

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 026

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-361**
(22) Přihlášeno: **17.06.2016**
(40) Zveřejněno: **22.11.2017**
(Věstník č. 47/2017)
(47) Uděleno: **11.10.2017**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **22.11.2017**
(Věstník č. 47/2017)

C08F 292/00 (2006.01)
C08F 20/58 (2006.01)
C08F 20/60 (2006.01)
C08F 8/30 (2006.01)
C07C 231/02 (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

- (56) Relevantní dokumenty:
Chou Y.-N. a kol.: "Ultra-low fouling and high antibody loading zwitterionic hydrogel coatings for sensing and detection in complex media", Acta Biomaterialia 2016, 40, 31-37 (publ. online 16.4.2016); Vaisocherová H. a kol.: "Functionalized ultra-low fouling carboxy- and hydroxy-functional surface platforms: functionalization capacity, biorecognition capability and resistance to fouling from undiluted biological media", Biosensors and Bioelectronics 2014, 51, 150-157; Lísalová H. a kol.: "Ultralow-fouling behavior of biorecognition coatings based on carboxy-functional brushes of zwitterionic homo- and co-polymers in blood plasma: functionalization matters", Analytical Chemistry, <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.6b04731>, 24.2.2017.
US 7 943 370 B2; WO 2009/130 233 A1; WO 03/083 040 A2.

- (73) Majitel patentu:
Ústav fotoniky a elektroniky AV ČR, v. v. i., Praha
8, Kobylisy, CZ
Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i.,
Praha 6, Břevnov, CZ

aminoethoxy)octovou reagují aktivní estery, na nichž
nedošlo ke kovalentnímu navázání bioaktivní látky.

- (72) Původce:
RNDr. Hana Lísalová, Ph.D., Praha 8, CZ
RNDr. Eduard Brynda, CSc., Praha 2, CZ
Mgr. Ivana Višová, Česká Třebová, CZ
Ing. Milan Houska, CSc., Praha 5, CZ
Ing. František Surman, Velké Pavlovice, CZ
Mgr. Kateřina Mrkvová, Praha 5, CZ
dipl. Ing. Xue Chadtová Song, Praha 9, 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 vynálezu:
**Způsob přípravy povrchu substrátu
obsahujícího karboxybetainové funkční
skupiny**

- (57) Anotace:
Předkládané řešení se týká způsobu přípravy povrchu substrátu obsahujícího karboxybetainové funkční skupiny s navázanými bioaktivními látkami a majícího rezistenci proti nežádoucí depozici složek biologických médií na povrchu substrátu, obsahujícího kroky chemické aktivace karboxybetainových funkčních skupin na povrchu substrátu převedením karboxylátové složky karboxybetainu na aktivní ester, kovalentního navázání bioaktivní látky na část aktivních esterů a podrobení produktu z předchozího kroku reakci s kyselinou (2-aminoethoxy)octovou, přičemž s kyselinou (2-

CZ 307026 B6

Způsob přípravy povrchu substrátu obsahujícího karboxybetainové funkční skupiny

Oblast techniky

5

Vynález se týká způsobu přípravy povrchu substrátu obsahujícího karboxybetainové funkční skupiny s navázanými bioaktivními látkami, která zvyšuje rezistenci povrchu proti nežádoucí biologické depozici při kontaktu s biologickými médii.

10

Dosavadní stav techniky

Při styku prakticky všech běžných materiálů s biologickým médiem dochází na jejich povrchu k biologické depozici, tzv. "fouling", začínající adsorpcí biologických molekul, hlavně proteinů, na které podle složení daného média mohou adherovat buňky a mikroorganismy následované dalšími biologickými procesy, jako je koagulace krve, zánětlivé a imunitní reakce nebo tvorba bakteriálních biofilmů. Výsledné biologické depozity mohou zhoršovat funkci materiálů a zařízení, která pracují v biologických médiích, jako jsou tělní tekutiny, média obsahující buňky, potraviny a média z biologických výrob a z biologického prostředí obecně. Problém je zvláště kritický pro materiály používané v kontaktu s krevním sérem, plazmou nebo krví. Proto jsou povrchy, které v biologických médiích brání nespecifické tvorbě biologických depozitů a současně umožňují navázání bioaktivních prvků zprostředkujících specifickou interakci povrchu s cílovými složkami biologického prostředí, velmi důležité pro mnoho biotechnologických a lékařských aplikací, např. jako 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, tzv. scaffolds, pro tkáňové inženýrství.

