



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 663**

51 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/553 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07732121 .4**
96 Fecha de presentación : **23.03.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2005179**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.12.2008**

54 Título: **Detección de sustancias basadas en fluorescencia.**

30 Prioridad: **24.03.2006 GB 0605965**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.10.2011

73 Titular/es: **University of East Anglia
Norwich, Norfolk NR4 7JT, GB
Kings College London**

72 Inventor/es: **Russell, David;
Leggett, Richard;
Lee-Smith, Emma;
Jickells, Sue y
Daniel, Barbara**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 366 663 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detección de sustancias basada en fluorescencia

5 La presente invención se refiere a la detección de sustancias que incluye, pero no se limita a, sustancias biológicas, fármacos y/o metabolitos usando fluorescencia. La presente invención puede usarse para detectar la presencia de ciertos compuestos en sustancias secretadas por seres humanos, por ejemplo, en una huella dactilar dejada sobre un sustrato.

10 Los científicos forenses frecuentemente encuentran huellas dactilares y sustancias biológicas en la escena de un crimen. Actualmente, los examinadores forenses inicialmente buscan indicios de sangre, semen y saliva a simple vista. Esto va seguido de un examen usando fuentes de luz especializadas. El semen y la saliva presentan fluorescencia bajo ciertas, pero ni mucho menos todas las circunstancias. La sangre no tiene fluorescencia nativa, pero tiene una fuerte banda de absorción centrada alrededor de 415 nm. De ahí que pueda 'visualizarse' bajo
15 fuentes de luz como una mancha oscura en comparación con un fondo más claro. Esto no funciona en muchos sustratos, ni cuando manchas minúsculas de sangre están presentes o cuando el autor de un crimen ha intentado limpiar los rastros. Cuando la inspección visual y con fuente de luz ha fracasado en la indicación de la presencia de fluidos corporales, los examinadores de la escena se basan en la presentación de la prueba 'mejor estimada', presentando artículos para el examen adicional que creen que pueden ser una fuente de ADN (por ejemplo, ropa interior, colillas de cigarrillos, etc.). Estos enfoques frecuentemente fracasan en la detección de rastros de fluidos corporales. Aún cuando el examen visual o con fuente de luz ha revelado lo que podría ser sangre, semen o saliva, esto es presuntamente y adicionalmente colorimétrico y, en el caso de presunto semen, se requieren pruebas microscópicas para confirmar la presencia de los diversos fluidos. Se requiere una prueba separada para cada fluido corporal, con diferentes procedimientos y reactivos usados para cada una. Por tanto, existe el deseo de crear una
20 prueba que pueda detectar más fácilmente una o más sustancias que puedan derivarse de un ser humano tales como saliva, sangre, semen y metabolitos.

La identificación de huellas dactilares es una de las piedras angulares de las pruebas forenses. Sin embargo, actualmente una huella dactilar es solamente útil cuando la policía u otras agencias de seguridad puedan obtener un
30 resultado positivo con aquellas huellas presentes en bases de datos.

Cuando se visualiza bajo un microscopio, la piel sobre las palmas aparece como arrugas y ranuras. Es el patrón de estas arrugas de la piel por fricción el que produce la única huella dactilar. Cada arruga de la piel tiene una única fila de poros por la que se secreta el sudor y se deposita sobre la superficie de la piel. Cuando un dedo toca una
35 superficie, el sudor se deposita dejando una impresión del patrón de arrugas del dedo denominado en lo sucesivo una huella dactilar latente. Tales huellas dactilares se consideran 'huellas invisibles' ya que requieren tratamientos físicos o químicos para permitir la visualización.

El sudor es el ultrafiltrado del plasma en sangre que contiene iones inorgánicos, lactato, urea y aminoácidos y estas especies están, por tanto, presentes dentro de una huella dactilar recientemente depositada. Además, se sabe que los fármacos ingeridos y metabolizados por vía oral son secretados en el sudor. Estos fármacos se han medido en sudor mediante el uso de dispositivos de recogida tales como parches de algodón adsorbente, seguido de extracción y posterior análisis usando técnicas tales como detección por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Sin embargo, los procedimientos son laboriosos, requieren una gran cantidad de sudor recogido
40 durante un periodo de tiempo y, por tanto, no son adecuados para el análisis rápido, por ejemplo, pruebas en carretera de personas que se sospecha que están conduciendo bajo la influencia de fármacos. La detección de sustancias en huellas dactilares no ha sido posible usando los procedimientos de la técnica anterior debido a la pequeña cantidad de sustancias en la huella dactilar.

50 La presente invención usa una partícula para su uso en un procedimiento de detección de fluorescencia de una sustancia, comprendiendo la partícula un metal o un óxido metálico, en el que uno o más anticuerpos para la unión a una sustancia está/están unidos, directamente o indirectamente, a la superficie del metal u óxido metálico. Preferentemente, el anticuerpo o cada anticuerpo está unido a la superficie del metal u óxido metálico mediante proteína A o proteína G, o cualquier otra proteína y/o ligador químico, tal como un enlace tiolato, que configura el anticuerpo de forma que esté disponible para unirse a la sustancia que va a detectarse.
55

La presente invención usa un procedimiento para preparar las partículas que comprende hacer reaccionar partículas que comprenden un metal o un óxido metálico con un anticuerpo para permitir la unión del anticuerpo a la partícula. Las partículas pueden cada una comprender una o más proteínas A y/o proteínas G unidas a la superficie del metal u óxido metálico.
60

La presente invención proporciona un procedimiento para la detección fluorescente de una sustancia como se define en la reivindicación 1.

65 Las partículas comprenden un metal o un óxido metálico. Preferentemente, las partículas comprenden oro. Las partículas pueden ser partículas de oro o las partículas pueden comprender un núcleo que comprenda

opcionalmente óxido de hierro (Fe_3O_4 y/o Fe_2O_3) que tiene una capa de metal sobre el mismo. La capa de metal puede incluir uno o más de oro, plata, platino y cobre.

5 Las partículas tienen preferentemente un diámetro inferior a 1 μm , más preferentemente inferior a 100 nm, lo más preferentemente inferior a 30 nm. A partir de ahora las partículas se llamarán nanopartículas.

10 Las nanopartículas de metal y óxido metálico pueden sintetizarse y recubrirse con anticuerpos monoclonales y/o policlonales específicos para cada sustancia de interés, por ejemplo, el fluido biológico diana. La partícula resultante que tiene un metal y/u óxido metálico unido a un anticuerpo puede llamarse conjugado anticuerpo-nanopartícula. Cada anticuerpo puede entonces marcarse con fluoróforos individuales o múltiples para permitir la diferenciación del fluido diana. Los conjugados anticuerpo-nanopartícula pueden usarse en la detección y la diferenciación de sangre, semen y saliva, y en la detección de ADN y otras sustancias de interés. Las partículas actuarán de soportes sólidos para los anticuerpos. El tamaño nanométrico de las partículas proporciona una gran área superficial y, por tanto, una alta concentración del anticuerpo sobre la superficie de la partícula. Esto proporcionará múltiples sitios de unión para las especies diana, aumentando así la sensibilidad de detección por fluorescencia.

20 Los presentes inventores han encontrado que pueden crear estructuras de monocapa que rodean partículas de dimensiones a escala nanométrica (4-100 nm) basándose en técnicas de autoensamblaje. Las partículas pueden crearse en disolución acuosa y formar una suspensión estable. Para la deposición de anticuerpos es necesario fabricar los conjugados anticuerpo-nanopartícula usando disoluciones acuosas para evitar la desnaturalización de la biomolécula.

