[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]
B01J 13/02
B42F 3/00 A61K 9/64
B05D 7/00 B05D 1/40

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95193484.8

[43]公开日 1997 年 5 月 28 日

[11] 公开号 CN 1150764A

[22]申请日 95.6.6

[30]优先权

[32]94.6.6 [33]US[31]08/254,303

[86]国际申请 PCT/US95/06879 95.6.6

[87]国际公布 WO95/33553 英 95.12.14

[85]进入国家阶段日期 96.12.6

[71]申请人 拜奥波尔公司

地址 美国加州

[72]发明人 李乃宏 詹姆斯·R·本森

北川直隆

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 甘 玲

权利要求书 16 页 说明书 31 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 聚合物微球及其制造方法

[57]摘要

本发明涉及有由互联孔连接的空腔的多孔交联聚合微球，其中各微球内部的至少某些空腔与微球表面连通。本发明还涉及制造多孔交联聚合微球的方法以及该方法的产品。该方法包括使油相与不连续水相混合形成乳状液，将该乳状液加入水悬浮介质中形成有分散的乳状液液滴的水包油悬浮体，和使乳状液液滴聚合制成微球。按照本发明制得的微球至少 10%基本上为球形或基本上为椭球形或两者的混合物。

权　利　要　求　书

1 、多孔交联聚合微球，该微球有通过互联孔连接的空腔，其中在各微球内部的至少某些空腔与微球表面连通，而且其中约1 0 %的微球基本上是球形的或基本上是椭球形的或是其混合物。

2 、权利要求1 的微球，其中微球有约5 μm －约5 mm 范围的平均直径。

3 、权利要求1 的微球，其中微球有至少约7 0 %的空隙容积。

4 、一种制造多孔交联聚合微球的方法，包括:

(a) 混合

(i) 一种油相，该相含有

(1) 一种基本上不溶于水的单官能的单体;

(2) 一种基本上不溶于水的多官能的交联剂；和

(3) 一种适合形成稳定的油包水乳状液的乳化剂；和

(i i) 一种不连续的水相，以形成乳状液，其中该乳状液含有至少约7 0 %不连续的水相;

(b) 将该乳状液加入水悬浮介质中，以形成有分散的乳状液液滴的水包油型悬浮液；和

(c) 使乳状液液滴聚合。

5 、权利要求4 的方法，其中单体是苯乙烯基单体。

6 、权利要求4 的方法，其中单体以约4 －约9 0 % (w t) 的浓度存在于油相中。

7 、权利要求4 的方法，其中交联剂选自由二乙烯基苯的化合物、二或三丙烯酸化合物、异氰脲酸三烯丙酯及其混合物组成的组。

8 、权利要求4 的方法，其中交联剂以约1 －约9 0 % (w t) 范围的浓度存在于油相中。

9 、权利要求4 的方法，其中乳化剂选自由脱水山梨醇脂肪酸酯、聚甘油脂肪酸酯、聚氧乙烯脂肪酸或酯组成的组，或者该乳化剂是一种它们的混合物。

1 0 、权利要求4 的方法，其中乳化剂以约3 －约5 0 % (w t) 范围的浓度存在于油相中。

1 1 、权利要求4 的方法，其中油相另外含有油溶的聚合引发剂。

1 2 、权利要求1 1 的方法，其中引发剂选自由偶氮引发剂和过氧化物引发剂组成的组。

1 3 、权利要求1 1 的方法，其中油溶的聚合引发剂以所有可聚合单体的约5 % (w t) 以下的浓度存在于油相中。

1 4 、权利要求4 的方法，其中油相另外含有致孔剂。

1 5 、权利要求1 4 的方法，其中致孔剂选自由十二烷、甲苯、环己醇、正庚烷、异辛烷和石油醚组成的组。

1 6 、权利要求1 4 的方法，其中致孔剂以约1 0 －约6 0 % (w t) 范围的浓度存在于油相中。

1 7 、权利要求4 的方法，其中不连续水相含有一种水溶的聚合引发剂。

1 8 、权利要求1 7 的方法，其中水溶的聚合引发剂包括一种过氧化物引发剂。

1 9 、权利要求1 7 的方法，其中水溶的聚合引发剂以约5 % (w t) 以下的浓度存在于不连续水相中。

2 0 、权利要求4 的方法，其中水包油悬浮体含有一定量的适用于产生稳定的悬浮体的高内相乳状液。

2 1 、权利要求4 的方法，其中水悬浮介质含有一种悬浮剂。

2 2 、权利要求2 1 的方法，其中悬浮剂选自由水溶性聚合物和不溶水的无机固体组成的组。

2 3 、权利要求2 2 的方法，其中悬浮剂包括一种已改性以增加无机固体颗粒的疏水性的不溶水的无机固体。

2 4 、权利要求2 1 的方法，其中悬浮剂以约1 －约3 0 % (w t) 的浓度存在于水悬浮介质中。

2 5 、权利要求4 的方法，其中水悬浮介质含有一种水溶的聚合引发剂。

2 6 、权利要求2 5 的方法，其中水溶的聚合引发剂是过氧化物引发剂。

2 7 、权利要求2 5 的方法，其中水溶的聚合引发剂以约5 % (w t) 以下的浓度存在于水悬浮介质中。

2 8 、权利要求4 的方法，其中悬浮体是通过将高内相乳状液加入水悬浮介质同时提供足够的剪力搅拌以产生稳定的悬浮体而形成的。

2 9 、一种制造多孔交联聚合微球的方法，包括

(a) 混合

(i) 一种油相，该相含有

(1) 苯乙烯;

(2) 二乙烯基苯;

(3) 偶氮异双丁腈;

(4) 十二烷;

(5) 脱水山梨醇单油酸酯

(i i) 一种不连续的水相, 该相含有过硫酸钾,

以形成乳状液;

(b) 将该乳状液加入水悬浮介质中以形成有分散的乳状液液滴的水包油悬浮体, 所述悬浮介质含有

(i) 过硫酸钾;

(i i) 改性二氧化硅

(i i i) 凝胶; 和

(c) 使乳状液液滴聚合。

3 0 、一种由下述方法制得的多孔交联聚合微球, 所述方法包括

(a) 混合

(i) 一种油相, 该相含有

(1) 一种基本上不溶于水的单官能的单体;

(2) 一种基本上不溶于水的多官能的交联剂; 和

(3) 一种适合形成稳定的油包水乳状液的乳化剂; 和

(i i) 一种不连续水相, 以形成一种乳状液;

(b) 将该乳状液加入水悬浮介质中形成有分散的乳状液液滴的水包油悬浮液; 和

(c) 使乳状液液滴聚合。

3 1 、一种由下述方法制得的多孔交联聚合微球, 所述方法包括:

(a) 混合

(i) 一种油相, 该相含有

(1) 苯乙烯

(2) 二乙烯基苯;

(3) 偶氮异双丁腈;

(4) 十二烷;

(5) 脱水山梨醇单油酸酯

(i i) 一种不连续水相, 该相含有过硫酸钾;

形成乳状液;

(b) 将该乳状液加入水悬浮介质中形成有分散的乳状液液滴的水包油悬浮体, 所述悬浮介质含有

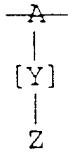
(i) 过硫酸钾;

(i i) 改性二氧化硅;

(i i i) 凝胶; 和

(c) 使乳状液液滴聚合。

3 2 、权利要求1 的微球, 其中微球已被官能化, 使得官能化的微球吸收含水的和/ 或有机酸性液体, 所述官能化的微球包含下面的结构单元:



其中，A 是交联的碳链;

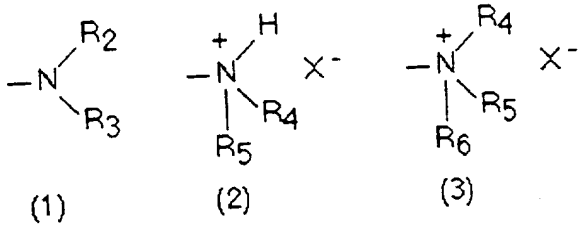
Y 是一个供选择的间隔基；和

Z 是一个离子或极性官能团。

3 3 、权利要求3 2 的官能化的微球，其中由官能化的微球吸收的含水的和/ 或有机酸与吸收的油酸甲酯的比大于约1 ． 2 。

3 4 、权利要求3 2 的官能化的微球，其中Z 选自由一个氨基或被取代的氨基；有8 个或更多碳原子的烷基阳离子季铵基；和一个在有8 个或更多碳原子的有机基团这种平衡离子存在下有8 个或更少碳原子的烷基阳离子季铵基团组成的组。

3 5 、权利要求3 2 的官能化的微球，其中Z 包括一种离子或极性官能团，所述官能团选自由物质1 －3 组成的组:



其中R_2、R_3、R_4、R_5 和R_6 可以相同或不同且选自由烷基、环烷基、芳基、羟烷基组成的组；或R_2 和R_3 构成一个环系的部分；和对于阳离子季铵(3) 来说，$R_4+R_5+R_6$ 中存在的碳原子数为1 0 个或更多；对于胺盐(2) 来说，R_4+R_5 中存在的碳原子数为8 个或更多；和平衡离子 X^- 是一种有机或无机离子。

3 6 、权利要求3 5 的官能化的微球，其中对于阳离子季铵来说，$R_4+R_5+R_6$ 中存在的碳原子数小于1 0 ；对于胺盐(2) 来说，R_4+R_5 中存在的碳原子数小于8 ；和平衡离子X^- 是一种有8 个或更多碳原子的有机基团。

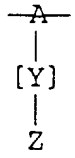
3 7 、权利要求3 2 的官能化的微球，其中交联度为约1 －约2 0 %。

3 8 、权利要求3 2 的官能化的微球，其中交联度为约2 －约1 0 %。

3 9 、权利要求3 2 的官能化的微球，其中微球的空隙容积大于约9 5 %。

4 0 、权利要求3 2 的官能化的微球，其中官能度大于约5 0 %。

4 1 、权利要求1 的的微球，其中微球已被官能化，使得官能化的微球吸收含水液体，所述官能化的微球包含下面的结构单元:



其中A 是交联的碳链;

Y 是供选择的间隔基；和

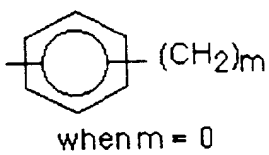
Z 是离子或极性官能团。

4 2 、权利要求4 1 的官能化的微球，其中由官能化的微球吸收的1 0 %氯化钠与吸收水的比大于约0 . 1 。

4 3 、权利要求4 2 的官能化的微球，其中1 0 %氯化钠与水吸收比大于约0 . 5 。

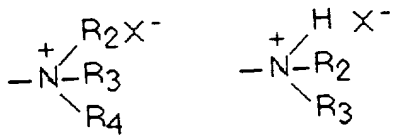
4 4 、权利要求4 3 的官能化的微球，其中1 0 %氯化钠与水吸收比大于约0 . 7 。