Za nejvíce odolné proti biologické depozici (tzv. "antifouling") jsou v současné době považovány povrchy připravené roubováním hydrofilních elektroneutrálních polymerů, jako jsou neionogenní poly(oligo(hydroxyethylen glykol) methakrylát) (polyHOEGMA), poly(2-hydroxyethyl methakrylát) (polyHEMA), poly(3-hydroxypropyl methakrylát) (polyHPMA), poly(*N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamid) (polyHPMAA) a zwitteriontové poly(karboxybetain methakrylát) (polyCBMA) a poly(karboxybetain akrylamid) (polyCBAA), z povrchu substrátů (tzv. "grafting from") pomocí povrchem iniciované radikálové polymerizace s přenosem atomu (SI ATRP). Výsledný kartáč polymerních řetězců, tzv. "polymer brush", je vrstva hustě uspořádaných polymerních řetězců navázaných jedním koncem k povrchu. Kartáče z polyCBAA, polyCBMA a polyHPMAA jako jediné účinně potlačují i depozici z nefeděné krevní plazmy a séra.

Alternativní metodou je připojení polymerních řetězců připravených polymerací v roztoku k povrchu (tzv. "grafting to"). Menší hustota polymerních řetězců dosahovaná v kartáčích připravených touto metodou oproti kartáčům připraveným metodou „grafting from“ poskytuje povrchu slabší odolnost proti biologické depozici.

Ještě slabší odolnost zejména proti depozici z krevní plazmy a séra poskytují často používané vrstvy karboxymethyldextranu nebo povlaky ze samoorganizovaných monovrstev (SAMs) ze směsi molekul $(CH_2)_{11}(EO)_4$ a $(CH_2)_{11}(EO)_6OOH$, kde EO je ethylenoxid, jejichž povrch je tvořen hustě uspořádanými oligoethylenoxidy obsahujícími v některých pozicích karboxylové skupiny používané pro navázání bioaktivních látek.

Pro navázání bioaktivních látek na neionogenní polymerní řetězce je používána aktivace hydroxylových skupin v jejich postranních řetězcích. Zbytkové produkty této aktivace, které zůstávají na polymerech po navázání bioaktivních látek, do velké míry zhoršují odolnost kartáčů proti biologické depozici. Povrchy s požadovanou biologickou aktivitou a lepší odolností proti depozici byly připraveny navázáním bioaktivních látek na kartáče z polyCBMA nebo polyCBAA, mající karboxybetainové zwitterionty jako postranní skupiny polymerních řetězců. Kartá-

če z polyCBMA a polyCBAA s bioaktivními látkami navázanými na karboxybetainové postranní skupiny polymerů jsou zahrnuty mimo jiné v dokumentech US 2014/0 370 567 a US 2013/0 244 249. Patentová přihláška PV 2015–313 popisuje kartáče z poly(HPMAA-*co*-CBMAA) roubované kopolymerizací monomerů HPMAA a karboxybetainakrylamidu (CBMAA) z povrchu různých substrátů včetně polymerních nanočástic a navázání bioaktivních látek na jejich aktivované karboxybetainové skupiny. WO 2016/177 354, která navazuje na PV 2015–313, zahrnuje i přípravu kartáčů z poly(HPMAA-*co*-CBMAA) připravených polymerací v roztoku a kovalentně roubovaných na povrch substrátu. Ke stavu techniky patří i hydrogely z kopolymerů poly(HEMA-*co*-CBMAA) odolné proti biologické depozici (Kostina, et al., *Bio-macromolecules* 2012, 13, 4164–4170) nebo sorbenty, jejichž povrch je modifikován připojením karboxybetainových zwitteriontů (WO 2014/165 421 A1).

Bioaktivní látky obsahující jednu nebo více aminoskupin se na karboxybetainové skupiny navazují prakticky výhradně reakcí s karboxylem karboxybetainového zwitteriontu, který se napřed aktivuje na meziprodukt snadno reagující s nukleofilní aminoskupinou navazované bioaktivní látky. Tato aktivace se provádí převážně reakcí s různými *N*-substituovanými karbodiimidy (DCI) za vzniku aktivního esteru *O*-acylisomočoviny. Tento meziprodukt však má ve vodném prostředí extrémně nízkou životnost a rychle se hydrolyzuje, takže vazebná reakce s aminoskupinou má nedostatečný výtěžek. Z tohoto důvodu se reakce provádí v přítomnosti *N*-hydroxysukcinimidu (NHS) nebo jeho derivátů, který rychle reaguje s *O*-acylisomočovinou za vzniku aktivního NHS-esteru. NHS-ester má vyšší reaktivitu vůči aminoskupině než *O*-acylisomočovinu a je stabilnější vůči hydrolýze, takže se lépe dosahuje požadovaného výtěžku. Reakce NHS-aktivního esteru i *O*-acylisomočoviny s aminoskupinou vede v obou případech ke stejné vazbě bioaktivní látky na karboxybetainovou skupinu amidickou vazbou.

