

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2020-270  
(22) Přihlášeno: 14.05.2020  
(40) Zveřejněno: 24.11.2021  
(Věstník č. 47/2021)  
(47) Uděleno: 08.07.2022  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 17.08.2022  
(Věstník č. 33/2022)

C08F 20/58 (2006.01)  
C08F 20/60 (2006.01)  
C08F 292/00 (2006.01)  
G01N 21/64 (2006.01)  
B01D 63/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

E. van Andel et al: „Systematic Comparison of Zwitterionic and Non-Zwitterionic Antifouling Polymer Brushes on a Bead-Based Platform“ Langmuir 2019, 35, 1181-1191; H. Vaisocherová-Lísalová et al: "Copolymer Brush-Based Ultralow-Fouling Biorecognition Surface Platform for Food Safety" Anal. Chem. 2016 88 (21),10533-10539 doi: 10.1021/acs.analchem.6b02617; H. Lísalová et al: Ultralow-Fouling Behavior of Biorecognition Coatings Based on Carboxy-Functional Brushes of Zwitterionic Homo- and Copolymers in Blood Plasma: Functionalization Matters" Anal. Chem. 2017 89 (6) 3524-3531; C. Rodriguez Emmenegger et al: "Interaction of Blood Plasma with Antifouling Surfaces" Langmuir 2009 25 (11), 6328-6333. WO 2016/177354 A2; CZ 2016-361 A3; US 3 671 502; US 2004/0082241 A1; WO 2018/185313 A1.

(73) Majitel patentu:

Fyzikální ústav AV ČR, v. v. i., Praha 8, Libeň, CZ

(72) Původce:

RNDr. Hana Lísalová, Ph.D., Praha 8, Březiněves, CZ

Ing. Markéta Vrabcová, Praha 5, Stodůlky, CZ

Mgr. Ivana Víšová, Česká Třebová, Parník, CZ

Ing. Milan Houska, CSc., Praha 5, Radotín, CZ

Alexandr Dejneka, Ph.D., Brandýs nad Labem-Stará Boleslav, Brandýs nad Labem, CZ

(74) Zástupce:

HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52, 170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:

**Polymerní kartáč obsahující terpolymer pro použití proti nespecifické adsorpci látek z biologických médií**

(57) Anotace:

Předmětem předkládaného řešení je polymerní kartáč obsahující statistický terpolymer N-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu, karboxybetain methakrylamidu a sulfobetain methakrylamidu, a funkcionalizovaný polymerní kartáč obsahující tento terpolymer. Uvedený polymerní kartáč zvyšuje odolnost povrchu substrátu proti nespecifické adsorpci látek z biologických médií a/nebo proti nespecifické interakci se složkami biologických médií, a je vhodný pro použití např. v senzorech nebo na membránách.

## Polymerní kartáč obsahující terpolymer pro použití proti nespecifické adsorpci látek z biologických médií

### 5 Oblast techniky

Vynález se týká polymerních kartáčů obsahujících statistický antifoulingový terpolymer, a jejich použití proti nespecifické adsorpci látek z biologických médií.

10

### Dosavadní stav techniky

Nespecifická adsorpce je nežádoucí depozice látek z komplexních biologických vzorků, která představuje kritický problém pro vývoj řady moderních bioanalytických a biomedicínských metod, zařízení a materiálů. Jedná se např. o biosenzory, separační metody, funkční nanočástice a nanostrukturované povrchy, nosiče léčiv, membrány, diagnostické částice pro analýzu v tělních tekutinách, obecně o libovolné bioanalytické metody a funkční materiály, které přicházejí do přímého styku s biologickým médiem. Proto je velké úsilí věnováno vývoji tzv. ultrarezistentních materiálů a povrchů, které účinně kombinují schopnost navázání funkčních, např. biorekogničních prvků, a které jsou současně odolné proti nespecifické adsorpci látek i z velmi komplexních biologických médií, jako jsou např. neředěné tělní tekutiny, potravinové extrakty, média obsahující buňky, vzorky z tkání a částí organismů obecně, či tekutiny z prostředí obecného charakteru.

V současné době jsou považovány za nejvíce odolné (tzv. „antifouling“, či „ultra-low fouling“) a přitom funkcionalizovatelné povrchy, které se připravují polymerizací z povrchu („grafting from“) hydrofilních elektroneutrálních polymerů, jako jsou neionogenní poly(oligo(hydroxyethylenglykol methakrylát) (polyHOEGMA), poly(2-hydroxyethyl methakrylát) (polyHEMA), poly(3-hydroxypropylmethakrylát) (polyHPMA) poly[*N*-(2-hydroxypropylmethakrylamid) (polyHPMAA) a ionogenní zwitteriontové poly(karboxybetainmethakrylát) (polyCBMA), poly(karboxybetainakrylamid) (polyCBAA) a statistický kopolymer *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu (HPMAA) s karboxybetainmethakrylamidem (CBMAA) (poly(HPMAA-*co*-CBMAA)), z povrchu substrátů pomocí povrchem iniciované radikálové polymerizace s přenosem atomu (ATRP). Postup se skládá z kovalentního navázání iniciátoru ATRP na povrch substrátu (S). Po přidání polymerizačního roztoku obsahujícího monomery rostou polymerní řetězce od upoutaného zbytku iniciátoru (R) postupným navazováním monomerních jednotek, přičemž iniciační atom halogenu se vždy přenáší na konec rostoucího řetězce polymeru. Výsledkem postupu je tzv. kartáč polymerních řetězců („polymer brush“), což je vrstva hustě uspořádaných polymerních řetězců navázaných jedním koncem k povrchu substrátu dle schématu S-R-polymerní řetězec. Při současném stavu techniky nelze u polymerních kartáčů roubovaných z povrchu spolehlivě stanovit délku jednotlivých řetězců ani hustotu kartáče. Proto bývá kartáč charakterizován pouze tloušťkou měřenou elipsometrickou metodou s využitím metody rezonance povrchových plazmonů (SPR) nebo pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM).

Příprava a aktivace kartáčů z homopolymerů polyCBMA a polyCBAA jsou zahrnuty v dokumentu US 2014/0370567. Tento dokument mimo jiné popisuje antifouling povrchy připravené roubováním polyCBMA a polyCBAA homopolymerů z povrchu substrátu polymerizací ATRP nebo RAFT, a blokové kopolymery, které obsahují blok z hydrofobního polymeru a blok z homopolymeru polyCBMA nebo polyCBAA, roubované polymerizací z povrchu nebo vazbou na povrch substrátu. Dokument US 2013/0244249 popisuje postup používající dvoustupňovou ATRP, při níž se napřed na povrch naroubuje vrstva polymeru s vysokou hustotou řetězců a dobrými antifouling vlastnostmi. Na tuto vrstvu je naroubována druhá vrstva z polyCBMA nebo polyCBAA o nízké hustotě polymerních řetězců s reaktivními skupinami podél řetězce, které slouží k imobilizaci bioaktivních prvků. Výslovně uvedeným cílem tohoto postupu je zvýšení dostupnosti reaktivních skupin pro vazbu velkých molekul v druhé vrstvě, přičemž otázkou vedlejších reakcí a nežádoucích reakčních reziduí se nezabývá. Dokument CZ 2015-313 se zabývá přípravou a

využitím statistického kopolymeru poly(HPMAA-*co*-CBMAA) a srovnává jeho antifoulingové vlastnosti po ukotvení funkčních prvků s polyCBAA.

