



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 21/658 (2024.08); B82Y 15/00 (2024.08)

(21)(22) Заявка: 2024107658, 22.03.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.03.2024

Дата регистрации:
01.11.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.03.2024

(45) Опубликовано: 01.11.2024 Бюл. № 31

Адрес для переписки:

236041, г. Калининград, ул. А. Невского, 14,
ФГАОУ ВО Балтийский федеральный
университет им. И. Канта, ЦНПП ДНИР,
патентоведу

(72) Автор(ы):

Зюбин Андрей Юрьевич (RU),
Рафальский Владимир Витальевич (RU),
Докторова Светлана Алексеевна (RU),
Демишкевич Елизавета Александровна (RU),
Евтифеев Денис Олегович (RU),
Зозуля Александр Сергеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Балтийский федеральный
университет имени Иммануила Канта" (БФУ
им. И. Канта) (RU)

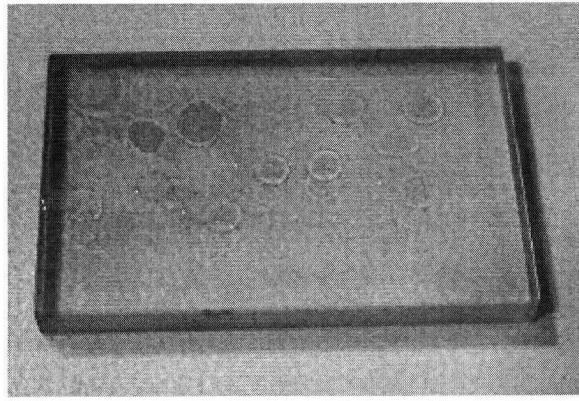
(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: С.А. Докторова и др. "Возможность
использования метода гигантского
комбинационного рассеяния света для
персонализации терапии метотрексатом",
Сборник тезисов VII Всероссийской научной
конференции "Клинические и теоретические
аспекты современной медицины", 2022 г., стр
35-36. RU 2543691 C2, 10.03.2015. US 7351588
B2, 01.04.2008. JP 2007240361 A, (см. прод.)

(54) Планарный наноструктурированный сенсор на основе поверхностного плазмонного резонанса для определения метотрексата в плазме крови человека

(57) Реферат:

Изобретение относится к области оптики и касается способа получения оптического сенсора с плазмонной структурой для получения разрешенных спектров лекарственного средства «метотрексат» в плазме человека. Способ включает создание химическим способом островковой пленки серебряных наночастиц. Для этого на химически очищенное кварцевое стекло марки «КУ-1» размером 3 на 4 см химически

наносят, а затем высушивают при комнатной температуре в течение 2 часов гидрозоль наночастиц серебра размером до 80 нм в количестве 2 мл. Технический результат заключается в упрощении конструкции и обеспечении возможности определения лекарственного средства «метотрексат» в концентрации порядка 10^{-10} моль/литр в плазме крови человека. 2 н.п. ф-лы, 2 ил.



Фиг.1

(56) (продолжение):
20.09.2007.

RU 2829593 C1

RU 2829593 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 21/65 (2006.01)
B82Y 15/00 (2011.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 21/658 (2024.08); *B82Y 15/00* (2024.08)

(21)(22) Application: **2024107658, 22.03.2024**

(24) Effective date for property rights:
22.03.2024

Registration date:
01.11.2024

Priority:

(22) Date of filing: **22.03.2024**

(45) Date of publication: **01.11.2024** Bull. № 31

Mail address:
**236041, g. Kaliningrad, ul. A. Nevskogo, 14,
FGAOU VO Baltijskij federalnyj universitet im.
I. Kanta, TSNPP DNIR, patentovedu**

(72) Inventor(s):

**Zyubin Andrej Yurevich (RU),
Rafalskij Vladimir Vitalevich (RU),
Doktorova Svetlana Alekseevna (RU),
Demishkevich Elizaveta Aleksandrovna (RU),
Evtifeev Denis Olegovich (RU),
Zozulya Aleksandr Sergeevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Baltijskij federalnyj universitet
imeni Immanuila Kanta" (BFU im. I. Kanta)
(RU)**

(54) **PLANAR NANOSTRUCTURED SENSOR BASED ON SURFACE PLASMON RESONANCE FOR DETERMINING METHOTREXATE IN HUMAN BLOOD PLASMA**

(57) Abstract:

FIELD: optics.