Nezareagované NHS-aktivní estery vytvořené aktivací 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid/*N*-hydroxysukcinimidem (EDC/NHS) pouze karboxylových skupin (nikoli karboxybetainů), např. na povrchu výše zmíněných SAMs, se ve vodném prostředí samovolně hydrolyzují zpět na karboxylové skupiny. Deaktivace NHS-aktivních esterů zlepšuje odolnost povrchu vůči depozici biologických látek, proto je často pro lepší zajištění deaktivace aktivních esterů, zbylých po navázání bioaktivních substancí na karboxylové skupiny v SAMs nebo karboxymethyldextranu, používána inkubace s roztokem ethanolaminu (US 5 561 069 A). Popsána byla také deaktivace aldehydových skupin na modifikovaném polyethylenglykolu, PEG-CH=O, reakcí s ethanolaminem a glycinem (Wildling et al. *Bioconjugate Chem.* 2011, 22, 1239–1248), nicméně deaktivace glycinem vedla v porovnání s ethanolaminem ke zvýšení nespecifické depozice, zřejmě v důsledku zavedení nadbytečného náboje karboxylu.

Přestože se obecně předpokládalo, že meziprodukty *O*-acylisomočovina i NHS-aktivní estery, které nezareagovaly s aminoskupinou, se po vazebné reakci mohou kvantitativně hydrolyzovat zpět na karboxylové skupiny, k regeneraci karboxylových skupin karboxybetainových zwitteriontů po aktivaci metodou DCI/NHS samovolnou hydrolýzou nedochází. Naše studie založené na reflexní IČ spektroskopii ukázaly, že v případě po aktivaci karboxybetainů reakcí s 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidem (EDC), který je nejčastěji používaným DCI, a NHS nedochází ke kvantitativní regeneraci karboxylových skupin, a to ani dlouhodobým působením vodných roztoků s různým složením elektrolytů, iontovou silou a pH.

Vzhledem k míře a šíři použití karboxybetainových skupin pro navázání biologicky aktivních látek na různé povrchy se regenerace nezareagovaných aktivních esterů na molekulu zakončenou karboxylovou skupinou jeví jako klíčová pro snížení biologické depozice (fouling) na těchto površích.

US 7 943 370 B2 popisuje přípravu povrchu substrátu obsahujícího karboxybetainové skupiny převedením karboxybetainu na aktivní ester, kovalentním navázáním bioaktivní látky a deaktivací nezareagovaných aktivních esterů pomocí glycinu nebo β -alaninu. Dokumenty Chou Y.-N. a kol., *Acta Biomaterialia* 2016, 40, 31 – 37 a Vaisocherová H. a kol., *Biosensors and Bioelectro-*

nics 2014, 51, 150 – 157 popisují přípravu povrchu substrátu obsahujícího karboxybetainové skupiny převedením karboxybetainu na aktivní ester, kovalentním navázáním bioaktivní látky a deaktivaci nezreagovaných aktivních esterů pomocí glycinu. WO 2009/130 233 A1 popisuje přípravu halogenovaných povrchů s potenciálním obsahem karboxybetainových skupin převedením karboxylové skupiny na aktivní ester, kovalentní navázání bioaktivní látky a deaktivaci nezreagovaných aktivních esterů pomocí glycinu. Vaisocherová H. a kol., Biosensors and Bioelectronics 2014, 51, 150 – 157 popisují přípravu povrchu substrátu obsahujícího karboxybetainové skupiny převedením karboxybetainu na aktivní ester, kovalentní navázání bioaktivní látky a deaktivaci nezreagovaných aktivních esterů pomocí glycinu.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká regenerace aktivních esterů karboxybetainových skupin způsobem přípravy povrchu substrátu, obsahujícího karboxybetainové funkční skupiny, který vede k nahrazení nezreagovaných aktivních esterů, zbylých po navázání bioaktivní látky na některé z aktivovaných karboxybetainových zwitteriontů, kyselinou (2-aminoethoxy)octovou. Části výrobku nebo zařízení, jejichž povrch má vykonávat nějakou aktivní funkci v biologickém médiu, která by mohla být ovlivněna biologickou depozicí, a jejichž povrch obsahuje karboxybetainové skupiny, mohou být z organických i anorganických materiálů, mohou mít libovolnou morfologii, např. částice, membrány, trubky, hadičky, destičky, porézní materiál, síť vláken, a různé použití v kontaktu s biologickým médiem, např. jako biosenzory, afinitní částice a membrány pro separaci a akumulaci biologických látek, cílené nosiče pro dopravu léčiv, biomateriály pro tkáňové inženýrství, antitrombogenní materiály pro kontakt s krví.

