

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2015-313

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C08F 292/00 (2006.01)
C08F 20/58 (2006.01)
C08F 20/60 (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **07.05.2015**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **07.07.2016**
(Věstník č. 27/2016)

- (71) Přihlašovatel:
Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i.,
Praha 6 - Břevnov, CZ
Ústav fotoniky a elektroniky AV ČR, v. v. i., Praha
8 - Kobylisy, CZ
- (72) Původce:
Cesar Rodriguez-Emmenegger, Praha 6, CZ
Ing. František Surman, Velké Pavlovice, CZ
RNDr. Eduard Brynda, CSc., Praha 2, CZ
Ing. Tomáš Riedel, Ph.D., Praha 4, CZ
Ing. Milan Houska, CSc., Praha 5, CZ
RNDr. Hana Lísalová, Ph.D., Praha 8, CZ
prof. Ing. Jiří Homola, CSc., DSc., Praha 10, CZ
- (74) Zástupce:
INVENTIA s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na
Bělidle 3, 150 00 Praha 5

- (54) Název přihlášky vynálezu:
**Polymerní kartáče odolné proti depozici
složek biologických médií, způsob jejich
přípravy a jejich použití**

- (57) Anotace:
Řešení poskytuje polymerní kartáč odolný proti depozici
složek biologických médií obecného vzorce I M – R –
poly(HPMAA-co-CBMAA), kde M je substrát; R je
zbytek iniciátoru; poly(HPMAA-co-CBMAA) je
statistický kopolymer N-(2-
hydroxypropyl)methakrylamidu
s karboxybetainmethakrylamidem.

~~TSK~~

~~IV 2015-313~~

07.05.15

Polymerní kartáče odolné proti depozici složek biologických médií, způsob jejich přípravy a jejich použití

Oblast techniky

Vynález se týká polymerních kartáčů, tedy povrchů, které v biologických médiích, jako jsou tělní tekutiny, média obsahující buňky, potraviny a média z biologických výrob a z biologického prostředí obecně, brání nespecifické tvorbě depozitů biologických látek, buněk a mikroorganismů a současně umožňují navázání bioaktivních prvků zprostředkujících specifickou interakci povrchu s cílovými složkami biologického prostředí.

Takové povrchy jsou důležité pro mnoho biotechnologických a lékařských aplikací, jako jsou biosenzory, membrány a částice pro separaci a akumulaci biologických látek a buněk, nosiče léčiv a diagnostické částice aplikované do krevního oběhu, materiály přicházející do kontaktu s krví a nosiče buněk pro tkáňové inženýrství.

Dosavadní stav techniky

Při styku prakticky všech běžných materiálů s biologickým prostředím dochází na jejich povrchu k depozici látek, tzv. „foulingu“, které obsahují hlavně proteiny a buněčné elementy. Tyto depozity mohou zhoršovat funkci materiálů a zařízení, která pracují v biologickém prostředí. Problém je zvláště kritický pro materiály používané v kontaktu s krevním sérem, plasmou nebo krví.

V současné době jsou považovány za nejvíce odolné (tzv. „antifouling“) povrchy připravené roubováním hydrofilních elektroneutrálních polymerů, jako jsou neionogenní poly(oligo(hydroxyethylenglykol) methakrylát) (polyHOEGMA), poly(2-hydroxyethylmethakrylát) (polyHEMA), poly(3-hydroxypropylmethakrylát) (polyHPMA) poly(N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid) (polyHPMAA) a ionogenní zwitteriontové poly(karboxybetainmethakrylát) (polyCBMA) a poly(karboxybetainakrylamid) (polyCBAA), z povrchu substrátů pomocí povrchem iniciované radikálové polymerizace s přenosem atomu (ATRP). Postup spočívá v kovalentním navázání iniciátoru ATRP na povrch substrátu (M). Po přidání polymerizačního roztoku obsahujícího monomery rostou polymerní řetězce od upoutaného zbytku iniciátoru (R) postupným přidáváním monomerních jednotek, přičemž iniciační atom halogenu se vždy přenáší na konec rostoucího řetězce polymeru. Výsledkem

postupu je kartáč polymerních řetězců, „polymer brush“, což je vrstva hustě uspořádaných polymerních řetězců připoutaných jedním koncem k povrchu substrátu znázorněná schématem M-R-polymerní řetězec. Při současném stavu techniky nelze u polymerních kartáčů roubovaných z povrchu určit délku jednotlivých řetězců ani hustotu kartáče. Proto bývá kartáč charakterizován pouze tloušťkou měřenou elipsometricky nebo AFM. I když všechny výše zmíněné polymerní kartáče potlačují depozici z modelových proteinových roztoků a snižují depozici z neředěné krevní plasmy pod 50 ng/cm^2 , jsou kartáče z polyHPMAA a zwitteriontové kartáče z polyCBMA a polyCBAA v současnosti jedinými „ultra-low fouling“ povrchy snižujícími depozici z plasmy pod 5 ng/cm^2 .

Pro připojení bioaktivních látek na neionogenní polymerní řetězce je využívána aktivace jejich bočních hydroxylových skupin, která však vede k tvorbě produktů, které do velké míry zhoršují antifouling vlastnosti kartáčů.

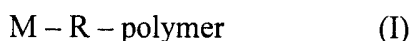
Elektroneutrální zwitteriontové boční skupiny polyCBMA a polyCBAA řetězců se skládají z karboxylového aniontu a aminového kationtu. Karboxylová skupina zwitteriontu se (obvykle pomocí EDC-NHS chemie) přemění na aktivní ester, který je následně využit pro kovalentní navázání bioaktivních prvků. U tohoto způsobu vazby se předpokládá, že přechodně vzniklý aktivní ester reaguje s aminoskupinou bioaktivní látky za vzniku amidické vazby a zbylý nezreagovaný aktivní ester se hydrolyzuje zpět na karboxylovou skupinu, nebo se může blokovat aminoethanolem, ovšem za vzniku koncové hydroxylové skupiny a již nikoli regenerace karboxylové skupiny. Podstatným faktorem pro antifouling vlastnosti je vysoká hustota polymerních řetězců v kartáči, která brání složkám biologického média interagovat přímo s povrchem substrátu. Při vysoké hustotě řetězců polykarboxybetainů může být malými aktivačními činidly aktivována většina bočních skupin polymerních řetězců, avšak jen část z nich lokalizovaná u povrchu kartáče je dostupná pro reakci s objemnějšími bioaktivními látkami. Aktivace a připojení bioaktivních látek částečně zhoršuje „ultra-low fouling“ vlastnosti polyCBMA a polyCBAA kartáčů. 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 první blok z homopolymeru polyCBMA nebo polyCBAA a druhý blok z hydrofobního polymeru, roubované z nebo 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.

