

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2020-270

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

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)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14.05.2020**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **24.11.2021**

(Věstník č. 47/2021)

(71) Přihlašovatel:
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 přihlášky vynálezu:
**Terpolymer pro použití proti nespecifické
adsorpci látek z biologických médií,
polymerní kartáče jej obsahující**

(57) Anotace:
Předmětem předkládaného řešení je statistický terpolymer N-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu, karboxybetain methakrylamidu a sulfobetain methakrylamidu, polymerní kartáč a funkcionalizovaný polymerní kartáč obsahující tento terpolymer. Uvedený statistický terpolymer 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 ve formě polymerního kartáče např. v senzorech nebo na membránách.

Terpolymer pro použití proti nespecifické adsorpci látek z biologických médií, polymerní kartáče jej obsahující

5 Oblast techniky

Vynález se týká nového statistického antifoulingového terpolymeru, polymerních kartáčů jej obsahujících, 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-hydroxypropyl methakrylát) (polyHPMA) poly[N-(2-hydroxypropyl methakrylamid] (polyHPMAA) a ionogenní zwitteriontové poly(karboxybetain methakrylát) (polyCBMA), poly(karboxybetain akrylamid) (polyCBAA) a statistický kopolymer N-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu (HPMAA) s karboxybetain methakrylamidem (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 plasmonů (SPR) nebo pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM).

Příprava a aktivace kartáčů z homopolymerů polyCBMA a polyCBAA jsou zahrnuty v dokumentu US20140370567. 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 US20130244249 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 PV 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 neředěné krevní plasmy pod 50 ng/cm^2 , jsou kartáče na bázi HPMAA, CBMA a CBAA v současnosti jedinými „ultra-low fouling“ povrchy snižujícími nespecifické vazby látek z krevní plasmy pod 5 ng/cm^2 . Obecně se uznává, že vysoká odolnost proti nespecifické adsorpci je dána kombinací vysoké hydrofility, která omezuje hydrofobní interakce, a celkové elektroneutrality, 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 hydrolýza aktivního esteru, a proto se s výhodou zbylé aktivní estery eliminují reakcí s malou molekulou obsahující aminoskupinu a karboxylovou skupinu, např. s glycinem (PV 2016-361). Nicméně žádný z těchto postupů se doposud neukázal jako plně vyhovující, a právě ztráta celkové elektroneutrality 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.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je statistický terpolymer N-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu (HPMAA), karboxybetain methakrylamidu (CBMAA) a sulfobetain methakrylamidu (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.

S výhodou statistický terpolymer podle vynálezu 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 %.

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



kde

5 S je substrát, na jehož povrch lze kovalentně navázat iniciátory polymerizace;

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
10 RAFT;

– je kovalentní vazba.

15 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 název.

S výhodou je tloušťka vrstvy statistického terpolymeru v polymerním kartáči 10 nm až 500 nm, výhodněji 20 nm až 200 nm, měřeno elipsometrickou metodou ve vodě.

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



kde

30 S je substrát, na jehož povrch lze kovalentně navázat iniciátory polymerizace;

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
35 RAFT;

– je kovalentní vazba;

F je alespoň jedna funkční entita kovalentně navázaná na polymer amidovou vazbou.

40 Předkládaný vynález řeší výše popsany problém ztráty celkové elektroneutality povrchu při problematických hydrolýzách reziduálních aktivních esterů, který vede ke snížené odolnosti kartáče po vazbě funkčních molekul. V dosud známých postupech se hydrolýzou reziduálních aktivních esterů, i s použitím látek obsahujících karboxylovou skupinu, sice mohou karboxylové skupiny regenerovat, nikoli však úplně, protože se nenahradí úbytek způsobený vazbou funkčního
45 prvku. Takto nahrazený zwitterion také není strukturálně 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 kvartérního 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
50 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
55 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 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.

5

Obsah SBMAA ve statistickém terpolymeru se v rámci výše uvedeného rozmezí od 0,1 mol % do 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.

10

Terpolymer podle předkládaného vynálezu má vysokou odolnost proti nespecifické adsorpci látek z biologických médií, a stejně tak i polymerní kartáče, které jej obsahují, mají tuto vysokou odolnost, a to i po aktivaci (tj. reakci tvorby aktivních esterů), navázání funkční entity a deaktivaci.