25 Las partículas pueden ser o pueden comprender nanopartículas de oro. El enfoque clásico para la fabricación de nanopartículas de oro basadas en acuosas es el informado por Turkevich¹. Como se describe en Turkevich, las nanopartículas de oro pueden formarse mediante la reducción de citrato de HAuCl_4 . Y, lo que es más importante, el citrato no sólo reduce la sal metálica, sino que también actúa de agente de apelmazamiento estabilizando las partículas y previniendo la agregación. Adicionalmente, la capa de citrato es fácilmente desplazada cuando un ligando que contiene un resto tiol / disulfuro se añade a una disolución de las partículas. Los anticuerpos fluorescentemente marcados se depositarán sobre las partículas usando tanto ligandos químicos como de proteína para facilitar la formación de monocapas sobre la superficie de la nanopartícula.

35 Como se muestra en el siguiente ejemplo, los presentes inventores han ideado un procedimiento simple y robusto para la formación de una monocapa de anticuerpo usando un ligador de proteína para recubrir la superficie de las nanopartículas de oro - la construcción de los conjugados anticuerpo-nanopartícula se muestra esquemáticamente en la Figura 1. Las nanopartículas de oro de 16 nm de diámetro, formuladas y establecidas usando la solución de citrato, se recubrieron con una monocapa de proteína A. La proteína A es un componente de la pared celular de *Staphylococcus aureus* que se une específicamente a la porción Fc de un anticuerpo (tronco de la Y). Mediante la unión del componente Fc, el anticuerpo se posiciona de forma que el componente de reconocimiento, la región de unión F(ab')_2 (la parte superior de la Y), esté directamente disponible para unirse al antígeno elegido como diana específico del fluido biológico. Con el fin de formar una monocapa de la proteína A sobre la superficie de la partícula de oro, la proteína se modifica primero con 3-(2-piridilditio)-propionato de *N*-succinimidilo (SPDP): - el éster de succinimidilo se une al ligador con una amina primaria sobre la superficie de la proteína mientras que el resto tiol proporciona un enlace con la partícula desplazando la capa de citrato sobre la superficie del oro². Una vez se ha formado, la monocapa de la proteína A proporciona una superficie con la que se une el anticuerpo de forma que el componente de reconocimiento F(ab')_2 pueda unirse directamente, y reproduciblemente, al antígeno (la sustancia de interés). La proteína A puede sustituirse por la proteína G o un ligador químico tal como un enlace tiolado.

La proteína A orienta el anticuerpo para la presentación óptima para la capacidad de unión a antígeno.

50 Alternativamente, un único anticuerpo químicamente ligado sobre la nanopartícula puede ser suficiente, es decir, un anticuerpo directamente ligado a la superficie del metal o superficie del óxido metálico de la nanopartícula. Un ligador químico tal como SPDP puede unirse al anticuerpo y permitir la unión directa del anticuerpo al metal, por ejemplo, oro u óxido metálico. Se espera que un anticuerpo unido a la partícula usando tales ligadores se oriente aleatoriamente sobre la superficie, reduciendo posiblemente la afinidad de unión por la diana. Sin embargo, la ventaja del enlace directo es la facilidad de fabricación de estos conjugados anticuerpo-nanopartícula.

60 Los anticuerpos que podrían usarse para la detección de sangre, semen y saliva en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, (i) la IgA secretora antihumana o proteína 1 ó 2 rica en anti-prolina para saliva, encontrándose que ambas están altamente concentradas; (ii) anti-citoqueratina 13, que puede usarse para teñir células epiteliales bucales como fuente de ADN; (iii) la proteína glucoforina de la membrana eritrocitaria (anti-CD235a), que puede usarse para teñir glóbulos rojos y albúmina de suero antihumano (iv) anti-CD45 o un anticuerpo citoplásmico anti-neutrófilo (ANCA), opcionalmente seleccionado de (i) p-ANCA (mieloperoxidasa) y (ii) c-ANCA (proteínasa 3 (PR3)), que puede usarse para teñir glóbulos blancos como fuente de ADN; (v) proteína de superficie de esperma (anti-SP17 o SP56) y/o además de antígeno específico de la próstata, que puede usarse para teñir semen. Estos anticuerpos están disponibles comercialmente.

Los procedimientos para la unión de un anticuerpo a un núcleo de metal u óxido metálico se desvelan en este documento. Un ejemplo particular de la síntesis se muestra en el Ejemplo 1 para cotinina. En un modo análogo, otros anticuerpos pueden unirse a núcleos de metal/óxido metálico reemplazando cotinina por otros anticuerpos.

5 Los datos de microscopía de fluorescencia producidos por los presentes inventores usando la proteína glucoforina de la membrana eritrocitaria para la detección de sangre seca se muestra en la Figura 7. Esta figura demuestra que
10 manchas secas pueden visualizarse usando los tipos de soluciones de inmunofluorescencia que pueden emplearse en el procedimiento de la presente invención. Los presentes inventores han encontrado que uno tal debería seleccionar anticuerpos que eligen como diana membranas de la superficie o componentes extracelulares ya que el trabajo de los inventores ha mostrado que en manchas biológicas las membranas celulares permanecen intactas.

Los fluoróforos pueden seleccionarse considerando: espectros de excitación y emisión con respecto a fuentes de luz usadas rutinariamente en la ciencia forense; el requisito de mapeo del color; sensibilidad y fluorescencia del sustrato.

15 Las fuentes de luz usadas para examen de pruebas incluyen: láseres; lámparas de arco de Xe y Hg de alta intensidad; y dispositivos LED.

20 Con el fin de detectar simultáneamente y localizar espacialmente sangre, semen, saliva y ADN asociado *in situ* preferentemente se usan técnicas de marcado multicolor, es decir, una disolución de detección (la formulación de la presente invención) que contiene los conjugados anticuerpo-nanopartícula se usará con fluoróforos que pueden diferenciarse por bandas de emisión que no se solapan cuando se unen a su matriz biológica diana³⁻⁵. En otras palabras, un fluoróforo para la detección de sangre tendrá diferente banda de emisión del fluoróforo para la detección de semen, y asimismo para saliva y ADN.

25 Se prefieren fluoróforos con espectros de emisión en el intervalo de aproximadamente 430-650 nm y están comercialmente disponibles. Hay nueve colorantes en la gama Alexa Fluor (Molecular Probes) dentro de esta "ventana" de longitud de onda, presentando todos fotoestabilidad excepcional. Estos fluoróforos son todos solubles en agua y poseen un resto éster de succinimidilo que permite químicas sencillas para marcar los anticuerpos mediante residuos amina primaria. La selección y la evaluación de los fluoróforos tendrá en cuenta fuentes de luz
30 actualmente usadas en laboratorios forenses (longitudes de onda de excitación y de emisión y ancho de banda en relación con la capacidad para permitir el mapeo multicolor) y espectros de excitación y de emisión de sustratos fluorescentes comúnmente encontrados en la ciencia forense⁶⁻⁸.

35 El fluoróforo puede ser una molécula fluorescente unida (o marcada) a un fragmento F(ab')₂ de un anticuerpo monoclonal, preferentemente fragmento F(ab')₂ de IgG de cabra anti-ratón.

Los sustratos que pueden probarse usando el procedimiento de detección de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, papel, vidrio, plástico, madera, metal, tela. Ejemplos de tales sustratos incluyen, pero no se limitan a,
40 documentos, papel para empapelar, hojas y ropa.

Hay metodologías bien establecidas para la detección de ADN en disolución, pero no para el ADN en estado seco, como frecuentemente se produce en manchas de sangre, semen o saliva. Los presentes inventores han desarrollado un procedimiento para la detección de ADN en su estado seco. Pueden usarse dos procedimientos:

45 El primer enfoque emplea las partículas de la presente invención en los procedimientos como se describen en este documento, en el que el anticuerpo puede elegir como diana proteínas de unión a ADN tales como histona 1. Los anticuerpos para histona H1 se conocen en la técnica.