Předkládaný vynález spočívá v tom, že ihned po aktivaci karboxybetainových skupin a navázání biologicky aktivních látek se povrch substrátu inkubuje s roztokem kyseliny (2-aminoethoxy)octové. Během této inkubace koncová aminoskupina této molekuly reaguje s aktivními estery, které nebyly spotřebovány při předchozím navázání biologicky aktivních látek. Volná karboxylová skupina v části molekuly, která nahradila aktivní ester, vytvoří nový zwitteriont s kationtem kvartérního dusíku zbylým po aktivaci původní karboxylové skupiny. Uvedeným postupem je neutralizována reaktivita zbytkových aktivních esterů a současně kompenzován kladný náboj kationtů kvartérního dusíku a tím opět zvýšena odolnost povrchu proti biologické depozici. Technický efekt způsobu přípravy povrchu substrátu obsahujícího karboxybetainové funkční skupiny se projeví zejména (ale nikoliv pouze) u polymerních kartáčů s vysokou hustotou polymerních řetězců obsahujících karboxybetainové postranní skupiny. Malé molekuly aktivačních reagentů mohou pronikat mezi polymerní řetězce a reagovat s karboxybetainy v celém objemu kartáče, zatímco pro navázání velkých bioaktivních látek, např. proteinů, jsou dostupné pouze karboxybetainy blízko povrchu vrstvy.

Předmětem předkládaného vynálezu je způsob přípravy povrchu substrátu obsahujícího karboxybetainové skupiny, se zvýšenou odolností proti nežádoucí depozici složek biologických médií na povrch substrátu, obsahující kroky:

a) chemická aktivace karboxybetainových skupin na povrchu substrátu převedením karboxylové skupiny karboxybetainu na aktivní ester;

b) kovalentní navázání bioaktivní látky reakcí její aminoskupiny s aktivním esterem připraveným v kroku a);

přičemž po kroku b) se provede krok c), ve kterém produkt z kroku b) reaguje s kyselinou (2-aminoethoxy)octovou,

kdy s kyselinou (2-aminoethoxy)octovou reagují aktivní estery, na nichž nedošlo v kroku b) ke kovalentnímu navázání bioaktivní látky. S výhodou se krok c) provede při zásaditém pH, výhodněji při pH v rozmezí od 7,5 do 9, nejvýhodněji při pH 8.

- 5 Karboxybetainové skupiny mohou být buď přímo součástí materiálu substrátu, nebo mohou být připojeny k povrchu substrátu, např. jako součást molekul naroubovaných na povrch substrátu nebo substrát může být pokryt vrstvou obsahující tyto skupiny, např. polymerním kartáčem připraveným povrchem iniciovanou polymerací z povrchu substrátu (grafting from) nebo připraveným připojením polymerních řetězců připravených polymerací v roztoku k povrchu (grafting to).

10 Karboxybetainové skupiny jsou odborníkovi v oboru dobře známé a jsou obecně definované jako neutrální chemické skupiny obsahující kvartérní amoniový kationt, který nenesé žádný vodíkový atom, a negativně nabitou karboxylovou skupinu, která nesousedí přímo s kvartérním amoniovým kationtem (IUPAC, Compendium of Chemical Terminology).

15 Substrátem se pro účely předkládaného vynálezu rozumí objekt, který je odolný proti depozici složek biologických médií, nebo který je třeba pokrýt polymerní vrstvou propůjčující mu odolnost proti depozici složek biologických médií (lze na něj naroubovat polymerní kartáč, nebo na něj lze nanést polymerní povlak). Substrátem tak může být:

20 (1) objekt, jehož povrch je pokryt vrstvou polymerního kartáče roubovanou z povrchu (grafting from) živou radikálovou polymerizací, viz PV 2015–313 a WO 2016/177 354,

25 (2) objekt, jehož povrch je pokryt vrstvou polymerů připravených v roztoku a následně připojených k povrchu kovalentní vazbou nebo fyzikální adsorpcí (grafting to), viz WO 2016/177 354,

(3) objekt, jehož povrch je pokryt polymerací iniciovanou radikály vytvořenými chemickou nebo fyzikální aktivací povrchu objektu,

30 (4) objekt, jehož povrch je povlečen adhezující vrstvou polymerů nanesenou z roztoku (polymerní povlak),

(5) objekt, jehož povrch lze modifikovat navázáním molekuly obsahující karboxybetainové zwitterionty,

35 (6) objekt, který obsahuje karboxybetainové zwitterionty ve své struktuře, např. polymerní gel, kde některé monomerní jednotky obsahují karboxybetainové zwitterionty.