15

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

20

Substrátem S je materiál, který se pokrývá funkcionalizovatelnou vrstvou terpolymeru odolnou proti nespecifické adsorpci. Substrátem je jakýkoliv materiál, na jehož povrch lze kovalentně navázat iniciátory polymerizace. Vhodnými substráty jsou tedy zejména materiály obsahující reaktivní skupiny na povrchu nebo inertní materiály povlečené vrstvou dobře adheující k jejich povrchu a obsahující reaktivní skupiny pro navázání iniciátoru, typicky polydopaminem připraveným autopolymerizací na povrchu materiálu. Tvar, rozměry, morfologie a chemická povaha substrátu nejsou rozhodující, může se jednat o planární či různě tvarované objekty, trubice, vlákna, částice, membrány, mikročástice, nanočástice, porézní materiály, kovy, křemík, materiály na bázi křemičitanů či hlinitokřemičitanů (např. sklo), polymery, anorganické materiály – zejména oxidy kovů či nekovů, apod. Ve výhodném provedení se zejména jedná o 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.

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 (atom transfer radical polymerization), iniciátory polymerizace SET-LRP (single-electron transfer living radical polymerization) nebo RAFT (reversible 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 Transfer Radical Polymerization*, Kryzstof Matyjaszewski, Wiley Online Library, 2018).

45

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 biorekogniční entita, která specificky interaguje s cílovým analytem, kterým může být například protein, peptid, nukleová kyselina, oligonukleotid a jiné organické nebo anorganické analyty.

50

Terpolymer poly(HPMAA-co-CBMAA-co-SBMAA) se připravuje známými technikami, např. metodou tzv. živé radikálové polymerizace. Polymerní kartáč obsahující tento terpolymer se připravuje živou radikálovou polymerizací z povrchu substrátu za vzniku řetězců polymerních

55

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 podle vynálezu či
 5 polymerního kartáče 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-methyl propanoát na sklo a křemík pokrytý oxidem, nebo ω -
 10 merkaptoundecyl bromisobutyryl na zlato, nebo iniciátor navázaný na povrchu substrátu obsahujícím karboxylové skupiny, který se připraví inkubací s roztokem kyseliny α -bromisomáselné, 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, HPMAA a CBMAA v terpolymerech, shodný se složením polymerizační násad.
- Příprava funkcionalizovaných polymerních kartáčů se provádí tak, že se karboxylové skupiny polykarboxybetainů (CBMAA jednotek) v polymerním kartáči podrobí reakci s aktivními
 20 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
 25 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 kotvici mezivrstvy, na příklad polydopaminu, která obsahuje reaktivní skupiny pro navázání iniciátorů.
- Předmětem předkládaného vynálezu je pak také použití statistického terpolymeru 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), například ve formě povlaku či ve formě polymerního kartáče.
- Konkrétněji je předmětem vynálezu použití statistického terpolymeru poly(HPMAA-co-CBMAA-co-SBMAA) nebo polymerního kartáče jej obsahujícího nebo funkcionalizovaného polymerního
 40 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.
- 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
 50 víceetapovou detekci s použitím přidávaných reagentů, jako jsou senzory rezonance povrchových plasmonů (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 membrány obsahující polymerní kartáč či funkcionalizovaný polymerní kartáč podle vynálezu. 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

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⁻ pás ionizované karboxylové skupiny CBMAA, -SO₃⁻ pás ionizované sulfoskupiny SBMAA.

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

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

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Příprava polymerního kartáče na zlatě

Skleněná destička s napařenou vrstvou zlata byla čištěna 10 min v UV ozonovém generátoru, ihned poté byla opláchnuta vodou a ethanolem. Potom byla destička ponořena do 0,1mM roztoku iniciátoru ω-merkaptoundecyl bromoisobutyrátu v ethanolu na 48 hodin v pokojové teplotě bez přístupu světla. Katalytická směs byla připravena ve Schlenkově baňce rozpuštěním CuCl (28 mg), CuCl₂ (8,4 mg) a Me₄cyclam (96,8 mg) v odplyněném methanolu (2 ml) pod dusíkovou atmosférou a sonikována 5 min 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 hod při pokojové teplotě. Poté byla destička opláchnuta vodou a před dalším použitím byla skladována ve fosfátovém pufru (pH 7,4) při teplotě 4 °C.