Podstata vynálezu

Podstata vynálezu spočívá v naroubování vrstvy poly(HPMAA-co-CBMAA) řetězců, tj. řetězců statistického kopolymeru N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMAA) s karboxybetainmethakrylamidem (CBMAA), z povrchu substrátu.

Předmětem vynálezu je tedy kartáč polymerních řetězců (polymerní kartáč, angl. „polymer brush“) statistického kopolymeru N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMAA) s karboxybetainmethakrylamidem (CBMAA) - poly(HPMAA-co-CBMAA) - jedním koncem navázaných na substrát (ang. „end-tethered“), mající strukturu I, který je odolný proti depozici složek biologických médií



kde

M 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, činidla pro polymerizaci s reverzibilním adičně-fragmentačním přenosem RAFT;

– je kovalentní vazba;

jehož podstata spočívá v tom, že polymerem je poly(HPMAA-co-CBMAA), což je statistický kopolymer N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu s karboxybetainmethakrylamidem.

Obsah karboxybetainmethakrylamidu ve statistickém kopolymeru je s výhodou do 40 mol %, výhodněji 10 ~~mol %~~ až 30 mol %. S výhodou je tloušťka vrstvy statistického kopolymeru poly(HPMAA-co-CBMAA) v kartáči 10 ~~nm~~ až 50 nm, měřeno elipsometricky nebo metodou AFM.

Biologickými médii jsou zejména míněny 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 a potraviny.

Substrátem M je materiál, který je třeba pokrýt polymerní vrstvou propůjčující mu odolnost proti depozici složek biologických médií. Substrátem může být jakýkoliv materiál, na jehož povrch lze kovalentně navázat iniciátory polymerizace. Jsou to materiály obsahující reaktivní skupiny na povrchu nebo inertní materiály povlečené vrstvou dobře adherující k jejich povrchu a obsahující reaktivní skupiny pro navázání iniciátoru, typicky polydopamin připravený autopolymerizací na povrchu materiálu. Tvar, rozměry, morfologie a chemická povaha substrátu není 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, apod.

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.

Vhodné způsoby polymerizace, 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 ω -merkaptoundecyl bromisobutyřát na zlato, nebo iniciátor navázaný na povrchu substrátu obsahujícím karboxylové skupiny, který se připraví inkubací s roztokem kyseliny α -brom-

isomásečné, 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.

Novost předkládaného vynálezu spočívá v polymerním kartáči obsahujícím řetězce statistického kopolymeru poly(HPMAA-co-CBMAA) naroubované z povrchu substrátu s použitím iniciátorů a povrchem iniciovaných polymerací. Použití CBMAA monomeru pro polymerní kartáče dosud nebylo známo. Tento monomer je vhodný pro kopolymeraci s HPMAA, jejímž výsledkem je kartáč obsahující řetězce statistického kopolymeru poly(HPMAA-co-CBMAA).

O statistickém charakteru polymerizace připravených kopolymerů svědčí molární poměr koncentrací monomerních jednotek HPMAA a CBMAA v připravených kopolymerech, který se shoduje poměrem monomerů HPMAA a CBMAA v polymeračním roztoku. Uvedeným postupem je tedy možné vložit mezi málo reaktivní monomerní jednotky HPMAA zvolenou koncentrací statisticky dispergovaných zwitteriontových jednotek CBMAA, jejichž karboxylové skupiny lze aktivovat pro kovalentní navázání bioaktivních prvků. Použití komonomery HPMAA a CBMAA mají stejnou polymerizovatelnou funkční skupinu. Po adici jednoho nebo druhého monomeru na rostoucí polymerní řetězec, typ růstového centra zůstává zachován a oba monomery se dále adují se stejnou pravděpodobností. Výsledkem je statistické zabudování strukturních jednotek monomeru v kopolymeru.

Použití statistického kopolymeru poly(HPMAA-co-CBMAA) v polymerním kartáči namísto dosud použitých polykarboxybetainů umožňuje zabudování předem stanoveného počtu reaktivních CBMAA monomerních jednotek, které lze použít pro navázání biologicky aktivních látek do pasivního HPMAA polymerního řetězce. Při vysoké hustotě řetězců polykarboxybetainů je přítomno velké množství karboxylových skupin, které mohou být dostupné pro malá aktivizační činidla, jako jsou EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid) a NHS (N-hydroxysukcinimid), avšak jen malá část aktivovaných skupin může být dostupná pro navázání velkých biologicky aktivních látek. Měřením infračervených spekter polyCBMAA homopolymeru a kopolymerů poly(HPMAA-co-CBMAA) jsme zjistili, že po reakci významně a nevratně klesá koncentrace ionizovaných karboxylových skupin (intenzita pásu valenční vibrace C=O při 1607 cm^{-1}), čímž se narušuje elektroneutrální charakter povrchu, který je pro nonfouling vlastnosti zásadní. Přítomnost kladného náboje po EDC-NHS aktivaci poly(HPMAA-co-CBMAA) kartáče jsme potvrdili adsorpcí polyaniontu

dextranulfátu (DS) měřenou SPR. Nulová adsorpce DS při kontaktu neaktivovaného poly(HPMAA-co-CBMAA) kartáče s roztokem DS ukázala, že kartáč je elektroneutrální. Vzrůst odezvy po EDC-NHS aktivaci byl způsoben elektrostatickou adsorpcí DS na kladně nabitý kartáč, ve kterém byly karboxylové anionty zwiteriontových skupin přeměněny na elektroneutrální produkty. Iontová síla, pH a složení roztoků, se kterými byl aktivovaný kartáč inkubován nebo reakce aktivních esterů s etanolaminem neměla vliv na následnou adsorpci DS. Oproti dosavadní hypotéze, předpokládající regeneraci karboxylových aniontů spontánní hydrolyzou aktivních esterů, zůstal kartáč kladně nabitý. Nevhodně vysoká koncentrace zreagovaných karboxylových skupin je tedy kritická. Ve srovnání s dosud používanými homopolymery, použití poly(HPMAA-co-CBMAA) kopolymeru, ve kterém lze regulovat koncentraci CBMAA monomerních jednotek, snižuje vliv aktivace kartáče na zhoršení antifouling vlastností. Plné zachování antifouling vlastností poly(HPMAA) kartáče po reakci s EDC-NHS svědčí o tom, že HPMAA monomerní jednotky nemají vliv na zhoršení antifouling vlastnosti poly(HPMAA-co-CBMAA) kartáče po EDC-NHS aktivaci.