4 5 、权利要求4 1 的官能化的微球，其中Z 选自由有1 0 个或更多碳原子的烷基阳离子季铵基；有8 个或更少碳原子的烷基胺盐基；烷氧基化的基团；硫酸、羧酸、磷酸或磺酸基团的金属、铵或被取代的铵盐组成的组，但当Z 为磺酸时，Y 不具有下面的结构:



4 6 、权利要求4 1 的官能化的微球，其中Z 包括一个选自由结构式1 －2

组成的组的离子或极性官能团:

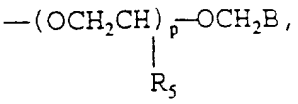


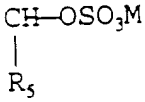
(1)　　(2)

其中

R_2、R_3 和R_4 可以相同或不同，且选自由烷基、环烷基、芳基和羟烷基组成的组；或R_2 和R_3 构成一个环系的一部分；和对于阳离子季铵（1）来说 $R_2+R_3+R_4$ 中存在的碳原子数小于10；对于胺盐（2）来说，R_2+R_3 中存在的碳原子数少于8；和平衡离子X^-是一个无机离子或有少于8 个碳原子的羧化物的基团。

47、权利要求41 的官能化的微球，其中Z 是有下结构式的烷氧基化的基团:



其中p 为1－680，且B =  或COOM或 

而且其中R_5 是氢或烷基，M是金属、铵或被取代的铵阳离子。

48、权利要求41 的官能化的微球，其中交联度为约1－约20 %。

49、权利要求41 的官能化的微球，其中交联度为约2－约10 %。

50、权利要求41 的官能化的微球，其中微球的空隙容积大于约95 %。

51、权利要求41 的官能化的微球，其中官能度大于约50 %。

52、权利要求1 的官能化的微球，其中微球具有含碳结构。

5 3 、权利要求5 2 的含碳微球，其中微球有至少约9 0 %的空隙容积和少于约0 . 2 5 g m / c c 的干密度。

5 4 、一种制造含碳微球的方法，包括

(a) 制造有由互联孔连接的空腔的稳定的多孔交联聚合微球；和

(b) 在惰性气氛中加热所述稳定的微球至少约5 0 0 ℃的温度。

5 5 、一种分离方法，包括

(i) 使一种有至少两种成分的溶液通过有由互联孔连接的空腔的多孔交联聚合微球，其中优选与两成分之一相互作用的化学基团连在微球表面上；和

(i i) 使两成分相互分离。

5 6 、权利要求5 5 的方法，其中分离方法为离子交换色谱法。

5 7 、权利要求5 5 的方法，其中所述化学基团结合到微球表面。

5 8 、权利要求5 5 的方法，其中化学基团结合到微球空腔内的凝胶或初凝胶上。

5 9 、一种方法，包括使一种含有反应物的溶液通过有由互联孔连接的空腔的多孔交联聚合微球，其中与反应物相互作用的化学基团连于微球表面。

6 0 、权利要求5 9 的方法，其中化学基团键合到微球表面。

6 1 、权利要求6 0 的方法，其中化学基团键合到微球空腔内的凝胶或初凝胶上。

6 2 、权利要求1 的微球，另外含有在微球空腔内的凝胶或初凝胶，其中凝胶或初凝胶含有一个化学基团，该基团与选自由化学合成中的溶液的组分和反应物组成的组的一个化学个体相互作用。

6 3 、权利要求6 2 的方法，其中空腔直径在约1 －约1 0 0 μm 范围。

64、权利要求62的方法，其中微球的交联使得在液体存在下微球膨胀不超过微球干体积的约两倍。

65、权利要求62的方法，其中溶胀凝胶与微球的重量比约60：40－约95：5的范围内。

66、一种制造有凝胶或初凝胶的微球的方法，包括:

(a) 制造有由互联孔连接的空腔的多孔的交联聚合微球和

(b) 使凝胶或初凝胶沉积并保留在微球空腔内。

67、权利要求66的方法，其中步骤(b)包括使微球与一种含初凝胶成分和微球溶胀剂的溶液接触一足够长的时间，以使初凝胶成分渗入溶胀的微球并在微球空腔内形成凝胶。

68、权利要求1的微球，其中使选自由多肽和低核苷酸组成的组的分子附着到微球表面。

69、权利要求68的微球，其中所述分子选自由抗体、外源凝集素、酶和半抗原组成的组的多肽。

70、权利要求68的微球，其中所述分子通过一种选自由非共价吸附、共价键合和经桥分子附着组成的组的附着方法附着到微球表面。

71、一种方法，包括按下列顺序的步骤:

(a) 在培养介质存在下使细胞与有由互联孔连接的空腔的多孔交联聚合微球接触，和

(b) 搅动微球。

72、权利要求4的方法，其中油相另外含有一种油溶的聚合引发剂，而且在不连续水相或者水悬浮介质中不存在聚合引发剂。

7 3 、权利要求7 2 的方法，其中油溶的引发剂选自由过氧化苯甲酰、过氧化月桂酰和V A Z O 引发剂组成的组。

7 4 、权利要求7 2 的方法，其中聚合引发剂以最多至总可聚合单体之约5 % (w t) 的浓度存在于油相中。

7 5 、权利要求7 2 的方法，其中不连续的水相基本上由水组成。

7 6 、权利要求7 2 的方法，其中乳状液另外含有:

(a) 一种天然的或合成的聚合稳定剂；和

(b) 一种惰性溶剂。

7 7 、权利要求7 6 的方法，其中聚合稳定剂为纤维素衍生物。

7 8 、权利要求7 6 的方法，其中聚合稳定剂选自由甲基纤维素、乙基纤维素和聚乙烯醇组成的组。

7 9 、权利要求7 6 的方法，其中聚合稳定剂以约0 . 0 1 －约1 5 % (w t) 范围的浓度存在于油相中。

8 0 、权利要求7 6 的方法，其中惰性溶剂选自由三氯乙烷和甲苯组成的组。

8 1 、权利要求7 2 的方法，其中悬浮剂为天然树胶。

8 2 、一种制造多孔交联聚合微球的方法，包括

(a) 混合

(i) 一种油相，该相含有

(1) 苯乙烯;

(2) 二乙烯基苯;

(3) 过氧化月桂酰;

(4) 三氯乙烷;

(5) 脱水山梨醇单油酸酯

(i i) 一种不含聚合引发剂的不连续水相,

形成一种乳状液;

(b) 将该乳状液加入水悬浮介质中形成有分散的乳状液液滴的水包油悬浮液, 其中所述悬浮介质含有阿拉伯胶且不含聚合引发剂; 和

(c) 使该乳状液液滴聚合。

8 3 、一种由下法制得的多孔交联聚合微球, 所述方法包括:

(a) 混合

(i) 一种油相, 该相含有

(1) 苯乙烯

(2) 二乙烯基苯;

(3) 过氧化月桂酰;

(4) 三氯乙烷;

(5) 脱水山梨醇－油酸酯

(i i) 一种不含聚合引发剂的不连续水相,

形成乳状液;

(b) 将该乳状液加入水悬浮介质中形成有分散的乳状液液滴的水包油悬浮

体，其中所述悬浮介质含有阿拉伯胶并且不含聚合引发剂；和

(c) 使乳状液液滴聚合。

8 4 、权利要求7 2 的方法，其中油相另外含有致孔剂。

说　　明　　书

聚合物微球及其制造方法

发明背景

发明领域

本发明涉及交联的多孔聚合材料的微球和制造这类微球的方法。特别是，本发明涉及一种具有特别高的孔隙率的聚合物微球。

现有技术描述

US．4522953 中公开了交联的、均质的、多孔聚合物材料（Barby 等人，1985 年6 月11 日公布）。所公开的聚合物材料是通过有较高的水油比的油包水乳状液的聚合制得的。这些乳状液被称为“高内相乳状液”，而且在本领域中公知为“HIPEs”。HIPEs 包含一个连续的油相和一个不连续的水相，所述油相包含一种单体和一种交联剂。这类乳状液是通过在一种乳化剂存在下搅拌混合的油和水相而制得的。聚合物是通过加热所得到的乳状液而制得的。然后洗涤聚合物以除去任何未聚合的单体/ 交联剂。

所公开的多孔聚合物具有刚性结构，该结构中有许多空腔，它们由腔壁上的孔连通。通过选择适当的成分和处理条件，可使HIPE 聚合物的空隙率达80%以上。这样，这类材料有很高的吸收和容留液体的能力。

已经公开了许多对HIPE 聚合物的改进方案。例如，U．S．4536521 (Haq，1985 年8 月20 日公布) 公开了HIPE 聚合物可以被磺化以制造一种磺化的聚合材料，该材料显示出高的吸收离子型溶液的能力。U．S．4611014 (Jones 等人，1986 年9 月16 日和U．S．4612344 (Jones 等人，1986 年9 月16 日) 公开了通过类似的方法制造的其它官能化的HIPE 聚合物。

尽管可聚合的HIPEs 的存在是公知的，但是有利的HIPE 聚合物的制备并不是没有它的困难的。因为用于制造这些聚合物的乳状液有高的水油比，这类乳状液趋于不稳定。为了形成稳定的乳状液，选择适合的单体/ 交联剂浓度、乳化剂和乳化剂浓度、温度和搅拌状态都是重要的。这些变量中的任何一种的微

小变化都可能使乳状液“破裂”或分成明显的油相和水相。另外，乳状液成分和制造稳定的乳状液的操作条件不可能总会产出适用于其预计目的HIPE聚合物。

除了这些问题外，与HIPE聚合物的大规模生产有关的费用一直妨碍基于HIPE聚合物的产品的商品化开发。大规模生产HIPE聚合物的方法是公知的。例如，U.S.5149720 (DesMarais等人，1992年9月22日公布）公开了一种制备适合于聚合成吸收剂聚合物的HIPEs的连续方法。另外，U.S.5252619 (Brownscombe等人，1993年10月12日公布）提出了一种通过减少HIPE中的单体的熟化时间来促进这类连续方法的进行的方法。然而，用这类公知方法大规模生产HIPE聚合物一直被缺乏从聚合物中除去未聚合的乳状液成分的经济有效的手段所妨碍。

所有的用于制造HIPE聚合物的现有技术的方法都是制得一块具有聚合所用的容器的尺寸和形状的聚合材料。制造块状HIPE聚合物的问题是很难从低密度、高吸收性材料中洗掉未聚合的乳状液成分。对这个问题所尝试的解决方案一直是将大块研磨成颗粒，但这种方法是不能令人满意的，因为干燥和研磨过程都需要高的代价，而且通过研磨制得的颗粒的尺寸有限。对于许多应用来说，必须除掉残留的乳状液成分。然而，到目前为止，一直没有开发出进行该洗涤步骤的经济有效的方法。

与现有技术的HIPE聚合块有关的另一个问题是所述块有一层表皮，它在HIPE和聚合用的容器之间的界面处形成。(U.S.4522953，Barby等人，1985年6月11日公布，第4栏，第1-6行）。为了制造渗透性的块，从而制得一块有用的产品，必须除掉所述表皮。理想的是，希望能制造具有所需性能的但没有所述表皮的HIPE聚合材料。

