聚合物基质及形成此类聚合物基质的方法。

背景技术

[0002] 聚合物颗粒越来越多地用作分离技术中的组分，并且帮助检测化学和生物系统两者中的分析物。例如，聚合物颗粒已用于色谱技术中以从溶液中分离目标分子。又如，具有磁性涂层的聚合物颗粒用于磁性分离技术中。最近，聚合物颗粒已用于增强ELISA型技术并且可用于捕获多核苷酸。

[0003] 许多此类技术和颗粒的使用依赖于对聚合物进行官能化。然而，使聚合物官能化带来了与控制具有所需官能团的位点的数量和通过聚合物网络到达待官能化的位点的挑战。

[0004] 因此，期望提供可一种改善的聚合物颗粒及制造此类聚合物颗粒的方法。

发明内容

[0005] 在一个示例性实施例中，提供了一种由羧基官能单体形成的聚合物基质，所述聚合物基质诸如聚合物颗粒。在一个实例中，羧基官能单体具有取代羧基基团的OH的保护基团。一旦单体被聚合，则能够去除此类保护基团，提供具有羧基官能位点的聚合物网络。此类位点可用于使官能团附接到聚合物基质。

[0006] 附图简略说明

[0007] 通过参考附图，本公开内容可得到更好理解，并且其众多特征和优点对于本领域技术人员变得显而易见。

[0008] 图1包括用于制造示例性聚合物颗粒的示例性流程的图示。

[0009] 图2包括利用聚合物颗粒的示例性测序方法的图示。

[0010] 不同附图中使用的相同参考符号指示相似或相同的项目。

具体实施方式

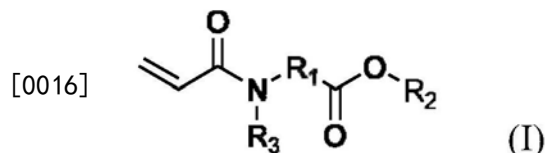
[0011] 在一个示例性实施例中，提供了一种由羧基官能单体形成的聚合物基质，所述聚合物基质诸如聚合物颗粒。在一个实例中，羧基官能单体具有取代羧基基团的OH的保护基团。保护基团可在聚合反应中保护OH基团或者能够使得单体更易于与疏水相混溶。一旦单体发生聚合，则可去除保护基团，提供具有羧基官能位点的聚合物网络。此类位点可用于使官能团附接到聚合物基质，诸如低聚物引物。

[0012] 在一个具体实例中，单体溶液可分配于亲水相或水性连续相内的疏水性分散相中。在一个实例中，疏水性分散相可由疏水性聚合物珠形成。单体溶液可包括受保护的羧基官能单体，诸如受保护的羧基官能丙烯酸酰胺。任选地，单体溶液还可包括其它单体、交联剂、致孔剂、催化剂或它们的任何组合。

[0013] 在一个实例中,单体可包括受保护的羧基官能丙烯酸酯单体。具体地,受保护的羧基官能丙烯酸酯包含保护基团,该保护基团保护羧基官能团的亲水性OH。保护基团可在聚合反应中保护OH基团,防止其发生反应,或者使得单体更易于与疏水相混溶。具体地,保护基团可从单体上裂解,或从由单体形成的聚合物网络上裂解。例如,保护基团可由酸裂解,具体地,在不引起聚合物网络水解的pH下裂解。

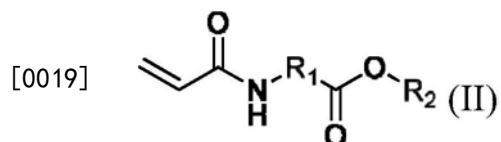
[0014] 例如,保护基团可包括甲硅烷基基团。在另一个实例中,保护基团可包括具有至少三个碳的直链或支链烷基基团。例如,烷基基团可包含3至8个碳,诸如3至6个碳或3至5个碳。具体地,保护基团可为支链烷基基团,诸如具有3至5个碳(诸如4个碳)的支链烷基基团。

[0015] 例如,单体可具有式(I):



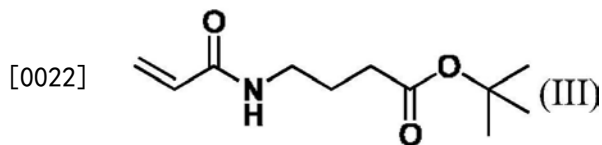
[0017] 其中R₁为具有3至10个碳的烷基基团、具有1至10个醚单元的聚醚基团或为其它非离子型极性基团,其中R₂为具有3至8个碳的直链或支链烷基基团或者为甲硅烷基基团,并且其中R₃为氢或具有1至6个碳的烷基基团。在一个具体实例中,R₁为具有3至10个碳的烷基基团或为具有1至10个醚单元的聚醚基团。例如,R₁可为具有3至6个碳(诸如3至5个碳)的烷基基团。在另一个实例中,R₁可为聚醚基团,该聚醚基团包括在2至6个单元的范围(诸如2至4个单元)的环氧乙烷或环氧丙烷单元。在另一个实例中,R₁可为非离子型极性基团,例如包括酰胺。在一个实例中,R₂为具有3至5个碳(诸如4个碳)的支链烷基基团。具体地,R₂可为异丙基、异丁基、仲丁基、或叔丁基或它们的任何组合。甲硅烷基基团可为三烷基甲硅烷基基团、有机二甲硅烷基基团或有机三甲硅烷基基团。例如,三烷基甲硅烷基基团可为三甲基甲硅烷基或三乙基甲硅烷基基团。在另一个实例中,R₃为氢。在另一个实例中,R₃为甲基或乙基基团。

[0018] 在一个实例中,单体可具有式(II):



[0020] 其中R₁为具有3至10个碳的烷基基团或为具有1至10个醚单元的聚醚基团,并且其中R₂为具有3至8个碳的直链或支链烷基基团或者为甲硅烷基基团。例如,R₁可为具有3至6个碳(诸如3至5个碳)的烷基基团。在另一个实例中,R₁可为聚醚基团,该聚醚基团包括在2至6个单元的范围(诸如2至4个单元)的环氧乙烷或环氧丙烷单元。在一个实例中,R₂为具有3至5个碳(诸如4个碳)的支链烷基基团。具体地,R₂可为异丙基、异丁基、仲丁基、或叔丁基或它们的任何组合。甲硅烷基基团可为三烷基甲硅烷基基团、有机二甲硅烷基基团或有机三甲硅烷基基团。例如,三烷基甲硅烷基基团可为三甲基甲硅烷基或三乙基甲硅烷基基团。

[0021] 在一个具体实例中,受保护的羧基官能单体可为由叔丁基保护基团保护且具有式(III)的丙烯酸酯基丁酸酯:



[0023] 在一个实例中,式(I)、(II)或(III)的受保护的羧基官能单体可通过受保护的氨基链烷酸盐(诸如氨基链烷酸烷基酯盐酸盐)与丙烯酰氯反应形成。例如,化学计量的氨基链烷酸烷基酯盐酸盐(诸如氨基丁酸叔丁酯盐酸盐)在二氯甲烷溶剂中,可在一定温度范围内与碳酸钾水溶液混合,该温度范围为 -10°C 至 10°C ,诸如 -5°C 至 5°C 。可加入丙烯酰氯溶液,并在相同温度条件下对混合物进行搅拌。可采用溶剂诸如二氯甲烷对混合物进行萃取。可在减压或真空下除去溶剂。

[0024] 在一个实例中,上述单体可聚合形成聚合物基质。例如,聚合物基质可为聚合物涂层或聚合物膜。在另一个实例中,聚合物基质可为聚合物颗粒或聚合物珠。例如,聚合物颗粒可使用乳液聚合作用形成,或可形成于亲水性连续相内的疏水性分散相中。

[0025] 例如,如图1所示,用于形成聚合物颗粒的方法100包括提供种子颗粒102,促进该种子颗粒102形成分散相104。将受保护的一种或多种单体加入悬浮液中,并且优选地居于由促进的种子颗粒所形成的分散相104中。使所述一种或多种单体与任选的交联剂聚合形成聚合物颗粒108。聚合物颗粒108可从种子颗粒剥离种子聚合物以形成聚合物颗粒110。去除聚合物颗粒110上的保护基团以形成亲水性颗粒112。可活化亲水性颗粒112以形成缀合颗粒114。

[0026] 种子颗粒102可包括种子聚合物。在一个实例中,种子聚合物是疏水性的。具体地,种子聚合物可包括苯乙烯类聚合物、丙烯酸类聚合物、丙烯酰胺、另一种乙烯基聚合物或它们的组合。在一个实例中,种子颗粒102是单分散的,例如具有不大于20%的变异系数。变异系数(CV)是指标准偏差除以平均值乘以100,其中“平均值”为平均粒径,并且标准偏差为粒度的标准偏差。另选地,“平均值”可为z-平均值或模式粒径。根据通常的实践,CV在主模式即主峰上进行计算,从而排除与聚集体相关的小峰。因此,低于或高于模式大小的一些颗粒可在计算中不计算,所述计算可例如基于可检测颗粒的总粒子数的约90%。此类CV测定可在CPS圆盘式离心机上执行。具体地,种子颗粒102群体可具有不大于10%诸如不大于5.0%、不大于3.5%、不大于3%、不大于2.5%、不大于2%或甚至不大于1.0%的变异系数。另外,种子颗粒102可具有不大于 $0.6\mu\text{m}$ 的初始粒度。例如,初始粒度可不大于 $0.45\mu\text{m}$,诸如不大于 $0.35\mu\text{m}$,或甚至不大于 $0.15\mu\text{m}$,但至少为 $0.001\mu\text{m}$ 。另选地,具有至少 $3\mu\text{m}$ 诸如至少 $5\mu\text{m}$ 、至少 $10\mu\text{m}$ 、至少 $20\mu\text{m}$ 或至少 $50\mu\text{m}$ 的初始粒度的更大的种子颗粒可用于形成更大的聚合物颗粒。在一个实例中,初始粒度可以不大于 $100\mu\text{m}$ 。

[0027] 种子颗粒102在水性悬浮液内可得到促进以形成促进的分散相104。具体地,促进种子颗粒包括使溶剂和促进剂与种子颗粒在水性悬浮液内混合以形成分散相。促进的种子颗粒更容易吸收疏水性组分。溶剂可为与水混溶的。例如,溶剂可包括醛或酮,诸如甲醛、丙酮、甲基乙基酮、二异丙基酮、二甲基甲酰胺或它们的组合;醚溶剂,诸如四氢呋喃、二甲醚或它们的组合;酯溶剂;杂环溶剂,诸如吡啶、二噁烷、四氢糠醇、N-甲基-2-吡咯烷酮或它们的组合;或它们的组合。在一个实例中,溶剂可包括酮,诸如丙酮。在另一个实例中,溶剂可包括醚溶剂,诸如四氢呋喃。在另一个实例中,溶剂可包括杂环溶剂,诸如吡啶。