50 El segundo enfoque emplea las partículas de la presente invención en los procedimientos como se describen en este documento, en los que el anticuerpo se reemplaza por oligómeros de ácido nucleico de péptido específico humano (PNA). Los oligómeros de PNA se sintetizarán por encargo (Eurogentec S.A.) para hibridarse con secuencias *Alu* (una familia de elementos de repetición nuclear intercalados llamada así debido a que son reconocidos por la endonucleasa de restricción *Alu1*, están esparcidos por todo el genoma y representan
55 aproximadamente el 5-10% del genoma total). Las bases en las moléculas de PNA son capaces de apareamiento de bases de Watson y Crick con bases de ADN. Por consiguiente, se han usado en experimentos de hibridación *in situ* por fluorescencia⁹ y pueden elegir como diana ADN en células vivas¹⁰ en las que ADN está en su configuración nativa empaquetada en cromatina.

60 También se ha encontrado que los oligómeros de PNA se unen de un modo específico de secuencia al ADN encontrado en manchas biológicas. Los oligómeros de PNA pueden marcarse con un fluoróforo apropiado y luego unirse a nanopartículas y los conjugados de nanopartícula-oligómero de ADN resultantes evaluarse para su unión a ADN genómico inicialmente en suspensiones de células y luego en fluidos corporales secos. Pueden lisarse células en manchas de fluido corporal para permitir el acceso del anticuerpo u oligómeros de PNA a ADN antes de o durante
65 el contacto con las partículas de la presente invención.

Las partículas de escala nanométrica de óxido de hierro (tanto Fe₃O₄ como Fe₂O₃) son superparamagnéticas, es

decir, están unidas a un campo magnético, pero no retienen magnetismo residual después de eliminarse el campo. Esta propiedad puede utilizarse sabiendo que cuando una suspensión de nanopartículas de la presente invención se aplica a una muestra forense, los conjugados de anticuerpo se unirían a las especies diana; sin embargo aquellas partículas no unidas podrían eliminarse fácilmente usando un simple imán. Una vez se elimina el campo, las partículas unidas ya no serían magnéticas.

Como sabe el experto, las nanopartículas de óxido de hierro se sintetizan fácilmente por la combinación de sales de $\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$ en una disolución alcalina bajo una atmósfera de nitrógeno. Las partículas pueden entonces estabilizarse usando una variedad de ligandos funcionalizados. Sin embargo, el pH de una disolución tal es demasiado alcalino para las partículas de la presente invención, ya que el anticuerpo se desnaturaría. Por tanto, en vez de sintetizarse directamente partículas de óxido de hierro, pueden sintetizarse partículas que tienen un núcleo de óxido de hierro con una vaina o recubrimiento de oro (llamadas nanopartículas de FeAu), preferentemente usando procedimientos previamente informados^{11,12}. Las nanopartículas de FeAu retienen las propiedades superparamagnéticas de las partículas de óxido de hierro, pero tienen la ventaja añadida de que la superficie del oro puede usarse para formular una monocapa autoensamblada reproducible. Las nanopartículas de FeAu se sintetizan en micelas inversas y luego se estabilizan con un ligando preferido.

Las partículas de la presente invención pueden comprender nanopartículas de vaina de oro / núcleo de óxido de hierro estabilizadas con una monocapa de anticuerpo. La formulación de la presente invención contiene preferentemente las partículas como una suspensión estable y lo más preferentemente las partículas están monodispersas, es decir, de aproximadamente el mismo tamaño y, opcionalmente, del mismo tipo.

Las partículas de FeAu pueden estabilizarse en un líquido usando ácido decanoico. Una reacción de transposición *in situ* en la que el ácido carboxílico se sustituye preferentemente con un ligando tiolado permite la deposición de la entidad elegida (ya que el resto SH tiene una mayor afinidad por la superficie del oro). Los enfoques previos han usado esta técnica para depositar macrociclos fluorescentes sobre la superficie de nanopartículas de FeAu (los macrociclos retienen sus propiedades de fluorescencia tras la deposición). Aunque, que sepan los presentes inventores, no se han formulado biomoléculas sobre tales nanopartículas, los diversos anticuerpos fluorescentemente marcados (y oligómeros de PNA) pueden unirse a la superficie de FeAu mediante ligadores químicos directos o (tiolados) de proteína A.

La formulación de la presente invención puede aplicarse mediante pincel o pulverizando la formulación sobre la superficie del sustrato. Los pinceles usados pueden ser pinceles magnéticos, por ejemplo, aquellos usados para aplicar polvo magnético de huellas dactilares.

El procedimiento de la presente invención puede usarse para detectar cualquier sustancia para la que hay un anticuerpo conocido. El anticuerpo puede unirse selectivamente a un fármaco, metabolito de fármaco, hormona o explosivo. Por ejemplo, pueden usarse nanopartículas conjugadas con fármaco, metabolito de fármaco, hormona y anticuerpos monoclonales específicos de explosivos (específicos para, por ejemplo, cocaína; benzoilecgonina; nicotina; cotinina, testosterona, estrógeno, TNT y RDX). Tales anticuerpos están comercialmente disponibles. Los conjugados nanopartícula-anticuerpo pueden aplicarse a manchas de fluido corporal y/o huellas dactilares que se sabe que contienen la sustancia diana. El sudor puede depositarse sobre un sustrato por medios tales como tomando una huella dactilar del sujeto. Probando fármacos o sus metabolitos en las manchas de sudor/fluido corporal es posible determinar si un fármaco ha sido ingerido por el sujeto, o simplemente manipulado. Si un fármaco ha sido ingerido por un sujeto, el fármaco y/o su metabolito estarán presentes en las manchas de sudor/fluido corporal secretadas por un sujeto. Sin embargo, si el fármaco ha sido manipulado, pero no ingerido, el fármaco puede estar presente sobre la piel de un sujeto y puede transferirse a, por ejemplo, la huella dactilar del sujeto.

Fármacos que pueden detectarse usando el procedimiento de la presente invención, si están disponibles anticuerpos adecuados, incluyen, pero no se limitan a:

A. **AGENTES ANABÓLICOS**. Éstos incluyen, pero no se limitan a:

1. Esteroides anabolizantes androgénos (EAA)

a. EAA exógenos*, que incluyen:

1-androstenodiol (5 α -androst-1-eno-3 β ,17 β -diol); **1-androstenodiona** (5 α -androst-1-eno-3,17-diona); **bolandioli** (19-norandrostenodiol); **bolasterona**; **boldenona**; **boldiona** (androsta-1,4-dieno-3,17-diona); **calusterona**; **clostebol**; **danazol** (17 α -etinil-17 β -hidroxiandrost-4-eno[2,3-d]isoxazol); **deshidroclorometiltestosterona** (4-cloro-17 β -hidroxi-17 α -metilandrosta-1,4-dien-3-ona); **desoximetiltestosterona** (17 α -metil-5 α -androst-2-en-17 β -ol); **drostanolona**; **etilestrenol** (19-nor-17 α -pregn-4-en-17-ol); **fluoximesterona**; **formebolona**; **furazabol** (17 β -hidroxi-17 α -metil-5 α -

androstano[2,3-c]-furazano); **gestrinona**; **4-hidroxitestosterona** (4,17β-dihidroxiandrost-4-en-3-ona); **mestanolona**; **mesterolona**; **metenolona**; **metandienona** (17β-hidroxi-17α-metilandrosta-1,4-dien-3-ona); **metandriol**; **metasterona** (2α,17α-dimetil-5α-androstan-3-ona-17β-ol); **metildienolona** (17β-hidroxi-17α-metilestra-4,9-dien-3-ona); **metil-1-testosterona** (17β-hidroxi-17α-metil-5α-androst-1-en-3-ona); **metilnortestosterona** (17β-hidroxi-17α-metilestr-4-en-3-ona); **metiltrienolona** (17β-hidroxi-17α-metilestra-4,9,11-trien-3-ona); **metiltestosterona**; **mibolerona**; **nandrolona**; **19-norandrostenodiona** (estr-4-eno-3,17-diona); **norboletona**; **norclostebol**; **noretandrolona**; **oxabolona**; **oxandrolona**; **oximesterona**; **oximetolona**; **prostanazol** ([3,2-c]pirazol-5α-etioalocolano-17β-tetrahidropiranol); **quinbolona**; **estanozolol**; **estenbolona**; **1-testosterona** (17β-hidroxi-5α-androst-1-en-3-ona); **tetrahidrogestrinona** (18a-homo-pregna-4,9,11-trien-17β-ol-3-ona); **trenbolona**, y otras sustancias con una estructura química similar o efecto(s) biológico(s) similar(es).