SUBSTANCE: invention relates to optics and concerns a method for producing an optical sensor with a plasmon structure for obtaining permitted spectra of the drug methotrexate in human plasma. Method involves chemical production of an island film of silver nanoparticles. For this purpose, a hydrosol of silver nanoparticles with size of up to 80 nm in amount of 2

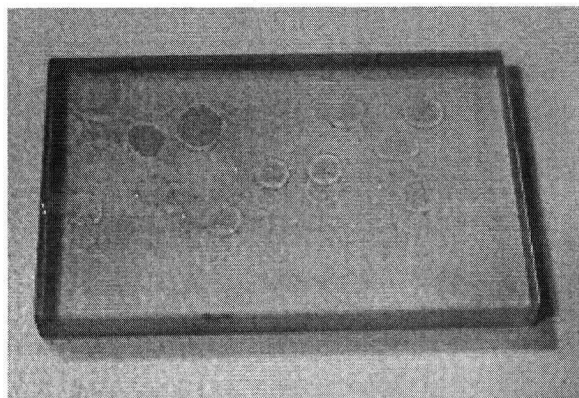
ml is chemically deposited on chemically cleaned quartz glass of the "KY-1" brand with size of 3 by 4 cm and then dried at room temperature for 2 hours.

EFFECT: simple design and enabling determination of the drug methotrexate in concentration of about 10^{-10} mol/l in human blood plasma.

2 cl, 2 dwg

RU 2 829 593 C1

RU 2 829 593 C1



Фиг.1

RU 2829593 C1

RU 2829593 C1

Изобретение относится к области физики, а именно к оптике, и представляет собой устройство - наноструктурированный оптический сенсор, основанный на эффекте поверхностного плазмонного резонанса, используемый для усиления сигнала комбинационного рассеяния метотрексата в плазме человека. Изобретение может быть
5 использовано в физике, медицине, биофизике.

Известны работы, являющиеся предпосылками заявляемого изобретения. Нижеприведенные примеры составляют часть предпосылок заявляемого изобретения и/или раскрывают методики, которые можно применять к некоторым аспектам заявляемого изобретения.

10 Разработка новых методов биомедицинских исследований с большим объемом данных, таких как секвенирование ДНК, протеомика, устройств мониторинга и протоколов визуализации, выявило значительные различия в механизмах и факторах, способствующих развитию заболеваний у конкретных исследуемых пациентов [Goetz L.H., Schork N.J. Personalized medicine: motivation, challenges, and progress //Fertility and
15 sterility. - 2018. - Т. 109. - №. 6. - С. 952-963]. В связи с этим возникают вопросы о том, в какой степени эти индивидуальные различия должны влиять на выбор оптимального способа лечения, мониторинга или профилактики заболевания. Основным правилом персонализированной медицины является уверенность в том, что одно и то же заболевание может иметь различную причину, клиническое течение и терапевтическую
20 эффективность в зависимости от особенностей пациента. Поэтому в последние годы решающее значение в тактике ведения и лечения конкретного пациента имеет индивидуальный подход или персонализированная медицина [Klak A. et al. Personalized medicine in rheumatology //Reumatologia/Rheumatology. - 2016. - Т. 54. - №. 4. - С. 177-186]. Персонализированная медицина, основанная на клинических, генетических и геномных
25 данных, уникальных для каждого пациента, является противоположностью традиционному терапевтическому процессу, который основан на адаптации лечения к видимым симптомам заболевания [Ginsburg G.S., McCarthy J.J. Personalized medicine: revolutionizing drug discovery and patient care //TRENDS in Biotechnology. - 2001. - Т. 19. -
30 №. 12. - С. 491-496]. Одним из методов, позволяющим персонализировать подход к фармакотерапии определенных заболеваний, является терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ). ТЛМ используется в клинической практике с целью определения концентрации конкретных лекарственных препаратов, что позволяет оптимизировать индивидуальные режимы дозирования [Bedoui Y. et al. Methotrexate an old drug with new
35 tricks //International journal of molecular sciences. - 2019. -Т. 20. - №. 20. - С. 5023; Гриднева Г.И. и др. Терапевтический лекарственный мониторинг метотрексата и его метаболитов в эритроцитах и мононуклеарах больных ревматоидным артритом //Современная ревматология. - 2020. - Т. 14. - №. 4. - С.60-64; Jiang X. et al. Systematic review and meta-
40 analysis on the efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis //Annals of palliative medicine. - 2021. - Т. 10. - №. 10. - С. 10652-10660]. В 1960-х годах были опубликованы первые фармакокинетические исследования, посвященные ТЛМ, в которых изучалась взаимосвязь между математическими теориями и результатами лечения пациентов [Kang J. S., Lee M. H. Overview of therapeutic drug monitoring //The Korean journal of internal medicine. - 2009. - Т. 24. - №. 1. - С. 1]. В конце 1960-х - начале 1970-х годов клиническая фармакокинетика сформировалась как дисциплина. В 1970-х годах активно изучались
45 нежелательные лекарственные реакции, и в ходе исследований было наглядно продемонстрировано, что путем построения терапевтических диапазонов можно снизить частоту токсичности препаратов, которые имеют узкий терапевтический индекс (дигоксин, фенитоин, литий, теофиллин) [Atkinson Jr A.J., Nordstrom K. The challenge of