发明概述

本发明包括一种物料（下文称为“微球”），其中至少约10%的物料是基本上为球形的和/或基本上为椭球形的球粒。这些微球具有多孔的、交联的聚合物结构，其特征是具有由互连孔连接的空腔。在每个微球内部的至少一些空腔与微球表面相通。

本发明还包括一种制造多孔的、交联的聚合物微球的方法以及该方法的产品。该方法的第一步是混合一个连续的油相（下文称为“油相”）和一个不连续的水相形成乳状液。乳状液的油相包含一种基本上不溶于水的、单官能单体，一种基本上不溶于水的多官能交联剂和一种适合于形成稳定的油包水乳状液的乳化剂。

该方法的第二步是将该乳状液加入水悬浮介质中，形成一种具有分散的乳状液液滴的水包油悬浮体。该方法的最后一步是聚合所述乳状液液滴生成微球。

在一个实施方案中，在HIPE的不连续的水相和含水悬浮介质中存在有聚合引发剂。可供选择的是油相中也可含有聚合引发剂。在该实施方案的一种变化方法中，油相包含作为单体的苯乙烯、作为交联剂的二乙烯基苯和作为乳化剂的脱水山梨醇单油酸酯。另外，油相含有可溶于油的聚合引发剂偶氮异双丁腈以及十二烷，所述聚合引发剂促进了互联孔的形成。不连续的水相包含溶于水的聚合引发剂过硫酸钾。水悬浮介质包含一种悬浮剂，该悬浮剂含有改性硅石和凝胶以及过硫酸钾。在另一种实施方案中，聚合引发剂只存在于油相中。

本发明还包括为用于特定领域已进行改性的微球。特别是，本发明包括为吸收液体而官能化的微球；由微球制得的含碳结构和制造这类结构的方法；和在微球空腔内有凝胶或预凝胶的微球以及制造这类微球的方法。

另外，本发明包括微球在各种应用中的用途，所述用途包括微球在分离和合成法中作为基质的用途；微球为固定分子如多肽或低核苷酸作为基质的用途；和微球在细胞培养法中的应途。

发明详述

微球

本发明包括称为“微球”的交联多孔聚合物料，其中至少约10%的微球基本上为球形的或基本上为椭球形的。本发明还包括一种制造这种物料的方法。微球一般是通过悬浮聚合称为“HIPE”的高内相乳状液而制得的。这样，本发明的微球有许多现有技术的HIPE聚合物所需要的物理性质（例如U.S.4522953，Barby等人的1988年6月11日公布的专利中所述的那些，全篇文献结合在此作为参考）。特别是，微球具有很低的密度，这归因于存在由互联孔连接的空腔。按照本发明的一批微球的堆积密度一般小于约0.2gm/ml。微球有高的空隙容积，优选至少约70%，更优选至少约90%。这样高的孔隙率使微球有极好的吸收性。另外，因为微球中的空腔的相通性允许液体流动穿过微球，所以微球提供一种用于生物技术领域如蛋白质的色谱分离和肽的合成的极好的基质。

微球的平均直径一般在约5 μm至约5 mm的范围内。优选的平均直径范围

为约50 μm至约500 μm。这种小尺寸有利于有效地洗涤微球以除去残留的未聚合的乳状液成分。本发明的方法还可被用于制造有较均匀粒度和形状的微球，这使得洗涤条件最佳以确保一批中的每个微球被彻底洗净。这样，这不象现有技术的HIPE块，微球可以较容易被洗净。本发明的这个特点有助于HIPE聚合物生产规模的经济有效的扩大。

微球的另一个特征是这种微球是“无皮的”，这使得一些内部空腔和孔与微球的表面相通。这样，这种微球相对现有技术的HIPE聚合物有这样的优点，即在聚合时可以直接得到多孔的聚合物料而无需去除皮层步骤。

这种微球的高孔隙率使它在各种生物技术应用中用作吸收物料并且还可用作固体载体，所述应用包括色谱分离、固相合成、抗体或酶的固定以及细胞培养。另外，这种微球的许多物性如空隙容积和空腔尺寸都是可控制的。从而可以专门为不同的用途制造不同类型的微球。下面给出对制造这种微球的一般方法的描述，然后讨论用制造特殊的微球的改变方案。

定义

术语“微球”是指交联的多孔聚合物料，其中该物料的至少10％由基本上为球形的和/或基本上为椭球形的球粒组成。优选该物料的至少约20％且更优选至少约50％由基本上为球形的和/或基本上为椭球形的球粒组成。

当用于HIPE的成分时，术语“基本上不溶于水的”是指任何在水相中存在的成分以这样低的浓度存在，以致于水相单体的聚合低于聚合单体的约5％（wt）。

正如这里所用的，术语“堆积密度”是指由已知体积的微球的重量除以所述体积所得到的值。

正如这里所用的，术语“空隙容积”是指不包括聚合材料的微球的容积。换句话说，微球的空隙容积包括空腔的总容积。空隙容积以微球总体积的百分数或每克微球物料的容积（cc/gm）表示。

正如这里所用的，术语“空腔尺寸”是指微球中存在的空腔的平均直径。

正如这里所用的，术语“致孔剂（porogen）”是指一种有机化合物，

当它存在于HIPE的油相中时，能促进形成连接微球中的空腔的孔。

缩写“DVB”是指“二乙烯基苯”；缩写“AIBN”是指“偶氮异双丁腈”；缩写“PVA”是指“聚乙烯醇”，它是通过聚乙酸乙烯酯的水解制得的。

微球的制造

本发明的微球是由HIPE常规制得的，所述HIPE包括一种由在油相中的不连续的水相构成的乳状液。一旦形成后，HIPE被加入一种水悬浮介质中以形成在悬浮介质中的HIPE微滴的悬浮体。然后进行聚合使HIPE微小液滴转化成固体微球。

在一个实施方案中，在HIPE的不连续相和水悬浮介质中都有聚合引发剂。可供选择的是，在油相中也可以含有聚合引发剂。另一个实施方案是，聚合引发剂只在油相中存在。

使用水相聚合引发剂的微球制造法

高内相乳状液的成分

HIPE的两个相的相对量相对于其它参数来说是微球物性的重要的决定因素。特别是，不连续的水相的百分比影响空隙容积、密度、腔尺寸和表面积。对于制造优选的微球所用的乳状液来说，不连续的水相的百分比一般在约70%-约98%的范围内，更优选在约75%-约95%，最好在约80%-约90%范围内。

乳状液的油相含有一种单体、一种交联剂和一种适合于形成稳定的油包水型乳状液的乳化剂。单体成分与现有技术的HIPE聚合物的单体没有什么不同，并且可以是任何基本上不溶于水的、单官能的单体。在一个实施方案中，单体是苯乙烯基的单体，如苯乙烯、4-甲基苯乙烯、4-乙基苯乙烯、氯甲基苯乙烯、4-叔-BOC-羟基苯乙烯。单体成分可以是单一单体或多种单体的混合物。单体成分的典型的存在浓度为油相的约5%-约90%（wt）。单体成分的浓度优选为油相的约15%-约50%，更优选约16%-约38%。

交联剂可以广泛地选自各种基本上不溶于水的多官能的单体。交联剂优选是双官能的。适合的交联剂与现有技术的交联剂没有什么不同并且包括二乙烯基芳

族化合物如二乙烯基苯（DVB）。还可以使用其它种交联剂如二或三丙烯酸化合物和异氰脲酸三烯丙酯。交联剂可以是单一交联剂或多种交联剂的混合物。交联剂一般以油相的约1 %－约9 0 % (wt) 的浓度存在。交联剂的浓度优选为油相的约1 5 %－约5 0 %。该浓度更优选为约1 6 %－约3 8 %。

除了单体和交联剂外，油相还含有乳化剂，它促进形成稳定的乳状液。乳化剂可以是任何非离子的、阳离子型的、阴离子型的或两性的乳化剂或乳化剂的混合物，只要能促进形成稳定的乳状液即可。适合的乳化剂与现有技术的乳化剂没有什么不同并且包括脱水山梨醇脂肪酸酯、聚甘油脂肪酸酯和聚氧乙烯脂肪酸和酯。在一个实施方案中，乳化剂是脱水山梨醇单油酸酯（以牌号SPAN80出售）。乳化剂一般以油相的约4 %－约5 0 % (wt) 的浓度存在。乳化剂的浓度优选为油相的约1 0 %－约2 5 %。该浓度进一步优选约1 5 %－约2 0 %。

在第一实施方案的改变方案中，油相还含有油溶的聚合引发剂和致孔剂。引发剂可以是任何能形成稳定的乳状液的油溶的引发剂，如偶氮引发剂。一种优选的引发剂是偶氮异双丁腈（AIBN）。引发剂可以以油相中所有可聚合单体（单体成分加上交联剂）的约5 % (wt) 以下的浓度存在。引发剂的浓度优选为所有可聚合单体的约0 . 5 －约1 . 5 % (wt)，进一步优选为约1 . 2 % (wt) 。

本发明的致孔剂可以是任何能形成稳定的乳状液的不聚合的有机化合物或多种化合物的混合物，条件是所述化合物对于所用的单体是好的溶剂，但对制得的聚合物是差的溶剂。适合的致孔剂包括十二烷、甲苯、环己醇、正庚烷、异辛烷和石油醚。一种优选的致孔剂是十二烷。致孔剂一般以油相的约1 0 －约6 0 % (wt) 的浓度存在。致孔剂浓度影响微球中连接空腔的孔的尺寸和数量。一般来说，增加致孔剂浓度会增大互联孔的直径和数量；而降低致孔剂浓度会减小孔的直径和数量。致孔剂的浓度优选为油相的约2 5 －约4 0 % (wt) 。该浓度进一步优选为约3 0 －约3 5 % (wt)，

在第一个实施方案中，HIPE的不连续的水相一般含有水溶的聚合引发剂。引发剂可以是任何适合的水溶性引发剂。这类引发剂是公知的并且包括过氧化物化合物如过硫酸钠、钾和铵；过乙酸钠；过碳酸钠等。一种优选的引发剂是过硫酸钾。引发剂可以以不连续水相的约5 % (wt) 以下的浓度存在。引发剂的浓度优选为不连续水相的约0 . 5 －约2 % (wt) 。

水悬浮介质的成分

在按照下面更详细地描述的方法形成HIPE后，将HIPE加入至水悬浮介质中形成水包油悬浮体。水悬浮介质包含有一种悬浮剂和在第一实施方案中有一种水溶性聚合引发剂。悬浮剂可以是任何能促进形成HIPE微滴的稳定的悬浮体的试剂或试剂的混合物。用于水包油型悬浮体的典型的液滴稳定剂包括水溶的聚合物如凝胶、天然树胶、纤维素和纤维素衍生物（如羟乙基纤维素）、聚乙烯吡咯烷酮和聚乙烯醇（PVA）。适合用作悬浮剂的PVA通过聚乙酸乙烯酯的部分（85-92%）水解制得。还可使用磨碎的水不溶性的无机固体，如粘土、硅石、矾土和氧化锆。可以混合使用两种以上不同的悬浮剂。在一个实施方案中，悬浮剂是凝胶或PVA（88%水解）和改性粘土或硅石颗粒的混合物。

