

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191917** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.17

(51) Int. Cl. *G01N 33/68* (2006.01)
C07K 5/09 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.01.09

(54) ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНЫЙ И СВЕРХЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ СЕНСОР ИОНОВ МЕТАЛЛОВ

(31) 19151227.6

(32) 2019.01.10

(33) EP

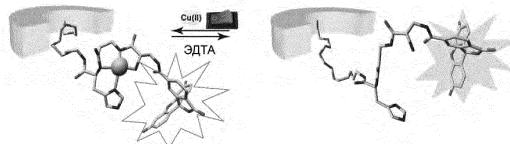
(86) PCT/EP2020/050461

(87) WO 2020/144294 2020.07.16

(71)(72) Заявитель и изобретатель:
ТИТЦЕ АЛЕСЯ (SE)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящая заявка посвящена сенсору для обнаружения и/или определения концентрации ионов металлов в жидкости, содержащей комплексообразующий агент, подходящий для связывания подлежащих обнаружению ионов металла, средство для обнаружения и линкерную группу, при этом средство обнаружения содержит полимерную мембрану с нанопорами. Сенсор настоящей заявки можно использовать для быстрого, высокоселективного и сверхчувствительного обнаружения ионов металлов в жидкости, в частности ионов Cu^{2+} . Такой сенсор обеспечивает качественное и/или количественное обнаружение ионов металлов, что может быть полезно при диагностике и/или мониторинге заболеваний, связанных с аномальными концентрациями ионов металлов, таких как, например, болезнь Альцгеймера.



A1

202191917

202191917

A1

ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНЫЙ И СВЕРХЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ СЕНСОР ИОНОВ МЕТАЛЛОВ

Настоящая заявка посвящена сенсору для качественного обнаружения и/или количественного определения концентрации ионов металлов в жидкости, использованию этого сенсора для диагностики и/или мониторинга заболеваний, а также в целом методу качественного и количественного обнаружения ионов металлов в жидком веществе. В частности, заявленный здесь сенсор может быть использован для избирательного обнаружения и определения концентрации ионов Cu^{2+} в жидкости.

Обнаружение и определение концентрации биологически и экологически значимых ионов металлов в последние годы вызывает огромный интерес в области химических сенсоров. Флуоресценция, как метод обнаружения, играет важную роль в области химических сенсоров, в частности, благодаря простоте применения и чувствительному пределу обнаружения. Селективность и чувствительность к конкретным ионам металлов обычно достигается за счёт подходящих комплексообразователей, связанных с флуорофорами, такими как родамин, флуоресцеин, пирен, антрацен, нафталимид и кумарин. К биологически и экологически интересным целевым ионам относятся, например, Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} и Cd^{2+} .

Медь является важным микроэлементом, незаменимым в биологических системах, который может быть обнаружен во многих ферментах, например, аминоксидазах и феррооксидазах, он необходим при росте младенцев, ионном метаболизме и развитии человеческого мозга. (Nat Chem Biol 2008, 4, 176-185; J Toxicol Environ Health B Crit Rev 2001, 4, 341-394). Но также медь широко используется в сельском хозяйстве, из-за чего является одним из основных металлов, загрязняющих окружающую среду. (Rev Environ Health 1999, 14, 231-238). Загрязнение медью таких экосистем, как реки, озера, почвы и подземные воды, вызывает повышенное ее накопление в организме (Chem Soc Rev 2017, 46, 7105-7123).

Это ведет к нарушениям метаболизма меди в организме и/или заболеваниям, связанным с аномальной концентрацией меди, например, болезни Вильсона, болезни Менкеса и болезни Альцгеймера (б.А.) (Water, Air and Soil Pollution 1998, 108, 457-471). Нарушение регуляции гомеостаза меди ведет к нейродегенеративным заболеваниям и поэтому взаимосвязь между медью и б.А. вызывает повышенный интерес среди учёных (Dalton Trans 2004, 1907-1917).

В последние годы были разработаны первые методы и сенсоры по обнаружению меди при ранней диагностике б.А. Например, Хираяма с соавторами (Proc Nat Acad Sci

USA 2012, 109, 2228-2233) создали сенсор для визуализации меди внутри живых клеток, чувствительный к реакции на флуоресценцию в присутствии ионов меди Cu^{2+} . Однако, этот метод зависит от визуализации живых клеток после переваривания флуоресцентного красителя, что требует специализированного оборудования и сложной подготовки для обнаружения и реализации данного метода. Сквитти с соавторами (J Alzheimers Dis 2014, 38, 809-822) разработали флуоресцентный метод для обнаружения свободных, не связанных с церулоплазмином ионов Cu^{2+} , распределенным по сыворотке крови. Однако, и этот метод требует длительного двухстадийного подхода, в котором сначала методом твердофазной экстракции отделяют свободную медь от связанной с белком, а затем измеряют флуоресценцию.

Известно, что пептиды в белках могут проявлять необычное и сверхчувствительное, как ключ к замку, поведение по отношению к активным центрам. К природным медьсвязывающим пептидам относятся альбумин (бычий сывороточный альбумин (BSA), человеческий сывороточный альбумин (HSA), кроличий сывороточный альбумин (RSA)), нейромедин С и К, протамин человеческой спермы P2a и гистидины (Accounts of Chemical Research 1997, 30, 123-130). Имперали с соавторами (J Am Chem Soc 1998, 120, 609-610) применили полипептидные группы для создания селективных хемосенсоров ионов Cu(II) . Папп с соавторами (Angewandte Chem Int Ed Engl 2018, 57, 4752-4755) смог присоединить аминоконцевой домен Cu(II) к Ni(II) -связывающему (ATCUN) фрагменту (Gly-Gly-His) на протравленных трековых поликарбонатных мембранах. Ситу с соавторами (Sensors and Actuators B-Chemical 2017, 240, 560-565) разработали систему флуоресцентного обнаружения меди невооруженным глазом с предельной концентрацией в 0,5 микромоль, однако с тем недостатком, что метод обнаружения длителен и многостадийен. Также сенсорные системы обнаружения невооруженным глазом были сконструированы Дингом и его соавторами (Journal of Materials Chemistry 2011, 21, 13345-13353) и представляют собой колориметрическое обнаружение меди с предельной концентрацией в 5 наномоль с использованием сенсорных полосок.

В связи с постоянной потребностью в высокочувствительных и селективных методах обнаружения ионов металлов, цель настоящей заявки состоит в предоставлении такого сенсора, который быстро, легко, с высокой чувствительностью и селективностью, качественно и количественно мог бы обнаруживать ионы металлов в жидкости, в частности, определять концентрации ионов металлов в биологических жидкостях организма и в пробах окружающей среды в предельно низких концентрациях.

Согласно инновациям данного проекта эта цель была достигнута путем

изобретения сенсора для обнаружения и/или определения концентрации ионов металлов в жидкости. Сенсор содержит комплексообразующий агент, подходящий для связывания ионов металлов, подлежащих обнаружению, средство обнаружения и линкерную группу, в которой средство обнаружения состоит из полимерной мембраны с нанопорами. Сенсор, в соответствии с настоящей заявкой, может применяться для быстрого, высокоселективного и сверхчувствительного обнаружения ионов металлов в жидкости. Указанный сенсор обеспечивает качественное и/или количественное обнаружение ионов металлов, в частности, через измерения вольт-амперных и/или флуоресцентных характеристик. В частности, было обнаружено, что сочетание комплексообразующего агента с полимерной мембраной, к которой он прикреплен, позволяет сверхчувствительно и количественно обнаруживать ионы металлов, такие как Cu^{2+} , вплоть до фемтомолярных концентраций.

В одном из вариантов реализации, качественное и количественное обнаружение ионов металлов регистрируется посредством изменения вольт-амперных характеристик, что позволяет обнаруживать концентрации ионов металлов в жидкости в фемтомолярном диапазоне (вплоть до 1 фМ). М означает молярную концентрацию моль на литр (моль/л). В другом варианте реализации, качественное и количественное обнаружение ионов металлов регистрируется через изменения в интенсивности флуоресценции, что не требует масштабных экспериментальных установок. Фактически, сенсор данной заявки позволяет обнаружение ионов металлов на месте и в режиме реального времени. Например, можно воспользоваться флуоресцентным светом и тест-полоской, содержащей заявленный здесь сенсор с флуорофором, присоединенным к комплексообразующему агенту.

Обычно сенсоры – это устройства для обнаружения определенных аналитов, в случае данного изобретения аналитами являются ионы металлов, например, $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ag/Ag^+ и Au/Au^+ , и особенно Cu^{2+} . Сенсор предоставляет информацию об анализируемом веществе, как правило, в форме измеряемого физического сигнала, коррелирующего с присутствием и/или количеством аналита.

Сенсор по данной заявке содержит комплексообразующий агент, подходящий для связывания подлежащих обнаружению ионов металла. Предпочтительные комплексообразующие агенты представляют собой пептиды, содержащие натуральные или модифицированные 2-6 аминокислоты и/или имитаторы аминокислот. Таким образом, комплексообразующий агент также может называться пептидным комплексообразователем. Комплексообразующий агент действует как хелатный лиганд и

образует хелатный комплекс с обнаруживаемым ионом металла. Комплексообразующий агент выбирается в зависимости от определяемого иона металла.

Аминокислоты пептида выбраны из группы, состоящей из стандартных аминокислот, нетипичных аминокислот, непротеиногенных аминокислот или имитаторов, и модифицированных аминокислот. Примерами стандартных L-аминокислот являются глицин (Gly), аланин (Ala), валин (Val), лейцин (Leu), метионин (Met), изолейцин (Ile), серин (Ser), треонин (Thr), цистеин (Cys), пролин (Pro), аспарагин (Asn), глутамин (Gln), фенилаланин (Phe), тирозин (Tyr), триптофан (Trp), лизин (Lys), аргинин (Arg), гистидин (His), аспарагиновая кислота (Asp) и глутамат (Glu). Предпочтительными стандартными аминокислотами, согласно заявленному изобретению, являются гистидин (His), аланин (Ala) и аспарагиновая кислота (Asp). Примерами нетипичных аминокислот являются 4-гидроксипролин, 5-гидроксилизин, 6-N-метиллизин, γ -карбоксиглутамат, десмозин, селеноцистеин, орнитин и цитролин. Непротеиногенные аминокислоты или имитаторы – это аминокислоты, не включающиеся в белки во время трансляции. Однако они могут включаться в аминокислотный каркас методами химического синтеза. К непротеиногенным аминокислотам или имитаторам, подходящим целям данной заявки, относятся, например, 2,3-диаминопропионовая кислота (DAP) и β -аланин. DAP может находиться как в форме L-DAP, так и D-DAP, а также в смеси L- и D-DAP. L-DAP форма более предпочтительна. Модифицированные аминокислоты могут состоять как из стандартных, так и из нетипичных аминокислот, они могут быть, например, метилированы, ацетилированы, или находиться в разных стерических конформациях: D диастереомерная, цис/транс или изостерическая.

В предпочтительном варианте реализации, изобретенный сенсор предназначен для обнаружения и/или определения концентрации ионов Cu^{2+} , и комплексообразующий агент представляет собой связывающую медь группу, такую как ATCUN или подобную, со схожими функциями. Предпочтительная медьсвязывающая группа включает в себя четыре электронодонорные группы, в состав которых входит как минимум три атома азота, четвертым донором электронов может быть как азот, так и сера или кислород. Далее ион Cu^{2+} образует плоский квадратный комплекс с медьсвязывающей группой, содержащим по крайней мере три атома азота. Примерами таких медьсвязывающих групп являются ATCUN-связывающие или ATCUN-подобные связывающие группы, которые будут использоваться в качестве комплексообразователей в сенсоре настоящей заявки, как показано на фиг. 2e. ATCUN-связывающие группы могут быть как линейными, так и циклическими пептидами, такими как линейный трипептид Gly-Gly-His. Предпочтительные комплексообразующие агенты представляют собой пептиды с

медьсвязывающей группой, такие как трипептид DAP-βAla-X, где X – это натуральная или модифицированная аминокислота, в частности, гистидин (His), аланин (Ala) или аспарагиновая кислота (Asp). В частности, сенсор в настоящей заявке содержит в качестве комплексообразующего агента пептидное соединение DAP-βAla-His, DAP-βAla-Asp или DAP-βAla-Ala для обнаружения ионов Cu^{2+} , например.

Заявленный здесь сенсор содержит полимерную мембрану с нанопорами в качестве метода детектирования и способен генерировать измеряемый физический сигнал.