I když všechny výše zmíněné polymerní kartáče potlačují nespecifickou adsorpci z modelových proteinových roztoků a snižují depozici z neředitelné krevní plazmy pod 50 ng/cm<sup>2</sup>, jsou kartáče na bázi HPMAA, CBMA a CBAA v současnosti jedinými „ultra-low fouling“ povrchy snižujícími nespecifické vazby látek z krevní plazmy pod 5 ng/cm<sup>2</sup>. Obecně se uznává, že vysoká odolnost proti nespecifické adsorpci je dána kombinací vysoké hydrofility, která omezuje hydrofobní interakce, a celkové elektroneutrálnosti, omezující elektrostatické interakce. Vazba funkčních entit, což mohou být látky a velké molekuly s různými doménami a velkým počtem nábojů, může tuto charakteristiku povrchu podstatně změnit a původně vynikající odolnost zhoršit.

Např. pro vazbu na neionogenní polymerní řetězce je využívána aktivace jejich bočních hydroxylových skupin, která však vede k tvorbě produktů, které do velké míry zhoršují odolnost kartáčů, příp. tyto schopnosti zcela ztratí.

Elektroneutrální zwitteriontové boční skupiny polyCBMA a polyCBAA řetězců obsahují karboxylový aniont a kvarterní amoniový kationt. Karboxylová skupina zwitteriontu se, obvykle pomocí EDC-NHS chemie, ale lze použít i jiná odborníkovi známá aktivační činidla pro aktivaci karboxylu (Bioconjugate Techniques, G. T. Hermanson, Elsevier, 2008), přemění na aktivní ester, který potom reaguje s aminoskupinou funkčního prvku za vzniku amidové vazby. V polymeru ovšem vždy zůstane část nezreagovaných aktivních esterů, které musí být kvantitativně odstraněny, jednak aby při následném styku s biologickým médiem nemohly nespecificky reagovat s jeho složkami, a dále aby se pokud možno zachovala původní elektroneutralita polymeru, tj. kompenzovala převaha permanentního kladného náboje kvarterní amoniové skupiny. K tomu nepostačuje prostá hydrolyza aktivního esteru, a proto se s výhodou zbylé aktivní estery eliminují reakcí s malou molekulou obsahující aminoskupinu a karboxylovou skupinu, např. s glycinem (CZ 2016-361). Nicméně žádný z těchto postupů se doposud neukázal jako plně vyhovující, a právě ztráta celkové elektroneutrálnosti povrchu je považována za jeden z klíčových faktorů, který vede ke snížené odolnosti kartáče po vazbě funkčních prvků.

Předkládaný vynález si klade za cíl odstranit výše uvedené nevýhody.

### 35 Podstata vynálezu

Polymerní kartáč podle vynálezu obsahuje statistický terpolymer *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMAA), karboxybetainmethakrylamidu (CBMAA) a sulfobetainmethakrylamidu (SBMAA). Tento terpolymer lze zapisovat jako poly(HPMAA-*co*-CBMAA-*co*-SBMAA).

S výhodou tento statistický terpolymer obsahuje od 0,1 % mol. do 40 % mol. SBMAA, s výhodou od 0,5 % mol. do 30 % mol. SBMAA.

45 S výhodou tento statistický terpolymer obsahuje od 0,1 % mol. do 50 % mol. CBMAA, výhodněji od 5 % mol. do 30 % mol. CBMAA, ještě výhodněji od 10 % mol. do 20 % mol. CBMAA.

HPMAA tvoří v terpolymeru zbytek do 100 % mol.

50 Předmětem vynálezu je tedy tzv. polymerní kartáč (angl. „polymer brush“) statistického terpolymeru *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMAA), karboxybetainmethakrylamidu (CBMAA) a sulfobetainmethakrylamidu (SBMAA), jehož řetězce jsou jedním koncem navázány na substrát (angl. „end-tethered“), přičemž polymerní kartáč má strukturu I,

55 
$$S-R-poly(HPMAA-co-CBMAA-co-SBMAA) \quad (I),$$

kde

S je substrát, na jehož povrch lze kovalentně navázat iniciátory polymerizace, vybraný ze skupiny kovy, křemík, materiály na bázi křemičitanů či hlinitokřemičitanů, polymery, anorganické materiály, zejména oxidy kovů či nekovů;

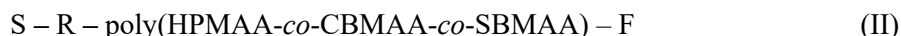
R je zbytek iniciátoru, vybraného ze skupiny zahrnující iniciátory radikálové polymerizace s přenosem atomu ATRP, iniciátory živé radikálové polymerizace s přenosem jednotlivého elektronu SET-LRP a činidla pro polymerizaci s reverzibilním adičně-fragmentačním přenosem RAFT;

– je kovalentní vazba.

Polymerní kartáč je struktura, která se skládá z polymerních řetězců jedním koncem navázaných na substrát, přičemž polymerní řetězce jsou uspořádány hustě vedle sebe, takže směřují od substrátu. Výsledná struktura polymerních řetězců připomíná vlákna kartáče, odtud tento název.

S výhodou je tloušťka vrstvy statistického terpolymeru v polymerním kartáči 10 nm až 500 nm, výhodněji 20 nm až 300 nm, měřeno elipsometrickou metodou ve vodě.

Předmětem vynálezu je rovněž funkcionalizovaný polymerní kartáč statistického terpolymeru *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMAA), karboxybetainmethakrylamidu (CBMAA) a sulfobetainmethakrylamidu (SBMAA), mající strukturu II



kde

S je substrát, na jehož povrch lze kovalentně navázat iniciátory polymerizace, vybraný ze skupiny kovy, křemík, materiály na bázi křemičitanů či hlinitokřemičitanů, polymery, anorganické materiály, zejména oxidy kovů či nekovů;

R je zbytek iniciátoru, vybraného ze skupiny zahrnující iniciátory radikálové polymerizace s přenosem atomu ATRP, iniciátory živé radikálové polymerizace s přenosem jednotlivého elektronu SET-LRP a činidla pro polymerizaci s reverzibilním adičně-fragmentačním přenosem RAFT;

– je kovalentní vazba;

F je alespoň jedna funkční entita kovalentně navázaná na polymer amidovou vazbou prostřednictvím karboxylové skupiny statistického terpolymeru a aminoskupiny funkční entity.