in-hospital medication use: An opportunity for clinical pharmacology //Clinical Pharmacology & Therapeutics. - 1996. - Т. 60. - №. 4. - С. 363-367; DUHME D.W., GREENBLATT D.J., Koch-Weser J.A.N. Reduction of digoxin toxicity associated with measurement of serum levels: a report from the Boston Collaborative Drug Surveillance program //Annals of Internal Medicine. - 1974. - Т. 80. - №. 4. - С. 516-519; Shenfield G. M. Therapeutic drug monitoring beyond 2000 //British journal of clinical pharmacology. - 2001. - Т. 52. - №. Suppl 1. - С. 3S]. Появлению клинического фармакокинетического мониторинга способствовало также растущее понимание взаимосвязи между концентрацией и эффектами лекарственных средств, отображение фармакокинетических характеристик, появление высокопроизводительной компьютеризации и прогресс в аналитических технологиях [Kheir N. et al. Clinical pharmacokinetics: perceptions of hospital pharmacists in Qatar about how it was taught and how it is applied //International journal of clinical pharmacy. - 2015. - Т. 37. - С.1180-1187; Ensom M.H. N. et al. Clinical pharmacokinetics in the 21st century: does the evidence support definitive outcomes? //Clinical pharmacokinetics. - 1998. - Т. 34. - С. 265-279]. Важно отметить, что в последнее время бурное развитие фармакогенетических и фармакогеномных исследований было вызвано значительным объемом генетических данных, полученных в рамках проекта "Геном человека" [Кпарр К. К. The Human Genome Project. APhA 2000-American Pharmaceutical Association Annual Meeting. Cited 2000 Jun 2]. В настоящее время используется стандартный метод исследования концентраций лекарственных средств - высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и ее модификации. Исторически сложилось так, что большинство лабораторий разрабатывали отдельные процедуры ТЛМ с использованием различных аналитических методов, включая радиоиммуноанализ и ВЭЖХ. Наиболее часто используемыми методами являются флуоресцентный поляризационный иммуноанализ (ФПИА), иммуноферментный анализ (ИФА) и твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) [Lim J. et al. Performance evaluation of the Syva EMIT methotrexate assay on the Toshiba 200FR NEO //Laboratory Medicine Online. - 2014. - Т. 4. - №. 4. - С. 187-190, Ates H.C. et al. On-site therapeutic drug monitoring //Trends in biotechnology. -2020. - Т. 38. - №. 11. - С. 1262-1277]. Данные методы специфичны, однако, в некоторых случаях метаболиты или другие вещества, подобные лекарственным средствам, также распознаются при анализе образцов, приводя к ложноположительным результатам [Patel J.A. et al. Abnormal theophylline levels in plasma by fluorescence polarization immunoassay in patients with renal disease //Therapeutic drug monitoring. - 1984. - Т. 6. - №. 4. - С. 458-460, Kushnir M.M. et al. Analysis of catecholamines in urine by positive-ion electrospray tandem mass spectrometry //Clinical Chemistry. - 2002. - Т. 48. - №. 2. - С. 323-331]. В целом данные методики являются рутинными вследствие простоты и скорости исполнения, однако они имеют некоторые ограничения: «шумы» от компонентов матриц, метаболитов лекарств, структурно сходных препаратов других групп, а также эндогенных соединений [Xu Q.A., Madden T.L. Analytical methods for therapeutic drug monitoring and toxicology. -John Wiley & Sons, 2011]. С другой стороны, эталонные методы, такие как жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС), в большинстве случаев по-прежнему являются золотым стандартом для ТЛМ в клинических лабораториях, поскольку они аналитически более надежны. Однако анализ занимает много времени и сил из-за тщательной подготовки проб и значительного объема образцов, необходимых для исследования [Karami F. et al. Analytical methodologies for determination of methotrexate and its metabolites in pharmaceutical, biological and environmental samples //Journal of Pharmaceutical Analysis. - 2019. - Т. 9. - №. 6. - С. 373-391, Silva M.F. et al. Liquid chromatographic methods for the therapeutic drug monitoring of methotrexate as clinical decision support for personalized