Полимерная мембрана представляет собой функционализированную полимерную мембрану, фольгу или лист с нанопорами, в частности, ионно-трековую полимерную мембрану, фольгу или лист, протравленную, например, полиэтилентерефталатом (ПЭТ). Функционализированная полимерная мембрана – это полимерная мембрана с функциональными группами, такими как карбоксилатные и/или аминогруппы, на поверхности мембраны и её нанопор. Полимерная мембрана может изготавливаться из поликарбоната (ПК) или любого другого полимерного материала, способного к химической функционализации. Предпочтительная полимерная мембрана имеет толщину в 1-30 мкм, лучше 10-20 мкм, или ещё лучше 11-15 мкм. Примером такой полимерной мембраны или фольги из ПК и ПЭТ являются трековые мембраны ipPORE™ от it4ip®.

Нанопоры могут иметь любую форму, но коническая или цилиндрическая предпочтительны. Коническая форма подходит лучше всего и имеет небольшие отверстия диаметром примерно 2-10 нм, лучше 4-6 нм, и большие отверстия диаметром 200-500 нм, лучше 300-400 нм. Длина пор составляет 10-20 мкм, лучше 12-15 мкм, и соответствует толщине полимерной мембраны. В наилучшем варианте реализации используются конические нанопоры с небольшим отверстием диаметром около 5 нм, большим отверстием диаметром около 300 нм и длиной около 12 мкм. Цилиндрические нанопоры характеризуются отверстием диаметра 50-500 нм, лучше 100-400 нм, и длиной в 10-20 мкм, лучше 12-15 мкм. Длина тоже соответствует толщине полимерной мембраны.

Предпочтительны полимерные мембраны, фольга или листы с концентрацией нанопор примерно от 1 до 10^7 на см^2 , лучше от 10^3 до 10^5 , и еще лучше около 10^4 на см^2 . Ионно-трековые полимерные мембраны, фольга или листы с коническими нанопорами изготавливаются по известной ионно-трековой технологии в совокупности с асимметричным химическим травлением, как описано в Nucl Instrum Methods Phys Res, Sect. B 2001, 184, 337-346. После облучения тяжелыми ионами и последующего процесса химического травления полимерных мембран, фольги или листов, на поверхности, в частности, на поверхности нанопор полимерной трековой мембраны, фольги или листа, образуются группы карбоновых кислот, которые можно использовать для ковалентного

присоединения функциональных молекул, содержащих, например, первичные амины.

Средства обнаружения, согласно данной заявке, могут дополнительно содержать флуорофоры, например, коммерчески доступные флуорофоры 5(6)-карбоксифлуоресцеин, DyLight Fluor, Alexa Fluor или цианиновые красители. В сенсоре предпочтителен флуорофор 5(6)-карбоксифлуоресцеин. Флуорофор может присоединяться к комплексообразующему агенту через N-конец аминокислоты пептида.

Степень гашения или увеличения интенсивности флуоресценции указывает на присутствие ионов металлов в жидкости, то есть на связывание ионов металлов с комплексообразующим агентом сенсора. Регистрацию изменения флуоресценции можно использовать для расчета концентрации ионов металла в жидкости, т.к. степень гашения или уменьшения флуоресценции пропорциональна концентрации ионов металла в жидкости. Фиг. 1 изображает релейные характеристики по принципу «включено-выключено» такого метода детекции сенсора данной заявки, использующего медьсвязывающие комплексообразующие группы для обнаружения ионов Cu^{2+} .

Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что сенсор, содержащий полимерную мембрану с нанопорами, позволяет проводить чрезвычайно надежные и высокочувствительные измерения ионов металлов, если использовать в качестве дополнительного средства обнаружения флуорофор, присоединенный к пептидному комплексообразователю. Это связано с ростом интенсивности флуоресценции внутри нанопор полимерной мембраны, происходящим в результате прикрепления меченных флуоресцентной меткой молекул комплексообразователя к поверхности нанопор внутри пор. Молекулы комплексообразователя с флуорофором укладываются в поры параллельно поверхности мембраны и перпендикулярно направлению обнаружения. Таким образом, интенсивность флуоресценции молекул флуоресцентно меченых комплексообразователей, наложенных друг на друга в направлении измерения, накапливается по длине нанопоры, что приводит к гораздо более интенсивному и легче детектируемому сигналу, по сравнению с монослоем флуоресцентно меченных комплексообразующих агентов на плоской поверхности, если смотреть со стороны обнаружения. На фиг. 1 показан принцип «включено-выключено» такого метода обнаружения сенсора данной заявки, содержащего медьсвязывающую группу в качестве комплексообразователя при обнаружении ионов Cu^{2+} .

В предпочтительном варианте реализации, сенсор данного изобретения содержит полимерную мембрану с нанопорами, в частности, ПЭТ-мембрану с ионно-трековым травлением с нанопорами, и флуорофор, например 5(6)-карбоксифлуоресцеин, в качестве средства обнаружения. В еще более предпочтительном варианте реализации настоящей

заявки, сенсор содержит 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP- β Ala-His, 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP- β Ala-Asp или 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP- β Ala-Ala в качестве флуоресцентно меченного комплексообразующего агента, т.е. комплексообразующего агента, к которому в качестве дополнительного средства обнаружения присоединен флуорофор.

Сенсор, согласно данной заявке, дополнительно содержит линкерную группу, которая в оптимальном случае связана с нанопорами полимерной мембраны и комплексообразующим агентом, т.е. расположена между этими двумя фрагментами. Линкерная группа связывает комплексообразующий агент, к которому предпочтительно присоединен флуорофор, с нанопорами полимерной мембраны и иммобилизует его. Линкерная группа предназначена для обеспечения пространственного разделения функциональных групп комплексообразующего агента, например, медь-связывающего, и, возможно, флуорофора на полимерной мембране, фольге или листе. Тем самым можно избежать нежелательного взаимодействия между функциональными группами.

Предпочтительная линкерная группа содержит звенья полиэтиленгликоля (ПЭГ), в частности, 4 звена ПЭГ. Желательно, чтобы линкерная группа имела формулу $R_1-[CH_2CH_2O]_a-R_2$, где индекс a изменяется от 2 до 10, R_1 – это -NH группа, а R_2 представляет собой группы CH_2CH_2COOH или $CH_2CH_2CCH_3=O$. В формуле $R_1-[CH_2CH_2O]_a-R_2$ a может быть от 2 до 8, от 2 до 6, от 2 до 4, от 4 до 10, от 4 до 8 или от 4 до 6, более оптимально a равное 3, 4, 5 или 6, а еще лучше a равное 4. В предпочтительном варианте реализации данного изобретения, линкер имеет структуру -HN-[CH_2CH_2O]₄- $CH_2CH_2COO(H)$ - (фиг. 2(e)) и обозначается линкерПЭГ₄. Если линкер содержит карбоксильную группу $R_2 = COO(H)$ -, то с её помощью может происходить связывание с полимерной мембраной, фольгой или листом. Например, можно добавить карбоксильную группу линкера к функциональной аминогруппе на поверхности полимерной мембраны с помощью стандартной химии пептидного связывания. Также аминогруппа R_1 легко связывается с C-концом аминокислоты пептидного комплексообразователя с помощью стандартной химии пептидного связывания.

В одном из вариантов реализации настоящей заявки, медьсвязывающая группа, такая как пептидный комплексообразователь с флуорофором, может быть присоединена посредством линкерной группы к поверхности полимерной мембраны с нанопорами, в частности, к поверхности интерьера нанопор ионно-трековой мембраны, фольги или листа. Предпочтительный комплексообразующий агент, с флуорофором или без, с помощью линкерной группы присоединяется и к поверхности мембраны, и к поверхности внутри нанопор. Например, комплексообразование ионов Cu^{2+} с медьсвязывающей группой

сенсора, согласно настоящему изобретению, изменяет вольт-амперные характеристики полимерной мембраны, фольги или листа с нанопорами, которые затем могут быть использованы для качественного и количественного определения ионов Cu^{2+} в жидкости, что позволяет обнаруживать ионы Cu^{2+} в низком диапазоне концентраций до 1 фМ.

В предпочтительном варианте реализации сенсор, согласно настоящей заявке, содержит медьсвязывающую группу DAP- β Ala-X в качестве комплексообразующего агента, средство обнаружения и линкер, при этом средство обнаружения представляет собой полимерную мембрану с нанопорами, в частности ионно-трековую протравленную ПЭТ-мембрану, фольгу или лист с нанопорами и флуорофором, в частности, 5(6)-карбоксифлуоресцеином. Флуорофор присоединяется к N-концу DAP, а линкерная группа присоединяется к C-концу натуральной или модифицированной аминокислоты X. Медьсвязывающая группа присоединяется с помощью линкерной группы к поверхности полимера, мембраны, фольги или листа, в частности, к поверхности нанопор.

Сенсор, в соответствии с настоящей заявкой, используется для обнаружения ионов металлов в жидкости, которая может быть набрана из любого источника. Жидкость представляет собой подвижную среду, предпочтительно на водной основе, например, из источников окружающей среды. Водный раствор может также быть эмульсией. Примерами жидкости, согласно данному изобретению, могут быть как питьевая вода, так и биологические жидкости, например моча, цельная кровь, плазма, сыворотка, внеклеточная интерстициальная жидкость, лимфа, желчь, спинномозговая жидкость, а также секреция желез, например, слюна или пот; при этом моча наиболее предпочтительна. Водный раствор, кроме того, может браться из водных потоков, луж, озер и морей. Прежде, чем поднести жидкий образец к сенсору настоящего изобретения, образец можно отфильтровать, сконцентрировать, центрифугировать, химически обработать и т.п.

В предпочтительном варианте реализации, сенсор настоящей заявки способен выборочно обнаруживать ионы Cu^{2+} в жидкости в присутствии ионов Ni^{2+} и/или ионов Zn^{2+} . Селективное обнаружение ионов Cu^{2+} в соответствии с настоящей заявкой означает, что в случае отсутствия в жидкости ионов Cu^{2+} и присутствия ионов Ni^{2+} и/или Zn^{2+} , сигнала, указывающего на присутствие желаемых ионов Cu^{2+} аналита, не будет. Например, в случае использования 5(6)-карбоксифлуоресцеина в качестве флуорофора, не будет наблюдаться гашение интенсивности флуоресценции. Кроме того, присутствие ионов Ni^{2+} и/или Zn^{2+} , в дополнение к определенной концентрации ионов Cu^{2+} в жидкости, не изменяет измеряемый сигнал более, чем на $\pm 5\%$, т.е. практически идентичные результаты по концентрациям ионов Cu^{2+} получены и в растворе,

содержащем ионы Ni^{2+} и/или Zn^{2+} , и в растворе, содержащем только ионы Cu^{2+} , без примеси ионов Ni^{2+} и/или Zn^{2+} . В данном варианте реализации предпочтителен медьсвязывающий комплексообразующий агент 2,3-диаминопропионовая кислота (DAP)- $\beta\text{Ala-X}$, где X – это натуральная или модифицированная аминокислота, в частности, гистидин (His), аланин (Ala) или аспарагиновая кислота (Asp), вместе с присоединенным флуорофором.

В одном из случаев реализации, сенсор настоящей заявки предназначен для использования при диагностике и/или мониторинге заболеваний, особенно заболеваний, связанных с аномальными концентрациями ионов Cu^{2+} (меди) и/или нарушением регуляции метаболизма ионов Cu^{2+} (меди), таких как б.А., болезнь Вильсона и болезнь Менкеса. Концентрации ионов Cu^{2+} , с точки зрения диагностики и/или мониторинга заболеваний, в частности, при определении концентрации ионов Cu^{2+} в моче, относятся к несвязанной меди, то есть ионам Cu^{2+} , не связанным с церулоплазмином. Такую медь можно также назвать «свободные ионы Cu^{2+} » или «свободные ионы Cu^{2+} в растворе».

Термин «аномальный» в отношении концентрации ионов Cu^{2+} (меди), в соответствии с настоящей заявкой, означает, что концентрация ионов Cu^{2+} в жидкости организма завышена или занижена, по сравнению с нормой у здоровых индивидуумов. Более высокая концентрация ионов Cu^{2+} в жидкости организма, например, в моче, наблюдается у людей, страдающих определенными заболеваниями, например, б.А или болезнью Вильсона. Более низкая концентрация ионов Cu^{2+} в жидкости организма наблюдается у людей, страдающих заболеваниями, связанными с дефицитом меди, например, болезнью Менкеса. У здоровых людей дневная концентрация несвязанного с церулоплазмином Cu^{2+} в моче находится в пределах 40-50 нМ, что рассчитано на основе данных о том, что 1,5-2,0 л мочи в среднем содержит 4,82 мкг ионов Cu^{2+} в день (J Trace Elem Met Biol 2018, 45, 181-188). Таким образом, концентрация ионов Cu^{2+} в моче, которая минимум в два раза превышает норму (40-50 нМ у здоровых людей) и находится выше 80-90 нМ, в частности, в диапазоне 100-130 нМ, часто встречается у больных с б.А. и считается аномальной.