[0028] 促进剂或促进试剂可以是疏水的,并且具有低水溶性,诸如在 25°C 下不大于

0.01g/L的水溶性。例如,促进剂可包括二辛酰过氧化物、己二酸二辛酯、邻苯二甲酸正丁酯、十二烷醇、具有低于20kD的分子量的聚苯乙烯或它们的组合。在一个实例中,二辛酰过氧化物还可用作聚合反应的引发剂。促进剂还可为低分子量聚苯乙烯,例如使用低单体/引发剂比率在单独的聚合步骤中制得,或在种子聚合过程中添加链转移试剂来制得。促进剂通常在高压均化器中乳化。

[0029] 水性悬浮液还可包括表面活性剂。表面活性剂可为离子表面活性剂、两性表面活性剂或非离子表面活性剂。离子表面活性剂可为阴离子表面活性剂。在另一个实例中,离子表面活性剂可为阳离子表面活性剂。示例性阴离子表面活性剂包括硫酸盐表面活性剂、磺酸盐表面活性剂、磷酸盐表面活性剂、羧酸盐表面活性剂或它们的任何组合。示例性硫酸盐表面活性剂包括烷基硫酸盐,诸如月桂基硫酸铵、月桂基硫酸钠(十二烷基硫酸钠(SDS))或它们的组合;烷基醚硫酸盐,诸如月桂基聚醚硫酸钠、肉豆蔻醇聚醚硫酸钠或它们的任何组合;或它们的任何组合。示例性磺酸盐表面活性剂包括烷基磺酸盐,诸如十二烷基磺酸钠;多库酯钠,诸如琥珀酸二辛酯磺酸钠;烷基苄基磺酸盐;或它们的任何组合。示例性磷酸盐表面活性剂包括烷基芳基醚磷酸盐、烷基醚磷酸盐、或它们的任何组合。示例性羧酸表面活性剂包括烷基羧酸盐,诸如脂肪酸盐或硬脂酸钠;月桂酰肌氨酸钠;胆汁酸盐,诸如脱氧胆酸钠;或它们的任何组合。

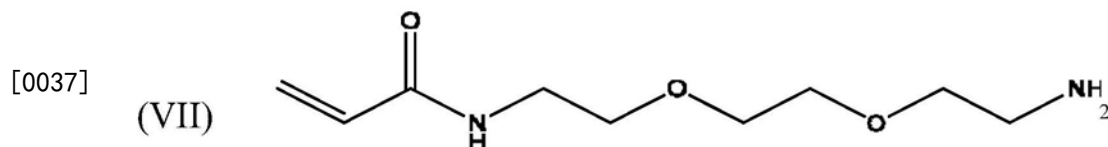
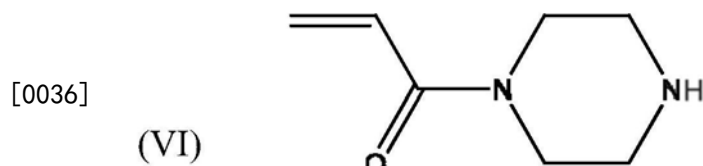
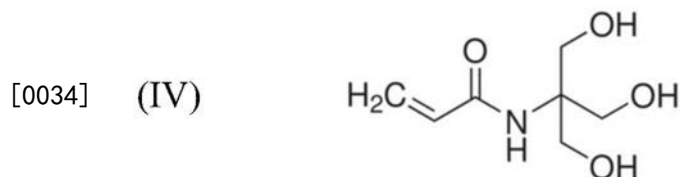
[0030] 示例性阳离子表面活性剂包括伯胺、仲胺或叔胺、季铵表面活性剂或它们的任何组合。示例性季铵表面活性剂包括烷基三甲基铵盐,诸如十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)或十六烷基三甲基氯化铵(CTAC);西吡氯铵(CPC);聚乙氧基化牛油胺(POEA);苯扎氯铵(BAC);苄索氯铵(BZT);5-溴-5-硝基-1,3-二噁烷;双十八烷基二甲基氯化铵;双十八烷基二甲基溴化铵(DODAB);或它们的任何组合。

[0031] 示例性两性表面活性剂包括具有磺酸盐、羧酸盐或磷酸盐阴离子的伯胺、仲胺或叔胺或季铵阳离子。示例性磺酸盐两性表面活性剂包括(3-[(3-胆酰胺丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸盐);磺基甜菜碱(sultaine),诸如椰油酰胺丙基羟基磺基甜菜碱;或它们的任何组合。示例性羧酸两性表面活性剂包括氨基酸、亚氨酸、甜菜碱诸如椰油酰胺丙基甜菜碱或它们的任何组合。示例性磷酸盐两性表面活性剂包括卵磷脂。在另一个实例中,表面活性剂可为非离子表面活性剂,诸如基于聚乙二醇的表面活性剂。

[0032] 返回图1,加入悬浮液中的一种或多种单体优选地自然居于由促进的种子颗粒所形成的分散相104中。交联剂诸如疏水性交联剂也可加入水性悬浮液中,并且可优先居于分散相中。在一个实例中,交联剂具有不大于10g/L的水溶性。另外,致孔剂可加入水性悬浮液中,并且可优先居于分散相中。在另一个实例中,分散相可包括丙烯酸亚磷酰胺(acrydite)寡核苷酸,诸如离子交换的丙烯酸亚磷酰胺寡核苷酸。如图1所示,单体与任选的交联剂聚合形成聚合物颗粒108。

[0033] 如上所述,单体可包括受保护的羧基官能丙烯酸酯。除受保护的羧基官能单体之外,可包括一种或多种共聚单体以优选居于分散相104中并且与受保护的羧基官能单体聚合。共聚单体可为可自由基聚合的共聚单体,诸如乙烯基共聚单体。具体地,共聚单体可包括与疏水性保护基团偶联的亲水性单体。在一个实例中,亲水性共聚单体可包括丙烯酰胺、乙酸乙烯酯、甲基丙烯酸羟烷基酯或它们的任何组合。在一个具体实例中,亲水性共聚单体为丙烯酰胺,诸如包含羟基、氨基、羧基或它们组合的丙烯酰胺。在一个实例中,亲水性共聚

单体为氨基烷基丙烯酸酯、由胺封端的聚丙二醇官能化丙烯酸酯(下文所示的VI)、丙烯酸基哌嗪(下文所示的VII)或它们的组合。在另一个实例中,丙烯酸酯共聚单体可为羟烷基丙烯酸酯,诸如羟乙基丙烯酸酯。具体地,羟烷基丙烯酸酯可包括N-三(羟甲基)甲基丙烯酸酯(下文所示的IV)、N-(羟甲基)丙烯酸酯(下文所示的V)或它们的组合。



[0038] 在一个具体实例中,亲水性共聚单体包含羟基基团或包含胺基。疏水性保护基团例如通过与羟基基团或胺基键合来屏蔽共聚单体的亲水性。当与羟基基团键合时,此类保护基团在本文中被称作羟基保护基团或氢氧基保护基团。具体地,疏水性保护基团可通过诸如裂解(例如,酸裂解)去除。疏水性基团可被选择为在酸性条件下裂解,所述酸性条件不导致下面的聚合物或其一部分发生水解。例如,对于低于6的pH,当丙烯酸酯聚合物存在时,疏水性保护基团在比丙烯酸酯的酰胺部分发生水解的pH更高的pH条件下裂解。对于高于9的pH,疏水性保护基团在比丙烯酸酯的酰胺部分发生水解的pH更低的pH条件下裂解。

[0039] 示例性疏水性保护基团包括有机金属部分。例如,有机金属部分可形成甲硅烷基醚官能团。甲硅烷基醚官能团可来源于卤代甲硅烷基化合物,诸如具有通式 $R_1Si(R_2)(R_3)(R_4)$ 的化合物,其中 R_1 为卤素,诸如氯,并且 R_2 、 R_3 和 R_4 独立地选自氢、烷基基团(诸如甲基、乙基、丙基、丁基)、芳基基团、甲硅烷基基团、它们的醚衍生物或它们的任何组合。示例性甲硅烷基醚官能团来源于叔丁基二甲基氯硅烷、三甲基氯硅烷、三乙基氯硅烷、三丙基氯硅烷、三丁基氯硅烷、二苯基甲基氯硅烷、氯(二甲基)苯基硅烷或它们的组合。在一个具体实例中,受保护的单体包括N-(2-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)乙基)丙烯酸酯或tBDMS-HEAM、N-(2-((三乙基甲硅烷基)氧基)乙基)丙烯酸酯或TES-HEAM或它们的组合。在另一个实例中,疏水性保护基团可包括有机部分。示例性有机部分可包括烷氧羰基部分,诸如叔丁氧羰基、苄基甲氧羰基或它们的组合。在一个实例中,此类有机部分可为与胺官能团结合的疏水性保护基团,所述胺官能团诸如胺官能化丙烯酸酯或其共聚物的胺官能团。

[0040] 在另一个实例中,可使用羧基官能单体与共聚单体的混合物,诸如羧基官能丙烯酸酯单体与羟烷基丙烯酸酯共聚单体的混合物,或羧基官能丙烯酸酯单体与胺官能化丙烯酸酯共聚单体的混合物。在一个实例中,包括的羧基官能丙烯酸酯单体相对于羟烷基丙烯

酰胺或胺官能化丙烯酸酰胺共聚单体的比率可在2:1至1:1000范围内,诸如在1:1至1:500范围内,在1:2至1:500范围内,1:5至1:500范围内,或甚至在1:10至1:200范围内。

[0041] 包括的受保护的单体和共聚单体(统称为“受保护的单体”)相对于初始种子聚合物的量以重量比(受保护的单体:种子聚合物)来表示,该重量比在500:1至1:2范围内,诸如在200:1至1:1范围内,在100:1至5:1范围内,在90:1至10:1范围内,或甚至在80:1至30:1范围内。另选地,包括的受保护的单体的量可在10:1至1:2范围内,诸如在5:1至1:2范围内,或甚至在2:1至1:2范围内。