b. EAA endógenos**:

androstenediol (androst-5-eno-3β,17β-diol); **androstenediona** (androst-4-eno-3,17-diona); **dihidrotestosterona** (17β-hidroxi-5α-androstan-3-ona); **prasterona** (deshidroepiandrosterona, DHEA); **testosterona** y los siguientes metabolitos e isómeros:
5α-androstano-3α,17α-diol; **5α-androstano-3α,17β-diol**; **5α-androstano-3β,17α-diol**; **5α-androstano-3β,17β-diol**; **androst-4-eno-3α,17α-diol**; **androst-4-eno-3α,17β-diol**; **androst-4-eno-3β,17α-diol**; **androst-5-eno-3α,17α-diol**; **androst-5-eno-3α,17β-diol**; **androst-5-eno-3β,17α-diol**; **4-androstenediol** (androst-4-eno-3β,17β-diol); **5-androstenediona** (androst-5-eno-3,17-diona); **epi-dihidrotestosterona**; **3α-hidroxi-5α-androstan-17-ona**; **3β-hidroxi-5α-androstan-17-ona**; **19-norandrosterona**; **19-noreticolanolona**.

* "exógeno" se refiere a una sustancia que generalmente no puede ser producida por el cuerpo naturalmente.

** "endógeno" se refiere a una sustancia que puede ser producida naturalmente por el cuerpo.

2. Otros agentes anabolizantes. Éstos incluyen, pero no se limitan a:

Clenbuterol, tibolona, zeranol, zilpaterol.

B. Hormonas. Éstas incluyen, pero no se limitan a:

1. Eritropoyetina (EPO);
2. Hormona de crecimiento (hGH), factores de crecimiento similares a insulina (por ejemplo, IGF-1), Factores de crecimiento de Mechano (MGF);
3. Gonadotropinas (LH, hCG), prohibidas en varones solo;
4. Insulina;
5. Corticotropinas.

C. AGONISTAS BETA-2 que incluyen sus isómeros D y L.

D. AGENTES CON ACTIVIDAD ANTIESTRÓGENA. Éstos incluyen, pero no se limitan a:

1. Inhibidores de aromatasa que incluyen, pero no se limitan a, **anastrozol, letrozol, aminoglutetimida, exemestano, formestano, testolactona.**

2. Moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM) que incluyen, pero no se limitan a, **raloxifeno, tamoxifeno, toremifeno.**

3. Otras sustancias antiestrógenas que incluyen, pero no se limitan a, **clomifeno, ciclofenilo, fulvestrant.**

E. DIURÉTICOS Y OTROS AGENTES DE ENMASCARAMIENTO. Estos incluyen, pero no se limitan a: **Diuréticos***, **epitestosterona, probenecid, inhibidores de alfa-reductasa** (por ejemplo,

finasterida, dutasterida), expansores del plasma (por ejemplo, albúmina, dextrano, hidroxietilalmidón) y otras sustancias con efecto(s) biológico(s) similar(es).

Los diuréticos incluyen:

acetazolamida, amilorida, bumetanida, canrenona, clortalidona, ácido etacrínico, furosemida, indapamida, metolazona, espieronolactona, tiazidas (por ejemplo, **bendroflumetiazida, clorotiazida, hidroclorotiazida**), **triamtereno** y otras sustancias con una estructura química similar o efecto(s) biológico(s) similar(es).

F. AGENTES PARA EL POTENCIAMIENTO DE LA TRANSFERENCIA DE OXÍGENO.

Estos incluyen, pero no se limitan a:

1. Sangre autóloga, homóloga o heteróloga o productos de glóbulos rojos de cualquier origen.
2. Productos perfluoroquímicos, efaproxiral (RSR13) y productos de hemoglobina modificados (por ejemplo, hemoderivados basados en hemoglobina, productos de hemoglobina microencapsulados).

G. ESTIMULANTES (incluyendo ambos de sus isómeros ópticos (D como L) si fueran relevantes). Éstos incluyen, pero no se limitan a:

Adrafinilo, adrenalina, anfepramona, amifenazol, anfetamina, anfetaminilo, benzfetamina, bencilpiperazina, bromantan, catina***, clobenzorex, cocaína, cropropamida, crotetamida, ciclazodona, dimetilanfetamina, efedrina****, etamivan, etilanfetamina, etilefrina, famprofazona, fenbutrazato, fencanfamina, fencamina, fenetilina, fenfluramina, fenproporex, furfenorex, heptaminol, isometepteno, levmetanfetamina, meclofenoxato, mefenorex, mefentermina, mesocarb, metanfetamina (D-)metilendioxianfetamina, metilendioximetanfetamina, p-metilanfetamina, metilefedrina****, metilfenidato, modafinilo, niketamida, norfenefrina, norfenfluramina, octopamina, ortetamina, oxilofrina, parahidroxianfetamina, pemolina, pentetrazol, fendimetrazina, fenmetrazina, fenprometamina, fentermina, 4-fenilpiracetam (carfedon), prolintano, propilhexedrina, selegilina, sibutramina, estrichnina, tuaminoheptano** y otras sustancias con una estructura química similar o efecto(s) biológico(s) similar(es).

H. NARCÓTICOS. Éstos incluyen, pero no se limitan a:

buprenorfina, dextromoramida, diamorfina (heroína), fentanilo y sus derivados, hidromorfona, metadona, morfina, oxicodona, oximorfona, pentazocina, petidina.

I. CANNABINOIDES. Éstos incluyen, pero no se limitan a:

hachís, marihuana

J. GLUCOCORTICOSTEROIDES

K. ALCOHOL (etanol)

L. BETA-BLOQUEADORES. Éstos incluyen, pero no se limitan a:

acebutolol, alprenolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, bunolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, esmolol, labetalol, levobunolol, metipranolol, metoprolol, nadolol, oxprenolol, pindolol, propranolol, sotalol, timolol.

M. ANFETAMINAS. Éstas incluyen, pero no se limitan a:

metanfetamina y MDMA (3,4-metilendioxi-N-metilanfetamina); LSD (dietilamida de ácido lisérgico); PCP (fenciclidina), ketamina y derivados;

N. ALCALOIDES Y SUS DERIVADOS. Éstos incluyen, pero no se limitan a:

nicotina, cocaína, efedrina, mescalina; alcaloides del opio (opioides) que incluyen morfina y opioides semisintéticos tales como diamorfina (heroína); alcaloides de triptamina tales como dimetiltryptamina y alfa-metiltryptamina;

O. BENZODIAZEPINAS. Éstas incluyen, pero no se limitan a:

alprazolam, diazepam, lorazepam, clonazepam, temazepam, oxazepam, flunitrazepam, triazolam, clordiazepóxido, flurazepam y nitrazepam, y no benzodiazepinas que incluyen imidazopiridinas, pirazolopirimidinas, ciclopironas.

5

P. GHB (ácido gamma-hidroxi-butírico) y derivados

El procedimiento de la presente invención puede usarse para detectar metabolitos de los fármacos mencionados anteriormente para los que están disponibles anticuerpos. Si un anticuerpo para una sustancia diana particular tal como un fármaco o su metabolito no está comercialmente disponible, el experto en la materia podría producir fácilmente un anticuerpo tal usando técnicas conocidas.

10

Los conjugados nanopartícula-anticuerpo fluorescentemente marcados usando anticuerpos que se unen a hormonas pueden aplicarse a sustratos sobre los que se sospecha que están presentes huellas dactilares latentes. Las hormonas son producidas en el cuerpo por hombres y mujeres y se secretan en el sudor. Probandos hormonas pueden visualizarse huellas dactilares de hombres y mujeres.