В предпочтительном варианте реализации, сенсор настоящей заявки предназначен для использования при диагностике и/или мониторинге б.А., болезни Вильсона и болезни Менкеса. В дополнительном оптимальном варианте реализации, сенсор настоящей заявки может использоваться для количественного определения концентрации ионов Cu^{2+} в моче индивидов во время диагностики и/или мониторинга заболеваний, связанных с аномальными концентрациями ионов Cu^{2+} (меди) и/или дисрегуляцией метаболизма ионов Cu^{2+} , например, б. А., болезни Вильсона и Менкеса. В частности, сенсор настоящего

изобретения применим при определении *ex vivo* концентрации ионов Cu^{2+} в жидкостях организма, предпочтительно в моче людей.

В качестве альтернативы, сенсор настоящей заявки применим для обнаружения ионов металлов и/или определения концентрации ионов металлов в пищевых продуктах или водных растворах, в частности, при контроле воды/пищевых продуктов и/или для анализа экологических проб. В этом отношении предпочтительными ионами металлов являются $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ag/Ag^+ и Au/Au^+ , и особенно Cu^{2+} .

В частности, сенсор настоящей заявки применим для множественных измерений, то есть сенсор позволяет многократное измерение ионов металлов или концентраций ионов металлов.

Настоящая заявка дополнительно раскрывает способ качественного и количественного обнаружения ионов металлов, в частности, ионов Cu^{2+} , в жидкости. На первом этапе сенсор приводится в контакт с пробой жидкости. Это может быть сделано, например, через погружение тест-полоски с иммобилизованным сенсором в образец жидкости или смешивание раствора сенсора настоящей заявки с жидким образцом, или капания жидкого образца на сенсор данной заявки. На следующем этапе происходит обнаружение ионов металлов и/или определение концентрации ионов металлов в образце. В зависимости от средств обнаружения различные параметры используются в качестве основы для качественного и/или количественного обнаружения ионов металлов в пробе жидкости. Если сенсор содержит флуорофор в качестве дополнительного средства обнаружения, например 5(6)-карбоксифлуоресцеин, то наблюдается гашение сигнала флуоресценции при контакте сенсора с ионами анализируемого металла, то есть регистрируется изменение интенсивности флуоресценции. На фиг. 3(a),(b) ясно видно, как интенсивность флуоресценции сенсора линейно уменьшается с добавлением ионов Cu^{2+} в раствор, показывая всё большее гашение флуоресценции с увеличением концентрации ионов Cu^{2+} .

Метод настоящего изобретения может дополнительно включать этап регулирования pH жидкой пробы, в частности перед ее воздействием на сенсор настоящего изобретения. При обнаружении ионов Cu^{2+} способ включает этап корректировки pH анализируемой жидкой пробы в области pH 5,0-8,5, и более точно pH 5,5-8,0, 6,0-7,3, 6,3-8,0 или 6,5-7,5, где наиболее предпочтителен pH 6,5-7,0. Регулируя pH анализируемой жидкой пробы, обеспечивается селективность сенсора данной заявки по отношению к ионам Cu^{2+} , в частности селективность по отношению к ионам Cu^{2+} в сравнении с ионами Ni^{2+} и Zn^{2+} . Установление pH жидкой пробы в заявленном диапазоне,

то есть в диапазоне рН 5,0-8,5, гарантирует образование комплекса исключительно между ионами Cu^{2+} и комплексообразующим агентом, то есть медьсвязывающей группой сенсора. Образование Ni^{2+} - или Zn^{2+} -комплексов в заявленном диапазоне рН с медьсвязывающей группой сенсора незначительно. Регулировка рН жидкости может производиться как до, так и во время приведения сенсора в контакт с пробой жидкости.

Не ограничиваясь теорией, предполагается, что при взаимодействии медьсвязывающей группы сенсора, такой как DAP- β Ala-His, с ионами Cu^{2+} , образуется плоский квадратный комплекс с полосой поглощения, соответствующей d-d переходу при 537 нм (фиг. 2(a)). Как видно на фиг. 2(b), образование комплекса сенсора настоящей заявки с никелем в значительной степени начинается при приблизительно $> \text{pH } 7$, что и отражается на полосе поглощения 438 нм на фиг. 2(a). Таким образом, регулируя рН и принимая во внимание то, в каком диапазоне рН не образуется Ni^{2+} -комплекс, можно получить высокоселективный метод обнаружения ионов Cu^{2+} в жидкости.

Выполнение количественного и/или качественного обнаружения ионов Cu^{2+} с помощью сенсора настоящей заявки в жидкости в области рН 5,0-8,5, точнее в диапазонах рН 5,5-8,0, 6,0-7,3, 6,3-8,0 или 6,5-7,5 и наиболее предпочтительно в диапазоне рН 6,5-7,0, соответствующем рН₅₀ медного сенсора, т.е. значению рН, при котором формируется 50% Cu^{2+} -комплексов, позволяет селективно обнаруживать ионы Cu^{2+} даже в присутствии ионов Ni^{2+} , так как в заявленном диапазоне рН присутствует только незначительное комплексообразование Ni^{2+} или его отсутствие.

В одном из вариантов реализации заявки, качественное и количественное обнаружение ионов металлов, в частности ионов Cu^{2+} , в жидкой пробе может быть достигнуто путем отслеживания изменения вольт-амперных характеристик сенсора настоящего изобретения. Регистрируя изменения вольт-амперных характеристик сенсора, можно количественно и качественно обнаруживать ионы металлов в пробе жидкости. Возможно обнаружение концентраций ионов металлов, например, концентраций ионов Cu^{2+} , в пробе жидкости с концентрациями ионов металлов до 1 фМ, в частности, в диапазоне 1 фМ - 30 мМ, 1 фМ - 20 мМ, 1 нМ - 10 мМ, 1 нМ - 5 мМ, в частности, в диапазоне 1 фМ - 60 мкМ, 5 нМ - 40 мкМ, 10 нМ - 10 мкМ, 12 нМ - 5 мкМ, 1 - 500 нМ, 1 - 200 нМ или 12 - 150 нМ.

В другом варианте реализации с применением флуорофора в качестве дополнительного средства обнаружения, в сенсоре настоящей заявки можно зарегистрировать изменение интенсивности флуоресценции, которое происходит при связывании ионов металла с комплексообразующим агентом, содержащим флуорофор. В случае комплексообразования ионов Cu^{2+} с медьсвязывающей группой интенсивность

флуоресценции снижается, т.е. гасится. Концентрация ионов металлов, в частности ионов Cu^{2+} , в пробе жидкости может быть количественно обнаружена с помощью сенсора настоящего изобретения в диапазоне 1 нМ - 30 мМ, 5 нМ - 20 мМ, 10 нМ - 10 мМ, 12 нМ - 5 мМ, в частности в диапазоне 1 нМ - 60 мкМ, 5 рМ - 40 мкМ, 10 нМ - 10 мкМ, 12 - 5 мкМ, 1 - 500 нМ, 1 - 200 нМ или 12 - 150 нМ.

При применении сенсоров очень важно количественное определение низких концентраций ионов Cu^{2+} (до 1 нМ) в жидких пробах при обнаружении следовых количеств ионов меди в образцах пищи/воды или при ранней диагностике б.А. в моче. Значение меди (ионов Cu^{2+}) в 24-часовой моче пациентов с б.А. составляет около 12 мкг/день (J Trace Elem Met Biol 2018, 45, 181-188), с учетом собранного объема мочи, равного 1,5–2,0 л, и эквивалентно 100–130 нМ концентрации свободной меди в моче. Сенсор настоящей заявки можно использовать для определения концентрации ионов меди (Cu^{2+}) непосредственно в образце мочи с помощью простой двухэтапной процедуры, где на первом этапе, например, происходит погружение тест-полоски с иммобилизованным сенсором в образец мочи или смешивание раствора сенсора настоящего изобретения с образцом мочи, или нанесение капли образца мочи на сенсор настоящей заявки, а на втором этапе образец облучается флуоресцентным источником света. Для людей с болезнью Вильсона концентрация свободных ионов Cu^{2+} в моче (не связанные с церулоплазмином ионы Cu^{2+}) составляет примерно 5–10 мкМ, что даже превышает концентрацию у больных б.А. Для здоровых людей с содержанием меди 4,82 мкг/день концентрация свободных ионов Cu^{2+} колеблется от 40 до 50 нМ. Все значения свободных ионов Cu^{2+} для здоровых людей и пациентов с б.А. и болезнью Вильсона находятся в пределах диапазона обнаружения сенсора настоящей заявки.

Качественное и/или количественное обнаружение ионов металлов в жидком образце может происходить через регистрацию изменений как вольт-амперных, так и флуоресцентных характеристик сенсора.

Сенсор настоящей заявки можно регенерировать для использования в дальнейших циклах обнаружения. Регенерация проводится путем воздействия на сенсор дополнительного комплексообразователя, который можно назвать регенерирующим комплексообразователем. Регенерирующий комплексообразователь отличается от используемого в сенсоре комплексообразователя. Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) может выступать в качестве регенерирующего комплексообразователя. В оптимальном варианте реализации, сенсор настоящей заявки можно регенерировать не менее 6 раз.

Сенсор настоящей заявки можно приготовить следующим образом. Сначала

методом стандартного твердофазного пептидного синтеза (ТФПС) синтезируется комплексообразующий агент, содержащий пептид из 2-6 аминокислот, натуральных, модифицированных или имитаторов аминокислот. Если в качестве дополнительного средства обнаружения используется флуорофор, то он присоединяется к N-концу пептидного комплексообразователя методом стандартной химии пептидного связывания. К C-концу пептида присоединяется линкерная группа тоже посредством метода стандартной химии пептидного связывания. Далее с помощью линкерной группы комплексообразующий агент присоединяется или иммобилизуется на поверхность полимерной мембраны с нанопорами.

Сенсор настоящей заявки можно использовать в комбинации с тест-полоской для обнаружения ионов металлов в жидкой пробе. Тест-полоска может содержать сенсор настоящей заявки на материале-носителе. Материал-носитель может иметь по меньшей мере две прорези или углубления для нанесения жидкого образца. В одну из прорезей/углублений может помещаться жидкая проба для качественного и/или количественного анализа на ионы металлов. В другую прорезь/углубление может быть нанесен контрольный раствор. Если для количественного определения ионов металлов в жидкой пробе нужны другие щели/углубления, то можно использовать калибровочный раствор. В оптимально варианте реализации, сенсор, используемый в комбинации с тест-полоской, содержит комплексообразующий агент, например медьсвязывающую группу, линкерную группу и ПЭТ-ионно-трековую мембрану с флуорофором в качестве средства обнаружения.

Описание чертежей

Фиг. 1 показывает две позиции метода обнаружения с использованием сенсора данной заявки, содержащего 5(6)-карбоксифлуоресцеин в качестве дополнительного средства обнаружения.

Фиг. 2(a) показывает спектры в области видимых и УФ-волн для комплекса Cu^{2+} при pH 8,0 (черная линия) и комплекса Ni^{2+} при pH 10,5 (серая линия) с пептидом (см. также фиг. 2e), присоединенным к линкерной группе ПЭГ₄. Увеличение области спектра от 350 до 650 нм показано на вставке. На фиг. 2(b-d) представлены спектры в области видимых и УФ-волн, показывающие pH-зависимое образование комплекса Cu^{2+} (черный квадрат) и комплекса Ni^{2+} (серые точки) с пептидами b) Ac-DAP- β Ala-His (Ac-ATCUN) (1 mM, вода), c) Ac-DAP- β Ala-Asp (Ac-ATCUN H3D) (1 mM, вода) и d) Ac-DAP- β Ala-Ala (Ac-ATCUN H3A) (1 mM, вода), присоединенными к линкерной группе (ПЭГ₄). Больцмановская аппроксимация данных (черные и серые линии) показывает сигмоидальный вид образования комплекса. Фиг. 2(e) показывает образование комплекса

между медьсвязывающими группами DAP-βAla-His, DAP-βAla-Asp, DAP-βAla-Ala и металлом M^{2+} (Cu^{2+}), где R представляет собой 5(6)-карбоксифлуоресцеин (FAM) или ацетил (Ac).

На фиг. 3(a) представлен спектр флуоресценции, регистрирующий уменьшение интенсивности флуоресценции 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP-βAla-His-линкераПЭГ₄ (1 мкМ, в буфере 2-(N-морфолино)-этансульфоновой кислоты (МЭС), pH 6,50) при добавлении к нему от 0 до 25 мкМ водного раствора $CuSO_4$. На фиг. 3(b) показано изменение интенсивности флуоресценции в зависимости от изменения молярного соотношения между Cu^{2+} и 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP-βAla-His-линкеромПЭГ₄ (обозначенном как «пептид» в описании оси абсцисс). На фиг. 3(c) представлен спектр флуоресценции, регистрирующий уменьшение интенсивности флуоресценции 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP-βAla-His-линкераПЭГ₄ (1 мкМ, буфер МЭС, pH 6,50) при добавлении к нему от 0 до 3 мМ водного раствора $NiSO_4$. На фиг. 3(d) показано изменение интенсивности флуоресценции в зависимости от изменения молярного соотношения между Ni^{2+} и 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP-βAla-His-линкеромПЭГ₄ (названном «пептидом» в описании оси абсцисс).