medicine: a brief review //Biomedical Chromatography. -2018. - Т. 32. - №. 5. - С. e4159]. Важно отметить, что современное представление о ТЛМ не ограничивается вышеописанными методами, оно включает в себя также изучение возможности использования новых перспективных физических методов, таких как метод комбинационного рассеяния света (КРС) [Jaworska A. et al. Potential of surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) in therapeutic drug monitoring (TDM). A critical review //Biosensors. - 2016. - Т. 6. - №. 3. - С. 47]. Гигантское комбинационное рассеяние света (ГКРС) может быть кандидатом для ТЛМ, поскольку количественный анализ лекарств и их метаболитов в биологических образцах может быть выполнен в течение нескольких минут и с сопоставимыми или меньшими ошибками, чем обычные методы ТЛМ [Schliicker S. Surface-Enhanced raman spectroscopy: Concepts and chemical applications //Angewandte Chemie International Edition. - 2014. - Т. 53. - №. 19. - С. 4756-4795, Jaworska A. et al. Potential of surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) in therapeutic drug monitoring (TDM). A critical review //Biosensors. - 2016. - Т. 6. - №. 3. - С. 47]. Кроме того, в настоящее время доступны портативные рамановские спектрометры, которые являются надежными, небольшими и простыми в использовании: они могут регулярно применяться в клинической практике медицинским персоналом [Jaworska A. et al. Potential of surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) in therapeutic drug monitoring (TDM). A critical review //Biosensors. -2016. - Т. 6. - №. 3. - С. 47]. Было продемонстрировано, что различные методы регистрации концентраций на основе ГКРС (оптический сенсор, плазмон-усиленный резонанс, электрохимический анализ) могут использоваться для проведения ТЛМ с широким спектром препаратов, таких как иматиниб, 6-меркаптопурин, 5-фторурацил, а также единично для метотрексата [Jaworska A. et al. Potential of surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) in therapeutic drug monitoring (TDM). A critical review //Biosensors. - 2016. - Т. 6. -№. 3. - С. 47, Goksel Y. et al. Quantification of methotrexate in human serum using surface-enhanced Raman scattering-Toward therapeutic drug monitoring //ACS sensors. - 2021. - Т. 6. - №. 7. - С. 2664-2673]. Известно, что ТЛМ не используется для всех препаратов, а только для тех, которые имеют узкий терапевтический индекс, а также лекарств с выраженной фармакокинетической вариабельностью, для которых трудно контролировать целевые концентрации. Объединяя знания в области фармацевтики, фармакокинетики и фармакодинамики, ТЛМ позволяет оценивать эффективность и безопасность конкретного лекарства в различных клинических условиях [Kang J.S., Lee M.H. Overview of therapeutic drug monitoring //The Korean journal of internal medicine. - 2009. - Т. 24. - №. 1. - С. 1]. Несмотря на значительный прорыв фармакотерапии ревматоидного артрита (РА), появление новых таргетных синтетических болезнь-модифицирующих антиревматических препаратов (тсБМАП), на сегодняшний день метотрексат (МТ) занимает одно из ведущих мест в терапии РА и по праву считается основным лекарственным средством в назначениях пациентам. Хорошо известно, что РА - это заболевание с прогрессирующим течением, и при отсутствии своевременной адекватной фармакотерапии происходит деструкция суставов, формирование функциональной недостаточности и значительное снижение качества жизни пациентов [Гриднева Г.И. и др. Терапевтический лекарственный мониторинг метотрексата и его метаболитов в эритроцитах и мононуклеарах больных ревматоидным артритом //Современная ревматология. - 2020. - Т. 14. - №. 4. - С. 60-64]. Распространенность РА среди взрослого населения в разных странах мира установилась в диапазоне от 0,5 до 1% [Smolen J. S., Aletaha D. IB MI //Rheumatoid arthritis. Ancet. - 2016. - Т. 388. - №. 10055. - С. 2023-38, van der Woude D. et al. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of rheumatoid arthritis //Best practice & research Clinical rheumatology. - 2018. - Т. 32. - №. 2. - С. 174-187].