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.

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

Příklad 2: Příprava polymerního kartáče na skle

- 5 Skleněná destička byla opláchnuta acetonem, čištěna 20 min ultrazvukem v 50% methanolu při teplotě 20 °C a poté sonikována dalších 20 min v chloroformu. Potom byla destička opláchnuta vodou, osušena vzduchem a čištěna 4 min v UV ozonovém generátoru. Po čištění byla destička dehydratována 1 hod při teplotě ≥ 90 °C v přítomnosti silikagelu a ihned poté byla na 2 hod ponořena do 3mM roztoku iniciátoru (MeO)₃-Si-(CH₂)₁₁-Br v bezvodém n-heptanu při pokojové
- 10 teplotě. Potom byla destička opláchnuta ethanolom 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), CuCl₂ (8,4 mg) a Me₄cyclam (96,8 mg) v odplyněném methanolu (2 ml) pod dusíkovou atmosférou a sonikována ultrazvukem 5 min do úplného rozpuštění. Ve druhé Schlenkově baňce byly rozpuštěny monomery
- 15 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 přidána do reaktoru s destičkou s navázaným iniciátorem. Polymerace probíhala v uzavřeném reaktoru 2 hod
- 20 při pokojové teplotě. 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

- 25 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 min za průtoku 10 μ l/min roztokem 0,1M NHS a 0,5M EDC v deionizované vodě na aktivní ester. Po aktivaci byla zaznamenána hladina
- 30 odezvy senzoru pro povrch ve vodě. 50 μ g/ml bakteriální protilátky anti-Salmonella bylo rozpuštěno v borátovém pufru (10 mM, pH 8,5), napuštěno rychlostí 30 μ 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
- 35 protilátky a odezvy ve vodě po ukončení imobilizace (Obrázek 2, červeně označená „hladina imobilizace“ odpovídá hodnotě 206 ng/cm²).

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

- 40 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
- 45 povrchy, vykazující vysokou míru rezistence k nespecifickým vazbám a zároveň dostatečnou funkcionalizační kapacitu - kopolymer obsahující 85 mol % HPMAA a 15 mol % CBMAA

(WO2016177354A3) a homopolymer polyCBAA. Dále je uveden postup přípravy těchto polymerů:

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

5

Skleněná destička s napařenou vrstvou zlata byla čištěna 10 min v UV ozonovém generátoru, ihned poté byla opláchnuta vodou a ethanolem. Potom byla destička ponořena do 0,1mM roztoku iniciátoru ω -merkaptoundecyl bromoisobutyrate v ethanolu na 48 hodin v pokojové teplotě bez přístupu světla. Katalytická směs byla připravena ve Schlenkově baňce rozpuštěním CuCl (28 mg), CuCl₂ (8,4 mg) a Me₄cyclam (96,8 mg) v odplyněném methanolu (2 ml) pod dusíkovou atmosférou a sonikována 5 min 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 přidána ke směsi monomerů. Homogenní polymerační směs byla pod dusíkem přidána do reaktoru s destičkou pokrytou iniciátorem. Polymerace probíhala v uzavřeném reaktoru 2 hod při pokojové teplotě. Poté byla destička opláchnuta vodou a před dalším použitím byla skladována ve fosfátovém pufru při teplotě 4 °C.

polyCBAA

20

Skleněná destička s napařenou vrstvou zlata byla čištěna 10 min v UV ozonovém generátoru, ihned poté byla opláchnuta vodou a ethanolem. Potom byla destička ponořena do 0,1mM roztoku iniciátoru ω -merkaptoundecyl bromoisobutyrate v ethanolu na 48 hodin v pokojové teplotě bez přístupu světla. Katalytická směs byla připravena ve Schlenkově baňce rozpuštěním CuCl (28 mg), CuCl₂ (8,4 mg) a Me₄cyclam (96,8 mg) v odplyněném methanolu (2 ml) pod dusíkovou atmosférou a sonikována 5 min 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.

30

Polymerace probíhala v uzavřeném reaktoru 2 hod při pokojové teplotě. Poté byla destička opláchnuta vodou a před dalším použitím byla skladována ve fosfátovém pufru (pH 7,4) při teplotě 4 °C.