На фиг. 4(a) представлен спектр флуоресценции, регистрирующий уменьшение интенсивности флуоресценции 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP-βAla-His-линкераПЭГ₄ (0,1 мкМ, фосфатный буфер, pH 8,0) при добавлении к нему от 0 до 0,15 мкМ водного раствора $CuCl_2$. На фиг. 4(b) показано изменение интенсивности флуоресценции в зависимости от молярного соотношения между Cu^{2+} и 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP-βAla-His-линкеромПЭГ₄ (обозначенном как «пептид» в описании оси абсцисс).

На фиг. 5(a) представлен спектр флуоресценции, регистрирующий уменьшение интенсивности флуоресценции 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP-βAla-His-линкераПЭГ₄ (0,025 мкМ, буфер CAPS, pH 10,55) при добавлении к нему от 0 до 0,038 мкМ водного раствора Ni^{2+} . На фиг. 5(b) показано изменение интенсивности флуоресценции в зависимости от молярного соотношения между Ni^{2+} и 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP-βAla-His-линкеромПЭГ₄ (обозначенном как «пептид» в описании оси абсцисс).

Фиг. 6(a) представляет собой спектр титрования в области видимых и УФ-волн для Ac-DAP-βAla-His-линкераПЭГ₄ (0,68 мМ, буфер МЭС pH 6,50) после добавления водного раствора Cu^{2+} (0 – 0,7 мМ). На фиг. 6(b) показан коэффициент поглощения ϵ комплекса Cu^{2+} в зависимости от молярного соотношения между Cu^{2+} и Ac-DAP-βAla-His-линкеромПЭГ₄ (обозначенном как «пептид» в описании оси абсцисс).

Фиг. 7(a) представляет собой спектр титрования в области видимых и УФ-волн для Ac-DAP-βAla-His-линкераПЭГ₄ (0,68 мМ, буфер МЭС pH 6,50) после добавления водного

раствора NiSO_4 (от 0 до 16 мМ). На фиг. 7(b) показано изменение абсорбции в зависимости от молярного соотношения между Ni^{2+} и Ас-DAP- β Ala-His-линкеромПЭГ₄ (обозначенном как «пептид» в описании оси абсцисс).

На фиг. 8(a) показаны изображения флуоресцентного излучения, полученные с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) после добавления различных количеств NiSO_4 (вверху). Также указано среднее значение интенсивности флуоресценции по отношению к разной концентрации NiSO_4 (внизу). На фиг. 8(b) показано изображение флуоресценции, полученное с помощью КЛСМ после добавления 100 мМ ZnSO_4 (вверху). Также указано среднее значение интенсивности флуоресценции при добавления 100 мМ ZnSO_4 в сравнении с референсной интенсивностью флуоресценции «вымывтых» с помощью 100 мМ ЭДТА нанопор (внизу).

На фиг. 9(a) представлен спектр флуоресценции, регистрирующий результаты титрования флуоресценции 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP- β Ala-His-линкераПЭГ₄ (1 мкМ, 100 мМ буфер МЭС, pH 6,50) при добавлении к нему от 0 до 3 мМ водного раствора ZnSO_4 . На фиг. 9(b) показан спектр титрования в области видимых и УФ-волн для Ас-DAP- β Ala-His-линкераПЭГ₄ (1 мМ, 100 мМ буфер МЭС, pH 6,50) после добавления к нему водного раствора ZnSO_4 (от 0 до 2 мМ).

На фиг. 10(a) показана поверхность ионно-трековой ПЭТ-мембраны с нанопорами и иммобилизованным 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP- β Ala-His-линкеромПЭГ₄ (посредством линкераПЭГ₄ в качестве линкерной группы) (отраженный свет). На фиг. 10(b) показаны изображения, полученные с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ), показан сенсор, содержащий 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP- β Ala-His-линкерПЭГ₄, связанный (через линкерПЭГ₄) с протравленной ионными треками ПЭТ-мембраной с нанопорами. Область с правой стороны показывает непротравленные нанопоры, 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP- β Ala-His-линкерПЭГ₄ на них не иммобилизовался. На фиг. 10(c) показана линейная зависимость между уменьшением средней интенсивности флуоресценции и увеличением концентрации ионов Cu^{2+} . На фиг. 10(d) изображены «включено-выключено» характеристики сенсора, полученные с помощью флуоресцентного излучения КЛСМ; в частности, показана возможность повторного использования сенсора после регенерации с помощью 1 мМ ЭДТА и промывки водой и буфером МЭС при pH 6,50.

На фиг. 11 показан график зависимости $F_0 - F$ от концентрации ионов Cu^{2+} для определения предела обнаружения сенсора, содержащего 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP- β Ala-His-линкерПЭГ₄ (1 мкМ, 100 мМ буфер МЭС, pH 6,50; добавление водного раствора CuSO_4 (от 0 до 60 нМ)), где F_0 - это интенсивность флуоресценции раствора без

аналита, то есть без ионов Cu^{2+} , а F - интенсивность флуоресценции раствора с ионами Cu^{2+} .

На фиг. 12 показаны вольт-амперные характеристики протравленной ионно-трековой ПЭТ-мембраны с нанопорами без иммобилизованного на них сенсора (исходное состояние), протравленной ионно-трековой ПЭТ-мембраны с нанопорами, модифицированными с помощью ЭДА (ЭДА-модифицирована) и протравленной ионно-трековой ПЭТ-мембраны с нанопорами, на которых был иммобилизован 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP- β Ala-His-линкерПЭГ₄ (пептид-модифицирована).

На фиг. 13(a) показаны вольт-амперные характеристики сенсора, содержащего протравленную ионно-трековую ПЭТ-мембрану с нанопорами, на которую был иммобилизован 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP- β Ala-His-линкерПЭГ₄ при применении различных концентраций ионов Cu^{2+} . На фиг. 13(b) показана зависимость проводимости от концентрации ионов Cu^{2+} . На фиг. 13(c) показано поведение обратимого комплексообразования/разрушения комплекса с участием ионов Cu^{2+} при использовании ЭДТА в качестве дополнительного комплексообразователя.

На фиг. 14 показаны вольт-амперные характеристики сенсора, содержащего протравленную ионно-трековую ПЭТ-мембрану с нанопорами, на которую был иммобилизован 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP- β Ala-His-линкерПЭГ₄ и были нанесены растворы 1 нМ Cu^{2+} , Ni^{2+} или Zn^{2+} ионов в буфере (МЭС/KCl 100 мМ, pH 6,5).

Примеры реализаций сенсоров

Твердофазный пептидный синтез (ТФПС) и характеристика медьсвязывающих групп, используемых в качестве комплексообразователей

Медьсвязывающие комплексы 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP- β Ala-His-линкерПЭГ₄ (1), ацетил(Ас)-DAP- β Ala-His-линкерПЭГ₄ (2), ацетил(Ас)-DAP- β Ala-Asp-линкерПЭГ₄ (3) и ацетил(Ас)-DAP- β Ala-Ala-линкерПЭГ₄ (4) были синтезированы стандартным методом Fmoc-ТФПС с использованием хлортритилхлоридной смолы (0,966 ммоль/г). После связывания смолы с линкеромПЭГ₄, блокировка возможных неотреагированных групп производилась смесью дихлорметана (ДХМ), метанола и диизопропилэтиламина (ДИЭА) в объемном соотношении 8,5 : 1 : 0,5 с последующим присоединением защищенных аминокислот Fmoc-His(Trt)-ОН, Fmoc-Asp(Trt)-ОН или Fmoc-Ala(Trt)-ОН, Fmoc- β Ala-ОН, Fmoc-Dap(Вос) и 5(6)-карбоксифлуоресцеина (флуорофор только для (1)). Снятие защиты осуществляли с помощью 20% пиперидина в N, N-диметилформамиде (ДМФ), а эффективность связывания контролировали спектрометрией поглощения при 301 нм. Полученные медьсвязывающие группы (2, 3 и 4) ацетилировали по N-концу уксусным ангидридом. Окончательное отщепление

медьсвязывающих групп (1) - (4) от смолы проводили в смеси триизопропилсилана (ТИПС), воды, трифторуксусной кислоты (ТФК) и ДХМ в объемном соотношении 2:2:48:48 при перемешивании в течение 1 ч при комнатной температуре.

Медьсвязывающие группы (2-4) очищали изократическим методом обратно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) на колонке C18 (MultoKrom 100-5, 250 x 20 мм, диаметр пор 100 Å, размер частиц 5,0 мкм) с использованием линейного градиента элюента Б (элюент А: вода (0,1% ТФК) и элюент Б: ацетонитрил (0,1% ТФК)) от 5% в течение первых 12 минут до 30% в течение 60 минут. Молекулярная масса была подтверждена с помощью масс спектрометрии методом ионизации с помощью электроспрея (ESI) ((1): m/z : $[M+H]^+$, рассчитано для C₄₄H₅₁N₇O₁₅ 918.92, обнаружено 918.35; (2): m/z : $[M+H]^+$, рассчитано для C₂₅H₄₃N₇O₁₀ 602.31, обнаружено 602.31), (3): m/z : $[M+H]^+$, рассчитано для C₂₃H₄₁N₅O₁₅ 580.28, обнаружено 580.28; (4): m/z : $[M+H]^+$, рассчитано для C₂₂H₄₁N₅O₁₀ 536.26, обнаружено 536.29).

Собранные фракции объединили, высушили лиофилизацией и поместили на хранение при -28°C. Чистота собранных фракций была подтверждена аналитической ОФ-ВЭЖХ на системе Waters XC e2695 (Waters, Милфорд, Массачусетс, США) с использованием диодноматричного детектора Waters PDA 2998, оснащенного ISAspher 100-3 C18 (C18, размер частиц 3,0 мкм, размер пор 100 Å, 50 × 4,6 мм, Isera GmbH, Дюрен, Германия). Медьсвязывающую группу (1), элюировали градиентом от 0 до 30% элюента Б в течение 10 мин при скорости потока 2 мл/мин. Медьсвязывающие группы (2), (3) и (4) элюировали 20 минут изократическим методом от 0% элюента Б в течение первых 4 минут с последующим линейным градиентом до 30% элюента Б. Хроматограммы экстрагировали при 214 нм. Молекулярные массы очищенных медьсвязывающих групп, а также их комплексов с Cu(II) и Ni(II) были подтверждены масс ESI спектрометрией на спектрометре TOF-Q impact II (Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия) и откалиброваны с помощью ESI-Tune-Mix компании Bruker.

Приготовление сенсора, содержащего медьсвязывающую группу, флуорофор, линкерную группу и протравленную ионно-трековую ПЭТ-мембрану с нанопорами

Протравленные ионно-трековые ПЭТ-мембраны с коническими нанопорами были изготовлены путем асимметричного химического травления латентных ионных треков, как описано в Nucl Instrum Methods Phys Res, Sect B 2001, 184, 337-346. ПЭТ-фольга или мембраны были сначала облучены одиночными быстрыми тяжелыми ионами (Au) с кинетической энергией 11,4 МэВ/нуклон на линейном ускорителе UNILAC (GSI Helmholtz Center for Heavy Ion Research, Дармштадт, Германия). Затем латентные ионные треки в полимерной фольге или мембранах были сенсibilизированы мягким ультрафиолетовым

светом. Процесс химического травления треков проводился в кондуктометрической ячейке. Ионно-трековая фольга или мембраны были закреплены между двумя камерами ячейки. В одну камеру был залит травильный раствор (9 М NaOH), а в другую – стоп-раствор (1 М KCl + 1 М HCOOH). Процесс травления проводился при комнатной температуре и контролировался путем приложения к фольге или мембране разницы потенциалов в –1 вольт. Процесс травления прекращали после достижения точки резкого скачка электрического тока. Затем протравленную фольгу или мембрану промывали стоп-раствором и погружали в деионизированную воду на ночь для удаления остаточных солей.

Для того, чтобы присоединить к поверхности полимерной фольги или мембраны, в частности, к поверхности нанопор группы карбоновых кислот использовали технологию химического травления. Сначала активировали группы карбоновых кислот методами стандартной химии карбодиимидного взаимодействия. Затем активировали протравленную трековую фольгу или мембрану, подвергая её воздействию этанольного раствора, содержащего 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (ЭДК) (100 мМ) и пентафторфенил (ПФФ) (200 мМ) в течение часа при комнатной температуре. Далее промывали активированную фольгу или мембрану несколько раз этанолом и оставляли на ночь в растворе этилендиамина (ЭДА, 50 мМ), чтобы позволить аминореактивным сложным эфирам ПФП ковалентно связаться с аминогруппой ЭДА. Утром модифицированную полимерную фольгу или мембрану тщательно промывали этанолом и потом деионизированной водой.