Согласно статистическим данным, в Российской Федерации (РФ) с диагнозом «ревматоидный артрит», установленным по критериям Американской ассоциации ревматологов (ACR), Европейской лиги ревматологов (EULAR), наблюдается более 300 тыс. пациентов, пик заболеваемости приходится на 40-55 лет [Насонов, Е.Л., et al.,
5 Ревматоидный артрит в Российской Федерации по данным Российского регистра больных артритом (сообщение I). Научно-практическая ревматология, 2015. 53(5): р. 472-484]. Метотрексат - препарат «первой линии» в терапии РА, однако, вследствие узкого терапевтического индекса, а также вариабельности фармакокинетических и фармакодинамических показателей у различных пациентов, может возникнуть
10 неэффективность фармакотерапии, увеличение частоты побочных эффектов [20]. Согласно литературным данным, неэффективность монотерапии РА метотрексатом достигает 30-40% [6, 29]. В 20-30% случаев пациенты прекратили применение МТ в течение первого года терапии вследствие развития нежелательных лекарственных реакций (НЛР) [30], в другом наблюдательном исследовании - в 42% случаев [Aletaha D., Smolen J. S. Effectiveness profiles and dose dependent retention of traditional disease modifying antirheumatic drugs for rheumatoid arthritis. An observational study //The Journal of rheumatology. - 2002. - Т. 29. - №. 8. - С. 1631-1638]. Фармакокинетические исследования показывают, что около 10% препарата подвергается пресистемному метаболизму в печени с помощью альдегидоксидазы с образованием одного из основных активных метаболитов - 7-
20 гидроксиметотрексата (7-ОН-МТ), циркулирующего в крови [Maksimovic V. et al. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate //Molecular biology reports. - 2020. - Т. 47. - С. 4699-4708, Seide-man P. et al. The pharmacokinetics of methotrexate and its 7-hydroxy metabolite in patients with rheumatoid arthritis //British journal of clinical pharmacology. - 1993. - Т. 35. - №. 4. - С. 409-412]. Примерно 5% препарата
25 метаболизируется кишечной микрофлорой, превращаясь в формы 4-амино-4-дезоксид-N10-метилптерроиновой и глютаминовой кислот [Bedoui Y. et al. Methotrexate an old drug with new tricks //International journal of molecular sciences. -2019. - Т. 20. - №. 20. - С. 5023, Maksimovic V. et al. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate //Molecular biology reports. - 2020. - Т. 47. - С. 4699-4708.]. Внутриклеточный
30 метаболизм МТ происходит преимущественно в эритроцитах, лейкоцитах, гепатоцитах и синовиоцитах; связан с активностью ферментов фолиполиглютамат синтетазы (FPGS) и γ -глутамил гидролазы (GGH) [Inoue K., Yuasa H. Molecular basis for pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in rheumatoid arthritis therapy //Drug metabolism and pharmacokinetics. - 2014. - Т. 29. - №. 1. - С. 12-19]. Активный транспорт МТ через
35 клеточную мембрану осуществляется с использованием трансмембранной транспортной системы, опосредованной белками-переносчиками [Lima A. et al. Genetic polymorphisms in low-dose methotrexate transporters: current relevance as methotrexate therapeutic outcome biomarkers //Pharmacogenomics. - 2014. - Т. 15. - №. 12. - С. 1611-1635]. Эта система включает группу белков-транспортеров, которые принадлежат двум основным суперсемействам:
40 транспортерам растворенных веществ (solute carrier - SLC) и АТФ-связывающим кассетным транспортерам (АТФ-binding cassette - ABC). Большая часть МТ попадает в клетку при участии белка-переносчика восстановленных фолатов 1 (reduced folate carrier 1 - RFC-1), SLC19A1 [Fowler B. The folate cycle and disease in humans //Kidney International. - 2001. - Т. 59. - С. S221-S229]. FPGS внутриклеточно опосредует последовательное
45 добавление остатков глютаминовой кислоты к МТ и его превращение в МТ-полиглютамат. Такой механизм внутриклеточного метаболизма способствует длительной персистенции МТ в клетке, и следовательно, его противовоспалительному, а также антипролиферативному терапевтическим эффектам [Mikkelsen T. S. et al. PharmGKB

summary: methotrexate pathway //Pharmacogenetics and genomics. - 2011. - Т. 21. - №. 10. -С. 679]. В тоже время, посредством работы фермента GGH происходит отщепление остатков глутаминовой кислоты от МТ-полиглутамата, превращаясь в МТ-глутамат 1 - метаболит, способный покидать клетки с помощью АТФ-транспортеров [Valiev T. T. et al. Role of pharmacogenetic factors in the development of side effects of methotrexate in the treatment of malignant tumors: A review //Journal of Modern Oncology. - 2021. - Т. 23. - №. 4. - С. 622-627]. Данный механизм позволяет поддерживать равновесную концентрацию (Css- steady-state concentration) МТ внутри клеток [Murakami T., Mori N. Involvement of multiple transporters-mediated transports in mizoribine and methotrexate pharmacokinetics // Pharmaceuticals. - 2012. - Т. 5. - №. 8. - С. 802-836]. Внутриклеточное накопление МТ-полиглутаматов приводит к продолжительной эффективности препарата и позволяет принимать МТ один раз в неделю, несмотря на относительно короткий период полувыведения (Т1/2) препарата из плазмы [Chabner B. A. et al. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? //The Journal of clinical investigation. - 1985. - Т. 76. - №. 3. - С. 907-912]. Согласно литературным данным, плазменные и/или сывороточные концентрации МТ у пациентов с РА не коррелируют с терапевтическим эффектом МТ, а в большей степени связаны с риском развития НЛР [Ouyang Z. et al. Studies on the intracellular accumulation process of methotrexate and its correlation with the key protein using an LC-MS/MS method: a novel way to realize prospective individualized medication //Analytical and Bioanalytical Chemistry. - 2021. - Т. 413. - С. 1799-1807]. Исследование же внутриклеточных метаболитов МТ, таких как МТ-полиглутаматы (МТ-ПГ2-7), прямо коррелирует с клиническим эффектом фармакотерапии низкими дозами МТ [Гриднева Г.И. и др. Терапевтический лекарственный мониторинг метотрексата и его метаболитов в эритроцитах и мононуклеарах больных ревматоидным артритом //Современная ревматология. - 2020. - Т. 14. - №. 4. - С. 60-64]. С этой целью возможно довольно успешное применение методов ГКРС в связи с простотой про-боподготовки, быстрым результатом и высокой точностью определения.