Předkládaný vynález řeší výše popsany problém ztráty celkové elektroneutrálnosti povrchu při problematických hydrolyzách reziduálních aktivních esterů, který vede ke snížené odolnosti kartáče po vazbě funkčních molekul. V dosud známých postupech se hydrolyzou reziduálních aktivních esterů, i s použitím látek obsahujících karboxylovou slupinu, sice mohou karboxylové skupiny regenerovat, nikoli však úplně, protože se nenahradí úbytek způsobený vazbou funkčního prvku. Takto nahrazený zwitterion také není strukturně identický s původním zwitterionem. Je také obecně známo, že elektroneutralita karboxybetainů je závislá na pH v důsledku změn ionizace karboxylové skupiny při zachování permanentního kladného náboje kvarterního amoniového kationtu. Vazba funkční entity, což může být například velká molekula s různými doménami a velkým počtem vlastních nábojů, vytváří na povrchu podstatně změněné mikrookolí, tedy i lokální pH, a tím ovlivňuje nábojovou rovnováhu. Předložený vynález řeší tento nedostatek novým způsobem, a to doladěním rovnováhy přidáním monomerní jednotky SBMAA, což je betain s trvale ionizovanou sulfoskupinou. Sulfoskupina se neúčastní vazebné reakce při aktivaci

karboxylových skupin pomocí aktivačních činidel (např. EDC-NHS nebo jiných odborníkovi známých aktivačních činidel pro aktivaci karboxylu), takže samotný homopolymer polySBMAA by nemohl být takto funkcionalizován, a jako homopolymer ostatně také nemá příliš dobrou odolnost proti nespecifické adsorpci. V poly(HPMAA-*co*-CBMAA-*co*-SBMAA) zajišťuje  
 5 funkcionalizovatelnost přítomnost CBMAA. Použití SBMAA v kombinaci s HPMAA a CBMAA pro polymerní kartáč dosud nebylo známo, přičemž, jak je doloženo dále, použití SBMAA je pro popsaný účel velmi výhodné a účinné.

Obsah SBMAA ve statistickém terpolymeru se v rámci výše uvedeného rozmezí od 0,1 % mol. do  
 10 30 % mol. optimalizuje podle navazované funkční entity tak, aby se po jejím navázání dosáhlo nejvyšší odolnosti proti nespecifické adsorpci. Tuto optimalizaci lze provést přípravou několika vzorků s různými obsahy SBMAA v rámci uvedeného rozmezí, a volbou vhodného obsahu SBMAA podle změřených požadovaných parametrů.

15 Polymerní kartáče obsahující uvedený terpolymer mají vysokou odolnost proti nespecifické adsorpci látek z biologických médií, a to i po aktivaci (tj. reakci tvorby aktivních esterů), navázání funkční entity a deaktivaci.

20 Biologickými médii jsou zde míněny zejména tělní tekutiny, jako je například krev, mozkomíšni mok, moč, sliny, ascitická tekutina, ale i další média biologického původu, jako je například krevní plazma a sérum, buněčné lyzáty, tkáňové extrakty, buněčné suspenze, média z biologických výrob, pitná či odpadní voda a potraviny.

25 Substrátem S je materiál, který se pokrývá funkcionalizovatelnou vrstvou terpolymeru odolnou proti nespecifické adsorpci. Vhodnými substráty jsou tedy zejména materiály vybrané ze skupiny kovy, křemík, oxidy kovů či nekovů, včetně křemičitanů či hlinitokřemičitanů. Substrátem může být například povrch senzoru, povrch biosenzoru, nebo sorbent, nebo povrch zařízení či materiálu používaného ve zdravotnictví.

30 Skupina R je zbytek iniciátoru. Pro ukotvení řetězce kopolymeru je potřeba nejprve na substrát navázat iniciátor polymerizace. Vhodné iniciátory a vhodné typy polymerizace pro roubování z povrchu jsou odborníkovi v oboru známy, jedná se o iniciátory polymerizace ATRP (anglický název je atom transfer radical polymerization), iniciátory polymerizace SET-LRP (anglický název je single-electron transfer living radical polymerization) nebo RAFT (anglický název je reversible  
 35 addition fragmentation transfer polymerization) činidla. Způsob vazby, kterou se iniciátor váže k substrátu, závisí na tom, o jaký substrát a jaký iniciátor se jedná, ale její určení, stejně jako určení vhodného iniciátoru pro každý substrát, je plně v rozsahu znalostí a schopností odborníka v oboru, bez potřeby vynaložení dalšího inventivního úsilí (odborník v oboru má k dispozici řadu monografií, učebnic a přehledových článků, jako příklad lze uvést Advanced Materials by Atom  
 40 Transfer Radical Polymerization, Krzysztof Matyjaszewski, Wiley Online Library, 2018).

F je funkční entita kovalentně navázaná amidovou vazbou k polymernímu kartáči, přesněji ke zbytku karboxylové skupiny monomerní jednotky CBMAA. F je entita obsahující aminoskupinu, např. proteiny, peptidy, protilátky, oligonukleotidy, nukleové kyseliny, DNA sondy. F může být  
 45 biorekogniční entita, která specificky interaguje s cílovým analytem, kterým může být například protein, peptid, nukleová kyselina, oligonukleotid a jiné organické nebo anorganické analyty.

Terpolymer poly(HPMAA-*co*-CBMAA-*co*-SBMAA) se připravuje známými technikami, např. metodou tzv. živé radikálové polymerizace. Polymerní kartáč obsahující tento terpolymer se  
 50 připravuje živou radikálovou polymerizací z povrchu substrátu za vzniku řetězců polymerních kartáčů jedním koncem vázaných na povrchu substrátu. Lze použít i metody „grafting to“, kdy se již uskupená polymerní entita naváže na substrát.

Vhodné způsoby polymerizace pro přípravu statistického terpolymeru a polymerního kartáče  
 55 obsahujícího tento terpolymer, např. ATRP polymerizace, SET-LRP polymerizace, RAFT