改性的无机固体颗粒是通过用一种试剂处理颗粒制得的，所述试剂能增加颗颗粒的疏水性，从而提高颗粒稳定悬浮体的能力。在一个实施方案中，无机固体颗粒是通过用一种表面活性剂如沥青质处理所述颗粒而改性的，所述处理是在一种适合的有机溶剂存在下进行的。适合的有机溶剂包括甲苯、庚烷和这两者的混合物。无机固体和沥青质的相对浓度可以改变以制造具有不同疏水性的改性的无机固体。颗粒疏水性的一种量度是“接触角”，它反映出颗粒在油水界面处进水相的程度。接触角为90°表示颗粒一半在油相中且一半在水相中。接触角小于90°表示颗粒进一步进入水相，即更亲水。在本发明中，调整无机固体颗粒的疏水性使颗粒促进形成稳定的悬浮体。在该实施方案的一种优选的改变方案中，改性的无机固体颗粒的接触角为约65°。

悬浮剂可以以任何能促进形成稳定的悬浮体的浓度存在于水悬浮介质中，所述浓度典型地为水悬浮介质的约0.1-约10%（wt）。对于一种优选的悬浮剂混合物来说，使用为水悬浮介质的约0.5%-约5%浓度的PVA和约0.05-约0.3%（wt）浓度的无机固体得到稳定的悬浮体。

在本发明的第一实施方案中，除了悬浮剂外，水悬浮介质还含有一种水溶的聚合引发剂。在悬浮介质以及HIPE微滴中存在引发剂会加速聚合反应。一般来说，悬浮体有随时间的延长而被破坏的趋势，所以希望进行快速聚合。

引发剂可以是任何适合的水溶的引发剂，如上面描述的用于HIPE的不连续的水相的那些。在该实施方案的优选的改变方案中，引发剂是过硫酸钾，它以约5%（wt）以下的浓度存在于悬浮介质中。引发剂的进一步优选的浓度为水悬浮介质的约0.5%-约2%（wt）。

高内相乳状液的制备

在制造HIPE基的微球中的第一步是形成高内相乳状液。可以按现有技术的任何方法如U.S.4522953 (Barby等人，1985年6月22日公布) 中所述的方法制备HIPE，该专利结合在此作为参考。简单地说，HIPE是通过混合油和水不连续相同时剪力搅拌混合物来制得的。一般使用一种混合或搅拌装置如销式旋转混合器 (pin impeller)。

剪力搅拌的程度和时间必须足以形成稳定的乳状液。由于剪力搅拌反向影响空腔尺寸，可以增加或降低搅拌以分别得到具有较小或较大空腔的微球。在一个实施方案中，HIPE是用一种设置为1400rpm的Gifford-Wood Homogenizer-Mixer (Model 1-LV) 制得的。在该混合速度下，用约5 分钟制得HIPE。在另一实施方案中，HIPE是用一种上述混合器的气动型 (Model 1-LAV) 制得的，空气压力置为5-10psi 时间为约5 -10 分钟。HIPE可以以间歇或连续方式制备，例如用U.S.5149720 (Des Marais 等人，1992年9 月22日公布) 中公开的方式。

HIPE微滴悬浮体的制备

一旦形成，即将制得的HIPE加至水悬浮介质中。HIPE必须以适于形成HIPE微滴的悬浮体的量和速度加入悬浮介质。

加入HIPE时，充分剪力搅拌悬浮体以形成稳定的悬浮体。为了确保所制得的微球尺寸较均匀，所用的混合装置应提供遍及全部悬浮体的较均匀分布的搅拌力。由于剪刀搅拌反向影响微滴尺寸，可以增加或减小搅拌以分别得到较小或较大的HIPE微滴。人们可以用这种方法控制聚合制得的微球的尺寸。

例如，为了在有挡板或凹槽的22 升球形反应器中制备稳定的微滴悬浮体，将HIPE以约500ml/min 以下的流速滴加到悬浮介质中，直至悬浮液含有约50 %以下的HIPE。当使用约1.5 -3 英寸直径的螺旋桨式或叶片式搅拌器时可以以约50 -约500rpm的速度进行搅拌。在一个实施方案中，HIPE以20ml/min 的流速加入在所述22 升反应器中的悬浮介质中，直至悬浮液含有约10 %HIPE。以约250rpm的速度搅拌该混合物，然后聚合，产生具有约100 -约160 μm平均直径的微球。

HIPE微滴的聚合

一旦得到HIPE微滴的稳定的悬浮体，使水悬浮介质的温度升到环境温度以上，并开始聚合。聚合条件按照HIPE的组成改变。例如，单体或单体混合物和聚合引发剂是聚合温度的特别重要的决定因素。另外，必须选择聚合条件使得稳定的悬浮体可以保持聚合所需的时间长度。对于给定的HIPE适合的聚合温度的确定是本领域技术人员公知的。一般来说，HIPE悬浮液的温度不应超过85℃，因为高温会引起悬浮液的破坏。当AIBN是油溶的引发剂和过硫酸钾是水溶的引发剂时，苯乙烯单体是通过保持悬浮体在60℃过夜（约18小时）来聚合的。

微球的洗涤

聚合步骤使HIPE微滴转化成固体微球。如上所述，一般需洗涤该微球以除去任何残留的未聚合的HIPE成分或悬浮介质。可以用任何可以使残留的成分溶液化而不影响微球的稳定性的液体洗涤微球。可能需要洗涤两次以上。优选方案是，用水洗涤微球5次，然后用Soxhlet萃取器进行约1天的丙酮萃取。然后用任何常规方式干燥微球。优选的是，微球用空气干燥两天或在50℃真空下干燥过夜。所得到的微球一般有小于约0.10gm/ml的堆积密度。

使用油相引发剂的微球制造法

微球成分

在第二实施方案中，可用这样一种方法制造聚合微球，其中聚合引发剂存在于油相中而不是水相中。适于该实施方案的引发剂包括油溶的引发剂如AIBN、过氧化苯甲酰、过氧化月桂酰、VAZO型引发剂（如1，1′-偶氮双（环己腈），由Aldrich，Milwaukee WI作为VAZO催化剂88出售）等。

在该实施方案中，将足够的引发剂加入油相以引发自由基反应。本领域技术人员可以容易地确定为制造给定的微球所用的引发剂的适当浓度。一般来说，引发剂以油相中的全部可聚合单体（单体成分加上交联剂）的约5%（wt）以下的浓度存在。引发剂的浓度优选为全部可聚合单体的约0.5-约3.0%（wt），进一步优选为约2.2%（wt）。

另外，第二实施方案需要使用一种能够在HIPE的不连续水相和水悬浮介质之间形成界面的稳定剂，这两种水介质在微滴悬浮体中邻接所述界面。这种现象与肥皂泡的情况相似，其中洗涤剂分子形成的界面使气泡内部的空气与外部空气分开。稳定剂减小了HIPE微滴中水的损失并有助于防止微滴合并。

一般来说，稳定剂应当是成膜化合物，该化合物可溶于有机溶剂并有足够的亲水性以稳定HIPE的不连续水相与水悬浮介质之间的界面。发现许多天然和合成聚合物具有这些特性，它们可以用作该实施方案中的稳定剂，所述聚合物包括纤维素衍生物如甲基纤维素和乙基纤维素以及PVA（少于约70%水解）。本领域技术人员可以根据这里的提示凭经验确定其它适合的稳定剂。优选的稳定剂包括乙基纤维素。

稳定剂的浓度必须足以减少HIPE微滴的水损失并减少微滴的合并。最佳的浓度随HIPE组成而变且可凭经验确定。适合的稳定剂浓度一般为油相的约0.01%-15%（wt）。可以使用更高的稳定剂浓度；然而浓度高于15%时，很难将稳定剂洗出聚合微球。稳定剂浓度优选为油相的约0.1%-约1%，进一步优选约0.2%-约0.6%。

如果稳定剂不溶于油相，一般将该稳定剂溶于惰性溶剂，并将得到的溶液加入HIPE的油相中。除了使稳定剂溶液化外，惰性溶剂还用作致孔剂。惰性溶剂可以是任何能够使稳定剂溶液化和可溶混于HIPE的油相中的溶剂。可用于第二实施方案中的惰性溶剂的实例包括三氯乙烷、甲苯、氯仿和其它卤化溶剂等。

向稳定剂中加入足够的惰性溶剂以增加稳定剂的溶解度，使稳定剂与油相混合。惰性溶剂的浓度随所用的稳定剂和油相而变，本领域技术人员能确定适于促进具体的稳定剂与给定的油相的混合的惰性溶剂的种类和浓度。惰性溶剂浓度的典型范围是油相的约3%-约60%（wt），进一步优选约10%-40%。

单体、交联剂和乳化剂的适合的浓度基本上如上所述，但是为了适合所包含的油相中的油溶的聚合引发剂、稳定剂和惰性溶剂的需要，可以减小这些成分的浓度。这样，在第二实施方案中这些成分的典型的浓度范围如下：

成分	浓度（占HIPE的重量%）
单体	4-90
交联剂	1-89
乳化剂	3-50

各种成分的优选浓度与上述第一实施方案所用的相同。另外，油相中可按上述第一实施方案供选择地包含致孔剂。如果致孔剂被包含在内，可以减小单体、交联剂和/ 或乳化剂的浓度。

第二实施方案的不连续水相和水悬浮介质与第一实施方案的不同之处是第二实施方案的不连续水相和水悬浮介质不含有聚合引发剂。在第二实施方案的改变方案中，不连续的水相基本上由水组成。本实施方案的水悬浮介质含有一种悬浮剂，它可以是任何能促进形成HIPE微滴的稳定的悬浮体的试剂或试剂的混合物。上面描述了适合的悬浮剂的实例。例如优选天然树胶，如阿拉伯胶（可由Aldrich Chemical Co.，Milwaukee，WI 购得）。悬浮剂可以以任何能促进形成稳定的悬浮体的浓度存在，所述浓度典型地是水悬浮介质的约1 %－约30 % (wt)。悬浮剂浓度优选为约2 %－约15 %。

微球的制造

为了按第二实施方案制造微球，通过使油溶的聚合引发剂、稳定剂和惰性溶剂与单体、交联剂和乳化剂混合制得油相。如上述通过混合油相和不连续水相同时充分地剪力搅拌混合物形成稳定的乳状液而制得HIPE。将所制得的HIPE 加入水悬浮介质中，其添加量和速度适合于形成HIPE 微滴的悬浮体。加入HIPE 时，如上述剪力搅拌悬浮体。

获得稳定的悬浮体后，通过升高温度启动聚合。正如上面所解释的，聚合条件根据HIPE 的组成变化，而且本领域技术人员能够确定给定的HIPE 的适合的条件。当例如过氧化月桂酰为引发剂时，聚合适宜在50 ℃进行20 小时。