Изучение концентраций МТ и его метаболитов в различных биологических образцах было продемонстрировано в единичных работах с использованием ГКРС. Так, в исследовании Göksel Y. и др. был достигнут предел количественного определения концентрации 2,1 мкМ для метотрексата в сыворотке крови. Разработанный метод обеспечивает быстрое обнаружение (до 10 минут) и количественное определение метотрексата в сыворотке крови человека (с точностью определения >90%) [Göksel Y. et al. Quantification of methotrexate in human serum using surface-enhanced Raman scattering- Toward therapeutic drug monitoring //ACS sensors. - 2021. - Т. 6. - №. 7. - С. 2664-2673]. Yang и др. исследовали МТ промежуточного слоя сэндвич-подложки путем восстановления AgNO₃ медной фольгой, при этом предел обнаружения достигает 1,0×10⁻¹⁰ моль/л [Yang J. et al. A sandwich substrate for ultrasensitive and label-free SERS spectroscopic detection of folic acid/methotrexate //Biomedical microdevices. - 2014. - Т. 16. - С. 673-679]. В другом исследовании Fornasaro и др. был использован композит Au-МТ с методом адсорбции на фильтровальной бумаге под действием цитрата, что позволило достигнуть предел детекции концентраций 1,0×10⁻⁷ моль/л [Fornasaro S. et al. Toward SERS-based point-of-care approaches for therapeutic drug monitoring: the case of methotrexate //Faraday Discussions. -2016. - Т. 187. - С. 485-499]. Важно отметить, что в настоящее время для осуществления мониторинга фармакокинетического параметра АUC (площадь под фармакокинетической кривой) внедрены новые минимально инвазивные методы забора биологических образцов, такие как устройства для объемного абсорбционного отбора проб (volumetric absorptive microsampling (VAMS)), подготовка образцов методом «сухой

капли» (dried blood spots (DBS), dried plasma spots (DPS)) и дальнейшего исследования [Martial L. C. et al. Cost evaluation of dried blood spot home sampling as compared to conventional sampling for therapeutic drug monitoring in children //PloS one. - 2016. - Т. 11. - №. 12. - С. e0167433]. Это удобные для пациента, реализуемые в домашних условиях методы с такими преимуществами, как минимальная инвазивность и минимальный объем пробы, стабильность образцов при транспортировке и хранении, экономичность. Таким образом, можно сделать вывод о том, что разработка и применение новых методов определений концентраций МТ и его метаболитов, поиск предикторов неэффективности терапии метотрексатом и, как следствие, персонализированный подход к лечению РА, способствует раннему наступлению ремиссии основного заболевания и снижению риска развития НЛР, раннему прекращению приема препарата [Ling S., Bluett J., Barton A. Prediction of response to methotrexate in rheumatoid arthritis //Expert review of clinical immunology. - 2018. - Т. 14. - №. 5. - С. 419-429.].

Известно изобретение «Подложка для биочипа и способ ее изготовления» (патент RU №2411180, 2011 г., G01N 33/48), содержащее сходный с используемым в заявленном способе принцип выбора и конструирования устройства, состоящего из поверхности и наночастиц благородных металлов (Ag, Au, Pt).

Недостатком данного изобретения является как сложность изготовления конструкции, так и использование фотохромного или фототерморефрактивного стекла. Известно, что стекло, в отличие от титана дает существенно больший паразитный сигнал флуоресценции и рассеяния, наличие которого сильно затрудняет выделение эффективного сигнала аналита. Такая конструкция крайне неудобна для использования с наночастицами платины, имеющими пик плазмонного поглощения в области 200-240 нм, в то время как стекло, в отличие от кварца не является оптически прозрачным в ультрафиолетовой области.

За прототип выбрано изобретение «Оптический сенсор с плазмонной структурой для определения химических веществ низких концентраций и способ его получения». (Патент RU №2720075 C1). Задачей изобретения является создание простой и эффективной конструкции для регистрации сигнала усиленного комбинационного рассеяния (до порядков 10^3) электромагнитным полем плазмонов, генерируемых под действием когерентного лазерного излучения на его поверхности, конструкции позволяющей определять малые (до 10^{-5} М) концентрации химических органических веществ.

Поставленная задача решается тем, что оптический сенсор с плазмонной структурой для определения низких концентраций химических веществ является многослойной плазмонной структурой содержащей слой наночастиц, согласно изобретению, включает в себя химически очищенное кварцевое стекло (марки КУ-1), на поверхности которого находится слой наночастиц серебра размером до 80 нм.