15

Como se ha establecido anteriormente, la presente invención proporciona, en un segundo aspecto, un procedimiento para preparar las partículas de la presente invención, comprendiendo el procedimiento hacer reaccionar partículas que comprenden un metal o un óxido metálico con un anticuerpo para permitir la unión del anticuerpo a la partícula. Las partículas pueden cada una comprender una o más de proteína A y/o proteína G unida a la superficie del metal u óxido metálico.

20

Están comercialmente disponibles anticuerpos para muchos fármacos / metabolitos de fármaco.

25

El anticuerpo usado en la presente invención puede ser un anticuerpo para un compuesto explosivo. Anticuerpos que ya se han caracterizado completamente para especificidad por TNT y RDX y éstos puede usarse para detectar estos residuos explosivos.

También es posible usar el procedimiento de la presente invención para detectar metabolitos resultantes de enfermedades tales como el VIH.

30

Como se muestra en el ejemplo, un anticuerpo para cotinina (el principal metabolito de la nicotina) puede unirse a la superficie de nanopartículas de oro como se muestra esquemáticamente en la Figura 1. Estos conjugados anticuerpo-nanopartícula pueden usarse para detectar cotinina en las huellas dactilares latentes de un fumador. El anticuerpo de cotinina se unió a las partículas y luego se incubó sobre la superficie de la huella dactilar. El exceso de disolución de nanopartículas se lavó de la superficie de la huella dactilar. Entonces, un fragmento $F(ab')_2$ de anticuerpo secundario fluorescentemente marcado (Alexa Fluor 546) se unió al conjugado de cotinina-nanopartícula. De nuevo, el exceso de reactivo se lavó de la superficie. Se obtuvieron imágenes de las huellas dactilares unidas a las nanopartículas usando un estereomicroscopio de fluorescencia - la imagen obtenida se muestra en la Figura 3. No se obtuvo imagen de fluorescencia de huellas dactilares de no fumadores.

35

40

Este experimento muestra que la estrategia de detección de anticuerpo-nanopartícula de los inventores puede proporcionar información de fluorescencia sobre la presencia de una especie diana de huellas dactilares latentes.

45

Podría usarse un anticuerpo fluorescentemente marcado en vez de unir un fluoróforo separado tal como un anticuerpo secundario. También podrían usarse nanopartículas de FeAu en lugar de nanopartículas de oro para la eliminación de partículas no unidas. Por tanto, empleando estas dos técnicas, el procedimiento forense completo podría llevarse a cabo no destructivamente (es decir, sin lavar) *in situ* y con sensibilidad mejorada.

50

En una realización preferida, la presente invención proporciona nanopartículas de 4 a 100 nm que tienen una superficie de oro y, opcionalmente, un núcleo que comprende óxido de hierro, en las que una o más proteínas A y/o proteínas G están unidas a la superficie del oro mediante enlace tiolato y un anticuerpo está unido mediante una porción de no unión a la proteína A y/o G.

55

La proteína A es un componente de la pared celular de *Staphylococcus aureus* que se une específicamente a moléculas de inmunoglobulina.

La proteína A o la proteína G están preferentemente unidas a la superficie del oro por un enlace tiolato como se muestra entre [Proteína A/G] y [superficie del oro] del siguiente modo:

60



en la que n es 1 a 5, preferentemente 2, y NH es parte de la proteína A.

65

Para sintetizar las partículas que tienen un núcleo de metal/óxido metálico unido a la proteína A o G mediante un

ligador que contiene azufre, preferentemente partículas que comprenden un metal o un óxido metálico, opcionalmente apelmazado con citrato, se ponen en contacto con proteína A o proteína G modificada con SPDP. El procedimiento de preparación de las partículas de la presente invención implica preferentemente poner en contacto partículas que tienen un núcleo de metal/óxido metálico unido a la proteína A o G mediante un ligador que contiene azufre con un anticuerpo. Preferentemente, la puesta en contacto se lleva a cabo en un líquido, preferentemente agua.

La proteína A o la proteína G se unen preferentemente al precursor de enlace tiolato haciendo reaccionar la proteína A o G con 1-3(2-piridiltio)propionato de N-succinimidilo (SPDP).

La proteína A o la proteína G pueden unirse a la superficie del oro de las nanopartículas poniendo en contacto en disolución durante un tiempo suficiente nanopartículas de oro apelmazadas con citrato y el producto de reacción de la proteína A o G con SPDP. La proteína A o G, en contacto con un anticuerpo en disolución, se unirá a la porción de no unión de un anticuerpo, preferentemente el componente F_c.

Referencias para la descripción anterior:

1. B.V. Enüstün y J. Turkevich, J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 3317-3324.
2. S. Ferretti, S. Paynter, D.A. Russell, K.E. Sapsford y D.J. Richardson, Trends Anal. Chem., 2000, 19, 530-540.
3. H. Hutter, J. Microsc., 2004, 215, 213-218.
4. M. Kagen (más 14 otros) J. Clin. Lig. Ass., 2002, 25, 104-110.
5. M. Ogawa, K. Tani, A. Ochai, N. Yamaguchi y M. Nasu, J. Appl. Microbiol., 2005, 98, 1101-1106.
6. R. Hooker, K. Creer y J. Brennan, For. Sci. Intl., 1991, 51, 297-304.
7. J. Burt y E. Menzel, J. For. Sci., 1985, 30, 364-370.
8. H. Kobus, E. Silenieux, y J. Scharnberg, J. For. Sci., 2002, 47, 819-823.
9. G. Cutrona, E.M. Carpaneto, M. Ulivi, S. Roncella, O. Landt, M. Ferrarini y L.C. Boffa. Nature Biotechnol., 2000, 18, 300-303.
10. I. E., Agerholm, S. Ziebe, B. Williams, C. Berg, D.G. Cruger, G. Bruun Petersen y S. Koluraa. Hum. Reprod., 2005, 20, 1072-1077.
11. J. Lin, W. Zhou, A. Kumbhar, J. Wiemann, J. Fang, E. Carpenter, C. O'Connor, J. Solid State Chem., 2001, 159, 26-31.

W. Zhou, E. Carpenter, J. Lin, A. Kumghar, J. Sims, C. O'Connor, Eur. Physical J. D. 2001, 16, 289-292.

La presente invención proporciona además un procedimiento para la detección fluorescente de una sustancia, procedimiento que comprende

proporcionar uno o más anticuerpos fluorescentemente marcados para la unión a un componente de fluido corporal, preferentemente sangre;

poner en contacto un sustrato, que puede o puede no tener el componente sobre su superficie, con el uno o más anticuerpos durante un tiempo suficiente para permitir que el anticuerpo se una al componente;

eliminar los anticuerpos que no se han unido al sustrato;

e iluminar el sustrato con radiación apropiada para mostrar los fluoróforos sobre el sustrato.

Preferentemente, el uno o más anticuerpos se seleccionan de proteína glucoforina de la membrana eritrocitaria (CD235a); albúmina de suero humano; antígeno leucocitario común (CD45); un anticuerpo citoplásmico anti-neutrófilo (ANCA).

El ANCA se selecciona preferentemente de (i) p-ANCA (mieloperoxidasa); y (ii) c-ANCA (proteína 3 (PR3)).

Preferentemente, los anticuerpos pueden unirse a uno o más fluoróforos mediante un resto éster de succinimidilo.

En este documento se describe un anticuerpo fluorescentemente marcado para la unión a un componente de fluido corporal, preferentemente sangre, en el que el anticuerpo se selecciona de proteína glucoforina de la membrana eritrocitaria (CD235a); albúmina de suero humano; antígeno leucocitario común (CD45); un anticuerpo citoplásmico anti-neutrófilo (ANCA). El anticuerpo se une preferentemente a uno o más fluoróforos mediante un resto éster succinimidilo.