[0042] 分散相还可包括交联剂。在一个实例中,包括的交联剂使得受保护的单体与交联剂的质量比在15:1至1:2范围内,诸如在10:1至1:1范围内,在6:1至1:1范围内,或甚至在4:1至1:1范围内。交联剂可具有低水溶性(例如,小于10g/L),导致其优先居于分散相中。具体地,交联剂可为二乙烯基交联剂。例如,二乙烯基交联剂可包括二丙烯酸酰胺,诸如N,N'-(乙烷-1,2-二基)双(2-羟乙基)丙烯酸酰胺、N,N'-(2-羟基丙烷-1,3-二基)二丙烯酸酰胺或它们的组合。在另一个实例中,二乙烯基交联剂包括乙二醇二甲基丙烯酸酯、二乙烯基苯、六亚甲基双丙烯酸酰胺、三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯、它们受保护的衍生物或它们的组合。在另一个实例中,交联剂可由疏水性保护基团诸如羟基保护基团保护。具体地,疏水性保护基团可为有机金属部分。例如,有机金属部分可形成甲硅烷基醚官能团示例性甲硅烷基醚官能团可来源于叔丁基二甲基氯硅烷、三甲基氯硅烷、三乙基氯硅烷、三丙基氯硅烷、三丁基氯硅烷、二苯基甲基氯硅烷、氯(二甲基)苯基硅烷或它们的组合。示例性受保护的二丙烯酸酰胺交联剂包括N,N'-(乙烷-1,2-二基)双(N-(2-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)乙基)丙烯酸酰胺、N,N'-(N-(2-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)丙烷-1,3-二基)二丙烯酸酰胺、N,N'-(乙烷-1,2-二基)双(N-(2-((三乙基甲硅烷基)氧基)乙基)丙烯酸酰胺、N,N'-(N-(2-((三乙基甲硅烷基)氧基)丙烷-1,3-二基)二丙烯酸酰胺、甲硅烷基保护的N-[2-(丙烯酰氨基)-1,2-二羟乙基]丙烯酸酰胺诸如N,N'-(2,3-双((三乙基甲硅烷基)氧基)丁烷-1,4-二基)二丙烯酸酰胺或它们的组合。在另一个实例中,保护基团可包括烷氧羰基部分,诸如叔丁氧羰基、苄基甲氧羰基或它们的组合。具体地,包含羟基基团的交联剂可由保护基团(如上文结合受保护的单体所述的那些保护基团)保护。

[0043] 此外,使具有疏水性保护基团的亲水性单体聚合可包括在致孔剂的存在下聚合。示例性致孔剂包括芳香族致孔剂。在一个实例中,芳香族致孔剂包括苯、甲苯、二甲苯、均三甲苯、乙酸苯乙酯、己二酸二乙酯、乙酸己酯、苯甲酸乙酯、乙酸苯酯、乙酸丁酯或它们的组合。致孔剂通常具有15-20的溶解度参数。在另一个实例中,致孔剂为烷醇致孔剂,诸如十二烷醇。包括的致孔剂相对于反应体系内的有机相的量可在1重量%至99重量%范围内,诸如在30重量%至90重量%范围内,或甚至在50重量%至85重量%范围内。

[0044] 任选地,可包括聚合引发剂。示例性聚合引发剂可通过自由基生成而引发聚合。示例性聚合引发剂包括偶氮引发剂,诸如油溶性偶氮引发剂。另一种引发剂可包括过硫酸铵。另一种示例性引发剂可包括四甲基乙二胺。在一个实例中,聚合引发剂可基于分散相的重量计以0.001重量%至3重量%的量存在。

[0045] 在聚合后,聚合物颗粒108可剥去种子聚合物,形成仍具有疏水性保护基团的聚合物颗粒110。例如,种子聚合物可使用溶剂萃取,所述溶剂诸如醛或酮,诸如丙酮、甲基乙基酮、二异丙基酮、乙酸丁酯、环己酮、二甲基甲酰胺或它们的组合;邻苯二甲酸酯溶剂,诸如

邻苯二甲酸正丁酯；醚溶剂，诸如四氢呋喃、二异丙醚、甲基叔丁醚、二甲醚、二乙醚或它们的组合；酯溶剂，诸如乙酸乙酯、乙酸丁酯或它们的组合；杂环溶剂，诸如吡啶、二噁烷、四氢糠醇或它们的组合；卤代溶剂，诸如二氯甲烷、氯仿或它们的组合；或它们的组合。另选地，种子聚合物可在聚合物颗粒转化为亲水性颗粒后进行萃取。例如，种子聚合物可在使颗粒聚合物脱保护（诸如去除聚合物上由受保护单体产生的甲硅烷基基团）后进行萃取。

[0046] 如图1所示，一旦萃取出种子聚合物，聚合物颗粒110即可通过去除疏水性保护基团的至少一部分而转化为亲水性聚合物颗粒。例如，疏水性保护基团可在酸作用下从聚合物颗粒上裂解。具体地，此类去除可从聚合物颗粒中去除基本上所有疏水性保护基团，诸如去除疏水性保护基团的至少80%，或甚至去除疏水性保护基团的至少90%。

[0047] 在一个实例中，疏水性保护基团通过添加酸诸如有机酸而发生酸裂解。具体地，有机酸可具有在3.0至5.5范围的pKa。例如，有机酸可包括乙酸、乳酸、柠檬酸或它们的任何组合。另选地，可使用无机酸。例如，可使用硫酸溶液。

[0048] 一旦去除疏水性保护基团的至少一部分，则形成亲水性颗粒112。亲水性颗粒包含羧基官能团。在一个实例中，亲水性颗粒112可为包括水凝胶聚合物的水凝胶颗粒。水凝胶为可吸收其重量至少20%的水的聚合物，诸如可吸收其重量的至少45%、至少65%、至少85%、至少100%、至少300%、至少1000%、至少1500%、或甚至至少2000%但不大于 $10^6\%$ 的水。

[0049] 在转化为亲水性颗粒之前，颗粒可具有正 $\log(p)$ 值。在转化之后，颗粒可具有负 $\log(p)$ 值。相对于疏水相，所转化的颗粒优先居于水相或亲水相中。

[0050] 可活化亲水性聚合物112以有利于与靶分析物诸如多核苷酸的缀合。例如，可增强亲水性颗粒112上的官能团，以使其与靶分析物或分析物受体结合。在一个具体实例中，亲水性聚合物的官能团可用能够使亲水性聚合物官能团转化为反应部分的试剂进行修饰，所述反应部分可发生亲核或亲电取代。

[0051] 具体地，亲水性聚合物112具有羧基官能团，该羧基官能团能够被活化以有利于缀合，例如缀合到生物分子诸如核酸。在示例性实施例中，亲水性聚合物包括具有链烷酸部分或其酯衍生物的聚丙烯酰胺聚合物网络，其能够与琥珀酰亚胺基化合物诸如琥珀酰亚胺基脲化合物或琥珀酰亚胺基磷化合物反应，以提供聚丙烯酰胺网络上的链烷酸酯部分。胺封端的核酸，诸如胺封端的寡核苷酸，可与琥珀酰亚胺基链烷酸酯部分反应以通过烷基酰胺部分将核酸捕获到聚合物网络中。

[0052] 例如，珠基质可由具有链烷酸部分或其酯衍生物的官能化聚丙烯酰胺聚合物网络形成。具体地，聚丙烯酰胺聚合物网络可由具有羧基部分或其酯衍生物的丙烯酰胺单体与具有羟基或胺部分的丙烯酰胺单体共聚形成。羧基官能单体与包括羟基或胺部分的丙烯酰胺单体的比率影响与琥珀酰亚胺基化合物（诸如琥珀酰亚胺基脲或琥珀酰亚胺基磷）反应的缀合位点的可用性。当与胺封端的生物分子诸如胺封端的核酸（例如，胺封端的寡核苷酸）缀合时，聚合物珠可包括具有烷基酰胺部分的聚丙烯酰胺聚合物网络，所述烷基酰胺部分直接连接至聚丙烯酰胺网络的丙烯酰胺骨架上酰胺部分中的氮并且连接至生物分子诸如核酸。

[0053] 琥珀酰亚胺基化合物例如可为琥珀酰亚胺基脲化合物或琥珀酰亚胺基磷化合物。在一个具体实例中，琥珀酰亚胺基化合物为琥珀酰亚胺基脲化合物。琥珀酰亚胺基脲化合

物可为O型琥珀酰亚胺基脲或N型琥珀酰亚胺基脲。具体地,琥珀酰亚胺基脲为O型琥珀酰亚胺基脲。在一个实例中,O型琥珀酰亚胺基脲为N-羟基琥珀酰亚胺基脲。在另一个实例中,琥珀酰亚胺基化合物为琥珀酰亚胺基磷化合物。

[0054] 在由包含羟基基团的共聚单体形成的实施方案中,亲水性颗粒112上的羟基基团可通过用磺酸根基团或氯取代羟基基团的至少一部分来活化。示例性磺酸根基团可来源于三氟乙基磺酰氯、甲磺酰氯、甲苯磺酰氯或4-氟苯磺酰氯(fosyl chloride)或它们的任何组合。磺酸根可用于使亲核体取代磺酸根。磺酸根还可与释放的氯反应,以提供可用于在过程中缀合颗粒的氯化基团。在另一个实例中,可活化亲水性聚合物112上的胺基。

[0055] 例如,目标分析物或分析物受体可通过与磺酸根基团的亲核取代而结合到亲水性聚合物。在具体实例中,由亲核体诸如胺或硫醇封端的目标分析物受体可发生亲核取代,以取代亲水性聚合物112的表面上的磺酸根基团。作为活化的结果,可形成缀合颗粒114。

[0056] 在另一个实例中,磺酸化颗粒还可与单官能或多官能单亲核试剂或多亲核试剂反应,所述亲核试剂可形成与颗粒的连接,同时保持对包含亲电基团诸如马来酰亚胺的寡核苷酸的亲核活性。此外,残余的亲核活性可通过连接至包含多个亲电基团的试剂而转化为亲电活性,其随后附接至包含亲核基团的寡核苷酸。

[0057] 在另一个实例中,可在聚合过程中加入包含官能团的单体。单体可包括(例如)含羧酸、酯、卤素或其它胺反应性基团的丙烯酰胺。酯基团可在与胺寡核苷酸反应之前水解。

[0058] 其它缀合技术包括在颗粒合成过程中使用包含胺上的疏水性保护基团的单体。胺基的脱保护使得可获得亲核基团,该亲核基团还可用于胺反应性双官能双亲电试剂修饰,所述修饰获得在附接至聚合物颗粒之后的单官能亲电基团。此类亲电基团可与具有亲核基团诸如胺或硫醇的寡核苷酸反应,促使通过与空亲电体反应的寡核苷酸附接。

[0059] 在颗粒112中结合有氨基官能共聚单体的另一个实例中,亲核氨基基团可用双官能双亲电部分诸如二异氰酸酯或双-NHS酯修饰,从而得到与亲核体反应的亲水性颗粒。示例性双-NHS酯包括双琥珀酰亚胺C2-C12烷基酯,诸如双琥珀酰亚胺辛二酸酯或双琥珀酰亚胺戊二酸酯。