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 μ l/min aktivován 20 min roztokem 0,1 M NHS a 0,5 M EDC v deionizované vodě. V případě ad (a) byl povrch dále 25 min omýván borátovým pufrem (10 mM, pH 8,5, průtok 30 μ l/min), v případě ad (b) byl povrch 25 min omýván borátovým (10 mM, pH 8,5, průtok 30 μ l/min) obsahujícím konkrétní rozpuštěnou funkční entitu obsahující primární aminy. Na následující povrchy byly imobilizovány dále uvedené entity:

poly[HPMAA(84,5 mol %)-co-CBMAA(15 mol %)-co-SBMAA(0,5 mol %)]:
DNA oligonukleotid s koncovou amino skupinou (roztok o koncentraci 4 μ M);

45

poly[HPMAA(82 mol %)-co-CBMAA(15 mol %)-co-SBMAA(3 mol %)]:
anti-bakteriální protilátka anti-Salmonella (roztok o koncentraci 50 μ g/ml);

poly[HPMAA(55 mol %)-co-CBMAA(15 mol %)-co-SBMAA(30 mol %)]:
poly L-lysine (roztok o koncentraci 50 μ g/ml);

50

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

anti-bakteriální protilátka anti-Salmonella (roztok o koncentraci 50 µg/ml), nebo DNA oligonukleotid s koncovou amino skupinou (roztok o koncentraci 4 µM), nebo poly L-lysin (roztok o koncentraci 50 µg/ml);

- 5 polyCBAA: anti-bakteriální protilátka anti-Salmonella (roztok o koncentraci 50 µg/ml), nebo DNA oligonukleotid s koncovou amino skupinou (roztok o koncentraci 4 µM), nebo poly L-lysin (roztok o koncentraci 50 µg/ml).

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 µl/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 µl/min při 25 °C po dobu 10 min, následovaná opláchnutím PBS. Po 10 min 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 plasmy a 10 min 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 plasmy a 10 min po ukončení odmývání v PBS s vyšší iontovou silou. Výsledky jsou ukázány v Obrázku 2, Tabulce 2 a Tabulce 3.

Obrázek 2 dokládá, že i při koncentraci 15 mol % CBMAA v terpolymeru se na povrch naváže dostatečné množství funkčního prvku (206 ng/cm² anti-Salmonella), a přitom se dosáhne vysoké odolnosti proti nespecifické adsorpci – nespecifická adsorpce z neředěné lidské plasmy byla 0 ng/cm².

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

Nespecifická adsorpce z neředěné krevní plasmy [ng/cm ²]			
	poly[HPMAA(82 mol %)-co-CBMAA(15 mol %)-co-SBMAA(3 mol %)]	polyCBAA	poly[HPMAA(85 mol %)-co-CBMAA(15 mol %)]
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

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 odmývání elektrostaticky adsorbovaného nespecifického depozitu.

Tabulka 3 – Nespecifická adsorpce z neředěné krevní plasmy 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.

5

Nespecifická adsorpce z neředěné krevní plasmy [ng/cm ²]		
	poly[HPMAA(84,5 mol %)- co-CBMAA(15 mol %)- co-SBMAA(0,5 mol %)]	poly[HPMAA(85 mol %)- co-CBMAA(15 mol %)]
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
	poly[HPMAA(55 mol %)- co-CBMAA(15 mol %)- co-SBMAA(30 mol %)]	poly[HPMAA(85 mol %)- co-CBMAA(15 mol %)]
Po aktivaci/ukotvení poly L-lysinu/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.

10

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 min 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 1×10^7 KTJ/mL (kolonie tvořících jednotek na ml) v PBS (15 min, průtok 45 µl/min). Potom byl čip opět oplachován PBS do ustálení odezvy senzoru.

25

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).