Затем на ЭДА-модифицированную фольгу или мембрану иммобилизировали сенсор, содержащий на конце линкера активированные группы карбоновой кислоты (фиг. 2(с)). Группы карбоновых кислот линкера активировались с помощью 1-[бис(диметиламино)метилден]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5]пиридиний-3-оксид гексафторфосфата (гексафторфосфат азабензотриазол тетраметил уроний, ГАТУ) и ДИЭА, и оставлены реагировать с медьсвязывающими группами (1) - (4) (0,5 мМ) в ДМФ на всю ночь при комнатной температуре.

Характеристика комплексов Cu^{2+} и Ni^{2+} с медьсвязывающей группой в качестве комплексообразующего агента сенсора и селективность сенсора настоящей заявки к ионам Cu^{2+} по сравнению с ионами Ni^{2+} и Zn^{2+} .

Исследования флуоресценции, проведенные с (1) при pH 8,0, при котором наблюдалось оптимальное образование Cu-комплекса, показывают, что при добавлении одного эквивалента ионов Cu^{2+} интенсивность флуоресценции понижается до 89% (остается 11% интенсивности) за счет образования нефлуоресцентного комплекса между

ионами Cu^{2+} и медьсвязывающей группы (фиг. 4(a),(b)). Для ионов Ni^{2+} pH 10,55 был оценен как самый низкий pH, при котором достигается полное образование Ni-комплекса и при добавлении 1 эквивалента ионов Ni^{2+} наблюдается 29% оставшейся флуоресценции (фиг. 5(a),(b)). Чтобы получить отчетливую селективность сенсора к ионам Cu^{2+} , pH медьсвязывающей группы DAP- β Ala-His протитровали и получили pH 6,50, как видно из фиг. 2(b). Аналогичная селективность к ионам Cu^{2+} при pH 6,5 достигается при использовании DAP- β Ala-Asp (Ac-ATCUN H3D) (фиг. 2(c)) и DAP- β Ala-Ala (Ac-ATCUN H3A) (фиг. 2 (d)). Более того, Ac-ATCUN H3D имеет более широкий диапазон pH (приблизительно от 5,5 до 7,2), при котором он обладает высокой селективностью к Cu^{2+} (фиг. 2(c)). pH-титрование проводили в 1 mM растворе сенсора в деионизированной воде. К нему добавляли один эквивалент соответствующего иона металла, Cu^{2+} или Ni^{2+} , и с помощью 0,1 mM HCl снижали pH до $\text{pH} < 3$. Далее pH постепенно увеличивали, добавляя к раствору небольшие аликвоты 0,1 mM NaOH, и регистрировали спектр.

При pH 6,50 комплексообразования с ионами никеля практически не происходит, тогда как для ионов меди это pH_{50} . Титрование ионов Cu^{2+} в видимой и ультрафиолетовой областях спектра показывает ожидаемое поведение меди при pH_{50} , демонстрируя насыщение после добавления примерно 0,5 эквивалента ионов Cu^{2+} (фиг. 6(a),(b)).

Спектр флуоресценции на фиг. 3(a) показывает гашение интенсивности флуоресценции 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP- β Ala-His-линкераПЭГ₄ (1) (1 мкМ, буфер МЭС, pH 6,50) при добавлении CuSO_4 в концентрациях от 0 до 25 мкМ. Максимум эмиссии (λ) регистрируется при 518 нм. Титрование флуоресценции при добавлении 20 эквивалентов Cu^{2+} при pH 6,50 ведёт к 88% тушения флуоресценции (остается 12% интенсивности флуоресценции) (фиг. 3(b)). Для никеля же титрование флуоресценции при pH 6,50 требует добавления 1364 его эквивалентов и ведёт всего лишь к 43% гашения флуоресценции (остается 57% интенсивности флуоресценции) (фиг. 3(c),(d)), что можно объяснить недостаточным комплексообразованием никеля при pH 6,50.

Кроме этого, эксперимент взаимодействия Ni^{2+} с Ac-DAP- β Ala-His-линкеромПЭГ₄ (2) при pH 6,50 не показал требуемого максимального поглощения при 438 нм, что указывает на образование плоской координации Ni^{2+} с комплексообразующим агентом, т.е. медьсвязывающей группой. Вместо этого максимальное поглощение наблюдалось при 394 нм, что указывает на образование неспецифического октаэдрического связывания вместо ожидаемого комплекса между ионами Ni^{2+} и медьсвязывающей группой (фиг. 7(a),(b)). Это гарантирует селективность сенсора настоящей заявки к Cu^{2+} по сравнению с Ni^{2+} при использовании в заявленном диапазоне pH и подтверждает почти исключительное образование комплекса между медью и медьсвязывающей группой, что

относится также к (3) и (4).

Фиг. 8(a) также показывает отсутствие видимого уменьшения интенсивности флуоресценции для ионов Ni^{2+} в диапазоне от 0 до 200 мкМ в буфере МЭС при pH 6,50. Только при добавлении концентрированного раствора NiSO_4 (1 мМ = 1000 мкМ в буфере МЭС) наблюдается тушение флуоресценции. Ионы Zn^{2+} вообще не влияют на интенсивность флуоресценции даже при добавлении 100 мМ ZnSO_4 в буфере МЭС при pH 6,50 (фиг. 8(b)). pH 6,50 был выбран, чтобы продемонстрировать селективность сенсора данной заявки по отношению к ионам Cu^{2+} .

Константы связывания Cu^{2+} и Ni^{2+} с комплексообразующим агентом, т.е. медьсвязывающей группой настоящей заявки, определяли спектроскопией в видимой и ультрафиолетовой области при pH 6,50 с использованием метода Бенези-Хильдебранда. Полученные константы были аналогичны константам связывания, определенным с помощью флуоресцентной спектроскопии с использованием графика Штерна-Фольмера при pH 6,50. Константы связывания показали немного лучшее связывание с группой, содержащей флуорофор: $\log K_{\text{Cu}} = 6,8$ для 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP- β Ala-His-линкераПЭГ₄ (1) с $K_b = 6,27 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ и $\log K_{\text{Cu}} = 6,56$ для Ac-DAP- β Ala-His-линкераПЭГ₄ (2) с $K_b = 4,00 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. При pH 6,50 константы связывания с никелем снова продемонстрировали выдающуюся селективность к меди: $\log K_{\text{Ni}} = 3,26$ с $K_b = 1,80 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ для (1) и $\log K_{\text{Ni}} = 2,76$ с $K_b = 5,80 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ для (2). Оптимизация значений pH позволила достигнуть превосходного, селективного связывания меди с медьсвязывающей группой, содержащейся в сенсоре настоящего изобретения.

Связывания ионов Zn^{2+} с 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP- β Ala-His-линкераПЭГ₄ (1) или Ac-DAP- β Ala-His-линкераПЭГ₄ (2) обнаружено не было (фиг. 9(a),(b)).

Регистрация интенсивности флуоресценции сенсора, содержащего медьсвязывающую группу 5(6)-карбоксифлуоресцеин в качестве средства обнаружения, линкерную группу и протравленную ионными треками ПЭТ-мембрану с нанопорами

При использовании интенсивности флуоресценции в качестве параметра для определения присутствия и/или концентрации ионов Cu^{2+} , в частности, при использовании 5(6)-карбоксифлуоресцеина в качестве флуорофора, уменьшение интенсивности флуоресценции указывает на присутствие ионов Cu^{2+} . Чем выше концентрация Cu^{2+} , тем меньше интенсивность флуоресценции (фиг. 10(a)-(d)). Фиг. 10(a)-(d) показывают результаты измерений конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) комплекса 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP- β Ala-His-линкерПЭГ₄ (1), прикрепленного с помощью линкерной группы линкерПЭГ₄ к протравленной ионно-трековой ПЭТ-мембране с нанопорами.

Как видно на фиг. 10(a), 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP-βAla-His-линкерПЭГ₄ (1) почти исключительно присутствует на поверхности нанопор протравленной ионно-трековой ПЭТ-мембраны или фольги. При возбуждении лазером при 488 нм (1) изображен зеленым цветом на КЛСМ снимке (фиг. 10(b)). Фиг. 10(d) показывает результаты титрования флуоресценции с увеличением концентрации ионов Cu^{2+} , а также указывается возможность повторного использования сенсор данного изобретения. Для титрования в буферный раствор МЭС при pH 6,50 добавляли CuSO_4 в концентрациях от 0 до 100 мкМ. В частности, на указанной фигуре можно увидеть характеристики «включено-выключено» сенсора данного изобретения, демонстрирующие возможность его повторного использования после регенерации с помощью 1 мМ ЭДТА и промывки водой и буфером МЭС при pH 6,50. Фиг. 10(c) ясно показывает линейную зависимость уменьшения флуоресценции с увеличением концентрации ионов Cu^{2+} . Этот эксперимент проводили, измеряя гашение средней интенсивности флуоресценции при постепенном добавлении CuSO_4 , от 0 до 60 мкМ концентрации в буфере МЭС при pH 6,50.

Фиг. 10(c) и (d) показывают линейное гашение флуоресценции при добавлении Cu^{2+} . Кроме того, видно, что использование ЭДТА в качестве комплексообразователя позволяет восстановить чувствительность сенсора к Cu^{2+} . Чувствительность к Cu^{2+} может быть восстановлена минимум семь раз (фиг. 10(d)). Кроме того, был установлен минимальный срок годности сенсора, равный шести месяцам.

Также с помощью флуоресценции был определен предел обнаружения (LOD) для ионов Cu^{2+} . Для определения чувствительности сенсора настоящей заявки к ионам Cu^{2+} методом титрования флуоресценции был определен предел обнаружения сенсора, содержащего 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP-βAla-His-линкерПЭГ₄ (1), он составил 12 нМ. Это значение чрезвычайно важно в применении сенсора настоящего изобретения для обнаружения следовых количеств ионов меди при контроле пищи/воды или обнаружении ионов меди в ранней диагностике б. А. в моче.

LOD был рассчитан с использованием следующего уравнения: $\text{LOD} = (3 \times \sigma) / \text{наклон}$, где σ = стандартное отклонение исходного раствора. В 1 мкл исходного раствора (100 мМ МЭС буфер pH 6,50) пипетировали до 1 мкМ раствора пептида в 100 мМ буфере МЭС и определяли разницу между интенсивностью флуоресценции F0-F относительно начальной интенсивности (фиг. 11). Из шестикратного титрования было определено стандартное отклонение интенсивности флуоресценции в зависимости от разбавления исходного раствора $\sigma = 1,28$. (Eur J Biochem 2002, 269, 1323-1331).

Измерение вольт-амперных характеристик сенсора, содержащего медьсвязывающую группу, флуорофор, линкерную группу и протравленную ионно-

трековую ПЭТ-мембрану с нанопорами в качестве метода определения.

Далее описывается регистрация изменения вольт-амперных характеристик сенсора настоящей заявки. Сенсор состоит из медьсвязывающей группы, флуорофора и линкерной группы 5(6)-карбоксифлуоресцеин-DAP- β Ala-His-линкерПЭГ₄, посредством которой медьсвязывающая группа с флуорофором присоединяется к протравленной ионно-трековой ПЭТ-мембране с нанопорами. ПЭТ-мембрана с нанопорами ведет себя как омический резистор перед комплексообразованием Cu^{2+} , т.е. суммарный поверхностный заряд на нанопорах равен нулю, и поток заряда от узкого отверстия конуса к широкому отсутствует. Протравленная ионно-трековая ПЭТ-мембрана с коническими нанопорами и карбоксильными группами на поверхности, без иммобилизованной медьсвязывающей группы (в исходном состоянии), показывает поток заряда от узкого конического отверстия к широкому благодаря отрицательным карбоксильным группам (фиг. 12). После модификации этилендиамином (ЭДА) поверхностный заряд переключается с отрицательного на положительный, что приводит к селективности аниона и сопутствующей инверсии ректификационного поведения нанопоры (модифицированный ЭДА). Иммобилизация медьсвязывающей группы с флуорофором посредством линкера на поверхность нанопор протравленной ионно-трековой ПЭТ-мембраны приводит к изменению ионо-транспортных свойств нанопор с ректифицирующего на неректифицирующий из-за потери нанопорами поверхностного заряда. ПЭТ-мембрана с иммобилизованной медьсвязывающей группой ведет себя как омический резистор, то есть суммарный поверхностный заряд на стенках нанопор равен нулю.

