



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU

## K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

241 262 ✓

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita

(22) Přihlášeno 22 02 84

(21) PV 1224-84

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>

A 61 K 39/385,

C 08 F 220/28,

C 08 F 2/46

(40) Zveřejněno 22 08 85

(45) Vydáno 01 09 87

(75)

Autor vynálezu

KOPEČEK JINDŘICH ing.CSc., PRAHA;  
FORNŮSEK LUBOR RNDr.CSc., HVOZDNICE;  
VĚTVIČKA VÁCLAV RNDr.CSc.;  
TLASKALOVÁ HELENA MUDr.CSc., PRAHA

(54)

Polymerní mikročástice na bázi hydrofilních monomerů a způsob jejich výroby

Řešení se týká polymerní mikročástice na bázi hydrofilních monomerů sestávající z 25 až 99,5 % hmot. hydrofilních monomerů, vybraných ze skupiny sestávající z 2-hydroxyethylmethakrylátu, 2-hydroxyethylakrylátu, jakož i odpovídajících monoesterů  $\alpha, \omega$ -dihydroxyoligo(oxyethylenu) a kyseliny methakrylátové či kyseliny akrylové 2,3-dihydroxypropylmethakrylátu, N-monosubstitovaného akrylamidu, kde substituent může být alkyl s 1 až 5 atomy uhlíku nebo hydroxyalkyl s 1 až 6 atomy uhlíku, obsahující 1 až 2 OH skupiny, 4-vinylpyridinu, 2-vinylpyridinu, alkylamidu a methakrylamidu, 0,1 až 40 % hmot. ionogenních komonomerů, vybraných ze skupiny sestávající z kyseliny methakrylové, kyseliny akrylové, kyseliny itakonové, maleinanhydridu, 2-(diethylamino)ethyl-methakrylátu, 2-(dimethylamino)ethyl-methakrylátu, 2-(dimethylamino)ethyl-akrylátu, 2-(diethylamino)ethylakrylátu, p-diethylaminostyrenu a 2-methakryloyloxyethyltrimethylamonium chloridu, 0,1 až 45 % hmot. síťovadla vybraného ze skupiny sestávající z N,N-methylenbis(akrylamidu), N,N-ethylenbis(akrylamidu), 1,2,3-(triakryloyloxymethyl)propanu, 1,3,5-triakryloylhydrotriazinu, ethylendimethakrylátu, ethylendiakrylátu, 2,2-oxydiethyl-dimethakrylátu, dimethakrylátů  $\alpha, \omega$ -dihydroxyderivátů oligoethylenů a 0,05 až 25 % hmot. kovalentní vazbou vázaného haptenu vybraného ze skupiny sestávající z N-methakryloyl-glycylglycyl-N-

-dinitrofenyllysinu, N-methakryloyl-glycyl-fenylalanyl-N-dinitrofenyllysinu a N-methakryloyl-glycylleucyl-N-dinitrofenyllysinu a popřípadě 0,05 až 7,5 % hmot. polymerizovatelné fluorescenční značky vybrané ze skupiny sestávající s dansylallylaminu, N-fluorescein-N-allylthiomocoviny a N-tetramethylrhodamin-N-allylthiomocoviny.

Vynález se týká polymerních mikročástic na bázi hydrofilních monomerů obsahujících specifické skupiny usnadňující jejich detekci a umožňující vazbu protilátek, jakož i použití těchto mikročástic, především v imunologii a parazitologii a způsobu jejich výroby.

Dosavadní syntetické mikročástice se vyráběly polymerizací za přítomnosti iniciátorů či emulgátorů, které není možno ze vzniklé suspenze mikročástic beze zbytku odstranit. Dosud používané postupy také neumožňovaly získat polymerizací homogenní velikost partikulí. Rovněž nebyla popsána výroba mikročástic, obsahujících již zapolymerizované hapteny přesně definované struktury.

Jmenované nevýhody dosud známých mikročástic a používaných postupů výroby odstraňuje předmětný vynález.