40 Polymerní vrstvy vytvořené na objektech (1), (2), (3) a (4) vždy obsahují alespoň jeden homopolymer nebo kopolymer obsahující karboxybetainové zwitterionty v bočních řetězcích. Ve vrstvách na objektech (2) a (4) mohou být polymery obsahující karboxybetainové zwitterionty ve směsi s hydrofilními polymery, s výhodou vybranými z polyHPMAA, polyHOEGMA, polyHEMA, a polyHPMA.

45 S výhodou jsou vrstvy na objektech (1), (2), (3) a (4) vytvořené z homopolymeru vybraného ze skupiny zahrnující polyCBMAA, polyCBMA a polyCBAA nebo z kopolymeru poly(A-co-B), kde A je monomerní jednotka vybraná ze skupiny obsahující HPMAA, HOEGMA, HEMA, HPMA a B je monomerní jednotka v koncentraci 1 až 99 mol. %, vybraná ze skupiny obsahující CBMAA, CBMA, CBAA.

50 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 hlinítokřemičitanů (např. sklo), polymery, anorganické materiály, apod.

55

Biologické médium je pro účely předkládaného vynálezu tekutina obsahující biologické látky, tj. biomolekuly a jejich asociáty (proteiny, sacharidy, polysacharidy lipidy, nukleové kyseliny, lipoproteiny, glykoproteiny, organely atd.), viry, buňky, mikroorganismy a jejich fragmenty. Biologickým médiem je tedy např. krev a ostatní tělní tekutiny, krevní plazma a sérum, tkáňové extrakty, buněčné lyzáty a suspence, potravinové extrakty.

Bioaktivní (biologicky aktivní) látkou v předkládaném vynálezu je látka, obsahující alespoň jednu NH_2 skupinu, selektivně interagující s cílovou složkou biologického média. Bioaktivní látka může mít afinitu k cílové složce, typicky je bioaktivní látkou přírodní protilátka, antigen, lektin a buněčný receptor a jejich umělé analogy a části připravené rekombinantní technikou a syntetické oligopeptidové sekvence, nukleové kyseliny a jejich části a syntetické oligonukleotidové sekvence a aptamery. Bioaktivní látka může katalyzovat chemickou přeměnu cílové látky, např. enzym, koenzym a jejich syntetické analogy. Nebo může bioaktivní látka vyvolávat biologickou odezvu, jako např. antikoagulant, např. heparin, proteiny a oligopeptidové sekvence reagující s buněčnými integriny, růstové faktory, hormony, a deriváty léčiv a vitamínů. Bioaktivními látkami mohou být také například nanočástice funkcionalizované NH_2 skupinou, zejména kovové, polymerní, silikonové nanočástice, nanočástice na bázi oxidů kovů či polymerní nanočástice s magnetickým jádrem.

Aktivní ester karboxybetainu je produkt reakce karboxylové skupiny karboxybetainu s N-substituovanými karbodiimidy, tj. O-acylmočovina, a/nebo produkt reakce karboxylové skupiny karboxybetainu s N-substituovanými karbodiimidy a N-hydroxysukcinimidem (NHS) nebo jeho deriváty, s výhodou je aktivním esterem NHS-ester nebo sulfo NHS-ester.

Ve výhodném provedení se krok c) provede tak, že se nejprve produkt z kroku b) opláchne pufrem, který byl použit jako rozpouštědlo v kroku b), následně se opláchne pufrem, který bude použit v následujícím kroku k inkubaci, s výhodou je takovým pufrem pufr o pH 8, následně se produkt inkubuje s roztokem kyseliny (2-aminoethoxy)octové v pufru, následně se opláchne pufrem předtím použitým k inkubaci, a následně se opláchne roztokem, do kterého je pak vložen pro skladování, nebo vodou a vysuší se.

V jednom provedení jsou karboxybetainové skupiny obsaženy v polymerní vrstvě na povrchu substrátu jako polymerní kartáč, připravený polymerací z povrchu nebo roubováním polymerů na povrch substrátu, nebo polymerní povlak, s výhodou má tato vrstva tloušťku v rozmezí od 5 nm do 5 μm .