Poly(HPMAA-co-CBMAA) kartáče mají vynikající antifouling vlastnosti v biologických médiích, které jsou srovnatelné s vlastnostmi známých kartáčů z homopolymerů polyCBMA a polyCBAA, umožňují vazbu dostatečného množství bioaktivních bioreceptorů na aktivované karboxyly CBMAA jednotek, avšak na rozdíl od polyCBMA a polyCBAA, vazba biologicky aktivních látek s použitím EDC-NHS chemie nevede k výraznému zhoršení nonfouling vlastností. Optimální složení kopolymeru z hlediska udržení nonfouling vlastností a kapacity pro vazbu proteinů je 85 mol % HPMAA a 15 mol % CBMAA.

Polymerní kartáč lze připravit tak, že se na povrch substrátu kovalentně naváže prostřednictvím vazebné skupiny iniciátor polymerizace, a následně se iniciuje růst polymerních řetězců statistického kopolymeru N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu s karboxybetainmethakrylamidem z roztoku obsahujícího směs monomerů N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu a karboxybetainmethakrylamidu z iniciátoru. Karboxylové skupiny zwiteriontových jednotek CBMAA v kartáči pak lze aktivovat pro kovalentní navázání bioaktivních látek. V jednom výhodném provedení se polymerizační roztok připravuje ve vodě s přídavkem ethanolu nebo methanolu.

Kopolymer poly(HPMAA-co-CBMAA) lze použít jako součást polymerního kartáče pro pasivaci povrchu substrátu, tedy pro zabránění depozice složek biologických médií, například molekul nebo buněk, na povrchu substrátu, a/nebo proti aktivaci koagulace krve. Toto použití zahrnuje například úpravy povrchů částí zařízení a materiálů, na kterých dochází k nežádoucí depozici při kontaktu s biologickými tekutinami nebo ke koagulaci krve, například tedy antitrombotické úpravy.

V dalším provedení lze polymerní kartáče použít pro selektivní vazbu analytů, kdy se na karboxylové skupiny CBMAA kovalentně naváže biologicky aktivní látka selektivně interagující s cílovým analytem. Biologicky aktivními látkami mohou být například - proteiny, peptidy, nukleové kyseliny, oligonukleotidy a další ligandy (organické či anorganické), aniž by v důsledku vazby docházelo k podstatnému zhoršení odolnosti proti depozici biologického materiálu na tyto povrchy. Substrátem pak může být například senzor, resp. povrch senzoru, v biosenzoru, nebo sorbent. Selektivní vazba analytů může být prováděna za účelem jejich detekce, kvantifikace nebo izolace ze směsi.

Předkládaný vynález dále zahrnuje biosenzory pro přímou detekci analytů nebo víceetapňovou detekci s použitím přidaných reagentů, jako jsou SPR senzory nebo fluorescenční senzory, které obsahují polymerní kartáč podle vynálezu. Substrátem je pak typicky povrch senzoru.

Předkládaný vynález dále zahrnuje membrány obsahující 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.

Vynález umožňuje univerzální modifikaci různých substrátů obsahujících reaktivní skupiny pro navázání iniciátorů polymerizace. Na povrch inertních substrátů, na které nelze iniciátory polymerizací přímo navázat je možné deponovat kotvící mezivrstvu, na příklad polydopaminu, která obsahuje reaktivní skupiny pro navázání iniciátorů.

Objasnění výkresu
Popis vyobrazení

Obr. 1 znázorňuje jako příklad polymerního kartáče statistický kopolymer poly(HPMAA-co-CBMAA) naroubovaný z povrchu zlatého substrátu, R je zbytek ATRP iniciátoru ω -merkaptoundecylbromoisobutyrate kovalentně navázaný na zlatý povrch, m je počet monomerních jednotek HPMA a n je počet monomerních jednotek CBMAA statisticky distribuovaných v kopolyměru, t je počet všech monomerních jednotek v polymerním řetězci. Obr. 2 znázorňuje závislost povrchové koncentrace CBMAA monomerních jednotek v kopolyměru poly(HPMAA-co-CBMAA) na koncentraci CBMAA monomeru v polymerizačním roztoku obsahujícím směs HPMAA a CBMAA monomerů. Kopolymer byl na zlatém povrchu SPR čipu připraven ATR polymerací podle příkladu 1 z polymerizačních roztoků obsahujících různé koncentrace monomerů.

Obr. 3 znázorňuje úbytek koncentrace ionizovaných karboxylových skupin (intenzita pásu valenční vibrace C=O při 1607 cm^{-1}) v polyCBMAA kartáči připraveném na SPR čipu po EDC-NHS aktivaci měřený FTIR GASR spektroskopií (příklad 12). (1) polyCBMAA; (2) polyCBMAA, aktivace EDC-NHS (12 min); (3) polyCBMAA, aktivace EDC-NHS (12 min), PBS (60 min); (4) polyCBMAA, aktivace EDC-NHS (12 min), PBS (60 min), ethanolamin 60 min, voda 10 min.

akutace
Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava polymerního kartáče na zlatě

Skleněná destička napařená zlatem byla opláchnuta ethanolem a vodou a dočištěna 20 min v UV ozonolýzátoru. Destička byla ponořena do 0,1 M roztoku iniciátoru ω -merkaptoundecyl

bromoisobutyrátu v ethanolu na 24 hodin bez přístupu světla. Do Schlenkovy ampule obsahující CuCl (35 mg), CuCl₂ (10,5 mg) a Me₄Cyclam (121 mg) bylo přidáno 7 ml odplyněného methanolu a katalytická směs byla míchána do úplného rozpuštění. Ve druhé Schlenkově ampuli bylo za chlazení ledem rozpuštěno 3,1 g násady CBMAA (15 mol %) a HPMAA (85 mol %) ve 12 ml odplyněné vody a 5 ml ethanolu. Po rozpuštění byl do ampule přidán pod argonem katalytický roztok. Homogenní polymerační směs byla nadávkována pod argonem do druhé Schlenkovy ampule s vloženou destičkou pokrytou iniciátorem a směs byla polymerována 120 min při 30 °C. Potom byla destička opláchnuta vodou. Stejný postup byl použit také pro přípravu povrchových vrstev polymerizací z násady o složení 7 mol % CBMAA/93 mol % HPMAA a 30 mol % CBMAA/70 mol % HPMAA. Složení kopolymeru v povrchové vrstvě stanovené FTIR-GASR spektroskopii je v celém rozsahu stejné jako složení násady (viz obr. 2) a jedná se tedy o statistickou kopolymerizaci. Tloušťka povrchové polymerní vrstvy stanovená elipsometricky byla 30 nm.