Předmětem vynálezu jsou polymerní mikročástice na bázi hydrofilních monomerů, obsahující specifické skupiny usnadňující jejich detekci a umožňující vazbu protilátek, vyznačené tím, že sestávají z 25 až 99,5% hmot. hydrofilních monomerů, vybraných ze skupiny sestávající z 2-hydroxyethyl-methakrylátu, 2-hydroxyethyl-akrylátu, jakož i odpovídajících monoesterů  $\alpha, \omega$ -dihydroxyoligo(oxyethylenu) a kyseliny methakrylové či kyseliny akrylové; 2,3-dihydroxypropylmethakrylátu, N-monosubstituovaného methakrylamidu, N-monosubstituovaného akrylamidu, N,N-disubstituovaného akrylamidu, kde substituent může být alkyl s 1 až 5 atomy uhlíku nebo hydroxyalkyl s 1 až 6 atomy uhlíku, obsahující 1 až 2 OH skupiny, 4-vinylpyridinu, 2-vinylpyridinu, akrylamidu a methakrylamidu, 0,1 až 40% hmot. ionogenních komonomerů vybraných ze skupiny sestávající z kyseliny methakrylové, kyseliny akrylové, kyseliny itakonové, maleinanhydridu, 2-(diethylamino)ethyl-methakrylátu, 2-(dimethylamino)ethyl-akrylátu,

2-(dimethylamino)ethyl-akrylátu, 2-(diethylamino)ethyl-akrylátu, p-diethylaminostyrenu a 2-methakryloyloxyethyltrimethylamoniumchloridu, 0,1 až 45% hmot. síťovadla vybraného ze skupiny sestávající z N,N'-methylenbis(akrylamidu), N,N'-ethylenbis(akrylamidu), 1,2,3-(triakryloyloxymethyl)propanu, 1,3,5-triakryloylhexahydrotriazinu, ethylendimethakrylátu, ethylendiakrylátu, 2,2'-oxydiethyl-dimethakrylátu, dimethakrylátů  $\alpha, \omega$ -dihydroxyderivátů oligoetherů a 0,05 až 25% hmot. kovalentní vazbou vázaného haptenu vybraného ze skupiny sestávající z N-methakryloyl-glycylglycyl-N-dinitrofenyllysinu a N-methakryloyl-glycylfenylalanyl-N-dinitrofenyllysinu a N-methakryloyl-glycylleucyl-N-dinitrofenyllysinu a popřípadě 0,05 až 7,5% hmot. polymerizovatelné fluorescenční značky vybrané ze skupiny sestávající z dansylallylaminu, N-fluorescein-N'-allylthiomocoviny a N-tetramethylrhodamin-N'-allylthiomocoviny.

Způsob výroby mikročástic podle vynálezu spočívá v tom, že účinkem radikálů vzniklých ozářením se kopolymerizuje roztok složený z 1 až 10% hmot. směsi monomerů a 90 až 99% hmot. vody nebo její směsi s 0 až 20% obj.  $C_1-C_4$  alkoholů nebo jiného s vodou mísitelného rozpouštědla, přičemž monomerní směs je složena z 25 až 99,5% hmot. hydrofilního monomeru (hydrofilních monomerů), 0,1 až 40% hmot. ionogenních komonomerů, 0,1 až 45% hmot. síťovadla, 0,05% až 25% hmot. polymerizovatelného haptenu, a popřípadě 0,05 až 7,5% hmot. polymerizovatelné fluorescenční značky, kde jednotlivé monomerní složky jsou definovány výše.

Monomerní roztok může navíc ještě obsahovat až 2% hmot. polymerního aditiva s výhodou poly[N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu]. Dále je možno použít poly(N-monosubstituovaný methakrylamid), poly(N-monosubstituovaný akrylamid), kde substituent může být alkyl s 1 až 4 atomy uhlíku nebo hydroxyalkyl s 1 až 5 atomy uhlíku obsahující 1 až 2 OH skupiny, poly(vinylalkohol), polyakrylamid, poly(ethylen) a poly(oxypropylen), jakož i monoalkyletery. Molekulová hmotnost aditiv je výhodně v rozmezí 5 000 až 250 000 daltonů. Polymerní aditivum umožňuje ovlivnit rozměr částic. Rovněž umožňuje provádět kopolymerizaci při vyšších koncentracích. Lze jej hodnotit jako stabilizátor částic.