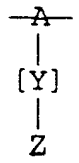
微球的改性

微球可用于许多应用领域，特别是用作吸收材料和生物技术领域中的固体载体。例如可以使用基于微球的吸收剂以输送溶剂、吸收体液和作为粘合剂微小载体。生物技术应用包括色谱分离、固相合成、抗体或酶的固定和微生物的及哺乳动物的细胞培养。可用各种方法改进基础微球以制造专门适合特定用途的微球。

用于吸收酸的微球的官能化

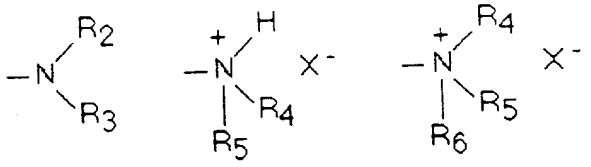
可将许多种离子和极性官能基团加到微球上以制造可吸收大量酸性液体的聚合微球。这类微球一般有比吸收中性油油酸甲酯更大地吸收含水的和/ 或有机酸的能力。特别是，含水的和/ 或有机酸与油酸甲酯的吸收比一般大于约1 . 2 。优选的制造这种微球的原料是一种交联度为约1 % - 约5 0 %，且在其溶剂溶胀状态下空隙容积大于约7 0 % 的微球。

官能化的微球包含下面的结构单元:



其中A 是交联的碳链，Y 是一个供选择的间隔基，且Z 是一个离子或极性官能团。Z 选自氨基或被取代的氨基和有8 个或更多碳原子的烷基阳离子铵基（下文称为“高级烷基”）或者在有8 个或更多碳原子的有机平衡离子存在下的8 个或更少碳原子的烷基阳离子季铵基。官能化的微球可包含单一一种这类结构单元或者不同种的结合。

在一个优选实施方案中，Z 选自具有结构1 -3 的离子或极性官能团:



(1)　　(2)　　(3)

其中R_2、R_3、R_4、R_5 和R_6 可以相同或不同，且选自烷基、环烷基、芳基和羟烷基。可供选择的是，R_2 和R_3 可构成一个环系的一部分。当Z 是一个阳离子的季铵基（3 ）时，R_4、R_5、R_6 优选使$R_4+R_5+R_6$ 的碳原子数为1 0 或更多。当Z 是一个胺盐基（2 ）时，R_4 和R_5 优选使R_4+R_5 的碳原子数为8 。

阳离子季铵基（3 ）或胺盐基（2 ）的平衡离子X^-是有机或无机离子。高级烷基阳离子基的平衡离子是无机物如氯离子、硫酸根或硝酸根。可供选择的是，所述平衡离子是长链或短链有机物如乙酸根或油酸根。

在另一个实施方案中，R_4、R_5 和R_6 是低级烷基，使$R_4+R_5+R_6$ 的碳原子数对于阳离子季铵基（3 ）为小于1 0 ，而且R_4+R_5 的碳原子数对于胺盐（2 ）为小于8 。在该实施方案中，平衡离子X^-优选为有8 个或更多碳原子的有机基团如油酸根。对于阳离子季铵基（3 ），X^-还可为OH^-。

只要交联度不超过约15 -20 %，离子或极性官能团的数目会增加官能化的微球所吸收的溶剂量。如果交联超过该水平，所吸收的液体量变得对取代度很不敏感，因为持液量取决于溶剂化的聚合物链的迁移率。通过改变单体和交联剂的相对浓度控制交联度。 交联度优选为约2 % -约10 %。 官能度一般大于约30 %，优选大于约50 %，最好大于约70 %。

官能化微球用与制造官能化HIPE聚合物所用的相同方法制造。适合的方法是公知的，例如在U．S．4611014 (Jomes 等人，1986 年9月9 日公布) 中公开了这类方法，这篇专利文献全文结合在此作为参考。简单地说，官能化的微球一般是通过带有活性基团如溴基或氯甲基的预制微球的化学改性间接制得。

适合于后续的化学改性的微球可以通过单体如氯甲基苯乙烯或4 -叔-BOC -羟基苯乙烯的聚合制得。其它适合的单体为苯乙烯、α-甲基苯乙烯或其它的取代的苯乙烯或乙烯基芳族单体，所述单体在聚合可以氯甲基化制成活性的微球中间体，该中间体可以随后转化成官能化的微球。

可将不带活性基团的单体 (包括交联剂) 以高达约20 %或更多的量混入微球。然而，为制造HIPE基的微球，这类单体必须能形成稳定的HIPE。活性单体的浓度一般应足够高以确保化学改性后产生的官能化的微球在最少约30 %的残留单体上带有离子或极性官能团。

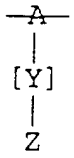
用各种常规方法进行活性微球中间体的化学改性。在实施例2 -4 中分别详细描述了制造胺、胺盐和阳离子季铵官能化的微球的优选实例方法。

在另一实施方案中，带有离子或极性基团的微球可以直接通过一种合适的基本上不溶于水的单体的乳化和聚合制得。

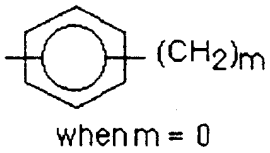
用于吸收水溶液的微球的官能化

通过选择不同的极性或离子官能团，可将微球官能化制得一种吸收大量水溶液的微球，而且所述微球还可用作离子交换树脂。这些微球吸收10 %氯化钠溶液的能力为10 %氯化钠与水吸收比一般大于约0．1，优选大于约0．5，最好大于约0．7。

用于水吸收的官能化的微球包含下的结构单元:

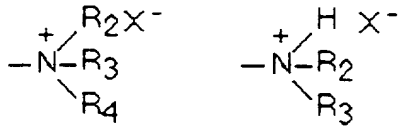


其中A 是交联的碳链，Y 是供选择的间隔基，和Z 是一个离子或极性官能基团。Z 选自有1 0 个或更少碳原子的烷基阳离子铵基，有8 个或更少碳原子的烷基胺盐，烷氧基化物，硫酸、羧酸、磷酸或磺酸基团的金属、铵或被取代的铵盐，条件是在Z 为磺酸时，Y 不具有下结构:



所述官能化的微球可以包含单一一种这类结构单元或不同种的结合。

在一个优选实施方案中，Z 选自具有结构1 －2 的离子或极性官能团:

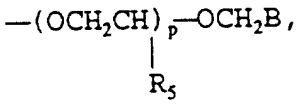


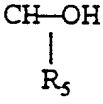
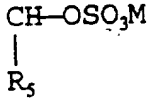
(1) (2)

其中，R_2 、R_3 和R_4 可以相同或不同，并选自烷基、环烷基、芳基和羟基烷基。可供选择的是，R_2 、R_3 形成一个环系的一部分。当Z 为阳离子季铵基（1 ）时，优选R_2 、R_3 、R_4 使$R_2 + R_3 + R_4$ 中的碳原子数小于1 0 当Z 为胺盐基（2 ）时，优选R_2 、R_3 使$R_2 + R_3$ 中的碳原子数小于8 。

阳离子季铵基（1 ）或胺盐基（2 ）的平衡离子X^- 为一种无机物如氯化物、硫酸根或硝酸根。供选择的是，平衡离子可以是有少于8 个碳原子的羧化物如乙酸根或乳酸根。对于阳离子季胺基（1 ），X^- 还可为OH^- 。

在一个实施方案中，Z 是这样一种烷氧基化的链:



其中P 为1 －6 8 0 ，且B =  或COOM或 

和R_5为氢或烷基，M为金属、铵或被取代的铵阳离子。特别优选的是R_5 = 氢，B = CH_2OH，且P < 20。

U．S．4612334 (Jones 等人，1986 年9 月16 日) 公开向HIPE 聚合物中添加上述官能团的方法，所述文献全文结合在此作为参考。用于水吸收的官能化的微球是通过与制造相应的官能化的HIPE 聚合物所用的相同的方法制造的。适用的方法与上述制造具有相同的碱型（如胺盐）官能团的用于酸吸收的官能化微球的方法相同。

特别是，用于制造可被官能化以吸收水溶液的活性微球中间体的适合的单体包括氯甲基苯乙烯、甲基丙烯酸正丁酯、丙烯酸特丁酯、丙烯酸2 －乙基己酯、或其它适当的丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯。另外可使单体如苯乙烯、α－甲基苯乙烯或其他取代的苯乙烯或乙烯基芳族单体聚合，然后氯甲基化、磺化、硝化、或其它活化以制造活性微球中间体，随后将所述中间体转化成官能化微球。实施例5 －8 分别详细地描述了制造胺盐、阳离子季铵、烷氧基化物和磺酸盐官能化的微球的优选的实例方法。

由微球制造稳定的碳结构

微球可被转化成多孔含碳材料，该材料保持微球空腔和互联孔的原有结构。该材料例如用作吸附或过滤介质和用作各种生物技术应用中的固体载体（下一部分将进一步描述）。另外，这种含碳微球可被用作电池和大容量电容器中的电极材料。电池电极材料优选有大的点阵间距如微球的点阵间距。大的点阵间距减小或避免了电池操作过程中点阵膨胀和收缩，延长电池的周期寿命。大容量电容器需要高导电性的电极。微球用于该应用是非常理想的，因为微球的互联性使它有高的导电性。

为了制造含碳微球，如U．S．4775655 (Edwards 等人，1988 年10 月4 日公布) 所述，在一种惰性气氛中加热稳定的微球，所述文献全文结合在此作为参考。微球的经受该热处理的能力随所用的单体改变。某些单体如苯乙烯基单体产出的微球必须被稳定化以抵抗加热过程的解聚。

稳定这类微球所需的改性可以采用许多方式进行。可以选择微球成分和操作条件以达到高交联度或包含能在所用的加热条件下减少或防止解聚的化学个体。适合的稳定化学个体包括卤素；磺酸酯；和氯甲基、甲氧基、硝基和氰基基团。为获得最大的热稳定性，交联度优选大于约20 %，且任何其它化学改性的程度为至少约50 %。稳定体可在微球制成后或通过选择适当改性的单体而被引入微

球中。

将稳定化后的微球在惰性气氛立即中加热到至少约5 0 0 ℃的温度。为了减少最终含碳结构中的稳定剂含量，一般应使温度升到至少约1 2 0 0 ℃。实施例9 详细地描述了由微球制造稳定的碳结构的优选的实例方法。

用作基质的微球的制造

许多色谱和化学合成技术使用一种基质。在色谱分离中，溶液的成分基于所述成分与连到基质表面的化学基团的相互作用能力来分离。在固相合成中，基质用作一种平台，生长分子如多肽固着在所述平台上。

两种方法都可以以间歇或连续方式进行。在间歇法中，将基质盛于一容器中，随后添加含有待分离的成分或反应物的溶液，然后通过过滤和洗涤除掉溶液。供选择的是，在连续或半连续法中，将基质装于一柱中，随后使溶液通过该柱。