Поставленная задача решается тем, что в способе получения оптического сенсора с плазмонной структурой для определения низких концентраций химических веществ, при котором, создают многослойную плазмонную структуру, содержащую слой наночастиц, согласно изобретению, на слой, представляющий из себя химически очищенное квадратное, размером 1 на 1 см кварцевое стекло (марки КУ-1) наносят, а затем термически высушивают при температуре 60-100°C в течение 5 минут гидрозоль наночастиц серебра размером до 80 нм в количестве 20 мкл.

Созданный заявляемым способом оптический сенсор с плазмонной структурой позволяет получать повторяемый сигнал гигантского комбинационного рассеяния от аналита, производя, таким образом, его детекцию и последующее определение

химического состава.

Задачей заявляемого изобретения является создание эффективной биосовместимой конструкции для регистрации сигнала усиленного комбинационного рассеяния электромагнитным полем плазмонов, генерируемых под действием когерентного лазерного излучения на его поверхности, конструкции позволяющей определять лекарственное средство «метотрексат» в плазме крови человека концентрации порядка 10^{-10} моль/литр.

Поставленная задача решается тем, что оптический сенсор с плазмонной структурой для получения разрешенного метотрексата в плазме человека является нанощероховатой поверхностью состоящей из наночастиц серебра, согласно изобретению, включает химически очищенную кварцевую пластину марки кварца КУ-1, на поверхности которой находится островковая пленка наночастиц серебра размером до 80 нм.

Поставленная задача решается тем, что в способе получения оптического сенсора с плазмонной структурой для получения разрешенных спектров лекарственного средства «метотрексат» в плазме человека, создают химическим способом островковую пленку серебряных наночастиц, согласно изобретению, на химически очищенное кварцевое стекло марки «КУ-1», размером 3 на 4 см, химически наносят, а затем высушивают при комнатной температуре в течение 2 часов гидрозоль наночастиц серебра размером до 80 нм в количестве 2 мл.

Созданный заявляемым способом оптический сенсор с плазмонной структурой позволяет получать повторяемый сигнал усиленного комбинационного рассеяния света от метотрексата в плазме порядка 10^{-10} моль/литр, производя, таким образом, его регистрацию и последующую идентификацию следующим способом:

Сначала кварцевые стекла промывали под проточной водой и очищали с использованием губки, затем их промывали дистиллированной водой, лишние капли убирали при помощи салфетки. После, стекла ставили в стакан со спиртом (этиловый или изопропиловый) в ультразвуковую ванну на 10 минут. Потом стекла вынимали, промывали дистиллированной водой и ставили в раствор хромовой смеси (хромпик) в ультразвуковую ванну на 10-15 минут. После стекла вынимали, промывали дистиллированной водой, и ставили в стакан с дистиллированной водой в ультразвуковую ванну на 10 минут. В конце стекла вынимали и высушивали при комнатной температуре. На втором этапе очищенные стекла на час помещали в раствор пираньи (смесь 30% перекиси H_2O_2 и концентрированной серной кислоты H_2SO_4 в отношении 1:3 по объему). Подложки ставили вертикально. Через час подложки вынимали пинцетом и опускали в стакан с дистиллированной водой и промывали в нем три раза, убирали капли при помощи салфетки. Затем ставили в стакан со спиртом в ультразвуковую ванну на 2-5 минут и сушили на плитке при температуре 60-70°C в горизонтальном положении.

После сушки подложки ставили вертикально в 7% (или 0,3 М) раствор АРТЕС (готовят добавлением 2,8 мл АРТЕС к 37,2 мл спирта (этанол или изопропиловый)) и оставляли на полтора часа. Затем подложки вынимали, окунали два-три раз в стакан со спиртом, убирали капли при помощи салфетки и ставили сушиться на плитку при температуре 60-70°C в горизонтальном положении. В рамках третьего этапа отбирали 5 мл коллоидного раствора НЧ в эппендорф на 5 мл и центрифугировали 20 минут при скорости 10000 об/мин. Затем из эппендорфов отбирали 4,5 мл надосадочной жидкости и снова доводили общий объем диет, водой до 5 мл. Встряхивали пробирку, чтобы осадок с частицами растворился, и центрифугировали 10 мин при скорости 10000 об/

мин. В конце отбирали максимально возможный объем надосадочной жидкости и разбавляли осадок дистиллированной водой до нужного объема. В рамках четвертого этапа разбавляли осадок центрифугированных НЧ дистиллированной водой до 0,8-1 мл. Затем к полученному раствору добавляли 20 мкл цитрата натрия NaCit_3 и

5 перемешивали, встряхивая пробирку. Затем, весь объем НЧ наносят на поверхность стекла, накрывали сверху бюксом и оставляли до полного высыхания при комнатной температуре. После высыхания стекла вынимали, окунали 2-3 раза в дистиллированную воду для удаления крупных агломератов и сушили на плитке.