Ve výhodném provedení je polymerní vrstvou obsahující karboxybetainové skupiny polymerní kartáč z polyCBMAA, polyCBMA, polyCBAA nebo poly(HPMAA-co-CBMAA/x mol. %), kde x (molární koncentrace CBMAA) je v rozmezí od 1 mol. % do 99 mol. %. S výhodou má tato vrstva tloušťku v rozmezí od 5 nm do 5 μm .

V jednom provedení je substrát vybraný ze skupiny zahrnující částice, porézní membrány, nosiče buněk ("scaffolds") a biosenzory.

Částice jsou s výhodou z materiálu vybraného ze skupiny obsahující zlato, stříbro, magnetické materiály, křemík, SiO_2 , polymery, spadají do definice substrátu (1) až (6) a mají s výhodou průměr od 5 nm do 1 mm. Částice s bioaktivními látkami navázanými na aktivované karboxybetainové skupiny na povrchu částic včetně vnitřního povrchu porézních částic jsou aplikovatelné jako nosiče pro cílenou terapii a diagnostiku *in vivo*, separaci a akumulaci biologických látek a enzymatickou katalýzu v bioreaktorech.

Porézní membrány jsou membrány určené pro afinitní separaci biologických látek z biologických médií.

Nosiče buněk ("scaffolds") jsou odborníkovi v oboru dobře známe, jejich využití je např. pro tkáňové inženýrství (viz např. http://www.wikiskripta.eu/index.php/Tk%C3%A1%C5%88ov%C3%A9_in%C5%BEen%C3%BDrstv%C3%AD).

5

V jednom provedení je substrátem detekční povrch biosenzoru pro přímou detekci nebo více-
stupňovou detekci analytů v komplexních biologických médiích, např. pomocí optických nebo
hmotnostních biosenzorů. S výhodou je detekční povrch pokryt polymerním kartáčem z poly-
CBMAA, polyCBMA, polyCBAA nebo poly(HPMAA-co-CBMAA) s navázanými biorecepto-
ry. Bioreceptory v této aplikaci jsou bioaktivní láky mající selektivní afinitu k cílovým složkám
analýzovaného média.

10

V jednom provedení je substrát určený pro kontakt s krví *in vitro*, *ex vivo* a *in vivo*.

15

Způsob přípravy povrchu substrátu obsahujícího karboxybetainové skupiny podle předkládaného
vynálezu, který má zvýšenou odolnost proti nežádoucí depozici složek biologických médií na
povrch substrátu, poskytuje velmi rychlé, levné a efektivní zmírnění problémů s depozicí nežá-
doucích složek biologických médií oproti řešením nabízeným v dosavadním stavu techniky.

20

Příklady uskutečnění vynálezu

25

Příklad 1: Obecný způsob úpravy povrchu substrátu obsahujícího karboxybetainové funkční
skupiny

30

35

V kroku (a) dochází k chemické aktivaci přítomných karboxybetainových skupin tím, že se
karboxylové skupiny karboxybetainu převedou na aktivní NHS-ester nebo sulfo-NHS-ester
reakcí s 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidem (EDC) a *N*-hydroxysukcinimidem
(NHS) nebo sulfo-NHS. V kroku (b) dojde k inkubaci vzorku s roztokem obsahujícím bioaktivní
látku (BAL), během které jsou tyto látky kovalentně navázány na některé z aktivních esterů
vytvořených v kroku (a). V kroku (c) probíhá reakce těch aktivních NHS-esterů nebo sulfo-
NHS-esterů, které nezreagovaly s bioaktivní látkou, s molekulami kyseliny (2-aminoethoxy)-
octové. V průběhu inkubace vzorku svodným roztokem kyseliny (2-aminoethoxy)octové jsou
tyto molekuly kovalentně navázány na povrch stálou amidickou vazbou.

40

Příklad 2: Odolnost karboxybetainových polymerních kartáčů proti biologické depozici z neředě-
né krevní plazmy a potravinových vzorků po EDC/NHS aktivaci, a po reakci s deaktivními
činidly