这种微球非常适合用于这类体系中，因为这种微球提供一种刚性构架，所述构架能确保液流通道敞开并允许溶液成分或反应物向微球内外扩散。如果需要用于特定场合，微球可以通过在微球表面提供直接与溶液中的成分或反应物相互作用的化学基团而被官能化。可供选择的是，微球表面的所述化学基团可以用作其它反应物料如催化剂、酶或抗体的结合团。

下面描述微球在色谱法和固相合成中的用途，并以实例讨论用于离子交换色谱和肽合成的微球的官能化。讨论这两种应用是为了说明而不以任何方式限制本发明。这些应用的改变对于本领域技术人员来说是容易的并且包括在本发明的范围之内。

用于色谱法中微球的官能化

在包括离子交换、凝胶过滤和亲合色谱法的色谱技术中，微球可用作一种基质。

在离子交换色谱法中，混合物的组分基于净电荷的不同而被分离。分离阳离子的基质，即所谓的“阳离子交换树脂”以存在带负荷的基团为特征。相反，分离阴离子的基质即所谓的“阴离子交换树脂”以存在带正电荷的基团为特征。与例如阴离子交换树脂结合的成分一般是通过增加柱缓冲剂的P H 值或添加能与该

例如阴离子交换树脂结合的成分一般是通过增加柱缓冲剂的PH值或添加能与该柱结合而与该成分竞争的阴离子而从树脂中释放出来的。这样一种成分是在有较高净负电荷的组分之前且在有较低净负电荷的组分之后流出该柱的。

通过在微球表面上提供酸性基团可由微球制造阳离子交换树脂。适合的基团包括强酸性磺酸根基团以及弱酸性羧酸根、羧甲基、磷酸根、磺甲基、磺乙基和磺丙基。通过用碱性基团将微球官能化可以由微球制造阴离子交换树脂，所述碱性基团包括强碱性季铵及弱碱性基团如氨乙基、二乙基氨基乙基、胍基乙基和表氯醇三乙醇胺基团。

可以按照上述用于吸收酸性和水溶液的微球的官能化的方法或通过任何其它常规方法将酸性或碱性基团加到预制的微球上。可供选择的是，带有这类基团的微球可以直接通过适当的单体的聚合制得。

无论制备方法如何，为色谱法官能化的微球一般有至少约70%的空隙容积和高达约50um的空腔尺寸。微球优选有约70%－约80%的空隙容积。所述特征的组合确保迅速吸入液体，使液体较自由地流动穿过微球。

微球基质的容量可以通过按U．S．4965289 (Sherrington，1990年10月23日公布) 中所述的方法将凝胶加入微球而增加。正如下一段进一步讨论的，凝胶在微球空腔内形成或被加入微球空腔内并连到微球表面。凝胶带有酸性或碱性基团，这取决于微球基质是用作阴离子交换树脂还是阳离子交换树脂。

用于固相合成的微球的官能化

通过提供连于微球表面上的化学官能团使微球官能化用于固相合成。选择与合成中所用到的反应物之一相互作用的化学基团。根据所选的化学基团，微球基质可以专门用于如肽、低核苷酸和低聚糖等多种物质的化学合成。用于添加适当的化学基团以使用于这类合成的微球官能化的方法与前面所述的现有技术的HIPE和其它聚合物所用的方法没有什么不同。

微球可以按照例如U．S．4965289 (Sherrington，1990年10月23日公布) 中关于HIPE聚合物所述的方法被官能化用于肽的合成，所述文献全文结合在此作为参考。简单地说，制备的微球的空隙容积为至少约70%且空腔尺寸高达约50 μm。微球优选有足够的交联度使得微球在

使用过程中不会膨胀成其无水体积的两倍以上。

连于微球表面的化学基团可以是任何与合成中的第一反应物结合的基团。在例如肽的合成中，化学基团是任何与要被制造的肽的第一氨基酸结合的基团。应当选择化学基团使得化学基团结合在氨基酸上的某一位置处而不是氨基上。一般来说，化学基团包括与第一氨基酸的羧基反应的氨基。

可将化学基团加到预制的微球上或者供选择地可以直接通过适当的基本上不溶于水的单体的乳化和聚合制得带所述化学基团的微球。如果需要，可将化学基团进一步改性以提供与肽的第一氨基酸反应的间隔基。

肽的合成通过使第一氨基酸结合到微球表面上的适合的化学基团上来引发。氨基酸反应物的氨基一般是被保护的，从而通过氨基酸的脱保护和偶联的交替循环发生链伸长。通过使肽脱离所述基质而使所述过程终止，然后一般将肽提纯。

微球基质的容量可以通过按U．S．4965289 (Sherrington按1990年10月23日公布) 中所述的方法将凝胶加入微球来增加。简单地说，按上述方法制得一种适合的微球，并使凝胶或初凝胶沉积并保留在微球空腔内。所述凝胶一般是高度溶剂溶胀的、交联的凝胶，而且可以例如是一种软的可变形的聚酰胺凝胶。对于合成应用，这种凝胶一般适合于与合成中的一种反应物反应。溶胀的凝胶与多孔材料的比率可以在约60：40－约95：5 (重量:重量) 的范围内，而且更优选为约75：25－约95：5。最优选的比率是约80：20。

凝胶可以通过制造填充有凝胶的HIPE聚合物的任何现有技术的方法沉积并保留在预制的微球内，所述方法为例如U．S．4965289 (Sherrington，1990年10月23日公布) 中所述的方法。在一个实施例中，凝胶由初凝物料在微球空腔内形成。凝胶最好在凝胶形成过程中保留或固着在微球空腔中。凝胶可以通过凝胶和微球表面之间的缠结和/或互相穿透来保留。另外，凝胶可以通过据信涉及凝胶和微球表面之间的化学结合的方法来保留。上述过程的组合也是可能的。

在一个实施方案中，微球与一种含有初凝成分和用于微球的溶胀溶剂的溶液接触。当初凝成分渗入微球并开始形成凝胶时，微球膨长，通过在微球的溶胀聚合材料和形成的凝胶之间的聚合物链的互相穿透截留部分形成的凝胶。适合的溶胀剂取决于微球聚合物的性质而且可以由本领域技术人员容易地确定。实施例1

0 提出了通过聚合物链的缠结制造填充有凝胶的微球的优选的实例方法的详情。

在另一个实施方案中，利用化学结合的保留可以通过使凝胶或初凝成分与微球上的固着基团反应来实现。适合的凝胶固着基团与现有技术公知的那些没有什么不同，所述基团包括有可得到的用于与凝胶或初凝成分相互作用的双键的基团。这类固着基因可以通过微球制成后的改性或通过选择适当改性的单体被引入微球。

例如，填充有凝胶的微球可以通过使氨基甲基官能化的微球与烯丙酰氯反应得到丙烯酰基化的微球来制得。在初凝成分存在下加热以引发凝胶聚合，据信丙烯酰基上的双键即与形成的凝胶相互使用，使得凝胶与微球形成共价键。当使用丙烯酰基化的微球时，适合的初凝单体包括如乙酸烯丙酰酪胺和烯丙酰肌氨酸甲酯。如上所述，固着基可以通过微球制成后的改性或通过选择适当改性的单体被引入微球。

用于固定分子的微球

微球可以被用作多种分子包括多肽和低核苷酸的基质。这种微球特别适用于固定抗体、外源凝集素、酶和半抗原。用于使这类分子附着到聚合物基质上去的方法是公知的。（参见例如Tijssen，P．Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology：Practice and Theories of Enzyme Immunoassays New York：Elsevier（1985），p298-314）。下面简单地描述这类方法中的几种。所述方法只作为实例而并不限于这些方法，因为本领域技术人员可以容易地决定如何使用或改变这些现有技术的方法以使所感兴趣的分子附着到微球上。

多肽可以通过非共价吸附或通过共价键合附着到微球上。非共价吸附一般归因于非特定的疏水性相互作用而且不依赖于多肽的净电荷。通过用含多肽的缓冲溶液处理微球使多肽附着到微球上。适合的缓冲液包括50 Mm碳酸盐，pH9．6；10mMTris-HCL，pH8．5，含100mM氯化钠；和磷酸盐缓冲盐水。多肽浓度一般在1 和10 μg／ml 之间。微球一般在4 ℃湿室中的该溶液中保温过夜。通过例如使多肽暴露于高温、低pH （如2．5）或变性剂（如尿素）中而使多肽部分变性可增加多肽的吸附量。

可利用许多不同的方法使多肽共价附着到微球上。方便的是，有自由氨基的多肽可以例如通过用戊二醛在低pH下处理微球被附着到苯乙烯基的微球上。然

后加入多肽，并用100mM碳酸盐使溶液pH增至约8.0－约9.5。pH的增大增加了使多肽结合到微球表面的戊二醛的活性。可用氯甲酸乙酯代替戊二醛或与之混合用于上述步骤中。

可供选择的是，微球可以被官能化以用于多肽的共价附着。这样微球提供与所感兴趣的多肽结合的固着基团。用于使多肽附着到聚合物上的适合的固着基团是公知的，而且包括酰肼基、烷基氨基和桑格（Sanger）试剂。固着基团可以通过微球制成后的改性或通过选择适当改性的单体被引入微球中。

另外，可用一种桥分子使多肽附着到微球*p13这种附着方法用于与微球结合差的多肽。这类多肽共轭到桥分子上，该桥分子有高的合成树脂亲合性，例如牛血清白蛋白（BSA）。为了使多肽经由BSA桥附着到微球上，将BSA加入微球，然后用一种常规交联剂如碳化二亚胺使多肽共轭到固定化的BSA上。

在另一实施方案中，微球用作低核苷酸的基质。方便的是，低核苷酸可以通过用聚阳离子性物质如甲基化的BSA、聚－L－赖氨酸或硫酸鱼精蛋白处理微球而被吸附到微球上。当使用后者时，一般用1％硫酸鱼精蛋白水溶液处理微球约90分钟，然后用蒸馏水洗涤几次。然后使微球干燥。通过将低核苷酸以在缓冲剂中的约10μg/m的浓度加入微球而将低核苷酸吸附到处理后的微球上，该缓冲液例如是含10mM乙二胺四乙酸（EDTA）和10mM乙二醇－二（β－氨基乙醚）N，N，N′，N′－四乙酸（EGTA）的pH7.5的50mM Tris－HCl。一般来说60分钟的处理时间能达到适当的结果。

微球用于高密度细胞培养

除了上述应用外，微球还可用于细胞培养。高密度细胞培养一般要求通过连续灌注生长介质的方式向细胞供料。悬浮体培养物能满足这一要求，然而，剪力影响限制了高细胞浓度情况下的换气。微球保护细胞不受这些剪力影响而且可以在常规的带搅拌的或气升式生物反应器中使用。

为了制备用于培养真核细胞或原核细胞的微球，一般用任何一种公知的灭菌方法将微球灭菌。适合的方法包括照射、环氧乙烷处理和优选的高压灭菌。然后将灭菌的微球和适合于待培养的细胞的生长介质一起置于培养器中。适合的生长介质是公知的而且与现有技术的悬浮体培养物的生长介质没有什么不同。添加细胞的培养液并使该培养物保持在适合于细胞附着到微球上的条件下。然后一般增加培养物量，并将培养物以与现有技术的悬浮体培养物相同的方式保养。