У здорового добровольца, который не имел острых и хронических заболеваний, брали венозную кровь для экспериментальных образцов. Образцы сыворотки готовили путем забора крови объемом 5,0 мл в пробирки с активатором свертывания (кремнезем, напыленный на внутреннюю поверхность стенок пробирок) и сепарирующим гелем на основе акрила BD Vacutainer® SST™ II Advance Plus. Далее после отстаивания в вертикальном положении в штативе при комнатной температуре в течение не менее 15 минут и не более 1 часа производилось центрифугирование в режиме 1600g (3200 об/мин) в течение 15 минут с использованием центрифуги Eppendorf 5703GP417507 (R ротора 13,7 см). Затем сыворотка разливалась при помощи дозатора Eppendorf Sartorius на аликвоты по 200 мкл в криопробирки типа Эппендорф с завинчивающейся крышкой и транспортировалась в штативе с крышкой в режиме +15...+25°C с хладоэлементом для поддержания стабильной температуры в термоконтейнере для дальнейших лабораторных исследований методом гигантского комбинационного рассеяния света.

Затем были приготовлены экспериментальные растворы препарата с плазмой крови человека. В пробирку типа эппендорф помещали 50 мкл сыворотки и 50 мкл дист. воды. Данный раствор рассматривался как контроль для эксперимента. Далее были 25 приготовлены растворы, состоящие из 50 мкл плазмы и 50 мкл препарата, концентрация которого варьировалась в диапазоне 10^{-2} - 10^{-7} М. Все образцы для эксперимента использовались через 10 минут хранения при комнатной температуре.

По истечению времени данные растворы были помещены на полученные поверхности с помощью дозатора в объеме 2 мкл. Высушивались образцы на поверхности при 30 комнатной температуре на протяжении 10-15 минут. Спектры КРС от данных растворов получали с помощью анализатора КРС Renishaw Virsa (Великобритания) и программного обеспечения WiRE 5.4.

На Фиг. 1 показан экспериментальный образец оптического сенсора на основе островковой пленки серебряных наночастиц.

На Фиг. 2 показан спектр плазмы человека с обозначенными максимумами препарата «метотрексат».

По результатам регистрации и записи сигнала комбинационного рассеяния света от препарата «метотрексат», усиленного с помощью заявленного изобретения, проводилась последующая идентификация лекарственного средства с помощью спектральной библиотеки.

(57) Формула изобретения

1. Оптический сенсор с плазмонной структурой для определения метотрексата в плазме человека является многослойной плазмонной структурой, содержащей слой наночастиц, отличающийся тем, что состоит из островковой пленки наночастиц серебра, размером таких частиц до 80 нм, нанесенной на поверхность химически чистого кварца марки КУ-1, позволяющей получать разрешенный, усиленный сигнал комбинационного рассеяния света от метотрексата в плазме человека концентрации порядка 10^{-10} моль/

литр.

2. Способ получения оптического сенсора с плазмонной структурой для получения разрешенных спектров лекарственного средства «метотрексат» в плазме человека, при котором создают химическим способом островковую пленку серебряных наночастиц, отличающийся тем, что на химически очищенное кварцевое стекло марки «КУ-1» размером 3 на 4 см химически наносят, а затем высушивают при комнатной температуре в течение 2 часов гидрозоль наночастиц серебра размером до 80 нм в количестве 2 мл.

10

15

20

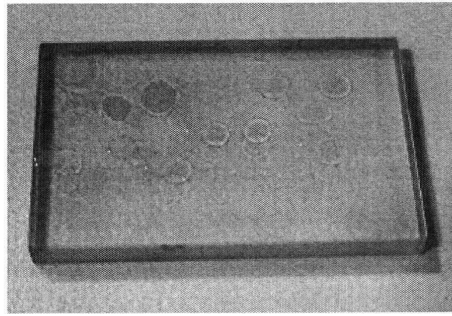
25

30

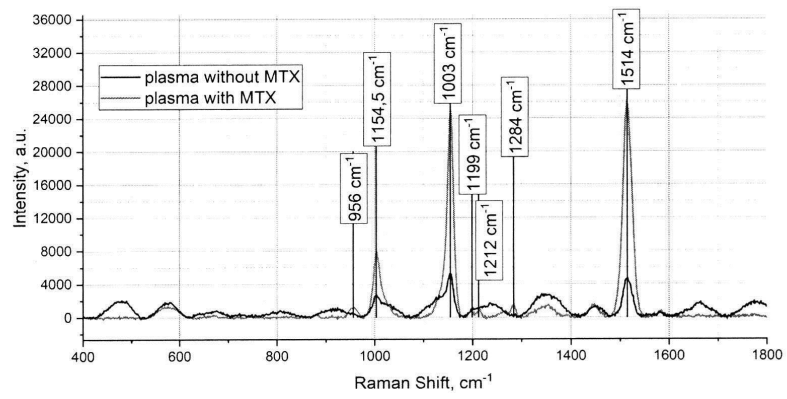
35

40

45



Фиг. 1



Фиг. 2