Jako s vodou mísitelného rozpouštědla lze kromě  $C_1-C_4$  alkoholů použít 1,4-dioxan, aceton, dimethylsulfoxid, dimethylformamid, ethyl-

acetát atd.

Jako hydrofilních monomerů lze použít 2-hydroxyethylmethakrylát, 2-hydroxyethylakrylát, jakož i odpovídající monoestery  $\alpha, \omega$ -dihydroxyoligo(oxyethylenu) a kyseliny methakrylové či kyseliny akrylové; 2,3-dihydroxypropylmethakrylát, N-monosubstituovaný methakrylamid, N-monosubstituovaný akrylamid, N,N-disubstituovaný akrylamid, kde substituent může být alkyl s 1 až 5 atomy uhlíku nebo hydroxyalkyl s 1 až 6 atomy uhlíku, obsahující 1 až 2 OH skupiny, 4-vinylpyridin, 2-vinylpyridin; akrylamid a methakrylamid. Je možno použít i  $^{14}\text{C}$ -označených monomerů.

Ionogenní komonomery jsou kyseliny methakrylová, kyselina akrylová, kyselina itakonová, maleinanhydrid, 2-(diethylamino)ethylmethakrylát, 2-(dimethylamino)ethylmethakrylát, 2-(dimethylamino)ethylakrylát, 2-(diethylamino)ethylakrylát, p-diethylaminostyren, 2-methakryloyloxyethyltrimethylamoniumchlorid.

Jako síťovadla je výhodné použít N,N'-methylenbis(akrylamid), N,N'-ethylenbis(akrylamid), 1,2,3-(triakryloyloxymethyl)propan, 1,3,5-triakryloylhexahydrotriazin, ethylendimethakrylát, ethylendiakrylát, 2,2'-oxydiethylmethakrylát, jakož i dimethakryláty  $\alpha, \omega$ -dihydroxyderiváty oligoetherů. Množství použitého síťovadla se řídí požadovaným stupněm sesítní. Je závislé na schopnosti daného síťovadla vytvářet příčné vazby.

Jako polymerizovatelné fluorescenční činidla lze použít například dansylallylamin, N-fluorescein-N'-allylthiomočovinu, N-tetramethylrhodamin-N'-allylthiomočovinu a N-akridin-N'-allylthiomočovinu.

Jako polymerizovatelné hapteny lze například použít N-methakryloyl-glycylglycyl-N<sup>6</sup>-dinitrofenyllysin, N-methakryloyl-glycylglycyl-arsanilovou kyselinu, N-methakryloyl-glycylfenylalanyl-N<sup>6</sup>-dinitro-

fenylyllysin a N-methakryloyl-glycylleucyl-N -DNP-dinitrofenyllysin.

Při polymerizaci se postupuje tak, že směs monomerů (polymerizační směs) se naplní do polymerizační nádoby, například skleněné ampule, probublá dusíkem nebo argonem asi 15-20 minut a zataví nebo jinak utěsňuje. Za teploty s výhodou 0 až 40 °C se ampule umístí do centra kobaltového zdroje a ozáří tak, aby dávka byla 0,1 až 5 Mrad. Po ozáření se ampule otevře, obsah 10x dekantuje nadbytkem destilované vody (event. směsí vody a s vodou mísitelného rozpouštědla a poté destilovanou vodou) a uschová při 4 °C.