- polymerizace, jejich použití pro jednotlivé typy substrátů, odpovídající iniciátory a odpovídající vazebné skupiny pro kombinace iniciátoru a substrátu jsou známy z literatury. Jako příklady kombinací iniciátorů vhodných pro substráty lze uvést 11-(trichlorsilyl)undecyl-2-bromo-2-methylpropanoát na sklo a křemík pokrytý oxidem, nebo  $\omega$ -merkaptoundecylbromisobutyřát na zlatu, nebo iniciátor navázaný na povrchu substrátu obsahujícím karboxylové skupiny, který se připraví inkubací s roztokem kyseliny  $\alpha$ -brom-isomáselné, NHS a EDC, nebo 2-brom-2-methylpropanoyl bromid jako iniciátor pro substrát obsahující na povrchu amino nebo hydroxylové skupiny, což je i případ vrstvy polydopaminu.
- Všechny monomery jsou methakrylamidy z hlediska polymerizace podobného typu, mají podobnou rychlostní konstantu polymerizace, a statistický charakter polymerizace dokládá molární poměr koncentrací monomerních jednotek SBMAA, HPMMA a CBMAA v terpolymerech, shodný se složením polymerizační násady.
- Příprava funkcionalizovaných polymerních kartáčů se provádí tak, že se karboxylové skupiny polykarboxybetainů (CBMAA jednotek) v polymerním kartáči podrobí reakci s aktivačními činidly, jako jsou například EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid) a NHS (*N*-hydroxysukcinimid), za vzniku aktivních esterových skupin. Vzniklé aktivní esterové skupiny se dále podrobí reakci s aminovou skupinou funkční entity za vzniku amidové kovalentní vazby. Zbylé nezreagované aktivní esterové skupiny se pak podrobí reakci s deaktivčním činidlem, například ethanolamin-*O*-sulfátem a/nebo amino-PEG2-octovou kyselinou a/nebo glycinem. Výhodnost použití ethanolamin-*O*-sulfátu spočívá v možnosti optimalizovat celkový náboj povrchu.
- Vynález umožňuje univerzální modifikaci různých substrátů obsahujících reaktivní skupiny pro navázání iniciátorů polymerizace. Na povrch inertních substrátů, na které nelze iniciátory polymerizací navázat přímo, je možné napřed deponovat kotvící mezivrstvu, na příklad polydopaminu, která obsahuje reaktivní skupiny pro navázání iniciátorů.
- Předmětem předkládaného vynálezu je pak také použití polymerního kartáče obsahujícího statistický terpolymer poly(HPMAA-*co*-CBMAA-*co*-SBMAA) pro zvýšení odolnosti povrchů proti nespecifické adsorpci látek z biologických médií. Povrch lze při takovém použití pokrýt terpolymerem poly(HPMAA-*co*-CBMAA-*co*-SBMAA) ve formě polymerního kartáče.
- Konkrétněji je předmětem vynálezu použití polymerního kartáče obsahujícího statistický terpolymer poly(HPMAA-*co*-CBMAA-*co*-SBMAA) funkcionalizovaného polymerního kartáče jej obsahujícího pro dosažení odolnosti povrchu (substrátu) proti nežádoucí nespecifické interakci se složkami biologických médií, zejména molekul proteinů a buněk, a proti adsorpci/depozici složek biologických médií na povrchy chráněné tímto polymerem.
- Dále je předmětem vynálezu použití funkcionalizovaného polymerního kartáče obsahujícího statistický terpolymer poly(HPMAA-*co*-CBMAA-*co*-SBMAA) pro specifickou a selektivní interakci s cílovými analyty, zahrnujícími zejména proteiny, peptidy, nukleové kyseliny, oligonukleotidy.
- Předkládaný vynález dále zahrnuje senzory, zejména biosenzory pro přímou detekci analytů nebo vícestupňovou detekci s použitím přidaných reagentů, jako jsou senzory rezonance povrchových plazmonů (SPR senzory), křemenné krystalové mikrováhy (quartz crystal microbalance) nebo fluorescenční senzory, které obsahují polymerní kartáč či funkcionalizovaný polymerní kartáč podle vynálezu.
- Předkládaný vynález dále zahrnuje polymerní kartáč či funkcionalizovaný polymerní kartáč podle vynálezu ve formě membrány. Substrátem je pak typicky membrána, vrstva polymerních řetězců je naroubována na povrch membrány. Je-li membrána porézní, je vrstva polymerních řetězců naroubována na povrchu pórů.

Objasnění výkresů

5 Obr. 1 ukazuje typické IRRAS spektrum kartáče poly[HPMAA(70 % mol.)-co-CBMAA(15 % mol.)-co-SBMAA(15 % mol.)] na zlatě. Vyznačeny jsou charakteristické absorpční pásy skupin jednotlivých složek: Am I a Am II amidové pásy řetězce, -OH pás hydroxylové skupiny HPMAA, -COO<sup>-</sup> pás ionizované karboxylové skupiny CBMAA, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup> pás ionizované sulfoskupiny SBMAA.

10

Obr. 2 je záznam odezvy SPR senzoru s čipem se zlatým povrchem opatřeným polymerním kartáčem, dle Příkladů 3 a 4.

15

Obr. 3 je záznam odezvy SPR senzoru při detekci *E.coli* na funkcionalizovaném terpolymerním kartáči, dle příkladu 5.

Příklady uskutečnění vynálezu

20 Příklad 1: Příprava polymerního kartáče na zlatě

Skleněná destička s napařenou vrstvou zlata byla čistěna 10 minut v UV ozonovém generátoru, ihned poté byla opláchnuta vodou a ethanolom. Potom byla destička ponořena do 0,1mM roztoku iniciátoru  $\omega$ -merkaptoundecylbromoisobutyrate v ethanolu na 48 hodin při teplotě místnosti bez přístupu světla. Katalytická směs byla připravena ve Schlenkově baňce rozpuštěním CuCl (28 mg), CuCl<sub>2</sub> (8,4 mg) a Me<sub>4</sub>cyclam (96,8 mg) v odplyněném methanolu (2 ml) pod dusíkovou atmosférou a sonikována 5 minut do úplného rozpuštění. Ve druhé Schlenkově baňce byly rozpuštěny monomery SBMAA (138 mg, 3 % mol.), CBMAA (572 mg, 15 % mol.) a HPMAA (1847 mg, 82 % mol.) v odplyněné vodě (16,9 ml) a methanolu (0,1 ml). Příklady dalších navážek pro přípravu povrchů s jiným procentuálním zastoupením složek jsou uvedeny v tabulce 1. Po rozpuštění byla katalytická směs pod dusíkem přidána ke směsi monomerů. Homogenní polymerační směs byla pod dusíkem přidána do reaktoru s destičkou pokrytou iniciátorem. Polymerace probíhala v uzavřeném reaktoru 2 hodiny při teplotě místnosti. Poté byla destička opláchnuta vodou a před dalším použitím byla skladována ve fosfátovém pufru (pH 7,4) při teplotě 4 °C.

35

Metodou infračervené reflexní absorpční spektroskopie (PM-IRRAS) byla ověřena chemická struktura terpolymerního kartáče. Na obrázku 1 je ukázáno typické IRRAS spektrum pro jedno provedení terpolymerního kartáče.

40

Tabulka 1: Vybrané příklady navážek pro přípravu terpolymeru s různým obsahem jednotlivých monomerů.

Složení polymerizační násady [% mol.]			Složení polymerizační násady [mg]		
HPMAA	CBMAA	SBMAA	HPMAA	CBMAA	SBMAA
84,5	15,0	0,5	1903	572	23
82,0	15,0	3,0	1847	572	138
80,0	15,0	5,0	1802	572	230
75,0	15,0	10,0	1689	572	460
70,0	15,0	15,0	1576	572	690
55,0	15,0	30,0	1239	572	1379