[0060] 其它活化化学过程包括引入多个步骤以转化特定官能团,以提供特定的期望的键。例如,例如,磺酸根修饰的羟基基团可通过几种方法转化为亲核基团。在一个实例中,磺酸根与叠氮化物阴离子反应得到叠氮化物取代的亲水聚合物。叠氮化物可经由“点击”(CLICK)化学处理直接用于与乙炔取代的生物分子缀合,所述“点击”化学处理可伴随或不伴随铜催化。任选地,叠氮化物可通过例如与氢的催化还原或与有机磷的还原而转化为胺。所得的胺随后可通过多种试剂转化为亲电基团,所述多种试剂诸如二异氰酸酯、双-NHS酯、三聚氯氰或它们的组合。在一个实例中,使用二异氰酸酯获得聚合物和连接基之间的脲键,所述脲键导致能够与氨基取代的生物分子发生反应的残留异氰酸酯基团,以获得连接基和生物分子之间的脲键。在另一个实例中,使用双-NHS酯获得聚合物和连接基之间的酰胺键,以及能够与氨基取代的生物分子发生反应的残留NHS酯基团,以获得连接基和生物分子之间的酰胺键。在另一个实例中,使用三聚氯氰获得聚合物和连接基之间的氨基-三嗪键,以及两个残留的氯-三嗪基团,其中一个基团能够与氨基取代的生物分子发生反应,以获得连接基和生物分子之间的氨基-三嗪键。其它亲核基团可经由磺酸根活化掺入颗粒内。例如,磺酸化颗粒与硫代苯甲酸阴离子的反应以及后续的硫代苯甲酸酯的水解将硫醇掺入颗粒

内,所述颗粒随后可与马来酰亚胺取代的生物分子反应,以获得与生物分子的硫代-琥珀酰亚胺键。硫醇还可与溴-乙酰基基团反应。

[0061] 另选地,丙烯酸亚磷酰胺寡核苷酸可在聚合过程中用于掺入寡核苷酸。示例性丙烯酸亚磷酰胺寡核苷酸可包括离子交换的寡核苷酸。

[0062] 使用与生物分子上的亲核部分偶联的基质上的亲电部分或与生物分子上的亲电连接偶联的基质上的亲核键基团,可在难熔性(refractory)基质或聚合基质上产生生物分子的共价键。由于感兴趣的大多数常见的生物分子具有亲水性性质,因此在这些偶联中选择溶剂为水或包含一些水溶性有机溶剂的水,以使生物分子分散到基质上。具体地,由于其聚阴离子性质,多核苷酸一般在水体系中与基质偶联。由于水通过使亲电体水解为失活部分用于缀合而与亲核体竞争亲电体,因此水性体系一般导致偶联产物的收率较低,其中收率是基于偶联对的亲电部分计。当期望反应偶联对的亲电部分获得高收率时,需要采用高浓度亲核体推动反应并且减轻水解,从而导致亲核体的利用率低。就多核酸而言,磷酸盐的金属反离子可取代为亲脂抗衡离子,以便帮助生物分子溶解于极性、非反应性、非水性溶剂中。这些溶剂可包括酰胺或脲,诸如甲酰胺、N,N-二甲基甲酰胺、乙酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、六甲基磷酰胺、吡咯烷酮、N-甲基吡咯烷酮、N,N,N',N'-四甲基脲、N,N'-二甲基-N,N'-三亚甲基脲或它们的组合;碳酸酯,诸如碳酸二甲基酯、碳酸亚丙基酯或它们的组合;醚,诸如四氢呋喃;亚砷和砷,诸如二甲基亚砷、二甲基砷或它们的组合;受阻醇,诸如叔丁醇;或它们的组合。亲脂阳离子可包括四烷基铵或四芳基铵阳离子,诸如四甲基铵、四乙基铵、四丙基铵、四丁基铵、四戊基铵、四己基铵、四庚基铵、四辛基铵以及它们的烷基和芳基混合物;四芳基磷阳离子,诸如四苯基磷;四烷基铷或四芳基铷,诸如四苯基铷;铯阳离子,诸如三甲基铯;或它们的组合。通过用亲脂阳离子交换金属阳离子使多核酸转换为可溶于有机溶剂中的材料的过程可利用多种标准阳离子交换技术实现。

[0063] 在另一个实例中,颗粒可使用乳液聚合技术来形成,其中疏水相在亲水相内形成分散相。单体、交联剂以及上述有利于疏水相的其它试剂和化合物趋于居于其中发生聚合的疏水相中。

[0064] 如上文所述的那些表面活性剂可用于亲水相中以支持乳液形成。当使用种子颗粒时,表面活性剂可以低于临界胶束浓度的浓度使用。另选地,表面活性剂可以大于临界胶束浓度的浓度使用。乳液聚合通常用水溶性引发剂(如过硫酸钾或过硫酸铵)进行。

[0065] 具体地,上述方法可制备具有期望的粒度和变异系数的多个颗粒。颗粒组可包括例如100000个颗粒,诸如500000个颗粒、大于1百万个颗粒、大于1千万个颗粒、或甚至至少 1×10^{10} 个颗粒,但是可包括不大于 1×10^{20} 个颗粒。所述多个颗粒中的颗粒可以为亲水性聚合物颗粒,诸如水凝胶颗粒。在一个具体实例中,水凝胶颗粒可为丙烯酰胺颗粒,例如包括交联的羟烷基丙烯酰胺聚合物的颗粒,或包括羧基官能丙烯酰胺与羟烷基丙烯酰胺或胺官能化丙烯酰胺中的一者或两者的交联共聚物的颗粒。

[0066] 所述多个颗粒可具有期望的粒度,诸如不大于 $100\mu\text{m}$ 、不大于 $30\mu\text{m}$ 、或不大于 $3\mu\text{m}$ 的粒度。平均粒度为平均粒径。例如,平均粒度可不大于 $2\mu\text{m}$,诸如不大于 $1.5\mu\text{m}$ 、不大于 $1.1\mu\text{m}$ 、不大于 $0.8\mu\text{m}$ 、不大于 $0.6\mu\text{m}$ 、不大于 $0.5\mu\text{m}$ 、或甚至不大于 $0.3\mu\text{m}$,但是一般为至少 $0.01\mu\text{m}$,诸如至少 $0.1\mu\text{m}$ 。在一个具体实例中,平均粒度可在 $0.1\mu\text{m}$ 至 $100\mu\text{m}$ 范围内,诸如在 $0.1\mu\text{m}$ 至 $50\mu\text{m}$ 范围内,或在 $0.1\mu\text{m}$ 至 $1.1\mu\text{m}$ 范围内。在一些方面,上述方法的技术优点在于能够制备具有在

5 μm 至100 μm 范围内(诸如在20 μm 至100 μm 范围内,或在30 μm 至70 μm 范围内)的平均粒度的颗粒。在其它方面,上述方法的技术优点在于能够制备具有不大于1.1 μm 的平均粒度的颗粒。当种子更大时,可形成更大的颗粒。颗粒的大小可基于种子颗粒的大小进行调整。使用本发明的方法,聚合物颗粒的大小比使用其它方法时更少依赖于表面活性剂的选择和浓度。

[0067] 另外,所述多个颗粒可以是单分散的,并且可具有期望的低变异系数,诸如不大于20%的变异系数。如上所述,变异系数(CV)是指标准偏差除以平均值乘以100,其中“平均值”为平均粒径,并且标准偏差为粒度的标准偏差。另选地,“平均值”可为z-平均值或模式粒径。根据通常的实践,CV在主模式即主峰上进行计算,从而排除与聚集体相关的小峰。因此,低于或高于模式大小的一些颗粒可在计算中不计算,所述计算可例如基于可检测颗粒的总粒子数的约90%。此类CV测定可在CPS圆盘式离心机或库尔特计数器上执行。例如,所述多个颗粒的变异系数(CV)可不大于15%诸如不大于10%、不大于5%、不大于4.5%、不大于4.0%、不大于3.5%、或甚至不大于3.0%的变异系数。此类CV无需过滤或其它体积排阻技术即可实现。

[0068] 在另一个实例中,水中的亲水性聚合物颗粒可为不大于50重量%的聚合物,诸如不大于30重量%的聚合物、不大于20重量%的聚合物、不大于10重量%的聚合物、不大于5重量%的聚合物、或甚至不大于2重量%的聚合物。

[0069] 在另一个实例中,聚合物颗粒可具有允许蛋白质和酶扩散的孔隙率。在一个实例中,聚合物颗粒可具有允许具有下述大小的蛋白质扩散的孔隙率:至少50千道尔顿,诸如至少100千道尔顿、至少200千道尔顿、至少250千道尔顿、或甚至至少350千道尔顿。在一个具体实例中,扩散仅限于具有10⁵千道尔顿的大小的蛋白质。

[0070] 在另一个实例中,当缀合时,聚合物颗粒可包括至少7 $\times 10^4/\mu\text{m}^3$ 的多核苷酸密度,其称为核苷酸密度。例如,核苷酸密度可为至少10⁵ μm^3 ,诸如至少10⁶ μm^3 、至少5 $\times 10^6/\mu\text{m}^3$ 、至少8 $\times 10^6/\mu\text{m}^3$ 、至少1 $\times 10^7/\mu\text{m}^3$ 、或甚至至少3 $\times 10^7/\mu\text{m}^3$ 。在另一个实例中,核苷酸密度可为不大于10¹⁵ μm^3 。

[0071] 此类聚合物颗粒可用于多种分离技术和分析技术中。具体地,聚合物颗粒可用于结合多核苷酸。此类结合多核苷酸可用于从溶液中分离多核苷酸或可用于分析技术诸如测序。在图2中所示的具体实例中,此类聚合物颗粒可在测序技术过程中用作多核苷酸的载体。例如,此类亲水性颗粒可固定多核苷酸以使用荧光测序技术进行测序。在另一个实例中,亲水性颗粒可固定多核苷酸的多个拷贝以使用离子感测技术进行测序。

[0072] 一般来讲,聚合物颗粒可经过处理以包括生物分子,所述生物分子包括核苷、核苷酸、核酸(寡核苷酸和多核苷酸)、多肽、糖、多糖、脂质或它们的衍生物或类似物。例如,聚合物颗粒可结合或附接到生物分子。生物分子的末端或任何中间部分均可键合或附接到聚合物颗粒。聚合物颗粒可使用连接化学键键合或附接到生物分子。连接化学键包括共价或非共价键,包括离子键、氢键、亲和键、偶极-偶极键、范德华键和疏水键。连接化学键包括结合配偶体之间的亲和力,例如下列结合配偶体之间的亲和力:抗生物素蛋白部分和生物素部分;抗原表位和抗体或其免疫反应片段;抗体和半抗原;地高辛配基部分和抗地高辛配基抗体;荧光素部分和抗荧光素抗体;操纵子和阻遏物;核酸酶和核苷酸;凝集素和多糖;类固醇和类固醇结合蛋白;活性化合物和活性化合物受体;激素和激素受体;酶和底物;免疫球蛋白和蛋白A;或者寡核苷酸或多核苷酸及其对应的补体。