45

50

55

Zlatý povrch čipu pro měření rezonance povrchových plasmonů (SPR), skleněná destička s napa-
řenou vrstvou zlata o tloušťce 50 nm, byl metodou SI ATRP pokryt kartáčem z polyCBMAA
nebo kartáčem z kopolymeru obsahujícího 15 mol. % CBMAA (poly(HPMAA-co-
CBMAA/15 mol. %)) s tloušťkou v rozsahu 19 až 31 nm dle protokolu popsaného v PV 2015-
313. Následně byl čip opláchnut vodou a upevněn do komory SPR senzoru s 6 průtokovými
mikrofluidními kanály. Karboxybetainové skupiny kartáče byly v 2. až 6. kanálu aktivovány
reakcí svodným roztokem *N*-hydroxysukcinimidu (NHS; 0,1 M) a 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-
propyl)karbodiimidu (EDC; 0,5 M) 20 min při 2 °C (krok (a) v příkladu 1). Po oplachování
vodou po dobu 5 min a PBS a vodou pH 8 (10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl,
2,7 mM KCl, pH 7,4) 10 min byl aktivovaný kartáč vystaven působení roztoku glycinu (1 M,
voda pH 8) 30 min v 3. kanálu, roztoku kyseliny (2-aminoethoxy)octové (0,1 M, voda pH 8)
30 min v 4. kanálu, roztoku ethanolaminu (1 M, voda pH 8) 30 min v 5. kanálu a deaktivnímu
pufru (10 mM borát sodný + 10 mM imidazol + 10 mM NaCl, pH 8) 40 min v 6. kanálu při 20 °C
(krok (c) v příkladu 1). Tímto způsobem byl připraven SPR senzor, ve kterém 1. kanál obsahoval

neaktivovaný kartáč, 2. kanál kartáč po aktivaci, 3. kanál kartáč po deaktivaci glycinem, 4. kanál kartáč po deaktivaci kyselinou (2-aminoethoxy)octovou, 5. kanál kartáč po deaktivaci ethanolaminem a 6. kanál kartáč po deaktivaci deaktivčním pufrém. Vždy po modifikaci kartáče provedené v příslušném kanále byl kartáč opláchnut vodou 5 min a PBS 10 min, změřena SPR rezonanční vlnová délka (λ_1) povrch byl inkubován s neředěnou krevní plazmou po dobu 10 min, opláchnut PBS a opět změřena λ_2 . Velikost biologického depositu v ng/cm^2 byla vypočtena z rozdílu $\lambda_2 - \lambda_1$.

Stejným způsobem byly na dalších čípech změřeny biologické deposity z komplexních vzorků potravin připravených homogenizací dle protokolu popsáního v ČSN ISO 7251 a ČSN EN ISO 6579. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1 a 2.

Tabulka 1: Depozice z komplexních biologických roztoků na kartáč z poly(HPMAA-co-CBMAA/15 mol. %) aktivovaný EDC/NHS a deaktivovaný deaktivčními činidly.

Deaktivční činidlo	Depozit [ng/cm^2]			
	Krevní plazma	Mléko	Hamburger	Okurka
Před aktivací	$4,9 \pm 2,0$	3,1	0,0	0,0
Po aktivaci	135,5	74,3	55,3	21,4
Glycin ^{*1}	5,1	1,9	1,4	0,2
Kyselina (2-aminoethoxy)octová ^{*2}	5,9	1,9	0,7	1,4
Ethanolamin ^{*3}	14,8	11,4	6,6	1,4
Deaktivční pufr ^{*4}	$12,5 \pm 3,1$	5,8	2,4	3,4

*¹ 1M glycin, pH 8, 30 min

*² 100mM kyselina (2-aminoethoxy)octová, pH 5, 30 min

*³ 1M ethanolamin, pH 8, 30 min

*⁴ 10mM borát sodný + 10mM imidazol + 10mM NaCl, pH 8, 40 min

Tabulka 2 Depozice z komplexních biologických roztoků na kartáč z polyCBMAA aktivovaný EDC/NHS a deaktivovaný deaktivacími činidly

Deaktivací činidlo	Depozit [ng/cm ²]			
	Krevní plazma	Mléko	Hamburger	Okurka
Před aktivací	9,6 ± 1,3	10,7	4,1	10,9
Ihned po aktivaci	222,7	897,6	73,1	135,5
Glycin ^{*1}	75,7	317,9	11,2	13,6
Kyselina (2-aminoethoxy)octová ^{*2}	71,9	316,1	14,6	11,1
Ethanolamin ^{*3}	90,4	364,6	16,3	15,1
Deaktivací pufr ^{*4}	92,9	380,8	63,9	43,4