Los anticuerpos fluorescentemente marcados pueden sintetizarse poniendo en contacto un fluoróforo para la unión a un anticuerpo con el anticuerpo, preferentemente en disolución. Un compuesto de ligación puede estar presente para ligar el anticuerpo al resto de fluoróforo, comprendiendo el compuesto de ligación preferentemente éster de succinimidilo. El fluoróforo puede seleccionarse de cualquier fluoróforo adecuado disponible para el experto.

La presente invención se ilustrará ahora en los siguientes ejemplos no limitantes y con referencia a los siguientes dibujos en los que:

- 5 La Figura 1 muestra una representación esquemática de una realización de los conjugados anticuerpo-nanopartícula. Los conjugados se formulan depositando una monocapa autoensamblada de proteína A que actúa de ligador biológico para orientar reproduciblemente el anticuerpo anti-cotina sobre la superficie de la partícula de oro;
- 10 la Figura 2 muestra la evolución del desarrollo de la huella dactilar usando conjugados anti-cotina-nanopartícula. Las huellas dactilares son de un fumador varón - las imágenes de fluorescencia se derivan de un fragmento $(F(ab')_2)$ de anticuerpo secundario de IgG de cabra anti-ratón) marcado con tanto Alexa Fluor 546 (A a E) como Alexa Fluor 488 (F a J). Las imágenes A y F son huellas dactilares tomadas de sujetos tal y como se presentan; las imágenes B-E y G-J se tomaron después de que el sujeto se lavara sus manos y luego dio una huella dactilar después de un tiempo de 'sudoración' predeterminado - B y G (10 minutos), C y H (20 minutos), D y I (30 minutos) y E y J (40 minutos). Las imágenes A a E se toman del pulgar, F, G y I son imágenes del dedo corazón, H es una imagen del dedo índice, mientras que J es una imagen del dedo meñique. En cada ejemplo la barra de escala representa 5 mm;
- 15 la Figura 3 muestra imágenes de fluorescencia, a aumentos variables, que muestran información detallada de la huella dactilar. Las imágenes se toman del pulgar de un fumador varón después de 40 min de sudoración usando los conjugados anti-cotina-nanopartícula iluminados usando un fragmento $(F(ab')_2)$ de anticuerpo secundario de IgG de cabra anti-ratón marcado con Alexa Fluor 546). La barra de escala representa: A, 5 mm; B, 2 mm; y C, 1 mm respectivamente;
- 20 la Figura 4 muestra imágenes de huellas dactilares de fluorescencia de mayor aumento que muestran altas concentraciones de exudado de cotina que rodean inmediatamente los poros de sudor. A - Dedo corazón de un fumador varón después de 10 minutos de sudoración; y B - Dedo anular de una fumadora hembra tal y como se presenta. Las barras de escala representan 1 mm;
- 25 la Figura 5 muestra imágenes de fluorescencia tomadas de un fumador varón tras la incubación con una disolución de anticuerpo anti-cotina (no estructurado sobre nanopartículas) y posteriormente fragmento $F(ab')_2$ marcado con (A) Alexa Fluor 488 y (B) Alexa Fluor 546 de IgG de cabra anti-ratón. Imágenes tomadas de (A) dedo meñique y (B) dedo índice. Las barras de escala representan 5 mm;
- 30 la Figura 6 muestra los resultados de un experimento de control de una huella dactilar de no fumador (varón). (A) muestra una imagen de campo brillante de un dedo índice. (B-C) son imágenes obtenidas con los conjugados anti-cotina-nanopartícula usando el fragmento $F(ab')_2$ marcado con Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 546 de IgG de cabra anti-ratón, mostrando respectivamente no fluorescencia. (B) Dedo corazón y (C) dedo índice. Las barras de escala representan 5 mm;
- 35 la Figura 7 muestra sangre seca sobre un cubreobjetos, teñida con anticuerpo anti-glucoforina (primario) seguido de anticuerpo secundario marcado con anti-FITC de ratón; y las Figuras 8 a 12 muestran eritrocitos, leucocitos y albúmina humana directamente teñidos con anticuerpos marcados específicos como se describe en el Ejemplo 2.

40

Ejemplo 1

Los presentes inventores han ideado un procedimiento simple, pero robusto, para la formación de nanopartículas funcionalizadas con anticuerpos usando una monocapa autoensamblada (SAM) de un ligador de proteínas para recubrir la superficie de nanopartículas de oro. Se formularon nanopartículas de oro de 16 nm de diámetro usando el enfoque de Turkevich (B.V. Enüstün y J. Turkevich, J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 3317-3324) que usa citrato tanto como reductor como agente estabilizante. Con referencia a la Figura 1, la proteína A - un componente de la pared celular de *Staphylococcus aureus* - se modificó primero con 3-(2-piridilditio)-propionato de N-succinimidilo (SPDP) para permitir la formación de una monocapa autoensamblada (SAM) de la proteína A sobre la superficie de nanopartículas de oro (el éster de succinimidilo une el SPDP con una amina primaria sobre la superficie de la proteína, mientras que el resto tiol proporciona un enlace a la superficie del oro (véase: S. Ferretti, S. Paynter, D.A. Russell, K.E. Sapsford y D.J. Richardson, Trends Anal. Chem., 2000, 19, 530-540)). Una SAM de proteína A se forma tras la adición de la proteína A modificada con SPDP a las nanopartículas con el ligando tiolado que desplaza la capa de citrato sobre la superficie de la partícula de oro. La proteína A se usó como ligador ya que la proteína une específicamente la porción Fc de un anticuerpo (véase: E. Harlow y D. Lane en *Antibodies: A Laboratory Manual* (Eds. E. Harlow y D. Lane) Cold Spring Harbour Laboratory, Nueva York, 1988, pág. 616-621). Uniendo el componente Fc, la proteína A orienta el anticuerpo de forma que el componente de reconocimiento, la región de unión $F(ab')_2$, se presente óptimamente para la unión directa y reproducible al antígeno. La anti-cotina se depositó fácilmente sobre la monocapa de la proteína A sobre las nanopartículas de oro. Sin embargo, debe observarse que esta estrategia puede aplicarse para funcionalizar nanopartículas con numerosos anticuerpos que permiten la detección de múltiples antígenos específicos.

Las nanopartículas funcionalizadas con anti-cotina se aplicaron a la detección de cotina en las huellas dactilares de fumadores. En un experimento típico, el fumador voluntario proporcionaría una huella dactilar (tales huellas dactilares se describen 'tal y como se presentan'), luego se les pidió que se lavaran sus manos y luego se indujo la sudoración poniendo la mano del voluntario en un vaso de precipitados de vidrio cerrado. Las huellas dactilares se

65

tomaron entonces a intervalos regulares entre 10-40 min. Los conjugados de cotinina-nanopartícula se pipetearon sobre las huellas dactilares y se incubaron durante 30 min. Tras la incubación, la huella dactilar se lavó para eliminar los conjugados de nanopartícula sin unir. Entonces, un fragmento de anticuerpo secundario fluorescentemente marcado (región (F(ab')₂)) se incubó y el exceso de reactivo se eliminó lavando con agua. Entonces, las imágenes de fluorescencia se tomaron de las huellas dactilares. La Figura 2 muestra las imágenes de huellas dactilares obtenidas de un fumador varón (que refiere que fuma entre 5-7 cigarrillos al día) usando 2 fragmentos de anticuerpo secundario fluorescentemente marcado.

Procedimientos y materiales

Reactivos: Todos los reactivos se compraron de Sigma-Aldrich (Gillingham, RU), a menos que se establezca, fueron de calidad analítica y se usaron sin más purificación. Se usó agua Milli-Q en toda la preparación de la disolución a menos que se establezca de otro modo.