[0073] 在一个实例中,可用于具有表面的系统中。该系统包括在表面上的一个或多个聚合物颗粒。表面可为固体表面。表面可包括平面、凹表面或凸表面或它们的任何组合。表面可包括纹理或特征结构,包括蚀刻、空穴化或隆起。表面可不含任何纹理或特征结构。表面可包括毛细管、通道、凹槽、孔或容器的内壁。表面可为网。表面可为多孔、半多孔或非多孔的。表面可为过滤器或凝胶。表面可包括针(例如,针阵列)的顶端。表面可由诸如下列材料制成:玻璃、硼硅玻璃、二氧化硅、石英、熔融石英、云母、聚丙烯酰胺、塑料聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚甲基丙烯酸酯(PMA)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚二甲基硅氧烷(PDMS)、硅、锗、石墨、陶瓷、硅、半导体、高折射率电解质、晶体、凝胶、聚合物或膜(例如,金膜、银膜、铝膜或金刚石膜)。表面可包括具有金属膜或金属涂层的固体基质。表面可为光学透明的,可具有最小限度的反射性,可具有最小限度的吸收性,或表现出低荧光性。

[0074] 多个聚合物颗粒可在表面上以随机或有序阵列排列,或以随机和有序阵列的组合进行排列。有序阵列包括直线和六边形图案。表面可包括以随机或有序阵列或两者的组合排列的多个位点。一个或多个聚合物颗粒可位于一个位点、一些位点或所有位点处。一些位点可具有一个聚合物颗粒,并且其它位点可具有多个聚合物颗粒。至少一个位点可不含聚合物颗粒。在阵列中,至少两个聚合物颗粒可彼此接触,或在聚合物颗粒之间不发生接触。

[0075] 如图2所示,多个聚合物颗粒204可与多个多核苷酸202一起置于溶液中。所述多个颗粒204可被活化或以其它方式制备,以与多核苷酸202结合。例如,颗粒204可包括与多个多核苷酸202中的多核苷酸的一部分互补的寡核苷酸。

[0076] 在一个具体实施例中,对亲水性颗粒和多核苷酸进行聚合酶链反应(PCR)扩增。例如,分散相小滴206或208作为乳液的一部分形成,并且可包括亲水性颗粒或多核苷酸。在一个实例中,多核苷酸202和亲水性颗粒204以相对于彼此较低的浓度和比率提供,使得单个多核苷酸202可能与单个亲水性颗粒204居于相同的分散相小滴内。其它小滴诸如小滴208可包括单个亲水性颗粒且不含多核苷酸。每个小滴206或208可包括酶、核苷酸、盐或足以促进多核苷酸复制的其它组分。另选地,可使用诸如包含或不含乳液的重组酶聚合酶扩增(RPA)等扩增技术。

[0077] 在一个具体实施例中,存在酶诸如聚合酶,所述酶结合到或靠近分散相小滴的亲水性颗粒或水凝胶颗粒。在一个实例中,聚合酶存在于分散相小滴中以促进多核苷酸的复制。多种核酸聚合酶可用于本文所述的方法中。在一个示例性实施例中,聚合酶可包括可催化多核苷酸复制的酶、它们的片段或亚单位。在另一个实施例中,聚合酶可为天然存在的聚合酶、重组聚合酶、突变型聚合酶、变体聚合酶、融合物或以其它方式改造的聚合酶、化学修饰的聚合酶、合成分子、或它们的类似物、衍生物或片段。

[0078] 在一个实施例中,聚合酶可为任何A家族DNA聚合酶(也称为pol I家族)或任何B家族DNA聚合酶。在实施例中,DNA聚合酶可为重组形式,其相比于非重组DNA聚合酶,能够以优异的准确度和收率复制多核苷酸。例如,聚合酶可包括高保真聚合酶或热稳定聚合酶。在实施例中,用于多核苷酸复制的条件可包括“热启动”条件,例如热启动聚合酶,诸如Amplitaq Gold® DNA聚合酶(Applied Biosciences)或KOD热启动DNA聚合酶(EMD Biosciences)。通常,“热启动”聚合酶包括热稳定聚合酶和一种或多种抗体,所述抗体抑制DNA聚合酶和3'-5'外切核酸酶在环境温度下的活性。

[0079] 在实施例中,聚合酶可为下列酶,诸如Taq聚合酶(来自水生栖热菌(Thermus

aquaticus))、Tfi聚合酶(来自丝状栖热菌(*Thermus filiformis*))、Bst聚合酶(来自嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*))、Pfu聚合酶(来自强烈炽热球菌(*Pyrococcus furiosus*))、Tth聚合酶(来自嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*))、Pow聚合酶(来自沃氏热球菌(*Pyrococcus woesei*))、Tli聚合酶(来自栖热球菌(*Thermococcus litoralis*))、Ultima聚合酶(来自海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*))、KOD聚合酶(来自超好热原始菌(*Thermococcus kodakaraensis*))、Pol I和II聚合酶(来自激烈火球菌(*Pyrococcus abyssi*))以及Pab聚合酶(来自激烈火球菌)。

[0080] 在实施例中,聚合酶可为重组形式的超好热原始菌。在实施例中,聚合酶可为KOD或类似KOD的DNA聚合酶,诸如KOD聚合酶(EMD Biosciences)、KOD“热启动”聚合酶(EMD Biosciences)、KOD Xtreme热启动DNA聚合酶(EMD Biosciences)、KOD XL DNA聚合酶(EMD Biosciences)、Platinum®Taq DNA聚合酶(Invitrogen)、Platinum®Taq高保真DNA聚合酶(Invitrogen)、Platinum®Pfx(Invitrogen)、Accuprime™Pfx(Invitrogen)、Accuprime™Taq高保真DNA聚合酶(Invitrogen)或Amplitaq Gold®DNA聚合酶(Applied Biosystems)。在实施例中,聚合酶可为包含与本文所述的那些聚合酶类似的突变的DNA聚合酶。

[0081] 在实施例中,多核苷酸的复制可包括调节复制条件。调节可任选地包括:提高或降低聚合酶浓度;提高或降低核苷酸浓度;提高或降低阳离子浓度;提高或降低反应温度、时间或pH等。调节可包括提高或降低反应速率、提高或降低反应产物收率等。在实施例中,复制可在适当的缓冲剂或核苷酸(包括核苷酸类似物或生物素化核苷酸)的存在下进行。

[0082] 具体地,待扩增的多核苷酸可由聚合物颗粒捕获。用于捕获核酸的示例性方法可包括:使多核苷酸杂交到附接至聚合物颗粒的寡核苷酸。在实施例中,用于捕获核酸的方法包括:(a)提供附接至单链寡核苷酸(例如,捕获寡核苷酸)的聚合物颗粒;(b)提供单链多核苷酸;和(c)使单链寡核苷酸杂交到单链多核苷酸,由此将单链多核苷酸捕获至聚合物颗粒。在实施例中,聚合物颗粒中的每个可与多个单链寡核苷酸(例如,捕获寡核苷酸)附接。在实施例中,步骤(c)可用多个单链多核苷酸进行。在实施例中,单链寡核苷酸的至少一部分包含与单链多核苷酸的至少一部分互补(或部分互补)的核苷酸序列。

[0083] 在一个实例中,该方法还包括使多核苷酸扩增为多个多核苷酸,并且使所述多个多核苷酸的至少一部分附接至亲水性颗粒,由此生成包括多个附接的多核苷酸的亲水性颗粒。另选地,该方法还可包括通过延伸寡核苷酸使多核苷酸扩增为多个互补多核苷酸,由此生成包含多个附接的多核苷酸的水凝胶颗粒。

[0084] 在实施例中,用于核苷酸掺入的方法包括:对多核苷酸进行核苷酸聚合反应,所述多核苷酸杂交到附接至聚合物颗粒的寡核苷酸。在实施例中,用于核苷酸掺入的方法包括:(a)提供附接至单链寡核苷酸(例如,引物寡核苷酸)的聚合物颗粒;(b)提供单链模板多核苷酸;(c)使单链寡核苷酸杂交到单链模板多核苷酸;和(d)在适合于聚合酶催化至少一个核苷酸聚合到单链寡核苷酸上的条件下,使单链模板多核苷酸与聚合酶和至少一个核苷酸接触,由此进行核苷酸掺入。在实施例中,聚合物颗粒中的每个可与多个单链寡核苷酸(例如,捕获寡核苷酸)附接。在实施例中,步骤(b)、(c)或(d)可用多个单链多核苷酸进行。在实施例中,单链寡核苷酸的至少一部分包含与单链多核苷酸的至少一部分互补(或部分互补)的核苷酸序列。在实施例中,系统包含杂交到单链寡核苷酸的单链多核苷酸,所述单链寡核

核苷酸附接至聚合物颗粒,其中至少一个核苷酸聚合到单链寡核苷酸的末端上。

[0085] 在实施例中,用于引物延伸的方法包括:对多核苷酸进行引物延伸反应,所述多核苷酸杂交到附接至聚合物颗粒的寡核苷酸。在实施例中,用于核酸引物延伸的方法包括:(a) 提供附接至单链寡核苷酸(例如,引物寡核苷酸)的聚合物颗粒;(b) 提供单链模板多核苷酸;(c) 使单链寡核苷酸杂交到单链模板多核苷酸;和(d) 在适合于聚合酶催化至少一个核苷酸聚合到单链寡核苷酸上的条件下,使单链模板多核苷酸与聚合酶和至少一个核苷酸接触,由此延伸引物。在实施例中,聚合物颗粒中的每个可与多个单链寡核苷酸(例如,捕获寡核苷酸)附接。在实施例中,步骤(b)、(c)或(d)可用多个单链多核苷酸进行。在实施例中,单链寡核苷酸的至少一部分包含与单链多核苷酸的至少一部分互补(或部分互补)的核苷酸序列。在实施例中,系统包含杂交到单链寡核苷酸的单链多核苷酸,所述单链寡核苷酸附接至聚合物颗粒,其中单链寡核苷酸由一个或多个核苷酸延伸。