*¹ 1M kyselina

*² 100mM kyselina (2-aminoethoxy)octová, pH 5, 30 min

*³ 1M ethanolamin, pH 8, 30 min

*⁴ 10mM borát sodný + 10mM imidazol + 10mM NaCl, pH 8, 40 min

Tabulky 1 a 2 ukazují signifikantně sníženou depozici ze všech testovaných biologických vzorků na oba typy karboxybetainových polymerních kartáčů po deaktivaci kovalentním navázáním aminokyselinových činidel (glycin nebo NH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-COOH) oproti zavedené deaktivaci hydrolyzou v deaktivací pufru nebo navázáním ethanolaminu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob přípravy povrchu substrátu obsahujícího karboxybetainové skupiny, se zvýšenou odolností proti nežádoucí depozici složek biologických médií na povrch substrátu, obsahující kroky:

a) chemická aktivace karboxybetainových skupin na povrchu substrátu převedením karboxylové skupiny karboxybetainu na aktivní ester;

b) kovalentní navázání bioaktivní látky reakcí její aminoskupiny s aktivním esterem připraveným v kroku a),

v y z n a ě n ý t í m, že po kroku b) se provede krok c), ve kterém produkt z kroku b) reaguje s kyselinou (2-aminoethoxy)octovou,

kdy s kyselinou (2-aminoethoxy)octovou reagují aktivní estery, na nichž nedošlo v kroku b) ke kovalentnímu navázání bioaktivní látky.

2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že krok c) se provede tak, že se nejprve produkt z kroku b) opláchne puftrem, který byl použit jako rozpouštědlo v kroku b), následně se

opláchne pufrem, který bude použit v následujícím kroku k inkubaci, následně se produkt inkubuje s roztokem kyseliny (2-aminoethoxy)octové v pufru, následně se opláchne pufrem použitým k inkubaci, a následně se opláchne roztokem, do kterého je pak vložen pro skladování, nebo vodou a vysuší se.

5

3. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **v y z n a ě n ý t í m**, že bioaktivní látka je látka obsahující alespoň jednu NH_2 skupinu a selektivně interagující s cílovou složkou biologického média, s výhodou je bioaktivní látkou látka s afinitou k cílové složce, vybraná ze skupiny zahrnující protilátku, antigen, lektin, buněčný receptor a jejich analogy, části připravené rekombinantní technikou, syntetické oligopeptidové sekvence, nukleové kyseliny a jejich části, syntetické oligonukleotidové sekvence, aptamery; látka katalyzující chemickou přeměnu cílové látky, vybraná ze skupiny zahrnující enzymy, koenzymy a jejich syntetické analogy; látka vyvolávající biologickou odezvu, vybraná ze skupiny zahrnující antikoagulanty, proteiny a oligopeptidové sekvence reagující s buněčnými integriny, růstové faktory, hormony a léčiva.

15

4. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **v y z n a ě n ý t í m**, že biologické médium je tekutina obsahující biomolekuly a jejich asociáty, vybrané ze skupiny zahrnující proteiny, sacharidy, polysacharidy, lipidy, nukleové kyseliny, lipoproteiny, glykoproteiny, organely; buňky, viry a mikroorganismy a/nebo jejich fragmenty.

20

5. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **v y z n a ě n ý t í m**, že karboxybetainové skupiny jsou obsaženy v polymerní vrstvě na povrchu substrátu, vybrané ze skupiny obsahující polymerní kartáč, připravený polymerací z povrchu nebo roubováním polymerů na povrch substrátu, a polymerní povlak, přičemž s výhodou má tato vrstva tloušťku v rozmezí od 5 nm do 5 μm .

25

6. Způsob podle nároku 5, **v y z n a ě n ý t í m**, že polymerní vrstva obsahuje alespoň jeden polymer obsahující karboxybetainové skupiny.

30

7. Způsob podle nároku 5, **v y z n a ě n ý t í m**, že polymerní vrstvou obsahující karboxybetainové skupiny je polymerní kartáč z poly(karboxybetain methakrylamid)u, poly(karboxybetain methakrylát)u, poly(karboxybetain akrylamid)u nebo kopolymeru poly(A-co-B), kde A je monomerní jednotka ze skupiny N-(2-hydroxypropyl) methakrylamid, 2-hydroxyethyl methakrylát, 3-hydroxypropyl methakrylát a oligo(hydroxyethylen glykol) methakrylát a B je monomerní jednotka ze skupiny karboxybetain methakrylamid, karboxybetain methakrylát a karboxybetain akrylamid v koncentraci od 1 do 99 % mol.

35

8. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **v y z n a ě n ý t í m**, že substrát je vybraný ze skupiny zahrnující částice s výhodou o velikosti v rozmezí od 5 nm do 1 mm, porézní membrány, nosiče buněk a biosenzory.

40

9. Způsob podle nároku 8, **v y z n a ě n ý t í m**, že substrátem je detekční povrch biosenzoru pro přímou detekci nebo vícestupňovou detekci analytů v komplexních biologických médiích.

45

Konec dokumentu

50