При комплексообразовании ионов Cu^{2+} с медьсвязывающей группой на поверхности нанопоры генерируется положительный заряд, который одновременно изменяет ионо-транспортные свойства нанопор. Нанопоры становятся ионоселективными, о чем свидетельствует последовательное увеличение положительного заряда за счет увеличения концентрации Cu^{2+} в диапазоне концентраций от фМ до нМ, как показано на фиг. 13(а) и (b). Таким образом, присутствие образованного комплекса Cu на поверхности нанопор переключает ионо-транспортное свойство нанопор из непроводящего «выключенного» состояния в проводящее «включенное» состояние. Фиг. 13(а) и (b) показывают, что сенсор настоящей заявки распознает ионы Cu^{2+} даже при низких концентрациях до 1 фМ, и этот процесс распознавания можно преобразовать в электронный сигнал благодаря ионо-транспортным свойствам нанопор. Данные, представленные на фиг. 13 демонстрируют замечательную способность сенсора настоящей заявки к взаимодействию с Cu^{2+} благодаря особой медьсвязывающей группе. Кроме того, фиг. 14 показывает ионную селективность сенсора (FAM-ATCUN-ПЭГ₄ с иммобилизованным ПЭТ, см. фиг. 2(e)) для различных

ионов металлов, таких как Cu, Ni и Zn, при pH 6,5, ясно демонстрируя высокую селективность к Cu.

Воспроизводимость измерений проводимости в течение шести циклов показана на фиг. 13(c).

Настоящая заявка также касается следующих пунктов.

Пункт 1. Сенсор для обнаружения и/или определения концентрации ионов Cu^{2+} в жидкости, согласно изобретению, в котором комплексообразующий агент представляет собой медьсвязывающую группу, 2,3-диаминопропионовую кислоту (DAP)- β Ala-X, где X представляет собой натуральную или модифицированную аминокислоту, в частности, гистидин (His), аланин (Ala) или аспарагиновую кислоту (Asp).

Пункт 2. Сенсор по пункту 1 содержит медьсвязывающую группу 2,3-диаминопропионовой кислоты (DAP)- β Ala-His, DAP- β Ala-Asp или DAP- β Ala-Ala, где L-DAP предпочтительна.

Пункт 3. Сенсор по пп. 1 и 2, в котором средство обнаружения дополнительно содержит флуорофор, в частности 5(6)-карбоксифлуоресцеин или 6-карбоксифлуоресцеин.

Пункт 4. Сенсор по пункту 3, в котором флуорофор присоединен к N-концу DAP.

Пункт 5. Сенсор по пунктам 1-4, в котором линкерная группа присоединена к C-концу X.

Пункт 6. Сенсор по любому из пунктов от 1 до 5, в котором ПЭТ-мембрана с ионным трекингом и нанопорами представляет собой мембрану с функциональными группами, такими как карбоксилатные и/или аминогруппы на поверхности мембраны и на поверхности нанопор.

Пункт 7. Сенсор по любому из пунктов от 1 до 6, в котором медьсвязывающая группа с присоединённым флуорофором связана через линкерную группу и с поверхностью полимерной ионно-трековой мембраны, и с поверхностью её нанопор.

Пункт 8. Сенсор по любому из пунктов 1-7, в котором линкерная группа содержит полиэтиленгликоль, в частности, линкерная группа имеет формулу $\text{R}_1\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_a\text{-R}_2$, где a равно 4, R_1 является -NH и/или R_2 представляет собой COO(H)^- , при этом линкерная группа со структурой $\text{-HN-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_4\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (линкерПЭГ₄) или $\text{-HN-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_4\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ наиболее предпочтительна.

Пункт 9. Сенсор по любому из пунктов от 1 до 8 для избирательного обнаружения ионов Cu^{2+} в жидкости в присутствии ионов Ni^{2+} и/или ионов Zn^{2+} .

Пункт 10. Сенсор по любому из пунктов с 1 по 9 для использования при диагностике и/или мониторинге заболеваний, предпочтительно заболеваний, связанных с

аномальными концентрациями ионов Cu^{2+} и/или нарушением метаболизма ионов Cu^{2+} в организме, в частности, при болезни Альцгеймера, болезни Вильсона и болезни Менкеса.

Пункт 11. Сенсор по любому из пунктов 1-9 в применении для определения концентрации ионов Cu^{2+} *ex vivo* в моче индивидуумов при диагностике и/или мониторинге заболеваний, связанных с аномальными концентрациями ионов Cu^{2+} и/или нарушением метаболизма ионов Cu^{2+} , в частности, болезни Альцгеймера, болезни Вильсона и болезни Менкеса.

Пункт 12. Сенсор по пункту 10 или 11 в применении к аномальной концентрации ионов Cu^{2+} в жидкости организма, такой как моча и/или сыворотка крови, величина которой превышает или сильно занижена, по сравнению со здоровым индивидуумом.

Пункт 13. Сенсор по любому из пунктов 1-9 для использования при обнаружении ионов Cu^{2+} и/или определении концентрации ионов Cu^{2+} в пищевых продуктах или жидкостях, в частности в пробах воды из окружающей среды.

Пункт 14. Метод обнаружения ионов Cu^{2+} и/или определения концентрации ионов Cu^{2+} в пробе жидкости, включающий этапы:

доведение pH анализируемой пробы жидкости к диапазону от 5,0 до 8,5, в частности, к диапазону pH от 6,3 до 7,0,

взаимодействие сенсора по любому из пунктов 1-9 с жидкой пробой, и

обнаружение присутствия и/или концентрации ионов Cu^{2+} в жидкой пробе путем регистрации изменения параметра средства детектирования, и

при желании ещё включает стадию регенерации сенсора путем воздействия на сенсор регенерирующего комплексообразователя.

Пункт 15. Метод как в пункте 14, в котором регенерирующий комплексообразователь содержит ЭДТА.

Пункт 16. Метод как в пункте 14, в котором регистрируется изменение интенсивности флуоресценции и/или в котором концентрация ионов Cu^{2+} в пробе жидкости находится в диапазоне от 1 нМ до 60 мкМ, в частности от 1 нМ до 200 нМ.

Пункт 17. Метод как в пункте 14, в котором регистрируется изменение вольт-амперных характеристик и/или в котором концентрация ионов Cu^{2+} в пробе жидкости находится в диапазоне от 1 фМ до 60 мкМ, в частности от 1 фМ до 200 нМ.

Пункт 18. Тест-полоска для обнаружения ионов Cu^{2+} в жидкой пробе, содержащая сенсор по любому из пунктов 1-9.

Пункт 19. Метод изготовления сенсора в соответствии с пунктами 1-9, включающий этапы:

синтез соединения, включающего комплексообразующий агент, линкерную группу

и флуорофор, путем твердофазного пептидного синтеза,
предоставление полимерной мембраны, фольги или листа, и
соединение комплекса через линкерную группу с поверхностью полимерной
мембраны.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сенсор для обнаружения и/или определения концентрации ионов металлов в жидкости, содержащей комплексообразующий агент, подходящий для связывания подлежащих обнаружению ионов металла, средство детектирования и линкерную группу, при этом средство детектирования содержит полимерную мембрану с нанопорами.

2. Сенсор по п. 1, в котором полимерная мембрана с нанопорами представляет собой протравленную ионно-трековую полимерную мембрану, в частности, протравленную ионно-трековую мембрану из полиэтилентерефталата.

3. Сенсор по пп. 1 или 2, в котором линкерная группа содержит полиэтиленгликоль, в частности, где линкерная группа имеет формулу $R_1-[CH_2CH_2O]_a-R_2$, где a предпочтительно является числом от 2 до 10, $R_1 = -NH$ и $R_2 = CH_2CH_2COO-$.

4. Сенсор по любому из пп. 1-3, в котором линкерная группа связана с полимерной мембраной посредством нанопор и с комплексообразующим агентом, подходящим для связывания ионов металла, подлежащих обнаружению.

5. Сенсор по любому из пп. 1-4, в котором средство детектирования дополнительно содержит флуорофор, в частности 5(6)-карбоксифлуоресцеин.

6. Сенсор по п. 5, в котором флуорофор присоединен к комплексообразующему агенту, подходящему для связывания ионов металла, подлежащего обнаружению.

7. Сенсор по любому из пп. 1-6, в котором комплексообразующий агент, подходящий для связывания ионов металла, подлежащего обнаружению, представляет собой пептид, содержащий от 2 до 6 аминокислот, модифицированных аминокислот, и/или имитаторов аминокислот.

8. Сенсор по любому из пп. 1-7 для селективного детектирования ионов Cu^{2+} в жидкости и/или для определения концентрации ионов Cu^{2+} в жидкости.

9. Сенсор по п. 8, отличающийся тем, что комплексообразующий агент, подходящий для связывания ионов Cu^{2+} , содержит медьсвязывающую группу, такую как 2,3-диаминопропионовую кислоту (DAP)- β Ala-X, где X представляет собой аминокислоту или модифицированную аминокислоту, в частности, гистидин, аланин или аспарагиновую кислоту.

10. Сенсор по любому из пп. 1-9, предназначенный для использования при диагностике и/или мониторинге заболеваний, предпочтительно заболеваний, связанных с аномальными концентрациями ионов Cu^{2+} и/или нарушением метаболизма ионов Cu^{2+} , в частности, болезни Альцгеймера, болезни Вильсона и болезни Менкеса, или для использования при обнаружении ионов металлов и/или определении концентрации ионов

металлов в пищевых продуктах и пробах воды из окружающей среды.

11. Способ детектирования ионов металлов и/или определения концентраций ионов металлов в жидкой пробе, включающий этапы:

приведение сенсора по пп. 1-9 в контакт с жидким образцом, и
определение присутствия и/или концентрации ионов металлов в жидкой пробе путем регистрации изменения вольт-амперных характеристик и/или интенсивности флуоресценции сенсора, и
необязательно, дополнительно включающий стадию регенерации сенсора путем воздействия на сенсор регенерирующего комплексообразователя.

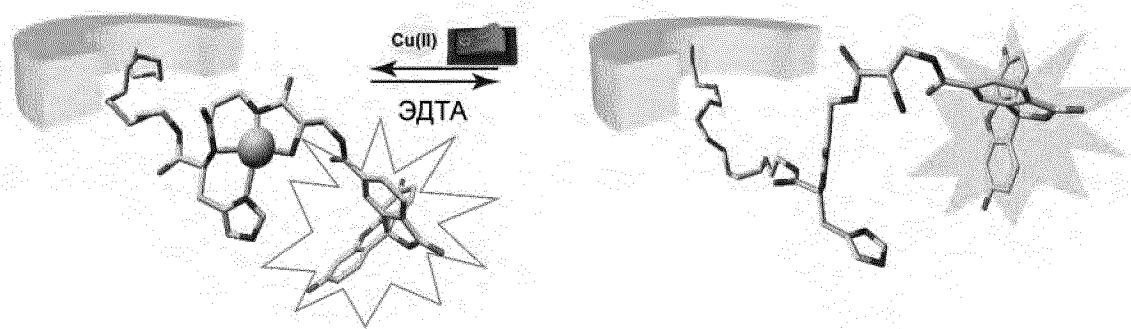
12. Способ по п. 11 для обнаружения ионов Cu^{2+} и/или для определения концентрации ионов Cu^{2+} в жидкой пробе, где способ дополнительно включает этап:

доведение pH анализируемой пробы жидкости до 5,0-8,5, в частности до pH 6,3-7,0 перед приведением сенсора в контакт с жидкой пробой.

13. Способ по пп. 11 или 12, в котором регистрируется изменение вольт-амперных характеристик и/или в котором концентрация ионов металла в жидкой пробе находится в диапазоне от 1 фМ до 60 мкМ, в частности, в диапазоне от 1 фМ до 200 нМ.