[0086] 在实施例中,用于核酸扩增的方法包括:对多核苷酸进行引物延伸反应,所述多核苷酸杂交到附接至聚合物颗粒的寡核苷酸。在实施例中,用于核酸扩增的方法包括:(a) 提供附接至单链寡核苷酸(例如,引物寡核苷酸)的聚合物颗粒;(b) 提供单链模板多核苷酸;(c) 使单链寡核苷酸杂交到单链模板多核苷酸;和(d) 在适合于聚合酶催化至少一个核苷酸聚合到单链寡核苷酸上的条件下,使单链模板多核苷酸与聚合酶和至少一个核苷酸接触,从而生成延伸的单链寡核苷酸。在实施例中,该方法还包括:(e) 从延伸的单链寡核苷酸上去除(例如,使变性)单链模板多核苷酸,使得单链寡核苷酸附接至聚合物颗粒;(f) 使剩余的单链寡核苷酸杂交到第二单链模板多核苷酸;和(g) 在适合于第二聚合酶催化第二至少一个核苷酸聚合到单链寡核苷酸上的条件下,使第二单链模板多核苷酸与第二聚合酶和第二至少一个核苷酸接触,从而生成后续延伸的单链寡核苷酸。在实施例中,步骤(e)、(f)和(g)可重复至少一次。在实施例中,聚合酶和第二聚合酶包含热稳定的聚合酶。在实施例中,适合于核苷酸聚合的条件包括在高温下进行核苷酸聚合步骤(例如,步骤(d)或(g))。在实施例中,适合于核苷酸聚合的条件包括在交替的温度(例如,高温和相对较低的温度)下进行核苷酸聚合步骤(例如,步骤(d)或(g))。在实施例中,交替的温度在60-95℃范围内。在实施例中,温度循环可为约10秒至约5分钟、或约10分钟、或约15分钟或更长时间。在实施例中,用于核酸扩增的方法可生成各自附接至多个模板多核苷酸的一种或多种聚合物颗粒,所述多个模板多核苷酸包含与单链模板多核苷酸或第二单链模板多核苷酸互补的序列。在实施例中,聚合物颗粒中的每个可与多个单链寡核苷酸(例如,捕获寡核苷酸)附接。在实施例中,步骤(b)、(c)、(d)、(e)、(f)或(g)可用多个单链多核苷酸进行。在实施例中,单链寡核苷酸的至少一部分包含与单链多核苷酸的至少一部分互补(或部分互补)的核苷酸序列。在实施例中,用于核酸扩增的方法(如上所述)可在油相(例如,分散相小滴)中的水相溶液中进行。

[0087] 在PCR后,形成颗粒诸如颗粒210,其可包括亲水性颗粒212和多核苷酸的多个拷贝214。虽然多核苷酸214作为在颗粒210的表面上示出,但多核苷酸214可在颗粒210内延伸。具有相对于水而言浓度较低的聚合物的水凝胶和亲水性颗粒可包括在颗粒210内部和各处的多核苷酸区段,或多核苷酸可居于孔及其它开口内。具体地,颗粒210可允许酶、核苷酸、引物和用于监测反应的反应产物扩散。每个颗粒采用大量多核苷酸有助于产生更出色的信号。

[0088] 在实施例中,在准备测序时,可收集来自破乳过程的聚合物颗粒并进行洗涤。收集可通过以下方法进行:使生物素部分(例如,与附接至聚合物颗粒的扩增的多核苷酸模板连接)与抗生物素蛋白部分接触,并且与不含生物素化模板的聚合物颗粒分离。可使收集的携带双链模板多核苷酸的聚合物颗粒变性,以得到待测序的单链模板多核苷酸。变性步骤可包括用碱(例如,NaOH)、甲酰胺或吡咯烷酮进行处理。

[0089] 在一个示例性实施例中,颗粒210可用于测序装置中。例如,测序装置216可包括孔218的阵列。颗粒210可置于孔218内。

[0090] 在一个实例中,引物可加入孔218中,或者颗粒210可在置于孔218内之前预暴露于引物。具体地,颗粒210可包括结合引物。引物和多核苷酸形成包括杂交到引物的多核苷酸(例如,模板核酸)的核酸双链体。核酸双链体为至少部分双链的多核苷酸。酶和核苷酸可提供给孔218以促进可察觉的反应,诸如核苷酸掺入。

[0091] 测序可通过检测核苷酸添加来进行。核苷酸添加可使用诸如荧光发射法或离子检测法等方法进行检测。例如,一组荧光标记核苷酸可提供给系统216,并且可迁移至孔218。激发能也可提供给孔218。当核苷酸由聚合酶捕获并加入延伸引物的末端时,则核苷酸的标记可发荧光,指示加入的核苷酸的类型。

[0092] 在另一个实例中,包括单一类型核苷酸的溶液可顺序进料。响应于核苷酸添加,孔218的局部环境内的pH可发生改变。此类pH变化可通过离子敏感场效应晶体管(ISFET)来检测。因此,pH变化可用于生成指示核苷酸与颗粒210的多核苷酸互补的次序的信号。

[0093] 具体地,测序系统可包括设置在离子传感器诸如场效应晶体管(FET)的传感器垫上的一个孔或多个孔。在实施例中,系统包括装载到孔内的一个或多个聚合物颗粒,所述孔设置在离子传感器(例如,FET)的传感器垫上,或包括装载到多个孔内的一个或多个聚合物颗粒,所述多个孔设置在离子传感器(例如,FET)的传感器垫上。在实施例中,FET可为chemFET或ISFET。“chemFET”或化学场效应晶体管包括用作化学传感器的一类场效应晶体管。chemFET具有与MOSFET晶体管类似的结构,其中由化学过程施加栅极电极上的电荷。“ISFET”或离子敏感场效应晶体管可用于测量溶液中的离子浓度;当离子浓度(诸如H⁺)改变时,通过晶体管的电流相应地改变。

[0094] 在实施例中,FET可以为FET阵列。如本文使用的,“阵列”为元件诸如传感器或孔的平面排布结构排列。阵列可以是一维或二维的。一维阵列可为具有在第一维度中的一列(或行)元件和在第二维度中的多个列(或行)的阵列。第一维度和第二维度中的列(或行)数目可相同或不同。FET或阵列可包括10²个、10³个、10⁴个、10⁵个、10⁶个、10⁷个或更多个FET。

[0095] 在实施例中,一种或多种微流体结构可制成处于FET传感器阵列上方,以提供对生物学或化学反应的约束或限制。例如,在一种具体实施中,一种或多种微流体结构可被构造为设置在阵列中的一个或多个传感器上的一个或多个孔(或微孔、或反应室、或反应孔,这些术语在本文中可互换使用),使得其上设置给定的孔的一个或多个传感器检测并且测量给定的孔中分析物的存在情况、水平或浓度。在实施例中,FET传感器与反应孔之间存在1:1对应的关系。

[0096] 参见图2,在另一个实例中,孔阵列中的孔218可操作地连接至测量装置。例如,对于荧光发射法,孔218可操作地耦接至光检测装置。就离子检测而言,孔218的下表面可设置在离子传感器诸如场效应晶体管的传感器垫上方。

[0097] 涉及通过检测核苷酸掺入的离子副产物来测序的示例性系统包括Ion Torrent PGM™、Proton™或S5™测序仪(Life Technologies),所述测序仪为基于离子的测序系统,其通过检测作为核苷酸掺入的副产物产生的氢离子,对核酸模板进行测序。通常,氢离子作为通过聚合酶的模板依赖性核酸合成过程中发生的核苷酸掺入的副产物释放。Ion Torrent PGM™、Proton™或S5™测序仪通过检测核苷酸掺入的氢离子副产物来检测核苷酸掺入。Ion Torrent PGM™、Proton™或S5™测序仪可包括待测序的多个模板多核苷酸,每个模板设置在阵列中相应的测序反应孔内。阵列的孔可各自与至少一种离子传感器偶联,所述离子传感器可检测作为核苷酸掺入的副产物产生的H⁺离子的释放或溶液pH的变化。离子传感器包括与离子敏感的检测层偶联的场效应晶体管(FET),所述离子敏感的检测层可感测H⁺离子的存在或溶液pH的变化。离子传感器可提供指示核苷酸掺入的输出信号,所述输出信号可表示为其量值与相应的孔或反应室中的H⁺离子浓度相关的电压变化。不同类型的核苷酸可连续流入

[0098] 反应室内,并且可按照由模板序列决定的次序通过聚合酶掺入延伸引物(或聚合位点)内。每个核苷酸掺入可伴有反应孔中H⁺离子的释放以及局部pH的同时变化。H⁺离子的释放可由传感器的FET来记录,所述FET产生指示发生核苷酸掺入的信号。在特定核苷酸流过程中未掺入的核苷酸可能不产生信号。来自FET的信号幅度还可与掺入延伸核酸分子内的特定类型的核苷酸的数目相关,由此能够分辨均聚物区域。因此,在测序仪运行过程中,流入反应室中的多个核苷酸流以及对多个孔或反应室中的掺入监测可使仪器同时分辨许多核酸模板的序列。

[0099] 当用于测序技术,特别是基于离子的测序技术中时,聚合物颗粒的实施例表现出技术优点。具体地,聚合物颗粒的实施例不含缓冲体系,可改进读取长度或准确度。

[0100] 在另一个实例中,聚合物颗粒可表现出无需过滤而具有比其它方法制备的颗粒更高的均匀度和更低的CV。例如,上述方法可直接形成聚合物颗粒,而无需施加任何种类的选择过程诸如过滤或使用离心机。具体地,乳液聚合可用于产生适合于种子颗粒的颗粒。通常,种子颗粒为非交联的,能够吸附促进剂分子。

[0101] 另外,本发明所公开的方法的实施例提供了基于种子颗粒的大小进行粒度控制的方法。另外,通过此类方法制备的颗粒的实施例相比于其它方法提高了缀合度,诸如缀合度提高了60%至80%。

[0102] 实例

[0103] 实例1(合成)

[0104] 向分散于155mL二氯甲烷中的24.87g(127.1mmol) γ -氨基丁酸叔丁酯盐酸盐的冰冷悬浮液中,加入将44.18g(317.7mmol)碳酸钾溶于125mL水中所得到的溶液。在冰浴中将反应混合物搅拌15分钟,然后在10分钟内加入16mL(0.19mol)丙烯酰氯。在冰浴中搅拌30分钟后,用250mL二氯甲烷对混合物进行萃取。用水(3×250mL)和饱和氯化钠水溶液(250mL)对有机相进行洗涤。在减压条件下除去溶剂,得到定量收率的粗产物。

[0105] 实例2(纯化)

[0106] 使用400g二氧化硅作为吸附剂,通过干柱真空层析(DCVC)对约27g粗产物进行纯化。使用二氯甲烷中的甲醇梯度(0-4%)对300mL的馏分进行洗脱。收集包含纯产物的馏分,随后在减压条件下除去溶剂,得到22.68g无色油状产物(总收率84%),该产物在储存时固