30

Příklad 6

- Dle příkladu 1 byl na zlatém povrchu čipu připraven terpolymerní kartáč o složení 81 mol % HPMMA, 15 mol % CBMAA, 4 mol % SBMAA. Čip byl opláchnut vodou, vložen do SPR senzoru a karboxylové skupiny CBMAA byly 20 min za průtoku 10 $\mu\text{l/min}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ bakteriální protilátky anti-Ecoli v borátovém pufru (10 mM, pH 8,5) bylo za průtoku 30 $\mu\text{l/min}$ napuštěno do mikrofluidického systému SPR senzoru a imobilizováno 104 ± 25 ng/cm^2 protilátky. Následně byly reziduální aktivní estery deaktivovány 36 min 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), a nebo (3) roztok ethanolamin-O-sulfátu (0,9 M v deionizované vodě, pH 8).
- Takto připravené povrchy byly dále 10 min promývány PBS (10 mM fosfátový pufr + 150 mM NaCl + 2,7 mM KCl, pH 7,4). Potom byla injektována 100% lidská krevní plasma rychlostí 30 $\mu\text{l/min}$ při 25 °C po dobu 10 min, následovaná opět promýváním PBS. Po 10 min 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 plasmy a 10 min po ukončení injektace. Nespecifická adsorpce po odmytí PBS s vyšší iontovou silou byla určena z rozdílu odezvy senzoru v PBS před injektací krevní plasmy a 10 min po ukončení injektace PBS s vyšší iontovou silou.
- Tabulka 4: Porovnání deaktivace reziduálních aktivních esterů - nespecifická adsorpce z neředěné krevní plasmy po deaktivaci dvěma referenčními, v literatuře používanými, činidly a novým činidlem ethanolamin-O-sulfátem.

Deaktivční činidlo	Nespecifická adsorpce ze 100% krevní plasmy (ng/cm^2)	Nespecifická adsorpce ze 100% krevní plasmy/odmytí PBS s vyšší iontovou silou (ng/cm^2)
glycin	20,3	13,7
kyselina (2-aminoethoxy)octová	21,2	18,1
ethanolamin-O-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. Statistický terpolymer N-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu, karboxybetain methakrylamidu
5 a sulfobetain methakrylamidu.

2. Statistický terpolymer podle nároku 1, **vyznačený tím**, že obsahuje
- od 0,1 mol % do 40 mol % sulfobetain methakrylamidu;
10 - od 0,1 mol % do 50 mol % karboxybetain methakrylamidu; a
- N-(2-hydroxypropyl) methakrylamid tvoří v terpolymeru zbytek do 100 mol %.

3. Polymerní kartáč mající strukturu I

15
$$S - R - \text{poly(HPMAA-co-CBMAA-co-SBMAA)} \quad (\text{I})$$

kde

S je substrát, na jehož povrch lze kovalentně navázat iniciátory polymerizace;

20 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;

25 poly(HPMAA-co-CBMAA-co-SBMAA) je statistický terpolymer podle nároku 1 nebo 2;

– je kovalentní vazba.

30 4. Funkcionalizovaný polymerní kartáč mající strukturu II

$$S - R - \text{poly(HPMAA-co-CBMAA-co-SBMAA)} - F \quad (\text{II})$$

kde

35 S je substrát, na jehož povrch lze kovalentně navázat iniciátory polymerizace;

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

poly(HPMAA-co-CBMAA-co-SBMAA) je statistický terpolymer podle nároku 1 nebo 2;

45 – je kovalentní vazba;