Příklad 2

Příprava polymerního kartáče na skle

Skleněná destička byla opláchnuta ethanolem a vodou a dočištěna 20 min v UV ozonolýzátoru. Destička byla ponořena na 3 hodiny do 1 mM roztoku iniciátoru 11-(trichlorsilyl)undecyl-2-bromo-2-methylpropanoátu v suchém toluenu. Potom byla destička opláchnuta toluenem, acetonem, ethanolem a vodou a osušena. Do Schlenkovy ampule obsahující CuCl (35 mg), CuCl₂ (10,5 mg) a Me₄Cyclam (121 mg) bylo přidáno 7 ml odplyněného methanolu a katalytická směs byla míchána do úplného rozpuštění. Ve druhé Schlenkově ampuli bylo za chlazení ledem rozpuštěno 2,9 g násady CBMAA (7 mol %) a HPMAA (93 mol %) ve 12 ml odplyněné vody a 5 ml ethanolu. Po rozpuštění byl do ampule přidán pod argonem katalytický roztok. Homogenní polymerační směs byla nadávkována pod argonem do druhé Schlenkovy ampule s vloženou destičkou pokrytou iniciátorem a směs byla polymerována 120 minut při 30 °C. Potom byla destička opláchnuta vodou. Tloušťka polymerní povrchové vrstvy byla 33 nm.

Příklad 3

Příprava polymerního kartáče na nanočásticích (NC) z ε-polykaprolaktonu (PKL)

Roztok kyseliny α-brom isomáselné, 0,15 M, N-hydroxysukcinimidu (NHS), 0,05 M, a EDC, 0,2 M, ve vodě byl ponechán 7 min při 25 °C a potom převeden do suspenze nanočástic

(průměr 150 nm, $5,5 \times 10^9/\text{ml}$) a suspenze byla míchána přes noc. Potom byla suspenze dialyzována 12 hodin při pokojové teplotě přes membránu Spectra/Pore® (6 000 až 8 000 Da). Roztok CuBr_2 (8,1 mg), 2,2'-dipyridylu (145 mg) a 5,7 g násady CBMAA (15 mol %) a HPMAA (85 mol %) v 10 ml vody byl odplyněn probubláváním argonem 1 hodinu. Potom byl pod argonem přidán CuCl (37 mg) a roztok probubláván argonem dalších 30 min. Tento roztok byl přidán do 5 ml suspenze nanočástic s navázaným iniciátorem a systém byl polymerizován pod argonem při 30 °C. Distribuce velikosti nanočástic před a po modifikaci byla stanovena metodou kvazielastického rozptylu. Tloušťku polymerního kartáče bylo možné regulovat dobou trvání polymerizace 30 ~~min~~ až 150 min v rozmezí 20 ~~nm~~ až 200 nm. Pokrytí nanočástic kartáčem poly(HPMAA-co-CBMAA/15 mol %) zamezilo agregaci nanočástic při inkubaci s neředěnou krevní plasmou.

Příklad 4

Příprava polymerního kartáče na křemíku s kotvicí mezivrstvou polydopaminu (PDA)

Křemíková destička byla očištěna sonikací v methanolu a vodě, ponořena na 10 min do směsi 25% amoniaku, 30% peroxidu vodíku a vody (1:1:5, v/v/v) ohřátého na 70 °C. Potom byla opláchnuta vodou a ethanolem, usušena a čištěna 2 hodiny v UV ozonolyzátoru. Potom byla destička vložena do otevřené Petriho misky s roztokem 2 mg dopamin hydrochloridu/ml vzduchem nasyceného 10 mM Tris-HCl pufru, pH 8,5, za mírného míchání. Po 3 hodinách byla destička opláchnuta vodou, sonikována ve vodě 15 minut a osušena. Destička s vrstvou PDA (13 nm) byla ponořena do roztoku 0,24 M triethylaminu při 0 °C a umístěna do třepačky a přidán roztok 2-brom-2-methylpropanoyl bromidu (0,24 M / 10 ml tetrahydrofuran, 0 °C). Po 3 minutách byla destička vyjmuta a opláchnuta postupně tetrahydrofuranem, ethanolem a vodou a usušena. Do Schlenkovy ampule obsahující CuBr (57,3 mg), CuBr_2 (17,7 mg) a Me_4Cyclam (122,7 mg) byl pod argonem převeden odplyněný ethanol (30 ml). Modrý roztok tohoto katalyzátoru byl převeden do druhé Schlenkovy ampule obsahující (4,5 g) CBMAA (15 mol %) a HPMAA (85 mol %). Polymerizační roztok byl převeden do reaktoru obsahujícího křemíkovou destičku s kotvicí vrstvou polydopaminu a ponechán polymerizovat 2 hodiny při 30 °C. Potom byly vzorky opláchnuty ethanolem a vodou. Přítomnost polymerního kartáče poly(HPMAA-co-CBMAA/15 mol %) byla kontrolována FTIR- IRRAS spektroskopií a tloušťka vrstvy stanovená elipsometricky byla 20 nm.

Příklad 5

Antitrombogenní vlastnosti polymerního kartáče

Na povrch připravený podle příkladu 2 s kopolymerem poly(HPMAA-*co*-CBMAA/15 mol %) byla nanесena citrátová krevní plasma od zdravého dárce smíchaná s 1M roztokem CaCl₂ ve vodě. Měřena byla turbidita při 405 nm. V porovnání s neupraveným sklem došlo k osminásobnému prodloužení rekalcifikačního času (40 min vs. 5 min). Trombogenita tohoto povrchu⁴ byla dále posouzena sledováním kinetiky polymerizace plné krve. Plná krev od zdravého dárce odebraná do citrátu byla smíchána s 1M roztokem CaCl₂ ve vodě (výsledná koncentrace 0,02 M) a ihned nanесena na povrch vzorku (100 μl). V časových intervalech 5, 15 a 30 minut byla koagulace krve zastavena přidavkem 3 ml destilované vody. Po 5 minutách bylo odebráno 200 μl vzorku a množství uvolněného hemoglobinu z erytrocytů nezachycených v krevní sraženině bylo stanoveno absorbancí při vlnové délce 540 nm pomocí spektrometru. Velikost krevní sraženiny je nepřímo úměrná hodnotě absorbance. Zatímco u povrchu připraveného dle příkladu 2 nedocházelo k výraznému poklesu hladiny hemoglobinu ani po 30 minutách, u neupraveného skleněného povrchu došlo k poklesu již po 5 minutách a ve třicáté minutě bylo více než 85 % erytrocytů zachyceno v krevní sraženině.