Mediciones de absorción UV-visible: Se usó un espectrofotómetro UV-visible Hitachi U3000 para registrar espectros de absorción a una temperatura de 22°C.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM): Para caracterizar el tamaño y la estructura de las nanopartículas de oro y la siguiente adición posterior de proteína A se usó microscopía electrónica de transmisión (JEOL 2000EX operando a 100 kV). Una gota de 5 µl de la muestra de nanopartícula se colocó sobre una rejilla de cobre de 200 de malla recubierta con carbono. El líquido en exceso se eliminó poniendo en contacto el lado de la rejilla con tejido de papel absorbente y luego dejando que la rejilla se seque durante otros 5 min.

Tiolación de la proteína A: Para permitir el autoensamblado de la proteína A sobre la superficie de la nanopartícula de oro se usó el reactivo heterobifuncional 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP). Se añadió SPDP (10 mM, 60 µl en etanol (Fisher, Loughborough, RU)) a la proteína A (5 µM, 2,5 ml en tampón fosfato 100 mM (Fisher, Loughborough, RU) pH 7,8) y se agitó durante 30 minutos. El SPDP sin unir se eliminó usando una columna de desalación Sephadex P-10 (Amersham Biosciences, Little Chalfont, RU). Primero, la columna se equilibró con tampón fosfato (10 mM, pH 7,4) y luego el complejo proteína A-SPDP (2,5 ml) se añadió sobre la columna y la SPDP-proteína A unida se eluyó con tampón fosfato (10 mM, pH 7,4).

Confirmación de la tiolación de la proteína A: La conjugación de SPDP a la proteína A se confirmó usando DL-ditiotreitol (DTT).¹ El DTT reduce específicamente el enlace disulfuro de SPDP dando 2-tiopiridona, la forma oxidada de DTT. Esta reacción puede monitorizarse a 343 nm, la $\lambda_{\text{máx}}$ de 2-tiopiridona ($\epsilon_{343} = 8,08 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), para confirmar que el SPDP se unió a la proteína A. Se tomó un espectro de UV-visible inicial del complejo de SPDP-proteína A (0,1 ml completados hasta 1 ml con tampón fosfato 10 mM, pH 7,4) y DTT (0,1 M, 25 µl en agua), se añadió a la disolución de proteína A-SPDP y el espectro de UV-visible se tomó 30 minutos después de la adición de DTT.

Síntesis de nanopartículas de oro: Las nanopartículas de oro (3 nM) solubles en agua se prepararon mediante la reacción de la sal tetracloroaurato de hidrógeno y el agente reductor y de apelmazamiento citrato de sodio dihidratado (Fisher Loughborough, RU)². Las dos disoluciones de citrato de sodio dihidratado (50 mg, 50 ml de agua) y de tetracloroaurato (III) de hidrógeno trihidratado (12,5 mg, 100 ml en agua, amarillo pálido) se calentaron a 60°C, luego siguió la rápida adición del citrato a la disolución de oro aumentando la temperatura a 85°C durante 2½ h con agitación continua. La disolución resultante tuvo un color rojo oscuro característico de las nanopartículas de oro de 16 nm de diámetro estabilizadas con citrato. El tamaño de partícula se verificó por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Síntesis de nanopartículas de oro modificadas con proteína A: La proteína A modificada con SPDP (1,6 M) se añadió a nanopartículas de oro (3 nM) y se agitó continuamente durante 48 horas para ayudar en el autoensamblado. Las nanopartículas de oro estabilizadas con la proteína A se centrifugaron (centrifuga Beckman Coulter Avanti™ J-25) a 53343 x g y 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante claro se separó pipeteando cuidadosamente, dejando un débil sedimento (~0,5 ml) con un color rojo oscuro y éste se resuspendió en tampón fosfato (10 mM, pH 7,4). El procedimiento de centrifugación se repitió por triplicado para eliminar cualquier proteína A-SPDP sin unir. Se tomó un espectro de UV-visible (800-300 nm) de la disolución resuspendida final.

Adición de anti-cotinina al complejo de proteína A-oro: Se añadió IgG anti-cotinina (40 µl, 5,4 mg/ml (Europe Bioproducts Ltd., Ely, RU)) a las nanopartículas de oro modificadas con la proteína A (20 ml) y se agitó durante 2 ½ horas. El procedimiento de centrifugación se repitió, quedando un sedimento rojo oscuro (~0,5 ml) después de eliminarse el sobrenadante claro y se usó en la última resuspensión de 5 ml de tampón fosfato (10 mM, pH 7,4). Se tomó un espectro de UV-visible (800-300 nm) de la disolución resuspendida final.

Microscopía de campo brillante y fluorescente: Las imágenes de campo brillante y fluorescentes de huellas dactilares latentes se adquirieron usando un estereomicroscopio Zeiss M2 Bio Quad SV11. Las huellas dactilares se iluminaron tanto con una lámpara halógena (campo brillante) como con una lámpara de arco de Hg de 100 W (fluorescencia), y las imágenes de luz reflejadas se capturaron con una cámara AxioCam HRc CCD y el software

Axio Vision (Carl Zeiss, Welwyn Garden City, RU). Se excitó Alexa Fluor 488[®] (Invitrogen, Paisley, RU) con luz pasada a través de un filtro de 470 nm (paso de banda de 40 nm) y la emisión se recogió por un filtro de 525 nm (paso de banda de 50 nm). Se excitó Alexa Fluor 546[®] (Invitrogen, Paisley, RU) usando un filtro de excitación de 560 nm (paso de banda de 40 nm) y un filtro de emisión de 630 nm (paso de banda de 60 nm).

Obtención de imágenes de cotinina en huellas dactilares latentes usando el complejo anti-cotinina-oro: Se limpiaron cuidadosamente portaobjetos de vidrio usando Kimwipes[®] sin pelusas y metanol (calidad para HPLC) para eliminar la contaminación sobre el portaobjetos. Un tejido de limpieza de la lente se colocó sobre el portaobjetos de vidrio, luego se aplicó líquido limpiacristales (6 µl) (Wizz Products Ltd, Leeds, RU) a través del tejido en la parte superior del portaobjetos y el tejido se pasó a través del portaobjetos para eliminar cualquier polvo y/o extensión sobre el portaobjetos. Esta última etapa se completa luego para la parte inferior del portaobjetos. Entonces se aplicó una huella dactilar de un fumador/no fumador al portaobjetos y luego se tomaron imágenes de campo brillante. Para contener el complejo de anti-cotinina-oro sobre la superficie de la huella dactilar se aplicó una barrera hidrófoba alrededor de la huella dactilar usando un rotulador de barrera hidrófoba ImmEdge (Vector, Peterborough, RU) para contener un líquido sobre la huella dactilar. Un lote fresco (usado en el transcurso de 1 día desde la producción) del complejo de anti-cotinina-oro (~200 µl) se aplicó cuidadosamente a la huella dactilar y el portaobjetos se incubó durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda (tejido humedecido alrededor del portaobjetos de vidrio en una placa de petri de plástico). Entonces, el área de la huella dactilar se lavó con agua para eliminar el complejo de anti-cotinina-oro sin unir. El anticuerpo secundario anti-ratón (región F(ab')₂), tanto marcado con Alexa Fluor 488 como 546 (Invitrogen, Paisley, RU) 20 µl de una dilución 1 en 20 de mezcla madre se añadió al área de la huella dactilar y se incubó en cuanto al anticuerpo primario. El portaobjetos se lavó de nuevo con agua para eliminar cualquier anticuerpo secundario sin unir y se tomaron imágenes fluorescentes.

Obtención de imágenes de cotinina en huellas dactilares latentes usando anti-cotinina: Entonces se repitió el procedimiento para obtener imágenes de cotinina en huellas dactilares latentes para una muestra de control de anti-cotinina. La anti-cotinina (40 µl) se añadió a tampón fosfato (10 mM, pH 7,4, 5 ml) dando una disolución madre. Se tomaron imágenes de campo brillante de huellas dactilares latentes de fumadores y de no fumadores antes de la incubación. Se tomaron imágenes fluorescentes de las huellas dactilares latentes después de la incubación como se describe para el complejo de anti-cotinina-oro.