45 Příklad 2: Příprava polymerního kartáče na skle

Skleněná destička byla opláchnuta acetonem, čištěna 20 minut ultrazvukem v 50% methanolu při teplotě 20 °C a poté sonikována dalších 20 minut v chloroformu. Potom byla destička opláchnuta vodou, osušena vzduchem a čištěna 4 minut v UV ozonovém generátoru. Po čištění byla destička dehydratována 1 hodinu při teplotě  $\geq 90$  °C v přítomnosti silikagelu a ihned poté byla  
 5 na 2 hodiny ponořena do 3mM roztoku iniciátoru (MeO)<sub>3</sub>-Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-Br v bezvodém *n*-heptanu při teplotě místnosti. Potom byla destička opláchnuta ethanolem a vodou a vložena do reaktoru k polymeraci. Další postup přípravy polymerního kartáče je analogický s výše uvedeným příkladem 1. Katalytická směs byla připravena ve Schlenkově baňce rozpuštěním CuCl (28 mg), CuCl<sub>2</sub> (8,4 mg) a Me<sub>4</sub>cyclam (96,8 mg) v odplyněném methanolu (2 ml) pod dusíkovou  
 10 atmosférou a sonikována ultrazvukem 5 minut do úplného rozpuštění. Ve druhé Schlenkově baňce byly rozpuštěny monomery SBMAA (138 mg, 3 % mol.), CBMAA (572 mg, 15 % mol.) a HPMAA (1847 mg, 82 % mol.) v odplyněné vodě (16,9 ml) a methanolu (0,1 ml). (Další příklady navážek jsou stejné jako příklady navážek uvedených v tabulce 1). Po rozpuštění byla katalytická směs pod dusíkem přidána ke směsi monomerů. Homogenní polymerační směs byla pod dusíkem  
 15 přidána do reaktoru s destičkou s navázaným iniciátorem. Polymerace probíhala v uzavřeném reaktoru 2 hodiny při teplotě místnosti. Poté byla destička opláchnuta vodou a před dalším použitím byla skladována ve fosfátovém pufru (pH 7,4) při teplotě 4 °C.

### Příklad 3: Vazba bakteriální protilátky

20 Dle příkladu 1 byl na zlaté vrstvě čipu připraven terpolymerní kartáč poly[(HPMAA(80 % mol.)-*co*-CBMAA(15 % mol.)-*co*-SBMAA(5 % mol.)). Čip byl opláchnut vodou, vložen do SPR senzoru a karboxylové skupiny CBMAA byly aktivovány 20 minut za průtoku 10  $\mu$ l/min roztokem 0,1M NHS a 0,5M EDC v deionizované vodě na aktivní ester. Po aktivaci byla zaznamenána hladina  
 25 odezvy senzoru pro povrch ve vodě. 50  $\mu$ g/ml bakteriální protilátky anti-Salmonella bylo rozpuštěno v borátovém pufru (10 mM, pH 8,5), napuštěno rychlostí 30  $\mu$ l/min do mikrofluidického systému SPR senzoru a reakcí s aktivovaným kartáčem kovalentně navázáno (20 minut). Po imobilizaci protilátky byla opět zaznamenána hladina odezvy senzoru ve vodě. Množství navázané protilátky bylo určeno z rozdílu odezvy senzoru ve vodě před nástřikem  
 30 protilátky a odezvy ve vodě po ukončení imobilizace (obrázek 2, červeně označená „hladina imobilizace“ odpovídá hodnotě 206 ng/cm<sup>2</sup>).

### Příklad 4: Funkcionalizační kapacita a odolnost proti nespecifické adsorpci po navázání funkčních entit

35 Dle příkladu 1 byly připraveny terpolymerní kartáče poly(HPMAA-*co*-CBMAA-*co*-SBMAA) obsahující (a) 84,5 % mol. HPMAA, 15 % mol. CBMAA, 0,5 % mol. SBMAA, (b) 82 % mol. HPMAA, 15 % mol. CBMAA, 3 % mol. SBMAA a (c) 55 % mol. HPMAA, 15 % mol. CBMAA, 30 % mol. SBMAA na zlaté vrstvě. Dále byly připraveny dva již známé referenční antifoulingové povrchy, vykazující vysokou míru rezistence k nespecifickým vazbám a zároveň dostatečnou  
 40 funkcionalizační kapacitu – kopolymer obsahující 85 % mol. HPMAA a 15 % mol. CBMAA (WO2016177354A3) a homopolymer polyCBAA. Dále je uveden postup přípravy těchto polymerů:

45 poly[HPMAA(85 % mol.)-*co*-CBMAA(15 % mol.)]

Skleněná destička s napařenou vrstvou zlata byla čištěna 10 minut v UV ozonovém generátoru, ihned poté byla opláchnuta vodou a ethanolem. Potom byla destička ponořena do 0,1mM roztoku iniciátoru  $\omega$ -merkaptoundecylbromoisobutyřátu v ethanolu na 48 hodin při teplotě místnosti bez  
 50 přístupu světla. Katalytická směs byla připravena ve Schlenkově baňce rozpuštěním CuCl (28 mg), CuCl<sub>2</sub> (8,4 mg) a Me<sub>4</sub>cyclam (96,8 mg) v odplyněném methanolu (2 ml) pod dusíkovou atmosférou a sonikována 5 minut do úplného rozpuštění. Ve druhé Schlenkově baňce byly rozpuštěny monomery CBMAA (572 mg, 15 % mol.) a HPMAA (1914 mg, 85 % mol.) v odplyněné vodě (16,9 ml) a methanolu (0,1 ml). Po rozpuštění byla katalytická směs pod dusíkem  
 55 přidána ke směsi monomerů. Homogenní polymerační směs byla pod dusíkem přidána do reaktoru



s destičkou pokrytou iniciátorem. Polymerace probíhala v uzavřeném reaktoru 2 hodiny při teplotě místnosti. Poté byla destička opláchnuta vodou a před dalším použitím byla skladována ve fosfátovém pufru při teplotě 4 °C.

5 polyCBAA

Skleněná destička s napařenou vrstvou zlata byla čistěna 10 minut v UV ozonovém generátoru, ihned poté byla opláchnuta vodou a ethanol. Potom byla destička ponořena do 0,1mM roztoku iniciátoru  $\omega$ -merkaptoundecylbromoisobutyřátu v ethanolu na 48 hodin při teplotě místnosti bez přístupu světla. Katalytická směs byla připravena ve Schlenkově baňce rozpuštěním CuCl (28 mg), CuCl<sub>2</sub> (8,4 mg) a Me<sub>4</sub>cyclam (96,8 mg) v odplyněném methanolu (2 ml) pod dusíkovou atmosférou a sonikována 5 minut do úplného rozpuštění. Ve druhé Schlenkově baňce byly rozpuštěny monomer CBAA (3590 mg) v odplyněné vodě (16,9 ml) a methanolu (0,1 ml). Po rozpuštění byla katalytická směs pod dusíkem přidána ke směsi monomerů. Homogenní polymerační směs byla pod dusíkem přidána do reaktoru s destičkou pokrytou iniciátorem. Polymerace probíhala v uzavřeném reaktoru 2 hodiny při teplotě místnosti. Poté byla destička opláchnuta vodou a před dalším použitím byla skladována ve fosfátovém pufru (pH 7,4) při teplotě 4 °C.