微球可以不用改性就用于细胞培养中，然而还可将微球改性以改进细胞附着、生长和特定蛋白质的制造。例如，可以使用各种桥分子以使细胞附着到微球上。适合的桥分子包括抗体、外源凝集素、戊二醛和聚－L －赖氨酸。另外，如上所述的微球磺化能增加细胞附着率。实施例1 1 阐述了磺化的微球在一种示例性哺乳动物细胞培养中的应用。

通过下述特定的但非限制性的实施例进一步阐明本发明。那些被建设性地简化成操作规程的步骤以现在时描述，已在实验室中进行的步骤以过去时陈述。

实施例1

A．使用水和油相引发剂的微球制造

按照下述方案制备典型的优选微球。HIPE和水悬浮介质的各成分最终浓度示于表1，研究项目4 。表1 还表明这样的研究项目，其中下述方案按所指示的方法改变。这些研究的结果示于表2 中。

1 、通过混合11.37gm苯乙烯基单体、11.25gm DVB，8.00gm span80、0.27gm AIBN，和15.00gm十二烷，并在室温下搅拌制备油相。

2 、通过添加0.78gm过硫酸钾到94.3ml 蒸馏水中制得不连续水相。

3 、以接近1400rpm搅拌油相，然后以20ml/min 的流速将不连续水相加入油相中。以1400rpm搅拌混合相约5 －10 分钟，以形成稳定的HIPE。

4 、通过混合2gm过硫酸钾和3gm高岭土 (Georgia Kaolin Co.，Inc.) 以及1 升蒸馏水制得水悬浮介质。以700rpm搅拌该混合物约15 分钟，然后调节搅拌速度到250rpm。

5 、以15ml/min 的流速将HIPE滴加到在22 升Lurex 反应器 (Model no.LX6214－1008) 中的水悬浮介质中，直到悬浮液达到约20 %的HIPE。

6、为制造微球，通过升高温度至60℃过夜（约18小时），同时以250rpm搅拌使悬浮液聚合。

7、用水洗涤所得的微球5次，然后在一个索格利特（Soxhlet）萃取器中进行丙酮萃取约1天。使微球空气干燥过夜。所得物料的堆积密度为每ml干微球0.055gm。

B．使用油相引发剂的微球制造

按照下述供选择的方案制备典型的优选的微球。HIPE和水悬浮介质的各成分的最终浓度示于表3 研究项目7。表3还表明这样的研究项目，其中下述方案按所指示的方法改变。这些研究的结果示于表4中。

1、在一个1升烧杯中，通过将0.4gm乙基纤维素溶于30gm三氯乙烷中并添加20gm苯乙烯基单体、19.5gm DVB、22gm Span80和0.9g过氧化月桂酰制得油相。

2、将该烧杯置于Gifford-Wood均化器-混合器（可由Greerco，Hudson，NH购得的Model 1-LV）中并以1800-4800rpm搅拌，同时缓慢添加850gm去离子水以形成HIPE。

3、在一个2升玻璃筒状反应器（由Ace Glass，Vineland，NJ购得）中，通过使120gm阿拉伯胶与800gm去离子水混合制得水悬浮介质。在以100rpm搅拌下，加热混合物至60-70℃持续15分钟，然后冷却该混合物至约40℃。

4、以约200ml/min的流速将HIPE滴加到水悬浮介质中。

5、按照所需的球粒度在10rp至300rpm之间调节混合速度。

6、为制造微球，通过在恒定搅拌下升高温度至45℃持续约20小时来使悬浮液聚合。

7、用水洗涤所得到的微球5次，然后在索格利特萃取器中进行丙酮萃取，然后进行甲醇萃取，所述萃取进行约18小时。将微球空气干燥过夜。

表1. 使用水和油相引发剂的微球制造

No.	单体（类型）/（在HIPE中的wt%）	交联剂（类型）/（在HIPE中的wt%）	乳化剂（类型）/（在HIPE中的wt%）	致孔剂*（类型）/（在HIPE中的wt%）	混合速度－HIPE形成 (rpm)	在HIPE中的水量** (ml) / (%)	悬浮剂***（类型）/（在HIPE中的wt%）	混合速度－悬浮液 (rpm)	聚合温度 (°C)
1	苯乙烯 / 27	DVB# / 25	Span 80 / 17	十二烷 / 33	725	435.0 / 91	PVA / 3	250	60
2	苯乙烯 / 25	DVB / 25	Span 80 / 17	十二烷 / 33	1400	435.0 / 91	PVA / 3 + 粘土 (90°) / 0.2	250	60
3	苯乙烯 / 25	DVB / 25	Span 80 / 17	十二烷 / 33	1400	435.0 / 91	凝胶 / 2	250	60
4	苯乙烯 / 25	DVB / 25	Span 80 / 17	十二烷 / 33	1400	94.3 / 70	粘土 (90°) / 0.3	250	60
5	苯乙烯 / 25	DVB / 25	Span 80 / 17	十二烷 / 33	1400	94.5 / 70	Triton X-100 / 0.5	200	60
6	苯乙烯 / 25	DVB / 24	Span 80 / 17	十二烷 / 33	1400	184.0 / 82	PVA / 0.5 粘土 (65°) / 0.3	250	60
7	苯乙烯 / 25	DVB / 24	Span 80 / 17	十二烷 / 33	1400	184.0 / 82	凝胶 / 2 粘土 (65°) / 0.3	250	60
8	苯乙烯 / 24	DVB / 24	Span 80 / 17	十二烷 / 34	1400	184.0 / 82	凝胶 / 2.5	250	65
9	苯乙烯 / 24	DVB / 24	Span 80 / 17	十二烷 / 34	1400	110.0 / 72	凝胶 / 2 + 硅石 (65°) / 0.3	250	65

No.	单体（类型）/（在HIPE中的wt%）	交联剂（类型）/（在HIPE中的wt%）	乳化剂（类型）/（在HIPE中的wt%）	致孔剂*（类型）/（在HIPE中的wt%）	混合速度－HIPE形成 (rpm)	在HIPE中的水量** (ml) / (%)	悬浮剂***（类型）/（在HIPE中的wt%）	混合速度－悬浮液 (rpm)	聚合温度 (°C)
10	苯乙烯 / 24	DVB / 24	Span 80 / 17	十二烷 / 34	2800	94.3 / 70	凝胶 / 2.5	250	65
11	苯乙烯 / 24	DVB / 24	Span 80 / 17	十二烷 / 34	1400	94.3 / 70	凝胶 / 2 + 硅石 (65°) / 0.3	300	65
12	苯乙烯 / 24	DVB / 24	Span 80 / 17	十二烷 / 34	1400	94.3 / 70	凝胶 / 2 + 硅石 (65°) / 0.3	400	65
13	苯乙烯 / 4	DVB / 24	Span 80 / 17	十二烷 / 34	1400	94.3 / 70	凝胶 / 2 + 硅石 (65°) / 0.3	450	65
14	苯乙烯 / 24	DVB / 24	Span 80 / 17	十二烷 / 34	1400	94.3 / 70	凝胶 / 1.5	250	65
15	苯乙烯 / 40	DVB / 9	Span 80 / 17	十二烷 / 34	1400	94.3 / 70	凝胶 / 1.5	250	65
16	ST-CH_2Cl## / 24	DVB / 24	Span 80 / 17	十二烷 / 34	1400	94.3 / 70	凝胶 / 2	250	65
17	苯乙烯 / 13	DVB / 35	Span 80 / 17	十二烷 / 34	1400	94.3 / 70	凝胶 / 0.8	250	65
18	苯乙烯 / 13	DVB / 35	Span 80 / 17	十二烷 / 34	1400	794.2 / 95	凝胶 / 2 + 硅石 (65°) / 0.3	200	65
19	苯乙烯 / 45	DVB / 4	Span 80 / 17	十二烷 / 34	1400	94.3 / 70	凝胶 / 2 + 硅石 (65°) / 0.3	200	65

No.	单体（类型）/（在HIPE中的wt%）	交联剂（类型）/（在HIPE中的wt%）	乳化剂（类型）/（在HIPE中的wt%）	致孔剂*（类型）/（在HIPE中的wt%）	混合速度-HIPE形成(rpm)	在HIPE中的水量**(ml) / (%)	悬浮剂***（类型）/（在HIPE中的wt%）	混合速度-悬浮液(rpm)	聚合温度(°C)
20	苯乙烯 / 13	DVB / 35	Span 80 / 17	十二烷 / 34	1400	184.0 / 82	凝胶 / 2 +硅石 (65°) / 0.3	300	65

* 油相还含有1.2wt%偶氮异双丁腈（占可聚合单体总量的wt%）

** 不连续水相含0.8gm过硫酸钾，最终浓度在0.1和0.8wt%之间

*** 悬浮介质还含有0.07wt%过硫酸钾。

\# 纯度 = 55%

\#\# ST-CH_2Cl = 氯甲基化的苯乙烯

表2. 由表1的研究项目得到的微球性能

No.	微球粒度 *	微球密度	空腔尺寸
1	100 μm - 300 μm	< 0.04 gm/ml	> 10 μm
2	100 μm - 300 μm	< 0.04 gm/ml	5 - 10 μm
3	100 μm - 300 μm	< 0.04 gm/ml	5 - 10 μm
4	200 μm - 3 mm	0.06 - 0.07 gm/ml	5 - 10 μm
5	200 μm - 3 mm	0.06 - 0.07 gm/ml	5 - 10 μm
6	200 μm - 3 mm	0.04 - 0.05 gm/ml	5 - 10 μm

No.	微球粒度 *	微球密度	空腔尺寸
7	100 μm - 300 μm	0.04 - 0.05 gm/ml	5 - 10 μm
8	100 μm - 300 μm	0.04 - 0.05 gm/ml	5 - 10 μm
9	100 μm - 300 μm	0.06 - 0.07 gm/ml	5 - 10 μm
10	100 μm - 300 μm	0.06 - 0.07 gm/ml	< 2 μm
11	50 μm - 180 μm	0.06 - 0.07 gm/ml	5 - 10 μm
12	20 μm - 100 μm	0.06 - 0.07 gm/ml	5 - 10 μm
13	20 μm - 100 μm	0.06 - 0.07 gm/ml	5 - 10 μm
14	200 μm - 3 mm	0.06 - 0.07 gm/ml	5 - 10 μm
15	200 μm - 3 mm	0.06 - 0.07 gm/ml	5 - 10 μm
16	100 μm - 300 μm	0.06 - 0.07 gm/ml	5 - 10 μm
17	200 μm - 3 mm	0.06 - 0.07 gm/ml	5 - 10 μm
18	100 μm - 300 μm	Not determined	5 - 10 μm
19	100 μm - 300 μm	0.06 - 0.07 gm/ml	5 - 10 μm
20	50 μm - 180 μm	0.04 - 0.05 gm/ml	5 - 10 μm