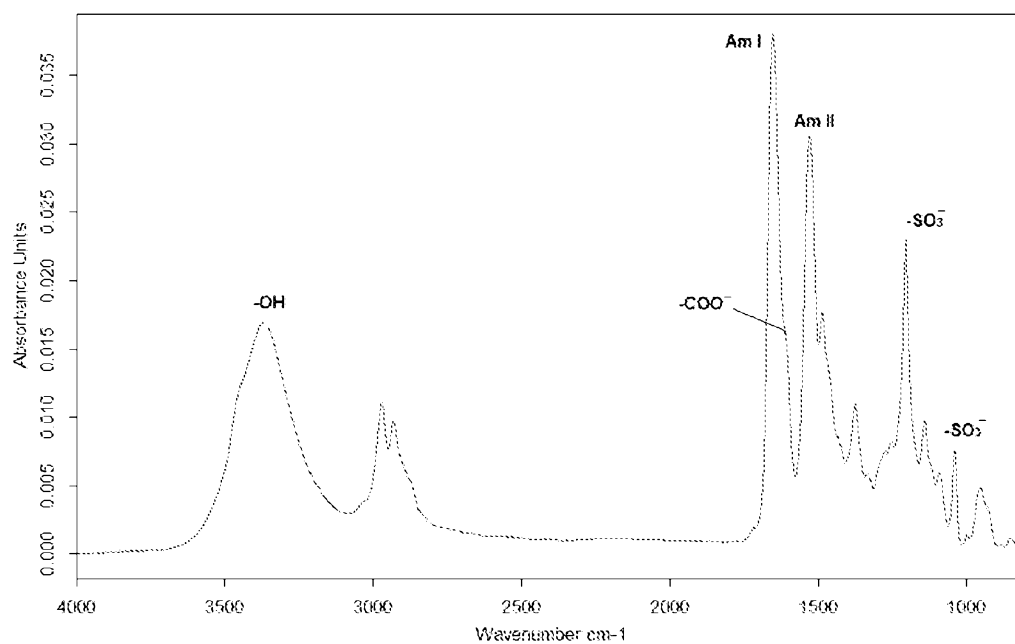
F je alespoň jedna funkční entita kovalentně navázaná na statistický terpolymer amidovou vazbou prostřednictvím aminoskupiny funkční entity, přičemž s výhodou je funkční entita vybrána ze skupiny zahrnující proteiny, protilátky, peptidy, nukleové kyseliny, oligonukleotidy.

50

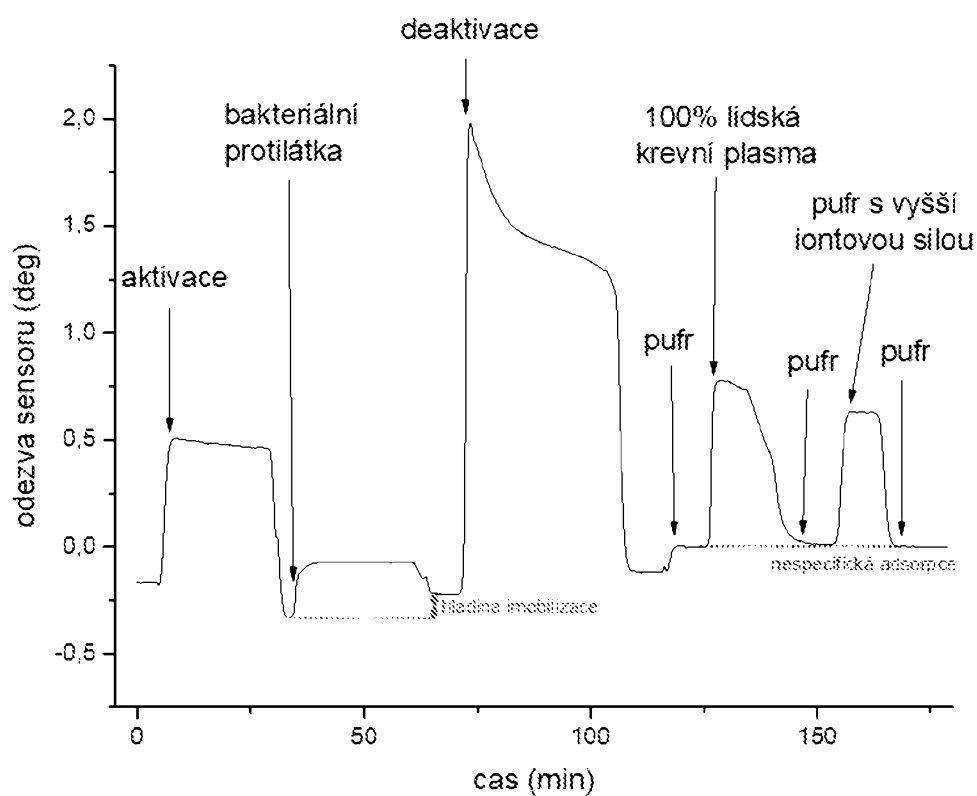
5. Polymerní kartáč podle nároku 3 nebo funkcionalizovaný polymerní kartáč podle nároku 4, **vyznačený tím**, že je tloušťka vrstvy statistického terpolymeru v polymerním kartáči 10 nm až 500 nm, s výhodou 20 nm až 300 nm, měřeno elipsometrickou metodou ve vodě.