Vazbu protilátek je možno provést několika postupy. Například je možno využít interakce protilátek s haptenními skupinami přítomnými ve struktuře mikročástic (viz příklad 1) nebo je možno využít funkčních skupin přítomných v ionogenních komonomerech - například -COOH skupin v molekule kyseliny methakrylové. K těmto skupinám je možno bioaktivní molekuly navázat pomocí N-cyklohexyl-N'-[2-(4-morfolinyl)ethyl]karbodiimid - methyl p-toluensulfonátu, Woodwardova činidla, 2-ethoxy-1-ethoxykarbonyl-1,2-dihydrochinolinu a podobných, v peptidové chemii užívaných, kondenzačních činidel.

Mikročástice připravené podle vynálezu jsou velmi vhodné pro použití k detekci specifických membránových znaků a k fagocytárním testům především buněk účastnících se na imunitních reakcích, ale i dalších typů buněk. Na rozdíl od řady dosud používaných technik je možno současně detekovat jak vazbu částice na sledovaný receptor, tak i fagocytózu tímto receptorem zprostředkovanou. Zvláště výhodné se jeví být použití částic se zapolymerovanou fluorescenční značkou, umožňující při detekci ve fluorescentním mikroskopu rozlišení fagocytované od nefagocytované částice použitím vhodné látky zhasající fluorescenci nefagocytovaných částic. Odlišení fagocytovaných od nefagocytovaných mikročástic se provede po proběhnutí testu zhasnutím fluorescence fluorescenční modifikace mikročástic zhasací látkou, například krystalovou violetí.

Výhodou zabudování haptenu přesně definované struktury postupem podle vynálezu je to, že hapteny nejsou z mikročástic uvolňovány do prostředí a zachovávají si svoji imunogennost i funkceschopnost. Vazba bioaktivních molekul přímou polymerizací, ale i prostřednictvím kondenzačních činidel je velmi jednoduchá a stálá. Trvanlivost suspenze samotné i s navázanými hapteny byla ověřována na Imunolo-

gickém oddělení MBÚ ČSAV od dubna 1981 do února 1984.

V dalším jsou uvedeny příklady objasňující předmět vynálezu, aniž by jej nějak omezovaly.

#### Příklad 1

Reakcí 5 mg tetramethylrhodaminisothiokyanátu s nadbytkem allylaminu v acetonu při 50°C byla připravena N-tetramethylrhodamin-N'-allylthiomocovina. Aceton a nadbytečný allylamin byly oddestilovány za sníženého tlaku. K získanému oleji bylo přidáno 0,4 ml směsi monomerů (76,9 hmot.dílů 2-hydroxyethylmethakrylátu, 0,1 hmot.dílů ethylendimethakrylátu, 2 hmot.díly methylen-bis-akrylamidu, 20 hmot.dílů methakrylové kyseliny a 1 hmot.díl N-methakryloylglycylglycyl-N<sup>6</sup>-dinitrofenyllysinu) a 19,6 ml destilované vody. Získaný homogenní roztok byl přefiltrován, naplněn do ampule, probublán 15 min. dusíkem a ozářen v <sup>60</sup>Co zdroji (1,2 Mrad). Získaná suspenze byla nalita do přebytku destilované vody, 7x dekantována. Byla získána suspenze částic o velikosti 2 μm.

Tyto částice byly reagovány s maximální subaglutinační dávkou myších monoklonálních anti-trinitrofenyl protilátek, isotyp IgE. Částice byly promyty (600g, 10 min.), resuspendovány a uchovávány při 4°C. Byly používány k detekci receptorů pro imunoglobuliny na povrchu buněk a k fagocytárním testům.

#### Příklad 2

10g směsi sestávající z 77,8% hmot. 2-hydroxyethylmethakrylátu, 2% hmot.methylen-bis-akrylamidu, 0,2% hmot.polyethylenoxidmonomethyletheru o  $M_w = 5\ 000$  a 20% hmot.kyseliny methakrylové bylo rozpuštěno ve 190 ml destilované vody. Dále bylo při polymerizaci postupováno jako v příkladu 1. Byly získány částice o průměru 1,2 μm. 50 μg mikročástic (suchá hmotnost) bylo resuspendováno v 1 ml roztoku čištěné C 3 složky komplementu (1 mg/ml). Po vychlazení na