20 Výše uvedené polymerní kartáče byly zkoušeny na odolnost proti nespecifické adsorpci: (a) aktivovaný a deaktivovaný povrch, (b) aktivovaný a funkcionalizovaný povrch po deaktivaci. Pro všechny kartáče byl dále uvedený analogický postup. Čip s kartáčem byl opláchnut vodou, vložen do SPR senzoru a za průtoku 10  $\mu$ l/min aktivován 20 minut roztokem 0,1 M NHS a 0,5 M EDC v deionizované vodě. V případě ad (a) byl povrch dále 25 minut omýván borátovým pufrem (10 mM, pH 8,5, průtok 30  $\mu$ l/min), v případě ad (b) byl povrch 25 minut omýván borátovým (10 mM, pH 8,5, průtok 30  $\mu$ l/min) obsahujícím konkrétní rozpuštěnou funkční entitu obsahující primární aminy. Na následující povrchy byly imobilizovány dále uvedené entity:

30 poly[HPMAA(84,5 % mol.)-*co*-CBMAA(15 % mol.)-*co*-SBMAA(0,5 % mol.)]:

DNA oligonukleotid s koncovou amino skupinou (roztok o koncentraci 4  $\mu$ M);

poly[HPMAA(82 % mol.)-*co*-CBMAA(15 % mol.)-*co*-SBMAA(3 % mol.)]:

35 anti-bakteriální protilátka anti-Salmonella (roztok o koncentraci 50  $\mu$ g/ml);

poly[HPMAA(55 % mol.)-*co*-CBMAA(15 % mol.)-*co*-SBMAA(30 % mol.)]:

poly L-lysin (roztok o koncentraci 50  $\mu$ g/ml);

40 poly[HPMAA(85 % mol.)-*co*-CBMAA(15 % mol.)]:

45 anti-bakteriální protilátka anti-Salmonella (roztok o koncentraci 50  $\mu$ g/ml), nebo DNA oligonukleotid s koncovou amino skupinou (roztok o koncentraci 4  $\mu$ M), nebo poly *L*-lysin (roztok o koncentraci 50  $\mu$ g/ml);

polyCBAA: anti-bakteriální protilátka anti-Salmonella (roztok o koncentraci 50  $\mu$ g/ml), nebo DNA oligonukleotid s koncovou amino skupinou (roztok o koncentraci 4  $\mu$ M), nebo poly *L*-lysin (roztok o koncentraci 50  $\mu$ g/ml).

50 Dále byl v obou případech ad (a) a (b) u všech povrchů použit stejný postup. Kartáč byl deaktivován reakcí s 1M kyselinou (2-aminoethoxy)octovou (30 min, průtok 10  $\mu$ l/min) a potom inkubován v PBS (10 mM fosfátový pufr + 150 mM NaCl + 2,7 mM KCl, pH 7,4) pro dosažení rovnováhy a konstantní odezvy senzoru. Poté byla injektována 100% lidská krevní plazma rychlostí 30  $\mu$ l/min při 25 °C po dobu 10 minut, následovaná opláchnutím PBS. Po 10 minutách

5 oplachování PBS byl na 5 minut injektován PBS s vyšší iontovou silou (10 mM fosfátový pufr + 750 mM NaCl + 2,7 mM KCl, pH 7,4) pro odmytí elektrostaticky adsorbovaného nespecifického depozitu a nakonec byl celý povrch relaxován opět v normálním PBS. Hladina nespecifické adsorpce byla určena z rozdílu odezvy senzoru v PBS před injektací krevní plazmy a 10 minut po ukončení injektace. Hladina nespecifické adsorpce po odmytí v PBS s vyšší iontovou silou byla určena z rozdílu odezvy senzoru v PBS před nástřikem krevní plazmy a 10 minut po ukončení odmytí v PBS s vyšší iontovou silou. Výsledky jsou ukázány v obrázku 2, tabulce 2 a tabulce 3.

10 Obrázek 2 dokládá, že i při koncentraci 15 % mol. CBMAA v terpolymeru se na povrch naváže dostatečné množství funkčního prvku (206 ng/cm<sup>2</sup> anti-Salmonella), a přitom se dosáhne vysoké odolnosti proti nespecifické adsorpci – nespecifická adsorpce z neředěné lidské plazmy byla 0 ng/cm<sup>2</sup>.

15 Tabulka 2 – Nespecifická adsorpce z neředěné krevní plazmy po aktivaci a deaktivaci a aktivaci/kovalentním navázáním protilátky anti-Salmonella a deaktivaci.

<b>Nespecifická adsorpce z neředěné krevní plazmy [ng/cm<sup>2</sup>]</b>			
	<b>poly[HPMAA(82 % mol.)-co-CBMAA(15 % mol.)-co-SBMAA(3 % mol.)]</b>	<b>polyCBAA</b>	<b>poly[HPMAA(85 % mol.)-co-CBMAA(15 % mol.)]</b>
Po aktivaci/deaktivaci	8,1	66,1	20,8
Po aktivaci/deaktivaci a odmytí PBS s vyšší iontovou silou	0	2,5	16,9
Po aktivaci/ukotvení anti-Salmonella/deaktivaci	10,9	51,9	39,5
Po aktivaci/ukotvení anti-Salmonella/deaktivaci a odmytí PBS s vyšší iontovou silou	4,5	8,5	40,9

20 Tabulka 2 dokládá zlepšené antifoulingové vlastnosti terpolymerního kartáče poly(HPMAA-co-CBMAA-co-SBMAA) po aktivaci a imobilizaci funkčních prvků v porovnání se známými antifoulingovými karboxy-funkčními povrchy. Zároveň ukazuje významně nižší hladinu nespecifické adsorpce i bez nutnosti odmytí elektrostaticky adsorbovaného nespecifického depozitu.

25 Tabulka 3 – Nespecifická adsorpce z neředěné krevní plazmy po aktivaci a kovalentním navázáním kladně (poly *L*-lysin) a záporně (DNA oligonukleotid zakončený amino skupinou) nabitého ligandu za daných funkcionalizačních podmínek na terpolymerních kartáčích s různým molárním zastoupením jednotlivých monomerních jednotek.

Nespecifická adsorpce z neředěné krevní plazmy [ng/cm <sup>2</sup> ]		
	<b>poly[HPMAA(84,5 % mol.)- co-CBMAA(15 % mol.)-co- SBMAA(0,5 % mol.)]</b>	<b>poly[HPMAA(85 % mol.)-co- CBMAA(15 % mol.)]</b>
Po aktivaci/ukotvení DNA oligonukleotidů s koncovou amino skupinou /deaktivaci	1,7	4,1
Po aktivaci/ ukotvení DNA oligonukleotidů s koncovou amino skupinou /deaktivaci a odmytí PBS s vyšší iontovou silou	0	3,0
	<b>poly[HPMAA(55 % mol.)-co- CBMAA(15 % mol.)-co- SBMAA(30 % mol.)]</b>	<b>poly[HPMAA(85 % mol.)-co- CBMAA(15 % mol.)]</b>
Po aktivaci/ukotvení poly L-lysínu/deaktivaci a odmytí PBS s vyšší iontovou silou	6,0	11,7

Tabulka 3 ukazuje výhodu laditelnosti složení terpolymerního kartáče v širokém rozmezí obsahu sulfobetainové složky. Pro různé ligandy lze na základě rozložení nábojů vyhodnotit vhodné složení kartáče tak, aby po imobilizaci zůstal povrch co nejvíce neutrální a tedy odolný proti nespecifické adsorpci. Lze tak docílit ještě nižší hladiny nespecifické adsorpce, než u známých funkcionalizovatelných antifoulingových povrchů bez sulfobetainové složky.