Příklad 6

Vazba detekčních ligandů na polymerní kartáč

Na substráty s vrstvou poly(HPMAA-*co*-CBMAA) připravené podle příkladu 1, polyHPMAA a polyCBMAA byly metodou EDC-NHS navázány následující ligandy: protilátka (anti-E.coli), streptavidin a amino-modifikované oligonukleotidy (11-mer). SPR čipy pokryté polymerním kartáčem byly opláchnuty vodou, 10% kyselinou octovou, vodou, usušeny ofouknutím dusíkem a vloženy do SPR senzoru. Přidán roztok NHS, 0,1 M a EDC, 0,5 M, 50 mM, ve vodě a ponecháno reagovat 20 min. Roztok byl vyměněn za borátový pufr, 10 mM, pH 8,5, 15 min. K jednotlivým aktivovaným čipům byl přidán roztok ligandu v borátovém pufru (50 μg anti-E.coli/ml, 100 μg streptavidin/ml, oligonukleotidová sonda, 4 μM). Funkcionalizované povrchy byly regenerovány postupným propláchnutím borátovým pufr (10mM, pH 8,5, 50 min) obsahujícím 150 mM NaCl a 10 mM imidazolu, NaOH (2 mM, 3 min) a ethanolaminem (1 M, 5 min). Nakonec byl čip opláchnut vodou a odečteno množství imobilizovaného ligandu.

Tabulka 1 - Množství vázané protilátky anti-*E.coli*, streptavidinu a amino- modifikované oligonukleotidové sondy na poly(HPMAA-co-CBMAA), polyHPMAA a polyCBMAA

Polymerní kartáč	Navázaný ligand [ng/cm ²]		
	Anti- <i>E.coli</i>	Streptavidin	ON-sonda
polyCBAA*	153.2.	136.8	30.9
polyHPMAA	0.0	0.0	N/A
Poly(HPMAA-co-CBMAA/7 mol %)	20.6	N/A	2.9
Poly(HPMAA-co-CBMAA/15 mol %)	200.1	30.1	18.6
Poly(HPMAA-co-CBMAA/30 mol %)	362.2	60.8	30.6
PolyCBMAA	450.8	242.0	31.5

* Dodaný z University of Washington, Seattle, USA

Tabulka 1 dokládá, že i při snížení koncentrace CBMAA v kopolymeru na 15 mol % lze na povrch navázat dostatečné množství ligandu.

Příklad 7

Vazba povrchového antigenu viru hepatitidy B (HBsAg) na polymerní kartáč

Poly(HPMAA-co-CBMAA/15 mol %) na SPR čipu připravený podle příkladu 1 byl aktivován 10 minut vodným roztokem EDC; 0,2M a NHS, 0,05M. Potom byl povrch opláchnut krátce acetátovým pufrém (10mM; pH 5) a HEPES pufrém (10mM; pH 7,5) a přidán roztok o koncentraci 25 µg HBsAg/ml HEPES. Směs byla nechána reagovat 10 minut a potom byla destička převedena do PBS pufru. Takto připravený SPR biosenzor byl použit pro přímou detekci protilátek proti viru hepatitidy B v sérech pacientů zředěných PBS na 10 %. Výsledkem bylo rozlišení pozitivních a negativních sér pacientů a určení relativního titru protilátek proti viru hepatitidy B.

Fluorescenční biosenzor s navázaným HBsAg připravený stejným postupem byl použit v biosenzoru založeném na SPR zesílené fluorescenci. Myší monoklonální protilátky proti viru hepatitidy B v PBS metodou SPR kombinovanou s povrchově zesílenou fluorescencí po reakci s fluorescenčně značenou sekundární protilátkou. Meze detekce této metody dosáhla na tomto modelovém příkladu 10 pM.

Příklad 8**Odolnost polymerního kartáče proti nespecifické depozici z krevní plasmy a potravin před a po navázání ligandů**

Byly testovány antifouling vlastnosti kartáčů připravených podle příkladu 1 na SPR čipu. Kartáče poly(HPMAA-*co*-CBMAA) o obsahu CBMAA 7 mol %, 15 mol % a 30 mol % byly porovnány s dalšími antifouling kartáči uvedenými v tabulkách 1 a 2 (tloušťka pokrytí SPR čipu v suchém stavu byla ca 25 nm) před a po funkcionalizaci modelovým ligandem anti-E.coli metodou EDC-NHS podle příkladu 6 (na polyHPMAA se ligand touto metodou neváže, na poly(HPMAA-*co*-CBMAA/7 mol %) lze navázat pouze 20 ng/cm², na ostatní povrchy bylo navázáno 250 ~~ng~~ až 350 ng anti-E.coli/cm², viz tabulka 1). Podmínky povrchové funkcionalizace včetně aktivace byly voleny tak, aby bylo dosaženo nejefektivnější kombinace funkcionalizace a anifoulingu. SPR čipy byly vystaveny působení neředěné citrátové krevní plasmy a neředěných extraktů uvedených potravin po dobu 10 min při 25 °C.

Tabulka 2 - Fouling z neředěné krevní plasmy a neředěných potravinových extraktů. A - nemodifikované povrchy; B - povrchy funkcionalizované anti-E.coli.

	Fouling [ng/cm ²]					
	Krevní plasma	Mléko	Špenát	Okurka	Hamburgr	Salát
A- Nefunkcionalizované povrchy						
PolyCBAA*	6,8	0,0	4,8	0,0	0,0	0,0
PolyHPMAA	0,0	0,0	0,0	0,0	N/A	0,0
Poly (HPMAA- <i>co</i> -CBMAA/ 7 mol%)	0,0	0,0	0,0	0,0	N/A	0,0
Poly(HPMAA- <i>co</i> -CBMAA/ 15 mol%)	2,9	0,0	0,5	0,3	0,0	0,2
Poly(HPMAA- <i>co</i> -CBMAA/ 30 mol%)	10,0	0,6	1,2	1,4	0,0	1,4
PolyCBMAA	11,1	27,9	2,7	2,1	N/A	2,4

B. Funkcionalizované povrchy	Fouling [ng/cm ²]					
	Krevní plasma	Mléko	Špenát	Okurka	Hambu rger	Salát
PolyCBAA*	20,2	8,0	62,9	8,1	2,2	4,3
PolyHPMAA	0,0	0,0	0,0	0,0	N/A	0,0
Poly (HPMAA- <i>co</i> -CBMAA/ 7 mol%)	2,6	0,0	N/A	0,0	N/A	0,0
Poly(HPMAA- <i>co</i> -CBMAA/ 15 mol%)	8,5	1,7	3,4	0,0	0,0	0,0
Poly(HPMAA- <i>co</i> -CBMAA/ 30 mol %)	16,2	6,8	4,2	2,8	N/A	3,5
PolyCBMAA	25,4	30,5	12,2	3,4	N/A	4,9

* Dodaný z University of Washington, Seattle, USA.