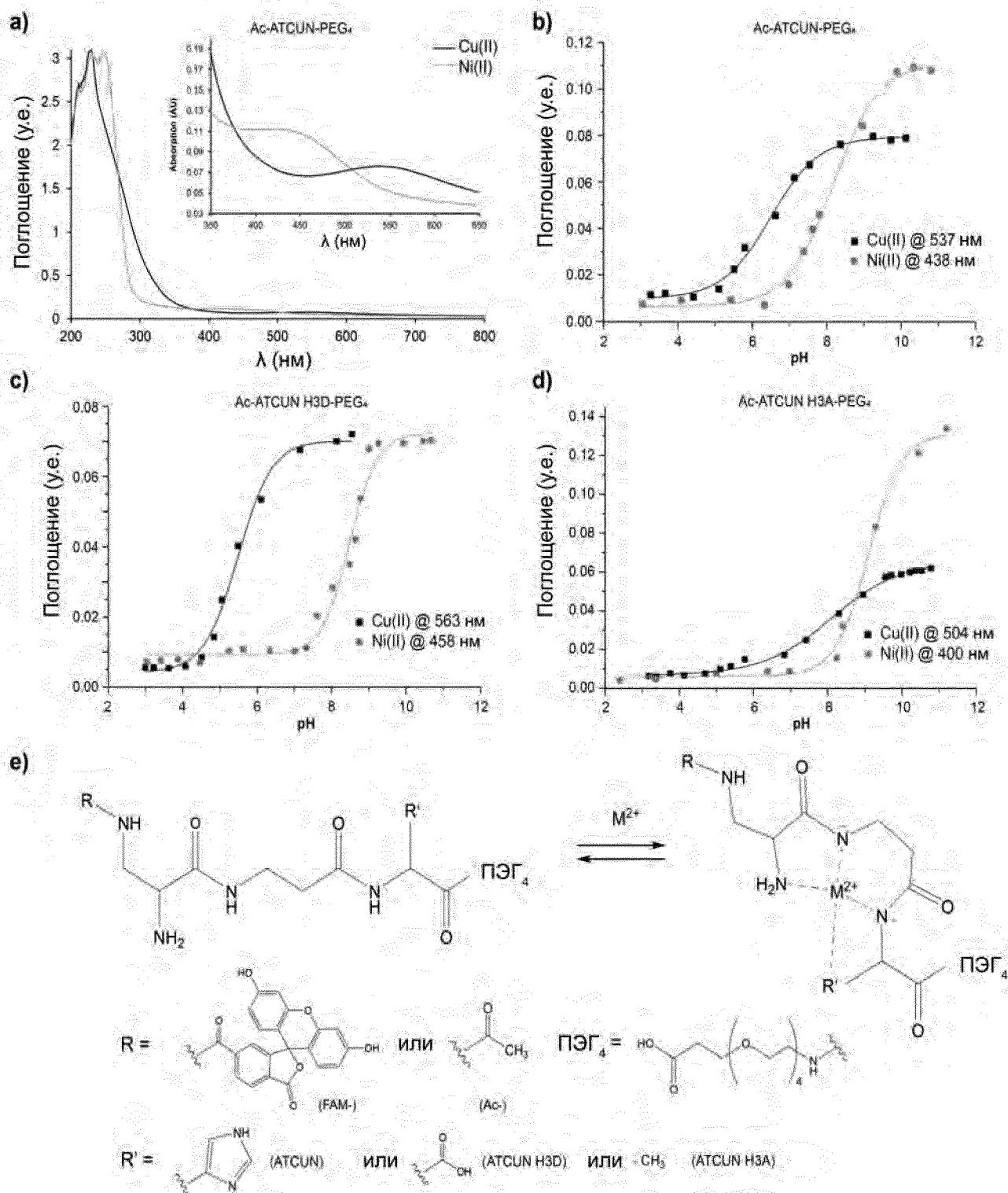
14. Способ по пп. 11 или 12, в котором регистрируется изменение интенсивности флуоресценции и/или где концентрация ионов металла в пробе жидкости находится в диапазоне от 1 нМ до 60 мкМ, в частности в диапазоне от 1 нМ до 200 нМ.

15. Тест-полоска для обнаружения ионов металлов и/или определения концентрации ионов металлов в жидкой пробе, содержащая сенсор по любому из пп. 1-9.