4°C bylo pomalu za intenzivního třepání přidáno 5 mg N-cyklohexyl-N'-[2-(4-morfolinyl)ethyl]karbodiimid methyl p-toluensulfonátu. pH bylo ihned upraveno na 7,0 a mikročástice byly inkubovány 10 hodin při 4°C za stálého třepání. Po několikerém promytí ve fyziologickém roztoku (250 g, 15 minut) a naředění na koncentraci  $10^9$  částic/ml bylo 0,1 ml takto zředěných mikročástic smícháno s  $10^6$  buněk (v 0,1 ml) a inkubováno 60 min. při laboratorní teplotě. Buňky s adherovanými 3 a více mikročásticemi byly považovány za buňky nesoící receptor pro C 3 složku komplementu.

### Příklad 3

5 mg dansyallylaminu bylo rozpuštěno v 4,5 ml směsi monomerů, sestávající z 50% hmot. 2-hydroxyethylmethakrylátu, 20% hmot. N,N-diethylakrylamidu, 4% hmot. triethylenglykoldimethakrylátu a 26% hmot. kyseliny akrylové. K tomuto roztoku bylo přidáno 245 ml destilované vody. Dále bylo při polymerizaci postupováno stejně jako v příkladu 1.

### Příklad 4

Reakcí 3 mg fluoresceinisothiokyanátu (isomer I) s nadbytkem allylaminu v acetonu při 40°C byla připravena N-fluorescein-N'-allylthiomocovina. Aceton a nadbytečný allylamin byly oddestilovány za sníženého tlaku. K získaným krystalkům bylo přidáno 0,6 ml směsi monomerů (77 hmot.dílů 2-hydroxyethylmethakrylátu, 2 hmot.díly methylen-bis-akrylamidu, 20 hmot.dílů kyseliny methakrylové a 1 hmot.díl N-methakryloylglycylglycyl-N<sup>ε</sup>-dinitrofenyllysinu) a 15,4 ml destilované vody. Dále bylo při polymerizaci postupováno stejně jako v příkladu 1. Tyto částice byly inkubovány s maximální subaglutinační dávkou myších monoklonálních anti-trinitrofenyl protilátek isotypu IgM (22°C, 1 hod). Potom byly částice promyty, resuspendovány a skladovány v lednici. Byly použity k detekci Fc receptorů na povrchu buněk - po inkubaci buněk s takto modifikovanými mikročásticemi (22°C) byly buňky pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu. Buňky, které měly adherováno 3 a více mikročástic, byly považovány za buňky obsahující Fc receptory.

#### Příklad 5

Byly připraveny dva zásobní roztoky. Roztok A, sestávající z 0,03 g N,N-methylenbis(akrylamidu), 1,309 g 2-hydroxyethyl-methakrylátu a 0,308 g 2-(diethylamino)ethyl-methakrylátu. Roztok B, sestávající z 1,589 g polyethylenoxidmethyletheru (m. v. 5 000), rozpuštěného v 38,2 ml vody. Do skleněné ampule bylo předloženo 0,4 ml roztoku A, 4 ml roztoku B a 35,6 ml vody. Dále bylo při polymerizaci postupováno jako v příkladu 1.