Tabulka 2 dokládá, že vynikající antifouling polyHPMAA není při vystavení podmínkám funkcionalizační reakce ovlivněn a ve všech médiích zůstává pod mezí detekce metody SPR (0,3 ng/cm²). Tím se potvrzuje, že zhoršení antifoulingu při funkcionalizaci je způsobeno změnami CBMAA. V souladu s tím se při stoupajícím obsahu CBMAA v kopolymeru s HPMAA antifouling zhoršuje. Kopolymer s obsahem 15 mol % CBMAA má však při stupni funkcionalizace srovnatelném s polyCBMAA podstatně (násobně) nižší antifouling, přičemž pro některé potravinové extrakty zůstává fouling pod mezí detekce.

Příklad 9

SPR detekce patogenních bakterií v potravinových vzorcích

Patogenní bakterie *E.coli* O157:H7 (deaktivované tepelným šokem) v roztoku pufru a 100% extraktu z hamburgeru a listového salátu byly detekovány pomocí SPR čtyřkanálového senzoru. SPR čip pokrytý poly(HPMAA-*co*-CBMAA/15 mol %) připravený podle příkladu 1 byl funkcionalizován protilátkami (kanál 1^{az'}3:anti-Ecoli, kanál 4: anti-Salm) podle příkladu 6. Množství imobilizovaných protilátek na povrchu bylo ~244 ng/cm² v případě anti-E.coli (kanál 1^{az'}3), ~204 ng/cm² v případě referenčního kanálu s imobilizovanou protilátkou k *Salmonella* spp., anti-Salm (kanál 4). Detekce bakterií byla provedena ve třech krocích. V kroku I byly bakterie *E.coli* O157:H7 v koncentraci 1.5x10⁷cfu/ml detekovány v pufru PBS (kanál 1), extraktu z hamburgeru (kanál 2), extraktu z listového salátu (kanály 3 a 4). Povrch

07.05.15

senzoru byl v kontaktu s těmito roztoky po dobu 10 minut při průtoku 30 μ l/min, poté byl omyt pufrém PBS po dobu 10^{ti} minut. V kroku II byla injektována sekundární biotinylovaná protilátka k E.coli (15 minut, 5 μ g/ml) do všech kanálů pro potvrzení specifity vazby bakterií na imobilizované protilátky. V kroku III byl injektován streptavidin (100 μ g/ml, 15 minut) pro zesílení odezvy senzoru. Výsledky detekce v posunu rezonanční vlnové délky (nm) pro každý krok zvlášť jsou zobrazeny v tabulce 3. Výsledky ukazují minimální vliv matrice na detekci bakterií a vysokou specifitu vazby detekovaných látek k zachyceným receptorům.

Tabulka 3 - Odezvy senzoru (posun rezonanční vlnové délky v nm) při detekci E.coli O157:H7 na poly(HPMAA-co-CBMAA/15%) v krocích I., II. a III. Kanály 1^{2v} a 3 (měřicí) byly funkcionalizovány anti-E.coli, kanál 4 referenční anti-Salm.

Kroky detekce	Odezva SPR senzoru [nm]			
	Kanál 1- anti-E.coli / detekce v PBS	Kanál 2 – anti-E.coli / detekce v extraktu z hamburgeru	Kanál 3 - anti- E.coli / detekce v extraktu z listového salátu	Kanál 4 (ref.)- anti- Salm / detekce vPBS
I. Přímá detekce E.coli O157:H7	0,8	1,1	0,9	0,0
II. Detekce biotinované protilátky anti- Ecoli	5,5	5,6	6,3	0,0
III. Detekce streptavidinu	11,1	11,5	12,0	0,1

Příklad 10

SPR detekce microRNA

SPR čipy s poly(HPMAA-co-CBMAA/15 mol %) (tloušťka vrstvy ca. 40 nm v hydratovaném stavu) připravené podle příkladu 1 byly funkcionalizovány amino-modifikovanými oligonukleotidovými sondami pomocí optimalizované EDC-NHS chemie podle příkladu 6 (sonda – NdmiR-122, sekvence 5'-Am-MC12 - CA AAC ACC ATT G-3', 4 μ M v 10 mM boratovém pufru, pH 8,0, 30 min, průtok 7,5 μ l/min, 25^oC). Po funkcionalizaci senzoru byla detekována mikroRNA (miR-122) specificky s odezvou senzoru ~0,6 nm (100 nM, 15 minut, 30 μ l/min, 15 °C). I po čtyřech měřících / regeneračních cyklech senzoru, kdy byly pomocí injektovaného roztoku NaOH (6 mM, 5 minut, 30 μ l/min) odmyty hybridizované miRNA

molekuly z povrchu senzoru a poté opětovně injektovány, zůstala velikost odezvy senzoru na detekované oligonukleotidy bez výraznější změny.

Příklad 11

SPR detekce DNA oligonukleotidů

SPR chipy s poly(HPMAA-*co*-CBMAA/15 mol %) a polyCBAA připravené podle příkladu 1 (tloušťka vrstvy ca. 40 nm v hydratovaném stavu) byly funkcionalizovány streptavidinem pomocí EDC-NHS chemie podle příkladu 6 optimalizované pro každý typ povrchu (50 µg/ml streptavidinu v 10 mM borátovém pufru, pH 8,0, 20 min, průtok 20 µl/min, 25 °C). Biotinylované oligonukleotidové sondy s komplementární (měřicí kanál) a nekomplementární sekvencí (referenční kanál) byly navázány pomocí interakce streptavidin-biotin na povrch senzoru (200 nM, PBS, 15 minut, 20 µl/min, 25 °C). Detekované oligonukleotidy byly poté injektovány přes měřicí a referenční kanál (200 nM, PBS, 15 min, 30 µl/min, 25 °C). Počet molekul sond na jednu molekulu streptavidinu byl stanoven na průměrnou hodnotu 3,1 pro povrch s poly(HPMAA-*co*-CBMAA/15 mol %) a 3,2 pro polyCBAA. Počet molekul detekovaného oligonukleotidu na sondu byl v průměru 0,9 pro poly(HPMAA-*co*-CBMAA/15 mol %) a 0,8 pro polyCBAA. Na obou typech polymerních kartáčů bylo tudíž dosaženo srovnatelné efektivity zachycení cílových molekul.