化。

[0107] 实例3 (纯化)

[0108] 在DCVC-柱上对粗产物 (0.57g) 进行纯化。使用己烷中的乙酸乙酯梯度 (5-50%) 对50mL的馏分进行洗脱。收集包含纯产物的馏分,随后在减压条件下除去溶剂,得到0.46g产物 (回收率81%)。

[0109] 实例4 (纯化)

[0110] 将粗产物 (39.6g) 溶于150mL乙酸乙酯中。加入庚烷 (600mL),并在搅拌过程中,使溶液缓慢冷却至-40℃,形成无色沉淀。在冷烧结玻璃漏斗上将沉淀物分离,用冷戊烷 (2×200mL) 洗涤,并在真空干燥器中干燥至恒定质量29.7g (回收率75%)。¹H NMR (CDC13, 400MHz) 结果:6.26 (d, 1H), 6.07 (dd, 1H), 5.98 (s, 1H), 5.62 (d, 1H), 3.37 (q, 2H), 2.30 (t, 2H), 1.84 (p, 2H), 1.44 (s, 9H)。

[0111] 实例5

[0112] 在由聚苯乙烯形成的分散相中,使甲硅烷基受保护的丙烯酰胺单体 (N-(2-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)乙基)丙烯酰胺) (tBDMS-HEAM) 和带有丙烯酰胺的酯基团 (4-丙烯酰胺基丁酸叔丁酯) 与N,N'-(乙烷-1,2-二基)双(N-(2-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)乙基)丙烯酰胺) (tBDMS-EBHEAM) 交联剂聚合并且脱保护以形成水凝胶颗粒。

[0113] 首先将1.3808g SDS溶于230.00g水中,然后加入11.51g丙酮和23.00g己二酸二(2-乙基己)酯 (DOA),由此制得乳液。利用ultraturax将乳液混合3分钟,并在高压Gauline APV-100均化器中于400Bar下进一步均化5分钟。

[0114] 将37.15g该溶液加入烧瓶中的13.91g种子颗粒 (种子直径0.539μm,包含15.41重量%固体)中。将混合物置于振荡水浴中,在40℃下振动40小时。

[0115] 通过将0.65g SDS和1.36g硼砂溶于341.11g水中,制得SDS-硼砂溶液。

[0116] 单体乳液通过以下方法形成:用高速混合器 (Ystral D-79282) 将48.20g乙酸2-苯乙酯、0.0402g 2,2'-偶氮二(2-甲基丁腈) (AMBN)、8.70g tBDMS-HEAM、1.7448g tBDMS-EBHEAM、0.0411g 4-丙烯酰胺基丁酸酯和328.38g SDS-硼砂溶液混合3分钟,并在高压均化器中于400Bar下进一步均化4分钟。

[0117] 在带夹套的反应器中,将14.18g活化的种子颗粒的水分散体与337.0g单体乳液混合。对混合物进行搅拌,并在40℃下加热2小时。在向混合物中通入氩气 (150-200ml/min) 的同时,进一步搅拌混合物,并在40℃下继续加热1小时。在吹扫结束时,测得的乳液中O₂的量为0ppb。停止氩流,在70℃下继续加热并搅拌10小时。

[0118] 对珠进行过滤,并在离心后除去上清液。将所得的珠与水混合,并将35.77g 1M的H₂SO₄水溶液加入珠分散体中,在60℃水浴中对该分散体振荡90分钟,并冷却至室温。用NaOH将凝胶分散体的pH调节至7.7,并加入THF。弃去有机相,将水解的珠在水中离心三次并在NMP中错流过滤,对所得的珠进行清洗。

[0119] 在另一个实例中,水解可在60℃的水浴中于3小时内完成,或在40℃的水浴中于18小时内完成。

[0120] 在另一个实例中,种子颗粒可具有至少0.050μm的平均直径。在另一个实例中,种子颗粒可具有最大10μm且通常介于90nm和330nm之间的平均直径。

[0121] 在第一方面,化合物具有上述式 (I),其中R₁为具有3至10个碳的烷基基团或者为

具有1至10个醚单元的聚醚基团,其中R₂为具有3至8个碳的直链或支链烷基基团或者甲硅烷基基团,并且其中R₃为氢或具有1至6个碳的烷基基团。

[0122] 在第一方面的一个实例中,R₁为具有3至6个碳原子的烷基基团。例如,R₁为具有3至5个碳原子的烷基基团。

[0123] 在第一方面的另一个实例及上述实例中,R₁为具有2至6个醚单元的聚醚基团。

[0124] 在第一方面的另一个实例及上述实例中,R₁的单元包括环氧乙烷或环氧丙烷单元。

[0125] 在第一方面的另一个实例及上述实例中,R₂为支链烷基基团。例如,R₂为具有3至5个碳原子的支链烷基基团。在一个实例中,R₂为具有4个碳原子的支链烷基基团。

[0126] 在第一方面的另一个实例及上述实例中,R₃为氢。

[0127] 在第一方面的另一个实例及上述实例中,R₃为甲基或乙基基团。

[0128] 在第二方面,一种合成单体的方法包括:使氨基链烷酸酯烷基酯盐酸盐与丙烯酰氯在-10°C至10°C范围内的温度下反应形成丙烯酰胺链烷酸烷基酯,其中氨基链烷酸酯烷基酯的链烷酸酯基团包含3至10个碳,并且氨基链烷酸酯烷基酯的烷基酯具有3至8个碳;以及使用溶剂萃取丙烯酰胺链烷酸烷基酯。

[0129] 在第二方面的一个实例中,链烷酸酯基团具有3至6个碳。例如,链烷酸酯基团具有3至5个碳。

[0130] 在第二方面的另一个实例及上述实例中,烷基酯包括直链酯。

[0131] 在第二方面的另一个实例及上述实例中,烷基酯包含3至5个碳。例如,烷基酯包含4个碳。

[0132] 在第三方面,颗粒群具有不大于5%的变异系数并且包含来源于上述式(I)的化合物的聚合的聚合物,其中R₁为具有3至10个碳的烷基基团或者为具有1至10个醚单元的聚醚基团,其中R₂为具有3至8个碳的直链或支链烷基基团或者甲硅烷基基团,并且其中R₃为氢或具有1至6个碳的烷基基团;并且其中在去除R₂后,当暴露于水时,所述颗粒吸收基于所述聚合物的重量至少300重量%且不大于10⁶%的水。

[0133] 在第三方面的一个实例中,聚合物还来源于受保护的丙烯酰胺或受保护的羟烷基丙烯酰胺与所述化合物的聚合。

[0134] 在第三方面的另一个实例及上述实例中,聚合物还来源于交联剂与所述化合物的聚合。例如,交联剂包括二丙烯酰胺。在一个实例中,二丙烯酰胺包括N,N'-(乙烷-1,2-二基)双(2-羟乙基)丙烯酰胺、N,N'-(2-羟基丙烷-1,3-二基)二丙烯酰胺、它们受保护的衍生物或它们的组合。

[0135] 在第三方面的另一个实例及上述实例中,R₁为具有3至6个碳的烷基基团。例如,R₁为具有3至5个碳原子的烷基基团。

[0136] 在第三方面的另一个实例及上述实例中,R₁为具有2至6个醚单元的聚醚基团。

[0137] 在第三方面的另一个实例及上述实例中,R₁的单元包括环氧乙烷或环氧丙烷单元。

[0138] 在第三方面的另一个实例及上述实例中,R₂为支链烷基基团。例如,R₂为具有3至5个碳原子的支链烷基基团。在一个实例中,R₂为具有4个碳原子的支链烷基基团。

[0139] 在第三方面的另一个实例及上述实例中,R₃为氢。

[0140] 在第三方面的另一个实例及上述实例中, R_3 为甲基或乙基基团。

[0141] 在第三方面的另一个实例及上述实例中, 当暴露于水时, 所述颗粒吸收基于聚合物的重量至少1000重量%的水。

[0142] 在第三方面的另一个实例及上述实例中, 颗粒具有不大于100微米的粒度。

[0143] 在第四方面, 一种形成颗粒的方法包括: 在水性悬浮液内的分散相中, 使具有上述式(I)的多个单体单元聚合, 其中 R_1 为具有3至10个碳的烷基基团或者为具有1至10个醚单元的聚醚基团, 其中 R_2 为具有3至8个碳的直链或支链烷基基团或者甲硅烷基基团, 并且其中 R_3 为氢或具有1至6个碳的烷基基团; 由此形成包含多个疏水性保护基团的聚合物颗粒; 以及使聚合物颗粒转化为亲水性颗粒。

[0144] 在第四方面的一个实例中, 亲水性颗粒为水凝胶颗粒。

[0145] 在第四方面的另一个实例及上述实例中, 分散相还包括亲水性单体, 所述亲水性单体包括丙烯酰胺单体。

[0146] 在第四方面的另一个实例及上述实例中, 分散相还包括具有疏水性保护基团的二丙烯酰胺交联剂。

[0147] 在第四方面的另一个实例及上述实例中, 转化所述聚合物颗粒包括从聚合物颗粒中去除所述多个 R_2 基团中的至少一部分。例如, 去除所述多个 R_2 基团中的至少一部分包括从所述聚合物颗粒中酸裂解所述多个 R_2 基团中的至少一部分。

[0148] 在第四方面的另一个实例及上述实例中, 该方法还包括促进种子颗粒在水性悬浮液中形成分散相。例如, 单体: 种子颗粒的质量比在150:1至1:1范围内。在另一个实例中, 种子颗粒包括种子聚合物。在另一个实例中, 该方法还包括在转化聚合物颗粒之后提取种子聚合物。例如, 种子聚合物是疏水性的。在一个实例中, 种子聚合物包括苯乙烯类聚合物、丙烯酸类聚合物、丙烯酰胺、另一种乙烯基聚合物或它们的组合。例如, 促进种子颗粒包括使溶剂和促进剂与种子颗粒混合。在另一个实例中, 促进剂包括二辛酰过氧化物或己二酸二辛酯或具有低于20kD的分子量的聚苯乙烯。