Příklad 5: Biorekogniční schopnost terpolymerního kartáče po navázání funkčních entit

Dle příkladu 1 byl na zlatém povrchu čipu připraven poly[HPMAA(75 % mol.)-co-CBMAA (15 % mol.)-co-SBMAA(10 % mol.)]. Čip byl vložen do SPR senzoru a postupem dle příkladu 3 byl funkcionalizován protilátkou proti bakterii *Escherichia coli* (*E.coli*), anti-*E.coli*, a protilátkou proti karcinoembryonálnímu antigenu (CEA), anti-CEA. Druhá zmíněná protilátka byla použita jako reference pro ukázání specifčnosti detekce bakterie *E.coli*. Po funkcionalizaci byly zbylé aktivní estery deaktivovány 30 minut reakcí s roztokem 1M kyseliny (2-aminoethoxy)octové (30 min, průtok 10 µl/min) a potom se čip nechal ustálit v PBS (10 mM fosfátový pufr + 150 mM NaCl + 2,7 mM KCl, pH 7,4). Po ustálení odezvy senzoru byl na čip injektován roztok inaktivované bakterie *E.coli* o koncentraci  $1 \times 10^7$  KJ/mL (kolonie tvořících jednotek na ml) v PBS (15 min, průtok 45 µl/min). Potom byl čip opět oplachován PBS do ustálení odezvy senzoru.

Obrázek 3 ukazuje záznam odezvy SPR senzoru. Odezva z referenčního kanálu (černá barva), ve kterém byla imobilizovaná protilátka anti-CEA, byla zanedbatelná proti specifické odezvě SPR senzoru (červená barva), kde byla imobilizovaná protilátka anti-*E.coli*.

Polymerní kartáče v příkladech 3, 4 a 5 byly připraveny v rozmezí tloušťek vrstvy statistického polymeru 80 nm až 100 nm (tloušťka byla ověřena elipsometrií a metodou SPR ve vodě).

Příklad 6

Dle příkladu 1 byl na zlatém povrchu čipu připraven terpolymerní kartáč o složení 81 % mol. HPMAA, 15 % mol. CBMAA, 4 % mol. SBMAA. Čip byl opláchnut vodou, vložen do SPR

senzoru a karboxylové skupiny CBMAA byly 20 minut za průtoku 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  aktivovány roztokem 0,5M EDC a 0,1M NHS v deionizované vodě za vzniku aktivního esteru. Po aktivaci byla zaznamenána hladina odezvy senzoru pro povrch ve vodě. 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bakteriální protilátky anti-*E.coli* v borátovém pufru (10 mM, pH 8,5) bylo za průtoku 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  napuštěno do mikrofluidického systému SPR senzoru a imobilizováno  $104 \pm 25 \text{ ng}/\text{cm}^2$  protilátky. Následně byly reziduální aktivní estery deaktivovány 36 minut jedním ze tří roztoků deaktivčních činidel: (1) roztok glycinu (1M v deionizované vodě, pH 7), nebo (2) roztok kyseliny (2-aminoethoxy)octové (1M v deionizované vodě, pH 7), anebo (3) roztok ethanolamin-*O*-sulfátu (0,9 M v deionizované vodě, pH 8).

Takto připravené povrchy byly dále 10 minut promývány PBS (10 mM fosfátový pufr + 150 mM NaCl + 2,7 mM KCl, pH 7,4). Potom byla injektována 100% lidská krevní plazma rychlostí 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  při 25 °C po dobu 10 min, následovaná opět promýváním PBS. Po 10 minutách promývání PBS byl na 5 minut injektován PBS s vyšší iontovou silou (10 mM fosfátový pufr + 750 mM NaCl + 2,7 mM KCl, pH 7,4) a nakonec byl celý povrch relaxován opět v PBS. Nespecifická adsorpce byla určena z rozdílu odezvy senzoru v PBS před injektováním krevní plazmy a 10 minut po ukončení injektace. Nespecifická adsorpce po odmytí PBS s vyšší iontovou silou byla určena z rozdílu odezvy senzoru v PBS před injektací krevní plazmy a 10 minut po ukončení injektace PBS s vyšší iontovou silou.

Tabulka 4: Porovnání deaktivace reziduálních aktivních esterů - nespecifická adsorpce z neředěné krevní plazmy po deaktivaci dvěma referenčními, v literatuře používanými, činidly a novým činidlem ethanolamin-*O*-sulfátem.

Deaktivční činidlo	Nespecifická adsorpce ze 100% krevní plazmy ( $\text{ng}/\text{cm}^2$ )	Nespecifická adsorpce ze 100% krevní plazmy/odmytí PBS s vyšší iontovou silou ( $\text{ng}/\text{cm}^2$ )
glycin	20,3	13,7
kyselina (2-aminoethoxy)octová	21,2	18,1
ethanolamin- <i>O</i> -sulfát	16,6	6,0

Tabulka 4 dokládá nižší nespecifickou adsorpci z komplexního roztoku po deaktivaci funkcionalizovaného terpolymerního povrchu ethanolamin-*O*-sulfátem v porovnání s referenčními již publikovanými metodami a dokládá tak zlepšení regenerace antifoulingových vlastností po deaktivaci ethanolamin-*O*-sulfátem.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Polymerní kartáč, **vyznačený tím**, že má strukturu I



5 kde

S je substrát vhodný pro povrchové kovalentní návázání iniciátorů polymerizace, vybraný ze skupiny kovy, křemík, materiály na bázi křemičitanů či hlinitokřemičitanů, polymery, anorganické materiály, zejména oxidy kovů či nekovů;

10 R je zbytek iniciátoru polymerizace, vybraného ze skupiny zahrnující iniciátory radikálové polymerizace s přenosem atomu ATRP, iniciátory živé radikálové polymerizace s přenosem jednotlivého elektronu SET-LRP a činidla pro polymerizaci s reverzibilním adičně-fragmentačním přenosem RAFT;

15 poly(HPMAA-co-CBMAA-co-SBMAA) je statistický terpolymer *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu, karboxybetain methakrylamidu a sulfobetain methakrylamidu; – je kovalentní vazba.

2. Polymerní kartáč podle nároku 1, **vyznačený tím**, že je funkcionalizovaný a má strukturu II



kde

20 S je substrát vhodný pro povrchové kovalentní návázání iniciátorů polymerizace, vybraný ze skupiny kovy, křemík, materiály na bázi křemičitanů či hlinitokřemičitanů, polymery, anorganické materiály, zejména oxidy kovů či nekovů;

R je zbytek iniciátoru polymerizace, vybraného ze skupiny zahrnující iniciátory radikálové polymerizace s přenosem atomu ATRP, iniciátory živé radikálové polymerizace s přenosem jednotlivého elektronu SET-LRP a činidla pro polymerizaci s reverzibilním adičně-fragmentačním přenosem RAFT;

25 poly(HPMAA-co-CBMAA-co-SBMAA) je statistický terpolymer *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu, karboxybetainmethakrylamidu a sulfobetainmethakrylamidu; – je kovalentní vazba;

30 F je alespoň jedna funkční entita kovalentně navázaná na statistický terpolymer amidovou vazbou prostřednictvím karboxylové skupiny statistického terpolymeru a aminoskupiny funkční entity, přičemž s výhodou je funkční entita vybrána ze skupiny zahrnující proteiny, protilátky, peptidy, nukleové kyseliny, oligonukleotidy.