6. Způsob přípravy funkcionalizovaných polymerních kartáčů podle nároku 4, **vyznačený tím**, že se karboxylové skupiny polykarboxybetainů v polymerním kartáči podrobí reakci s aktivačními činidly pro aktivaci karboxylu za vzniku aktivních esterových skupin; vzniklé aktivní esterové skupiny se dále podrobí reakci s aminovou skupinou funkční molekuly za vzniku amidové kovalentní vazby; a zbylé nezreagované aktivní esterové skupiny se pak podrobí reakci s ethanolamin-O-sulfátem a/nebo amino-PEG2-octovou kyselinou a/nebo glycinem.
7. Použití statistického terpolymeru podle nároku 1 nebo 2 pro zvýšení odolnosti povrchů proti nespecifické adsorpci látek z biologických médií a/nebo proti nespecifické interakci se složkami biologických médií.
8. Použití polymerního kartáče podle nároku 3 nebo funkcionalizovaného polymerního kartáče podle nároku 4 pro zvýšení odolnosti povrchu substrátu proti nespecifické adsorpci látek z biologických médií a/nebo proti nespecifické interakci se složkami biologických médií.
9. Použití funkcionalizovaného polymerního kartáče podle nároku 4 pro specifickou a selektivní interakci s cílovými analyty, zahrnujícími zejména proteiny, peptidy, nukleové kyseliny, oligonukleotidy.
10. Senzor, zejména vybraný ze skupiny zahrnující senzory rezonance povrchových plasmonů, křemenné krystalové mikrováhy nebo fluorescenční senzory, **vyznačený tím**, že obsahuje polymerní kartáč podle nároku 3 či funkcionalizovaný polymerní kartáč podle nároku 4.
11. Membrána, **vyznačená tím**, že obsahuje polymerní kartáč podle nároku 3 či funkcionalizovaný polymerní kartáč podle nároku 4.

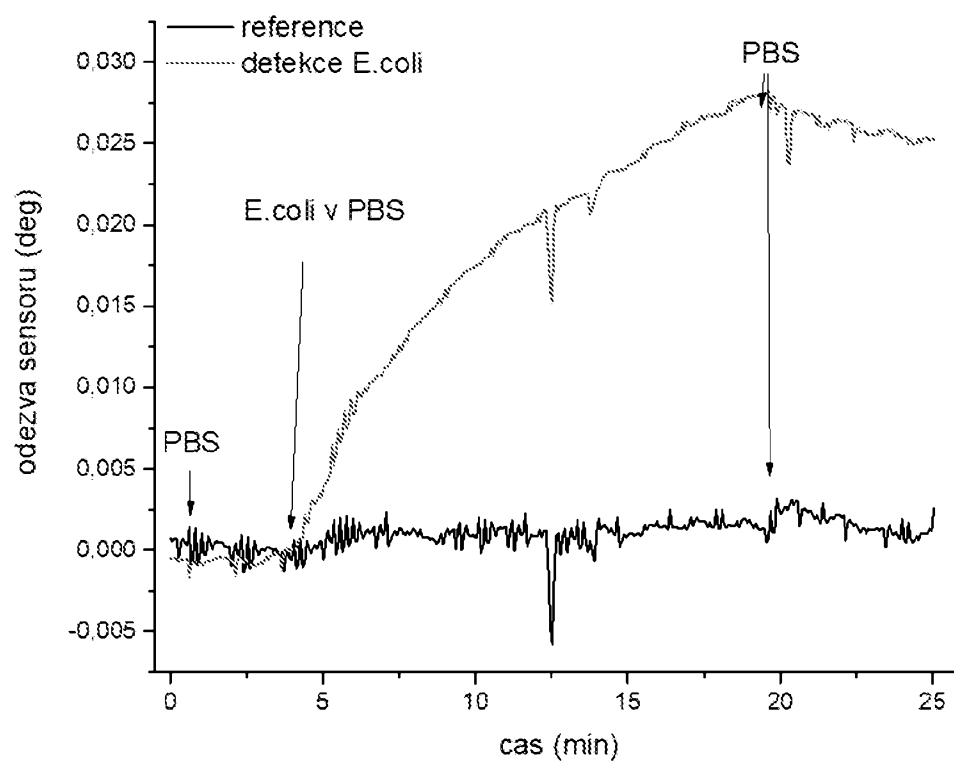
2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3