* 各实验微球的产率为75 - 85 %。

表3. 使用油相引发剂的微球制造

No.	单体（类型）/（在HIPE中的wt%）	交联剂（类型）/（在HIPE中的wt%）	乳化剂和稳定剂（类型）/（在HIPE中的wt%）	惰性溶剂（类型）/（在HIPE中的wt%）	混合速度－HIPE形成 (rpm)	在HIPE中的水量（%）	悬浮剂（类型）/（在HIPE中的wt%）	混合速度－悬浮液 (rpm)	聚合温度 (°C)	HIPE相/悬浮介质比（g/g）
1	苯乙烯 / 34.23	DVB / 31.39	Span 80/25.65 乙基纤维素 /0.69	TCE / 8.04	2800	87.60	阿拉伯胶 / 7.4	120	50	536.3 / 1080
2	苯乙烯 / 19.39	DVB / 19.09	Span 80/13.16 乙基纤维素 /0.30	TCE / 48.06	3100	79.90	阿拉伯胶 / 5.66	120	50	312.88 / 530
3	苯乙烯 / 19.18	DVB / 17.56	Span 80/15.67 乙基纤维素 /0.38	TCE / 47.56	3200	78.50	阿拉伯胶 / 3.84	100	53	299.35 / 520
4	苯乙烯 / 26.00	DVB / 23.38	Span 80/17.28 乙基纤维素 /0.45	TCE / 32.47	2800	86.58	阿拉伯胶 / 9.90	150	50	693 / 1110
5	苯乙烯 / 20.59 VBC / 5.41	DVB / 23.82	Span 80/17.28 乙基纤维素 /0.45	TCE / 32.46	3100	86.58	阿拉伯胶 / 9.90	150	47	692.98 / 1110
6	苯乙烯 / 25.65	DVB / 23.55	Span 80/18.24 乙基纤维素 /0.40	TCE / 32.16	4800	89.93	阿拉伯胶 / 10.71	120	45	933.98 / 1120
7	苯乙烯 / 21.79	DVB / 21.17	Span 80/23.95 乙基纤维素 /0.41	TCE / 32.68	4800	90.14	阿拉伯胶 / 13.04	200	45	942.93 / 920

1. 油相含约2wt%过氧化月桂酰（占可聚合单体总量的wt%）
2. 不连续水相是水
3. VBC = 乙烯基苄基氯
4. TCE = 1，1，1－三氯乙烷

表4. 由表3的研究项目得到的微球的性能

No.	近似堆积密度 (g/ml)	微球粒度范围* (μm)
1	0.15	100-200
2	0.12	80-200
3	0.14	150-400
4	0.13	50-150
5	0.15	50-150
6	0.09	100-300
7	0.10	30-150

* 各实验的微球产率约85－95％。

实施例2

利用氨基吸收酸的微球的官能化

由按实施例1 所述制得的氯甲基苯乙烯微球制造二乙胺官能化的微球。使微球空气干燥过夜并用200ml 己烷索格利特萃取15 小时以除去残留的未聚合成分。然后用150ml 含水二乙胺回流加热5 g m微球20 小时。所得到的二乙胺官能化的微球是85 ％被取代的，并有1．5 mM/ g m的容量。1 g m该材料吸收20 ml 1 N硫酸。

实施例3

利用胺盐吸收酸的微球的官能化

为制备二己铵盐，按实施例3 关于二乙胺官能化的微球所述的方法制造二己胺官能化的微球。然后将1 g m二己胺官能化的微球加入100 ml 甲醇HCL中并搅拌30 分钟。所得到的盐的平衡离子为氯。过滤收集氯化二己铵官能化的微球，用50 ml 甲醇洗涤3 次并空气干燥过夜。所得的微球是70 ％被取代的。

实施例4

利用季铵基团吸收酸的微球的官能化

为制造二甲基癸铵盐，按实施例1 所述制备氯甲基苯乙烯微球。使该微球空气干燥过夜并用己烷索格利特萃取以除掉残留的未聚合的成分。然后在真空下用10倍摩尔数过量的乙醇胺填充1 g m微球并回流7 小时。所得的盐的平衡离子是氯。过滤收集氯化二甲基癸铵官能化的微球，用50 ml 乙醇洗涤两次并用50 ml 甲醇洗涤两次，然后空气干燥过夜。所得的微球70 %被取代的。

实施例5

利用胺盐吸收水溶液的微球的官能化

为制造二甲铵盐，按实施例3 所述制备二乙胺官能化的微球。使微球空气干燥过夜并用己烷索格利特萃取以除去残留的未聚合的成分。然后将1 g m微球加入100 ml 甲醇HCL 中并搅拌30 分。所得到的盐的平衡离子是氯。氯化二乙胺官能化的微球是85 %被取代的。

实施例6

利用季铵基吸收水溶液的微球的官能化

为制造二甲基癸铵盐，按实施例1 所述制备氯甲基苯乙烯微球。使微球空气干燥过夜并用己烷索格利特萃取除去残留的未聚合的成分。然后用100 ml 含水胺处理1 g m微球30 分钟。所得到的氯化二甲基癸铵官能化的微球是85 %被取代的。

实施例7

利用烷氧基化的基团吸收水溶液的微球的官能化

由按照实施例1 所述的方法制备的氯甲基苯乙烯微球制备乙氧基化的微球。使该微球空气干燥过夜并用己烷索格利特萃取以除去残留的未聚合的成分。然后用1.000 ml 阴离子型聚乙二醇（PEG）处理1 g m微球，所述聚乙二醇含有在过量作为溶剂的PES 中的8 -9 乙二醇单体。在95 ℃加热反应物2 小时。

所得到的乙氧基化的微球是90％被取代的。

实施例8

利用磺酸基团吸收水溶液的微球的官能化

由按照实施例1 所述制备的苯乙烯微球制造磺化微球。使微球在50℃真空干燥2 天。然后将10gm微球加入装有200ml 氯仿和50ml 氯磺酸的混合物的500ml 烧瓶中。在室温下摇动烧瓶两天。过滤收集磺化微球并随后用氯仿、二氯甲烷、丙酮和甲醇各250ml 洗涤。将微球浸入300ml 10％氢氧化钠水溶液中过夜。然后用水洗涤直至洗脱液达到中性pH。所得到的物料的堆积密度为0.067gm/ml 干微球，且容量为2.5mM/gm。1g该物料吸收23.5gm水。

实施例9

由氯甲基苯乙烯微球制造稳定的碳结构

按实施例1 所述制备3 －氯甲基苯乙烯微球，使交联度为20－40％且空隙容积为90％。然后将1gm微球置于电加热的管式炉中，然后在不含氧的氮气气氛中温度升至600℃。加热速度一般保持在每分钟5 ℃以下，而且在180℃－380℃范围内的加热速度不超过每分钟2 ℃。加热处理后，使微球在惰性气氛中冷却至环境温度以防被空气氧化。

实施例10

用作蛋白质合成的基质的填充有凝胶的微球的制造

按实施例1 所述制得的微球具有90％的空隙容积、0.027m/ml 的堆积密度、1－50 μm范围的平均空腔直径而且交联度为10％。所用的凝胶为聚（N－（2－（4－乙羧基苯基）乙基）－丙烯酰胺。为制造凝胶前体溶液，将2.5gm单体、0.075gm交联剂亚乙基双（丙烯酰胺）和0.1gm引发剂AIBN加入10ml 溶胀剂二氯乙烷中。然后通过用氮气吹洗使凝胶前体溶液脱氧。

将0.7gm微球加入凝胶前体溶液中并通过在60℃加热混合物引发聚合，

同时在改进成回流加热的旋转式汽化器上转动该样品。二氯乙烷使微球膨胀，使凝胶前体渗入微球并形成聚酰胺，它与微球的聚合物链互相穿透。1 小时后，用5 0 m l 二甲基甲酰胺（D M F ）和5 0 m l 二乙醚洗涤填充有凝胶的微球（下文称“复合体”），然后真空干燥。复合体的产率为2 . 7 g m。

为了在复合体内产生化学基团，用5 0 m l 在D M F 中的5 %水合肼溶液处理0 . 2 5 g m复合体5 分钟。该处理在凝胶基质内提供游离的酚官能度，它用作肽合成的化学基因。

实施例1 1

微球用于高密度细胞培养中

为制造适合于哺乳动物细胞培养的微球，按实施例8 所述制备磺化的微球，然后在7 0 %的乙醇溶液中润湿并在1 2 1 ℃高压灭菌1 5 分钟。然后用无菌的磷酸盐缓冲的盐水洗涤微球两次并用全部生长介质洗涤一次。将5 0 0 m l 无菌微球置于一个5 0 0 m l 滚筒罐中，该罐已经硅化处理，以防止细胞附着到罐上。

将在5 0 m l 生长介质（含1 0 %胎牛血清）中的5 ×1 0 ^{7} 个小田鼠肾细胞的培养液加入该滚筒罐中。在微球存在下使培养液在3 7 ℃保温8 小时，并定期搅拌以使细胞附着到微球上。然后培养物量增至1 0 0 m l ，并将空气-CO_2（9 5 ： 5 ）混合物供给滚筒罐，且将该罐置于一滚动设备中。在葡萄糖浓度降至1 g m / 升以下时更换生长介质。

按照条约第 19 条修改时的声明的中文译文

对本申请的权利要求书进行了修改，其中将权利要求 83 增补完全，并增加了权利要求 84 。这些权利要求在原始申请的第 67 - 68 页上都有记述。所附的“Return Receipt Postcard”证明本申请包括 17 页（指原始申请文件 - 英文）的权利要求书（ 52 - 68 页）。虽然申请人相信具有使这些权利要求被认作是原始申请的一部分的权利，但是申请人还是选择了此比较便捷的方式来修改权利要求书，即：包括权利要求 84 以及权利要求 83 遗缺的部分。

本发明的题目、摘要或说明书都未做任何修改。

(3) 过氧化月桂酰;

(4) 三氯乙烷;

(5) 脱水山梨醇单油酸酯

(i i) 一种不含聚合引发剂的不连续水相,

形成一种乳状液;

(b) 将该乳状液加入水悬浮介质中形成有分散的乳状液液滴的水包油悬浮液, 其中所述悬浮介质含有阿拉伯胶且不含聚合引发剂; 和

(c) 使该乳状液液滴聚合。

8 3 、一种由下法制得的多孔交联聚合微球, 所述方法包括:

(a) 混合

(i) 一种油相, 该相含有

(1) 苯乙烯

(2) 二乙烯基苯;

(3) 过氧化月桂酰;

(4) 三氯乙烷;

(5) 脱水山梨醇－油酸酯

(i i) 一种不含聚合引发剂的不连续水相,

形成乳状液;

(b) 将该乳状液加入水悬浮介质中形成有分散的乳状液液滴的水包油悬浮

体，其中所述悬浮介质含有阿拉伯胶并且不含聚合引发剂；和

(c) 使乳状液液滴聚合。

8 4 、权利要求7 2 的方法，其中油相另外含有致孔剂。