[0149] 在第四方面的另一个实例及上述实例中, 分散相还包括丙烯酰胺、羟烷基丙烯酰胺或它们的组合, 所述丙烯酰胺或羟烷基丙烯酰胺使所述多个单体单元聚合。

[0150] 在第四方面的另一个实例及上述实例中, 使所述多个单体单元聚合还包括使交联剂与所述多个单体单元混合。

[0151] 在第四方面的另一个实例及上述实例中, 混合交联剂包括以处于15:1至1:2范围内的单体: 交联剂的质量比混合交联剂。例如, 交联剂为二乙烯基交联剂。在一个实例中, 二乙烯基交联剂包括二丙烯酰胺。例如, 二丙烯酰胺包括 N, N' -(乙烷-1,2-二基) 双(N -(2-((叔丁基二甲基甲硅烷基) 氧基) 乙基) 丙烯酰胺、 N, N' -(2-羟基丙烷-1,3-二基) 二丙烯酰胺、它们受保护的衍生物或它们的组合。例如, 二丙烯酰胺包括 N, N' -(乙烷-1,2-二基) 双(N -(2-((叔丁基二甲基甲硅烷基) 氧基) 乙基) 丙烯酰胺、 N, N' -(N -(2-((叔丁基二甲基甲硅烷基) 氧基) 丙烷-1,3-二基) 二丙烯酰胺、 N, N' -(乙烷-1,2-二基) 双(N -(2-((三乙基甲硅烷基) 氧基) 乙基) 丙烯酰胺、 N, N' -(N -(2-((三乙基甲硅烷基) 氧基) 丙烷-1,3-二基) 二丙烯酰胺、甲硅烷基保护的 N -[2-(丙烯酰氨基)-1,2-二羟乙基] 丙烯酰胺诸如 N, N' -(2,3-双((三乙基甲硅烷基) 氧基) 丁烷-1,4-二基) 二丙烯酰胺或它们的组合。在一个实例中, 二乙烯基交联剂包括乙二醇二甲基丙烯酸酯、二乙烯基苯、六亚甲基双丙烯酰胺、三羟甲基丙烷三甲基

丙烯酸酯或它们的组合。

[0152] 在第四方面的另一个实例及上述实例中,使所述多个单体单元聚合包括使致孔剂混合到所述分散相中。例如,致孔剂为芳香族致孔剂。在一个实例中,芳香族致孔剂包括甲苯、二甲苯、均三甲苯、乙酸苯乙酯或苯甲酸乙酯。

[0153] 在第四方面的另一个实例及上述实例中,该方法还包括活化亲水性颗粒。例如,活化包括将琥珀酰亚胺基化合物应用于所述亲水性颗粒。在一个实例中,该方法还包括使寡核苷酸键合到活化的水凝胶聚合物。在另一个实例中,键合包括亲核取代并且寡核苷酸为亲核体封端的寡核苷酸。例如,亲核体封端的寡核苷酸的亲核体为胺基。在另一个实例中,该方法还包括使多核苷酸杂交到寡核苷酸。例如,该方法还包括使多核苷酸扩增为多个多核苷酸,并且使所述多个多核苷酸的至少一部分附接至水凝胶颗粒,由此生成包括多个附接的多核苷酸的水凝胶颗粒。例如,该方法还包括通过延伸寡核苷酸使多核苷酸扩增为多个互补多核苷酸,由此生成包括多个附接的多核苷酸的水凝胶颗粒。

[0154] 在第四方面的另一个实例及上述实例中,水凝胶颗粒为水中多个类似形成的水凝胶颗粒中的一者,所述水凝胶颗粒具有至少0.01微米且不大于3微米的平均粒度。

[0155] 在第四方面的另一个实例及上述实例中,水凝胶颗粒为水中多个类似形成的水凝胶颗粒中的一者,所述水凝胶颗粒具有在5微米至100微米范围内的平均粒度。

[0156] 在第四方面的另一个实例及上述实例中,聚合物颗粒具有正 $\log(p)$ 值,并且在转化后,所述亲水性颗粒具有负 $\log(p)$ 值。

[0157] 上述方法、系统、化合物和聚合物颗粒表现出期望的技术优点。先前的系统和方法利用硅烷保护的胺或羟基官能化丙烯酰胺,其在低于7的pH条件下发生水解。不受保护的羧基官能化丙烯酰胺可引起低pH条件,使其它组分水解并且使它们与分散相不混溶,导致珠的形成减少。即使缓冲至pH为9时,羧酸也是盐,并且不溶于油相,因此无法聚合成颗粒。因此,上述化合物、方法和系统有利地改善了珠的形成。

[0158] 应注意,并非在上文一般描述或实例中所描述的所有活动都是需要的,特定活动的一部分可能是不需要的,并且可以进行除所描述活动之外的一种或多种其它活动。再者,活动所列的次序未必是活动被执行的次序。

[0159] 在前述说明书中,已参考具体的实施例对这些概念进行了描述。然而,本领域的普通技术人员应当理解,在不脱离如以下权利要求书中所述的本发明的范围的情况下,可做出各种修改和变化。因此,说明书和附图被视为示例性的而非限制性的,并且所有这些修改旨在包括在本发明的范围内。

[0160] 如本文所用,术语“由……构成”、“包括”、“包含”、“具有”、“有”或它们的任何其它变型旨在涵盖非排他性的包含之意。例如,包含一系列特征的工艺、方法、物件或设备不一定仅限于那些特征,而是可包括没有明确列出或这类工艺、方法、物件或设备所固有的其它特征。另外,除非明确相反地陈述,否则“或”是指包括性的“或”而不是排他性的“或”。例如,以下任一项符合条件A或B:A为真(或存在)且B为假(或不存在),A为假(或不存在)且B为真(或不存在),以及A和B均为真(或存在)。

[0161] 另外,采用“一”或“一个”描述本文所述的元件和部件。这样做仅是为方便起见和给出本发明范围的一般性意义。除非显而易见指的是其它情况,否则此描述应理解为包括一个或至少一个,并且单数也包括复数。

[0162] 上文已经参照特定实施方案描述了益处、其它优点和问题解决方案。然而,所述益处、优势、问题解决方案以及可以使任何益处、优势或解决方案出现或变得更显著的任何特征不应解释为任何或所有权利要求关键的、必需的或基本的特征。

[0163] 在阅读本说明书之后,技术人员将理解,为清楚起见,本文在单独实施例的语境下描述的某些特征也可以在单个实施例中组合提供。相反,为简明起见,在单个实施例的上下文中描述的各种特征也可以单独提供或以任何子组合提供。此外,提及范围中所陈述的值包括在那个范围内的每一个值。

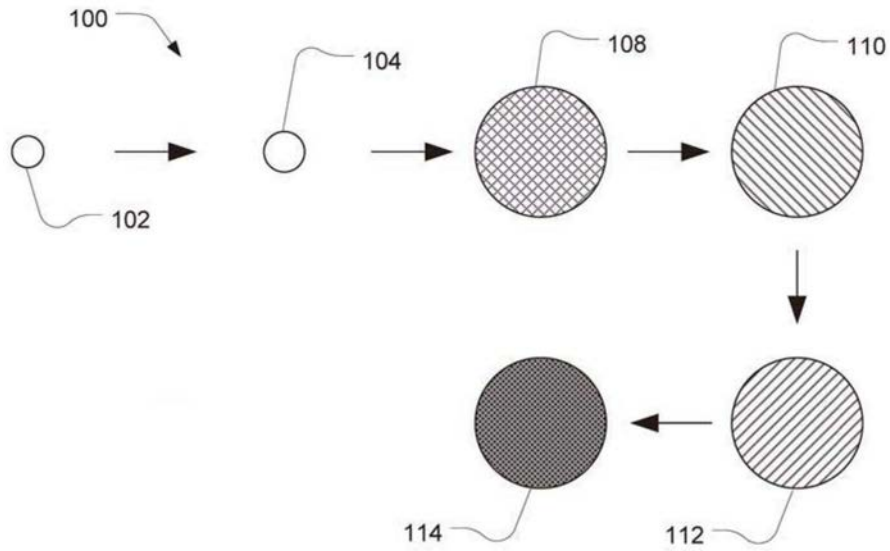


图1

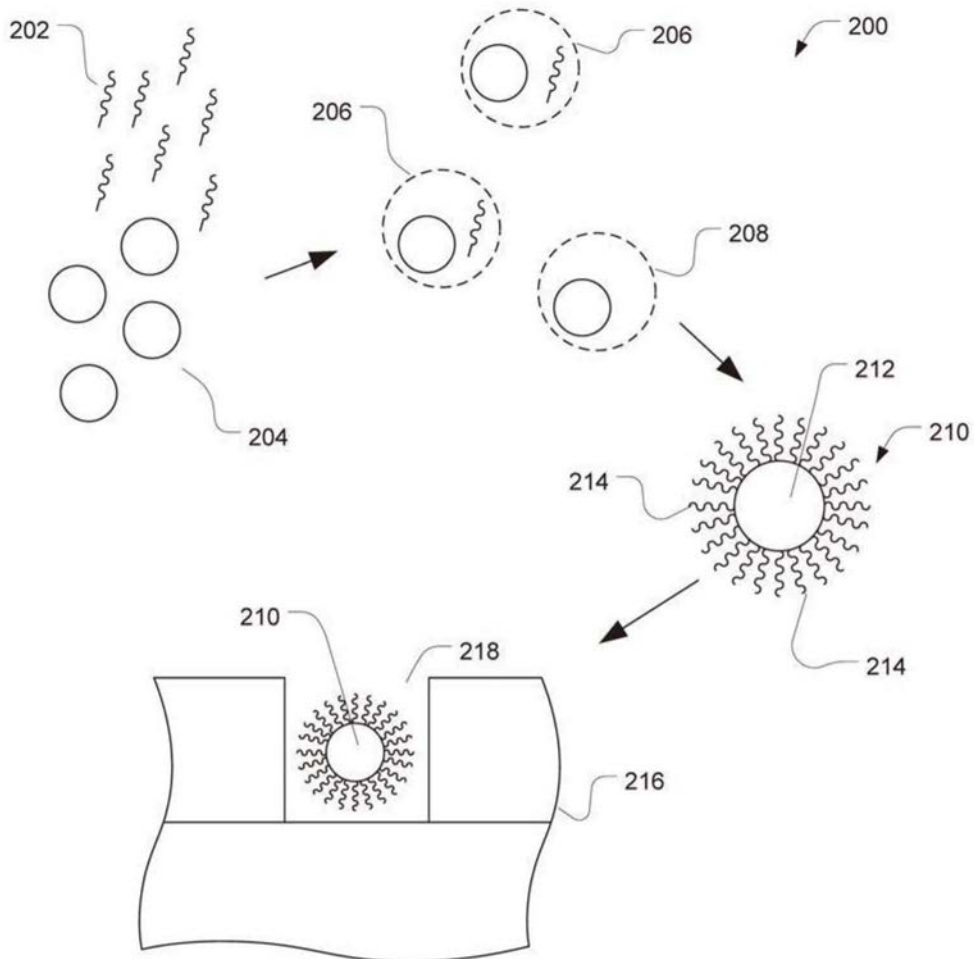


图2