Příklad 12

Porušení elektroneutality CBMAA zwitteriontových bočních skupin kartáčů EDC-NHS aktivací

FTIR GASR spektra kartáče polyCBMAA homopolymeru ukazují, že po EDC-NHS aktivaci významně a nevratně klesá koncentrace ionizovaných karboxylových skupin (intenzita pásu valenční vibrace C=O při 1607 cm⁻¹) – obr. 3.

Náboj na površích poly(HPMAA-*co*-CBMAA/15 mol %) byl charakterizován SPR metodou pomocí měření množství polyaniontu dextran sulfátu (DS), který se adsorboval k povrchu pomocí elektrostatických interakcí. Neaktivované polymerní kartáče a povrchy po aktivaci EDC-NHS chemií za různých podmínek ošetření byly inkubovány roztokem DS (MW 9 kDa, 10 min, 1 mg/ml v 10 mM fosfátovém pufru, pH 6) a poté reverzibilně odmyty z povrchu roztokem fosfátového pufru s vysokou iontovou silou (500 mM NaCl, pH 8). Množství adsorbovaného DS je ukázáno v tabulce 4. Detailní popis podmínek ošetření povrchu je

uveden níže. Z tabulky je vidět, že po aktivaci EDC-NHS zůstal na původně elektroneutrálním povrchu kladný náboj, který způsobil výraznou adsorpci polyaniontů DS. I přes použití různých podmínek omývání povrchu (vysoká iontová síla promývacího pufru, vyšší pH, aj.) se nepodařilo povrchu vrátit původní elektroneutralitu.

Podmínky ošetření povrchu:

N1 – povrch opláchnut vodou, poté 10 min inkubace s PBS.

N2 – povrch opláchnut vodou, 10% (w/w) kyselinu octovou, vodou, 10 minut inkubace v PBS.

A1 – inkubace ve vodě po dobu 2 minuty (po aktivaci EDC-NHS).

A2 - inkubace s 10 mM borátovým pufrem, pH 8 (15 minut), 10 mM borátový pufr, 10 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8 (54 minut).

A3 - inkubace s 10 mM borátovým pufrem, pH 8 (15 minut), 10 mM borátový pufr, 10 mM imidazol, pH 8 (117 minut).

A4 - inkubace s 10 mM borátovým pufrem, pH 8 (15 minut), 10 mM borátový pufr, 10 mM NaCl, 10 mM imidazol (148 minut), 5 mM NaOH (2 minuty).

A5 - inkubace s 10 mM borátovým pufrem, pH 8 (15 minut), 10 mM borátový pufr, 10 mM NaCl, 10 mM imidazol (148 minut), 5 mM NaOH (2 minuty), PBS (20 minut) a 10 mM borátový pufr, 500 mM NaCl, pH 9 (5 minut).

A6 - inkubace s 10 mM borátovým pufrem, pH 8 (15 minut), 10 mM borátový pufr, 10 mM NaCl, 10 mM imidazol (148 minut), 5 mM NaOH (2 minuty), 1 M etanolamin (10 minut), PBS (20 minut) a 10 mM borátový pufr, 500 mM NaCl, pH 9 (5 minut).

A7 - inkubace s 10 mM borátovým pufrem, pH 8 (15 minut), 10 mM borátový pufr, 10 mM NaCl, 10 mM imidazol (148 minut), 5 mM NaOH (2 minuty), 1 M etanolamin (10 minut).

A8 - inkubace s 10 mM borátovým pufrem, pH 8 (15 minut), 10 mM borátový pufr, 10 mM NaCl, 10 mM imidazol (148 minut), 5 mM NaOH (2 minuty), 1 M etanolamin (10 minut), 10 mM borátový pufr, 10 mM NaCl, 100 mM imidazol (20 minut).

07.05.15

Tabulka 4: Vliv EDC-NHS aktivace kartáče poly(HPMAA-co-CBMAA/15 mol %) na množství adsorbovaného polyaniontu DS

Typ ošetření povrchu poly(HPMAA-co-CBMAA/ 15 mol %)	Adsorbovaný DS [ng/cm ²]
NEAKTIVOVANÝ POVRCH	
N1	0.0
N2	0.3
POVRCH PO EDC-NHS AKTIVACI	
A1	47.6
A2	40.8
A3	45.9
A4	47.6
A5	47.6
A6	44.2
A7	49.3
A8	49.3

~~DIK~~

~~PV 2045 345~~

10.02.10

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Polymerní kartáč odolný proti depozici složek biologických médií, mající strukturu I



kde

M 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, činidla pro polymerizaci s reverzibilním adičně-fragmentačním přenosem RAFT;

– je kovalentní vazba

vyznačující se tím, že

polymerem je poly(HPMAA-co-CBMAA), což je statistický kopolymer N-(2-

— hydroxypropyl)methakrylamidu s karboxybetainmethakrylamidem.

2. Polymerní kartáč podle nároku 1, vyznačující se tím, že obsah karboxybetainmethakrylamidu ve statistickém kopolymeru je v rozmezí 10 až 30 mol %.

3. Polymerní kartáč podle nároku 1 nebo 2, vyznačující se tím, že obsahuje statistický kopolymer poly(HPMAA-co-CBMAA) v tloušťce vrstvy v rozmezí 10 ~~nm~~ až 50 nm.

4. Použití poly(HPMAA-co-CBMAA) jako součásti polymerního kartáče podle nároku 1 pro pasivaci povrchu substrátu M vůči depozici a/nebo adhezi složek biologických médií, zejména molekul a/nebo buněk, a/nebo proti aktivaci koagulace krve.

5. Použití polymerního kartáče podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro selektivní interakci s analyty, vybranými ze skupiny zahrnující proteiny, peptidy, nukleové kyseliny, oligonukleotidy, kdy se karboxylové skupiny jednotek karboxybetainmethakrylamidu nejprve aktivují 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimidem, popřípadě s N-
— hydroxysukcinimidem na reaktivní meziprodukty, a následně se na tyto reaktivní meziprodukty kovalentně naváže alespoň jedna biologicky aktivní látka, vybraná ze skupiny

zahrnující proteiny, peptidy, nukleové kyseliny, oligonukleotidy, selektivně interagující s cílovým analytem.