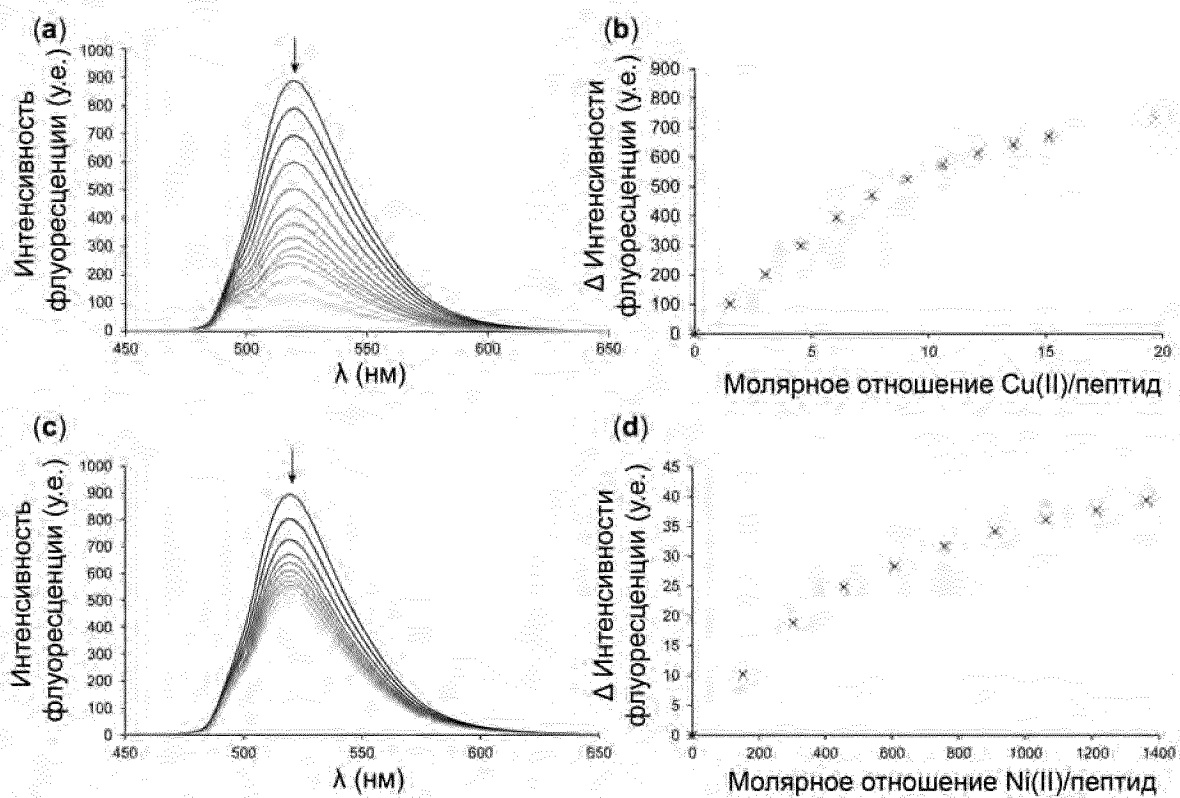


Фиг. 1

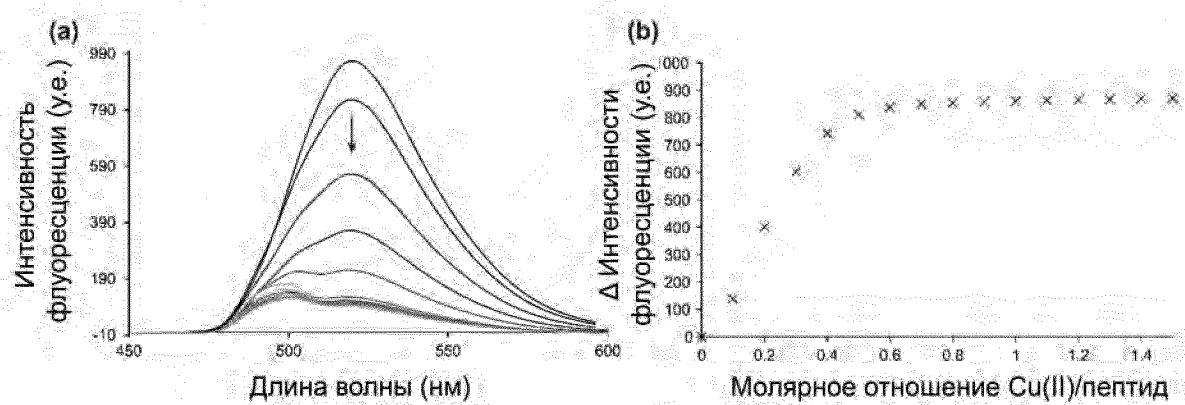
Фиг. 2



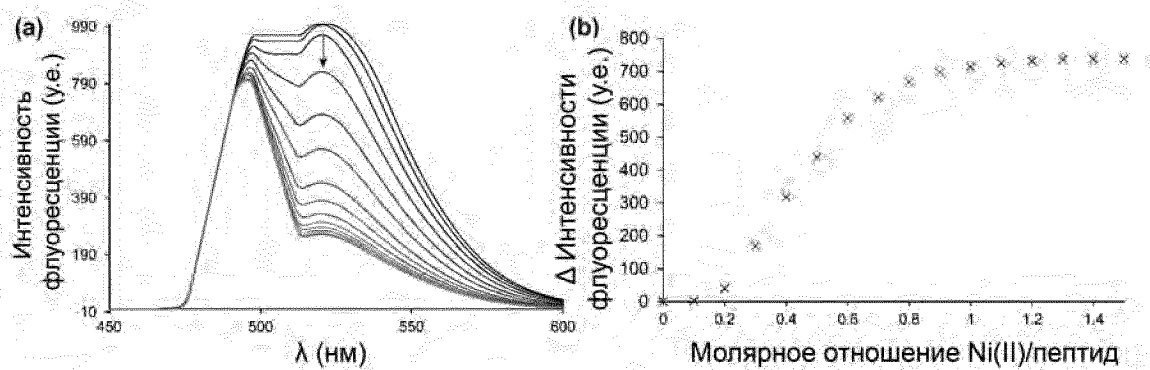
Фиг. 3



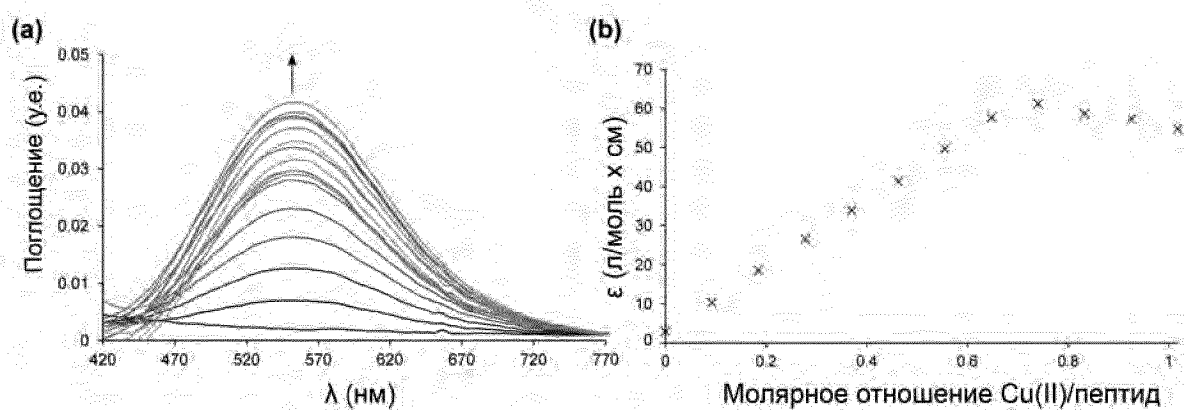
Фиг. 4



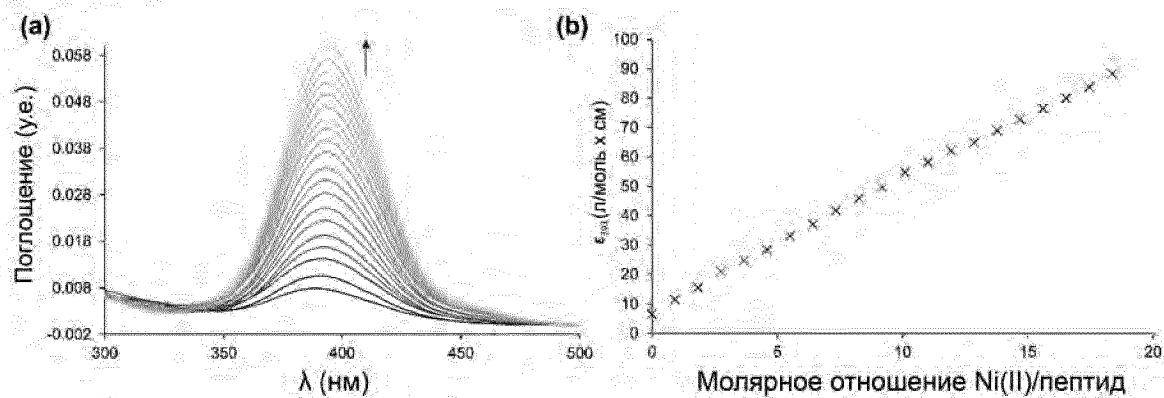
Фиг. 5



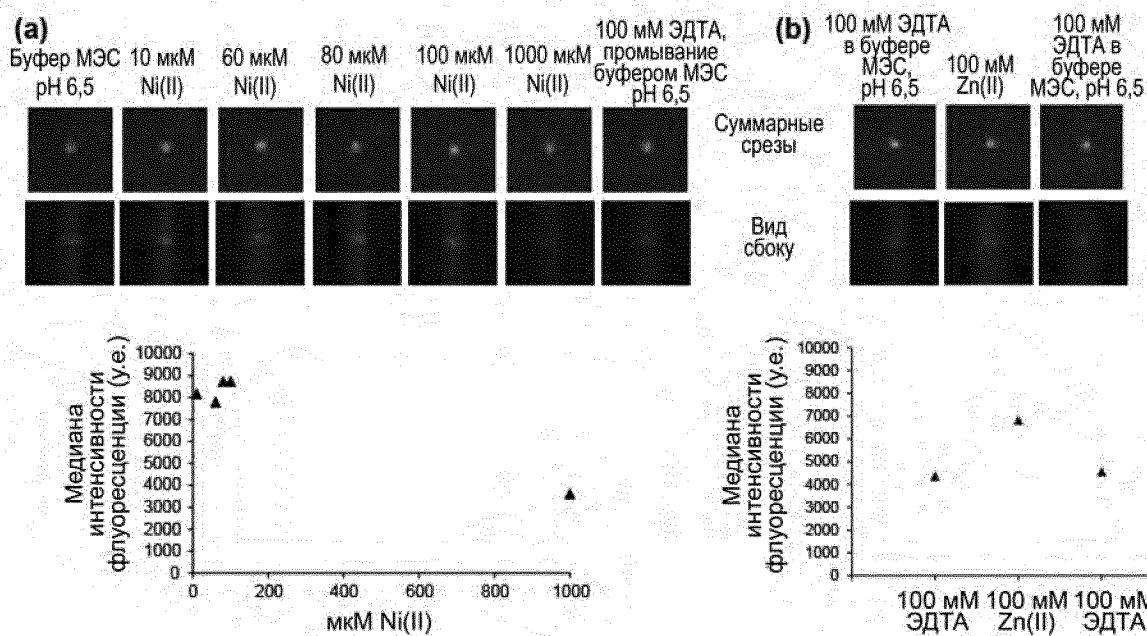
Фиг. 6



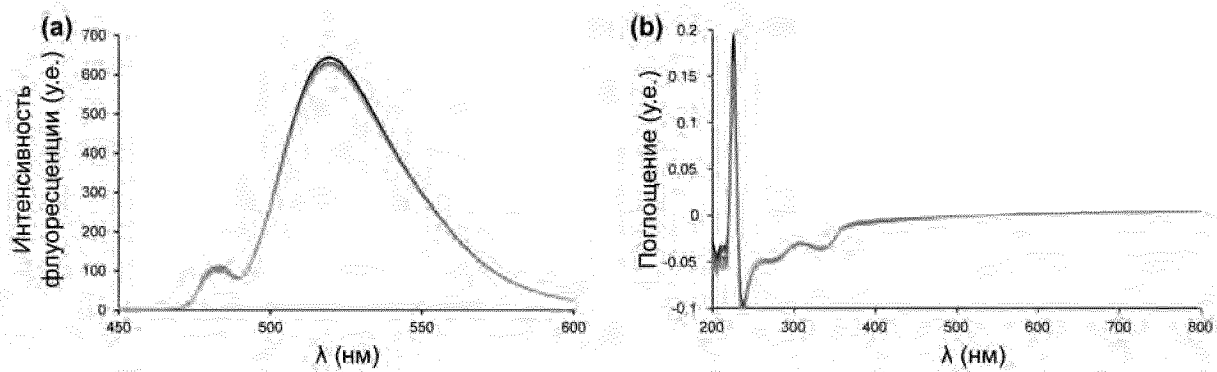
Фиг. 7



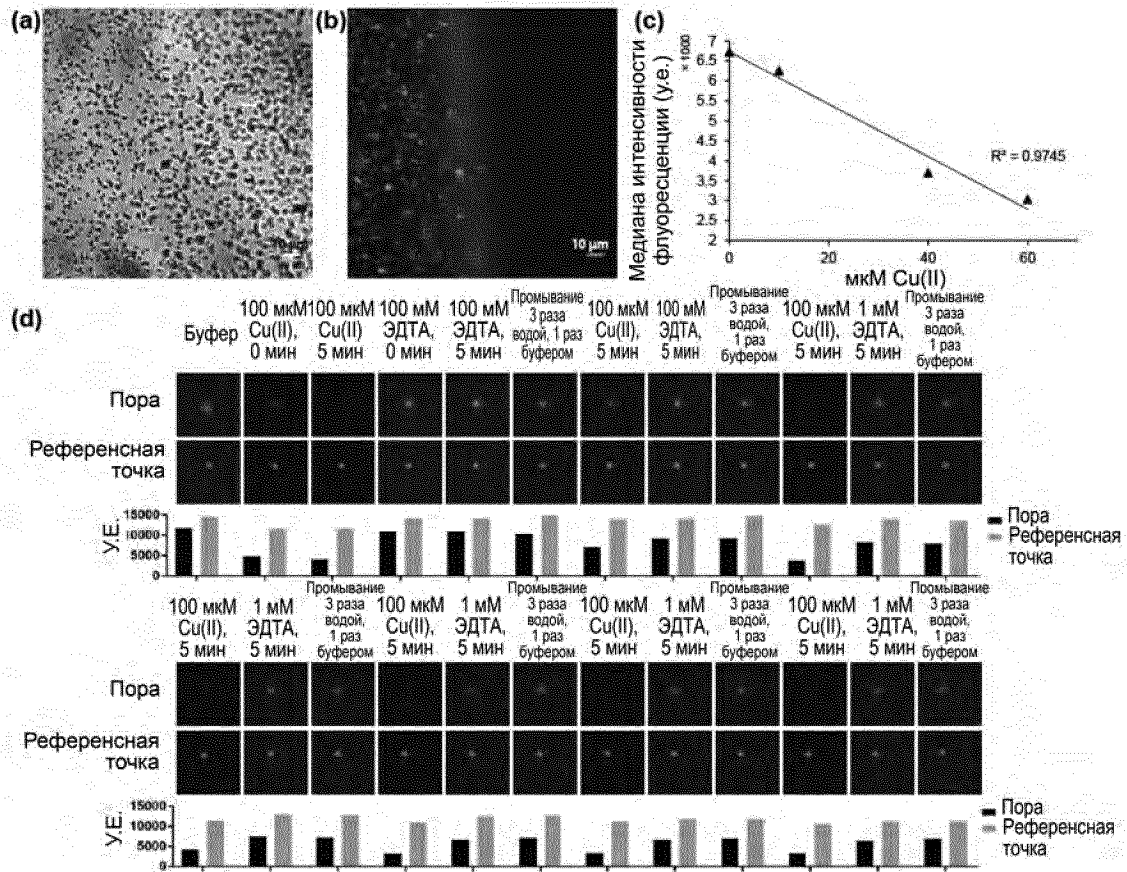
Фиг. 8



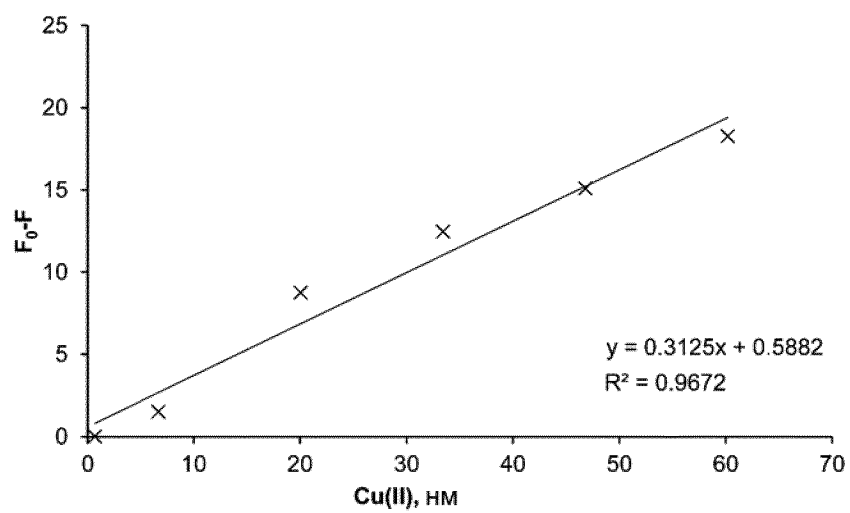
Фиг. 9



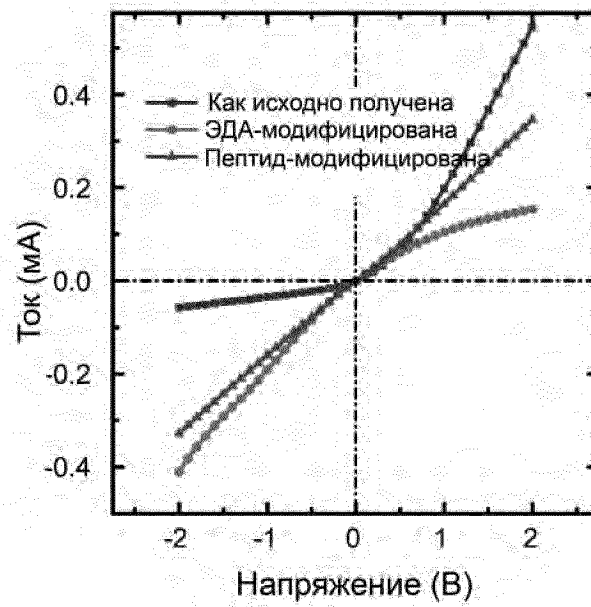
Фиг. 10



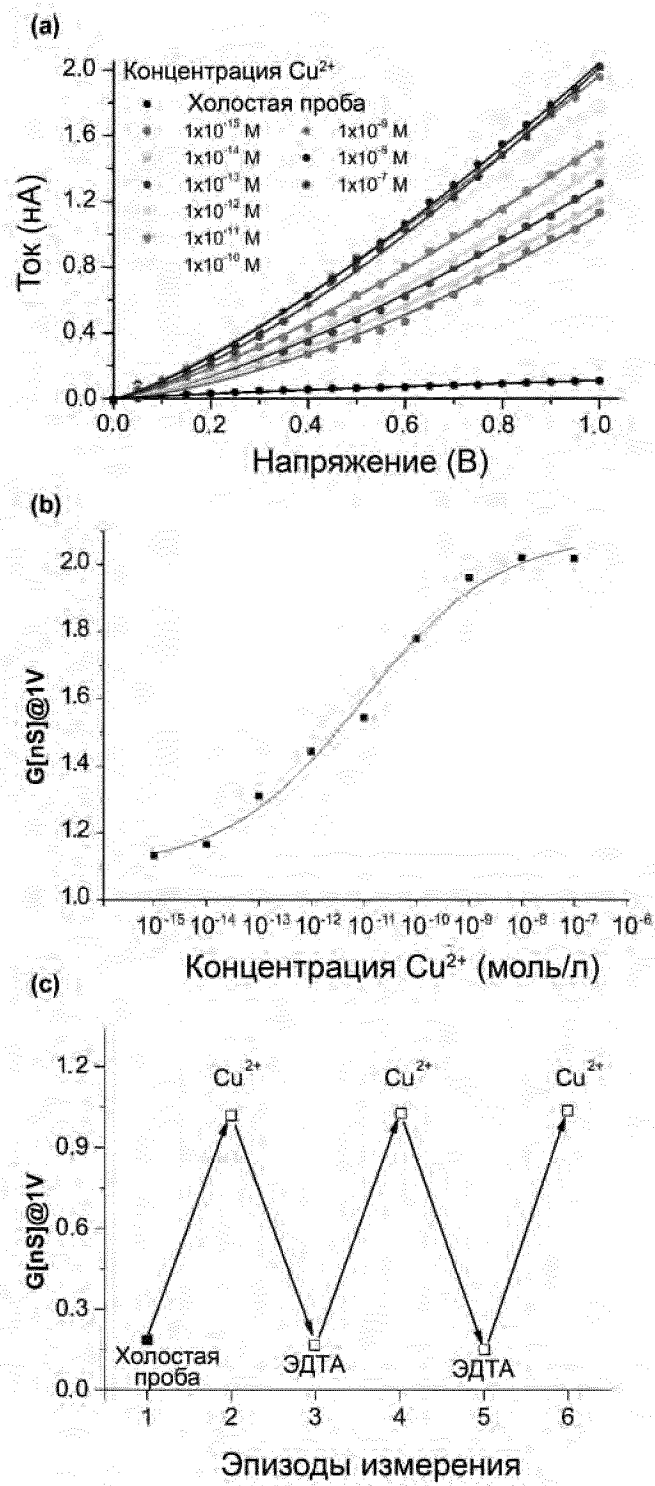
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 11