3. Polymerní kartáč podle nároku 1 nebo 2, **vyznačený tím**, že poly(HPMAA-co-CBMAA-co-SBMAA) obsahuje

35 od 0,1 % mol. do 40 % mol. sulfobetain methakrylamidu;

od 0,1 % mol. do 50 % mol. karboxybetain methakrylamidu a

*N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamid tvoří v terpolymeru zbytek do 100 % mol.

4. Polymerní kartáč podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačený tím**, že je tloušťka vrstvy statistického terpolymeru v polymerním kartáči 10 nm až 500 nm, s výhodou 20 nm až 300 nm, měřeno elipsometrickou metodou ve vodě.

5. Polymerní kartáč podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačený tím**, že substrát je ve formě membrány.

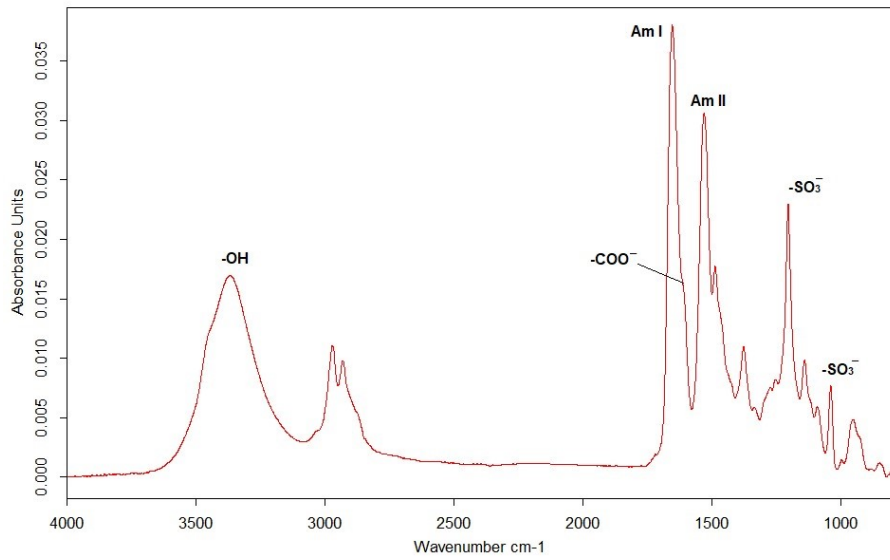
6. Použití polymerního kartáče podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, pro zvýšení odolnosti povrchu substrátu proti nespecifické adsorpci látek z biologických médií a/nebo proti nespecifické interakci se složkami biologických médií.

5 7. Použití funkcionalizovaného polymerního kartáče podle nároku 2, pro specifickou a selektivní interakci s cílovými analyty, zahrnujícími zejména proteiny, peptidy, nukleové kyseliny, oligonukleotidy.

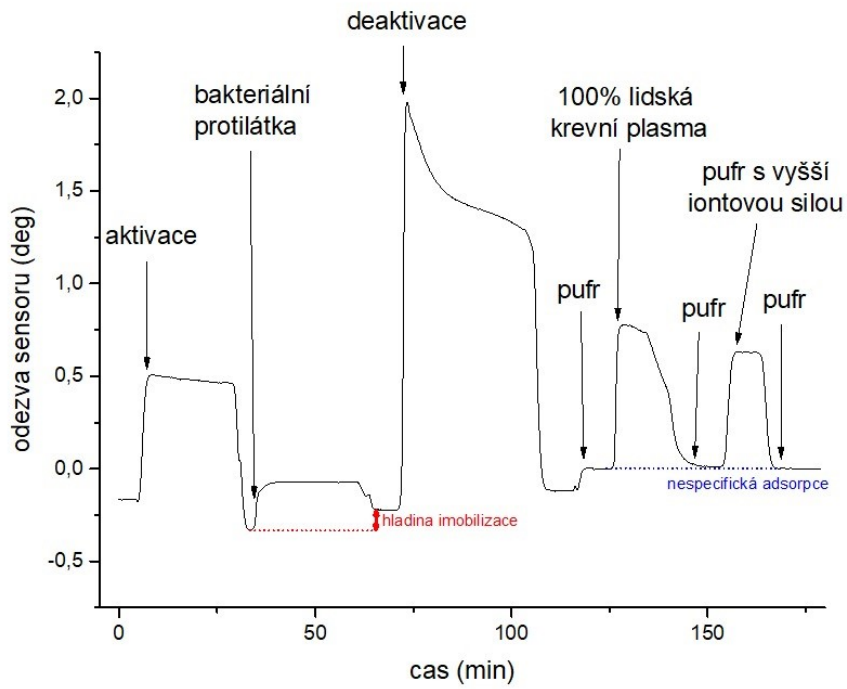
8. Senzor, zejména vybraný ze skupiny zahrnující senzory rezonance povrchových plasmonů, křemenné krystalové mikrováhy nebo fluorescenční senzory, **vyznačený tím**, že obsahuje polymerní kartáč podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3.

10

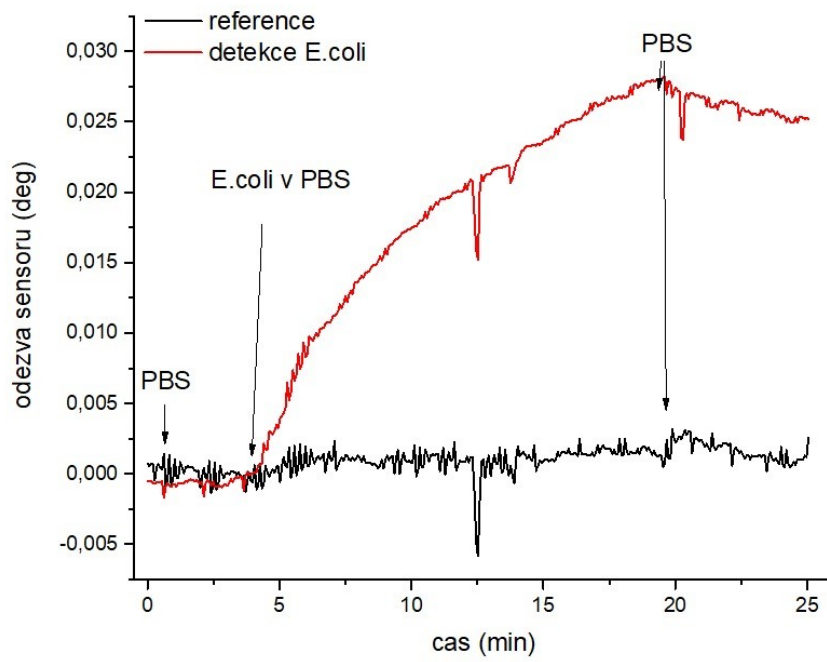
2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3