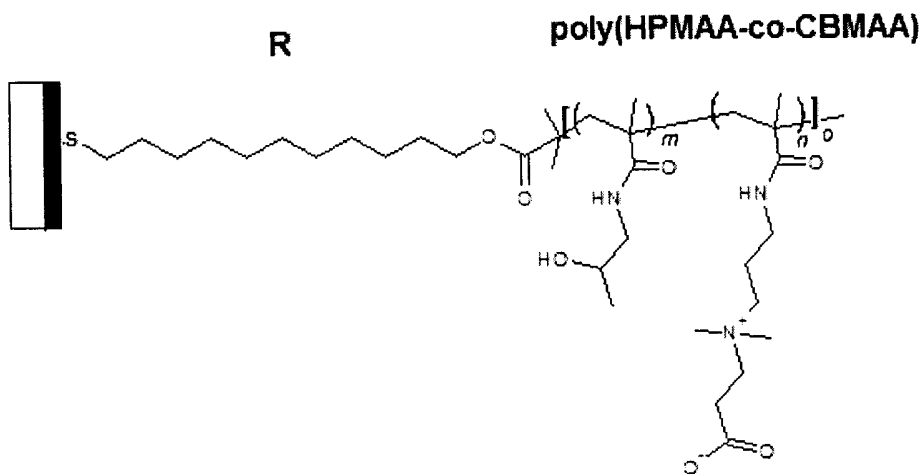
6. Biosenzory, vyznačující se tím, že obsahují polymerní kartáč podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde substrátem je povrch senzoru, s výhodou jsou biosenzory vybrány ze skupiny zahrnující senzory pro přímou detekci analytů nebo víceetapňovou detekci s použitím přidaných reagentů, jako jsou senzory resonance povrchového plasmonu SPR nebo fluorescenční senzory.

7. Separační membrány, vyznačující se tím, že obsahují polymerní kartáč podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, přičemž substrátem je membrána.

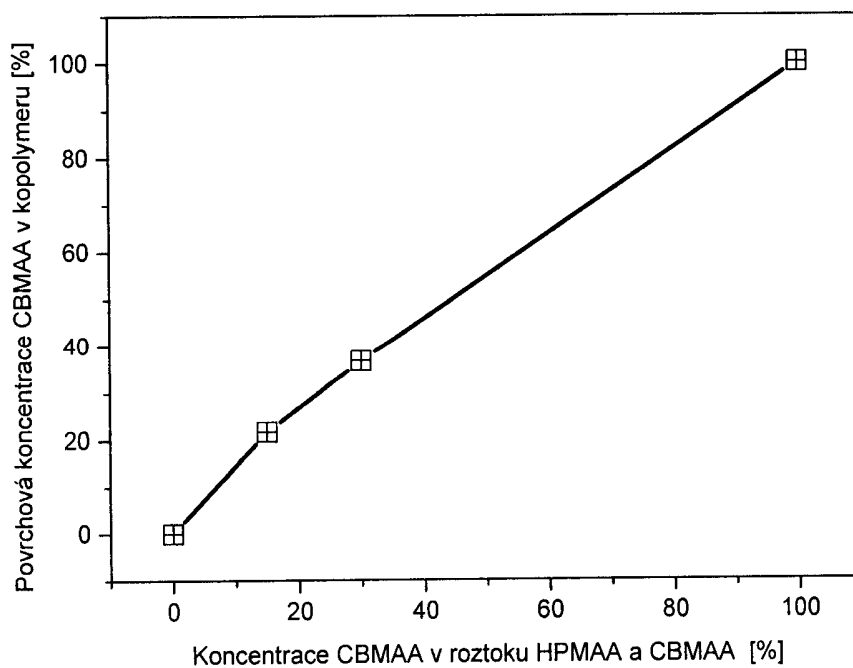
TISK

1/2

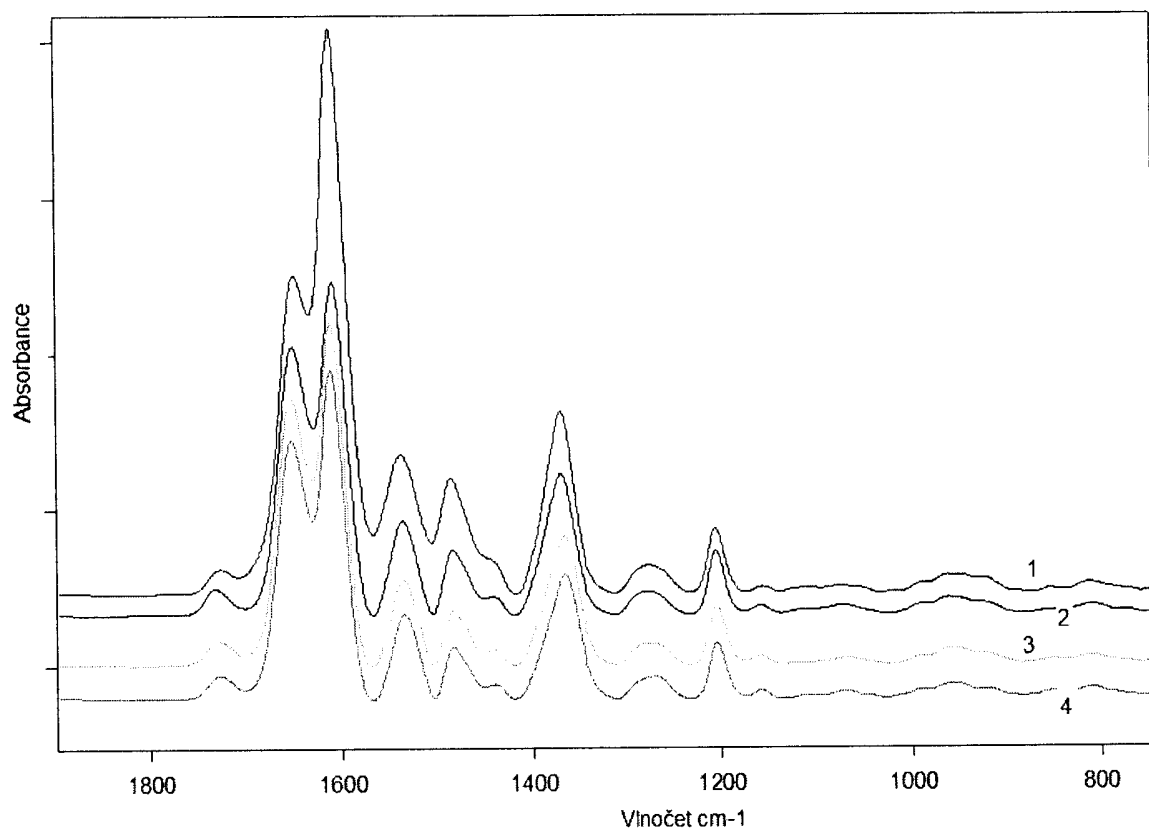
PV 2015-313
07.05.15



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3