#### Příklad 6

4 mg dansylallylaminu bylo rozpuštěno ve směsi monomerů, sestávající z 55% hmot. 2-hydroxyethyl-methakrylátu, 15% hmot. N-ethylakrylamidu, 5% hmot. 1,2,3-(triakryloyloxymethyl)propanu a 25% hmot. 4-vinylpyridinu. K tomuto roztoku bylo přidáno 230 ml destilované vody. Dále bylo při polymerizaci postupováno stejně jako v příkladu 1.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Polymerní mikročástice na bázi hydrofilních monomerů obsahující specifické skupiny, usnadňující jejich detekci a umožňující vazbu protilátek, vyznačené tím, že sestávají z 25 až 99,9% hmot. hydrofilních monomerů vybraných ze skupiny sestávající z 2-hydroxyethylmethakrylátu, 2-hydroxyethylakrylátu, jakož i odpovídajících monoesterů  $\alpha, \omega$ -dihydroxyoligo(oxyethylenu) a kyseliny methakrylové či kyseliny akrylové, 2,3-dihydroxypropyl-methakrylátu, N-monosubstituovaného methakrylamidu, N-monosubstituovaného akrylamidu, N,N-disubstituovaného akrylamidu, kde substituent může být alkyl s 1 až 5 atomy uhlíku nebo hydroxyalkyl s 1 až 6 atomy uhlíku, obsahující 1 až 2 OH skupiny, 4-vinylpyridinu, 2-vinylpyridinu, akrylamidu a methakrylamidu, 0,1 až 40% hmot. ionogenních komonomerů vybraných ze skupiny sestávající z kyseliny methakrylové, kyseliny akrylové, kyseliny itakonové, maleinanhydridu, 2-(diethylamino)ethyl-methakrylátu, 2-(dimethylamino)ethyl-methakrylátu, 2-(dimethylamino)ethyl-akrylátu, 2-(diethylamino)ethyl-akrylátu, p-diethylaminostyrenu a 2-methakryloyloxyethyltrimethylamoniumchloridu, 0,1 až 45% hmot. síťovadla vybraného ze skupiny sestávající z N,N'-methylenbis(akrylamidu), N,N'-ethylenbis(akrylamidu), 1,2,3-tri(akryloyloxymethyl)propanu, 1,3,5-triakryloylhexahydrotriazinu, ethylendimethakrylátu, ethylendiakrylátu, 2,2'-oxydiethyl-dimethakrylátu, dimethakrylátu  $\alpha, \omega$ -dihydroxyderivátů oligoetherů a 0,05 až 25% hmot. kovalentní vazbou vázaného haptenu vybraného ze skupiny sestávající z N-methakryloyl-glycyl-glycyl-N<sup>C</sup>-dinitrofenyllysinu a N-methakryloyl-glycyl-fenylalanyl-N<sup>C</sup>-dinitrofenyllysinu a N-methakryloyl-glycyl-leucyl-N<sup>C</sup>-dinitrofenyllysinu a popřípadě 0,05 až 7,5% hmot. polymerizovatelné fluorescenční značky vybrané ze skupiny sestávající z dansylallylaminu, N-fluorescein-N'-allylthiomocoviny a N-tetramethylrhodamin-N'-allylthiomocoviny.
2. Polymerní mikročástice podle bodu 2, vyznačené tím, že hydrofilní monomer je 2-hydroxyethylmethakrylát.

3. Polymerní mikročástice podle bodu 1, vyznačené tím, že ionogenní komonomer je kyselina methakrylová.
4. Polymerní mikročástice podle bodu 1, vyznačené tím, že síťovadlo je N,N'-methylenbis(akrylamid).
5. Způsob výroby mikročástic na bázi hydrofilních monomerů, obsahujících specifické skupiny usnadňující jejich detekci a umožňující vazbu protilátek podle bodu 1, vyznačený tím, že se kopolymerizuje roztok složený z 1 až 10% hmot. směsi monomerů a 90 až 99% hmot. vody nebo její směsi s 0 až 20% obj. C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkoholů nebo jiného s vodou mísitelného rozpouštědla, přičemž monomerní směs je složena z 25 až 99,5% hmot. hydrofilního monomeru (hydrofilních monomerů), 0,1 až 40% hmot. ionogenních komonomerů, 0,1 až 45% hmot. síťovadla, 0,05% až 25% hmot. polymerizovatelného haptenu a popřípadě 0,05 až 7,5% hmot. polymerizovatelné fluorescenční značky, kde jednotlivé monomerní složky jsou definovány v bodu 1.
6. Způsob podle bodu 5, vyznačený tím, že monomerní roztok obsahuje navíc až 2% hmot. polymerního aditiva, s výhodou poly [N-(2-hydroxypropyl) methakrylamid]w.