Referencias para el ejemplo:

1) Imoto, T.; Yamada, H. en Protein Function – A Practical Approach; Creighton, T.E., Ed.; IRL Press: Oxford, 1997, pág. 247-259.

2) Hone, D.C.; Haines, A.H; Russell, D.A.; Langmuir, 2003, 19, 7141-7144.

Ejemplo 2 - No dentro del alcance de la invención.

Este ejemplo ilustra el uso de ciertos anticuerpos en la detección de sangre.

a) Selección de anticuerpos y de fluoróforos

En el siguiente ejemplo, anticuerpos monoclonales se marcan directamente con fluoróforos específicos en vez del marcado indirecto que hace uso de un 2º anticuerpo marcado que es específico para el 1º anticuerpo. Este enfoque de un único anticuerpo permite análisis más rápidos de manchas de sangre seca, además de reducir el riesgo de reactividad cruzada que puede producirse usando un enfoque indirecto.

Se seleccionaron colorantes Alexa Fluor, con el resto éster de succinimidilo para permitir el marcado de residuos de amina primaria sobre los anticuerpos monoclonales, debido a su brillo, fotoestabilidad, compatibilidad con el instrumento, insensibilidad a pH y solubilidad en agua.

Se seleccionaron anticuerpos monoclonales comercialmente disponibles basándose en la especificidad del tipo de células humanas. Los leucocitos son dianas naturalmente importantes dentro de las extensiones de sangre debido a la presencia de núcleos y, por tanto, ADN que está ausente de eritrocitos. También es importante observar que los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) constituyen la mayoría de la población de glóbulos blancos de la sangre, por tanto, éstos se consideran como buenas células diana dentro de una extensión de sangre. Los anticuerpos seleccionados fueron del siguiente modo:

1. Proteína glucoforina de la membrana eritrocitaria (CD235a)

2. Albúmina de suero humano

3. Antígeno leucocitario común (CD45)

4. Anticuerpos citoplásmicos anti-neutrófilo (ANCA):

i) p-ANCA (mieloperoxidasa) que normalmente se localiza en la región perinuclear en granulocitos

ii) c-ANCA (proteína 3 (PR3)) que normalmente se localiza en el citoplasma de granulocitos

Para la detección de ADN dentro de una población de leucocitos se seleccionaron histonas (proteínas de unión a

ADN) como dianas. Se observa que la histona H1 está más variada entre especies que las H2A, H2B, H3 y H4 más conservadas, por lo que ésta se seleccionó como diana. También se seleccionó el subtipo de H1 H1.3 ya que éste debería ser específico para ser humano. Sin embargo, la tinción de estas histonas no mostrará especificidad de células, ya que se observa que estos anticuerpos tendrán que usarse conjuntamente con anticuerpos específicos de leucocitos tales como CD45 o ANCA marcados con un fluoróforo diferente.

b) Materiales y procedimientos

i) Marcado de anticuerpos

Los colorantes Alexa Fluor (488, 568), ácido carboxílico, éster de succinimidilo 1 mg (Invitrogen) se disolvieron en dimetilformamida (DMF) a una concentración de 1 mg/ml. Los anticuerpos monoclonales se compraron normalmente en una disolución de PBS y azida de sodio sin BSA o gelatina y a una concentración de al menos 1 mg/ml. A 70 μ l de disolución de anticuerpo se añadió NaHCO_3 (pH 8,5) a una concentración final de 100 mM. El colorante se añadió a una relación 10:1 de colorante con respecto a proteína y se hizo reaccionar durante 1 h (Alexa Fluor 488) o 2 h (Alexa Fluor 568) en la oscuridad a temperatura ambiente con mezclado cada 15 minutos.

El colorante sin unir se eliminó usando columnas de centrifugación desaladas Zeba (Pierce) de 0,5 ml que normalmente mostraron el 95% de retención de sales y otras moléculas < 1000 MW y alta recuperación de proteína (aprox. 90-95%). La concentración de proteína y la relación de colorante:proteína se midió usando un Nano Drop y se calculó del siguiente modo:

Conc. de proteína:

$$\frac{[A280 - [A568 \times \text{factor de corrección}]] \times \text{factor de dilución}}{\epsilon \text{proteína (203.000 para IgG) cm}^{-1} \text{ M}^{-1}}$$

$$\epsilon \text{proteína (203.000 para IgG) cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

Factor de corrección = absorbancia del colorante a 280 nm (0,46 para AF568 y 0,11 para AF488)

Grado de marcado:

$$\frac{A568 \times \text{factor de dilución}}{\epsilon(\text{colorante}) \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}}$$

$$\epsilon(\text{colorante}) \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

$$\epsilon \text{ para AF488} = 71.000$$

$$\epsilon \text{ para AF568} = 91.300$$

Normalmente, un buen marcado dio aproximadamente 3 moléculas de colorante : 1 molécula de proteína, sin embargo, si se marcó por defecto, se añadió un lote nuevo de colorante y se hizo reaccionar durante otra 1 hora.

El marcado en exceso produjo la extinción del fluoróforo o la tinción no específica.

Se añadió azida de sodio a una concentración final de 2 mM para servir de conservante.

ii) Preparación de células

Se extendió sangre humana sobre un portaobjetos adhesivo (Surgipath), se secó y se fijó en MeOH durante 10 min a temperatura ambiente. Esto fue seguido por lavado 2 x en PBS (100 mM, pH 7,2) y secado adicional. El área que iba a marcarse se definió con un rotulador PAP y el anticuerpo conjugado (dependiendo de la concentración) se aplicó normalmente a 1:25 ó 1:50 en PBS con 2,5% de BSA durante 30 minutos. Entonces, las extensiones de sangre se lavaron con PBS y se montaron en un medio antifluorescente (Dako).

Se adquirieron imágenes de campo brillante y fluorescente en un estereomicroscopio Zeiss Axioskop 2 MOT plus. Las extensiones de sangre se iluminaron con tanto una lámpara halógena para campo brillante como una lámpara de arco de Hg de 100 W para fluorescencia. Las imágenes se capturaron con una cámara AxioCam HRC CCD y se procesaron usando el software Axiovision 3.1.

c) Imágenes

Las Figuras 8 a 12 muestran eritrocitos, leucocitos y albúmina humana directamente teñidos con anticuerpos marcados específicos.

La Figura 8 muestra eritrocitos humanos x 400 de una extensión de sangre seca marcada con Alexa Fluor 568 de

rata anti-CD235a humano.

La Figura 9 muestra albúmina de suero humano de una extensión de sangre humana marcada con Alexa Fluor 488 de ratón anti-albúmina humana (A) x 100 (B) x 400.

5 La Figura 10 muestra dos ejemplos de eritrocitos humanos secos sobre algodón negro x 200 marcados con Alexa Fluor 568 de rata anti-CD235a humano.

10 La Figura 11 muestra neutrófilos humanos x 1000 de una extensión de sangre seca marcada con (A) Alexa Fluor 488 de ratón anti-CD45 humano, (B) Alexa Fluor 568 de ratón anti-histona H1 humana, (C) solapamiento de las imágenes A y B.

15 La Figura 12 muestra linfocito o monocito humano x 1000 de una extensión de sangre seca marcada con Alexa Fluor 568 de conejo anti-histona H1.3 humana

d) Especificidad

20 Se encontró que anti-CD235a humano de rata, anti-CD45 humano de ratón y anti-albúmina humana de ratón no mostraron reactividad cruzada con sangre de perro, conejo o cerdo. Anti-histona H1 humana de ratón mostró reactividad cruzada con estos tres tipos de sangre diferentes. Sin embargo, todavía podría usarse conjuntamente con CD45 para mostrar especificidad de célula y especificidad humana. Esto proporcionaría una herramienta útil en la detección de una mancha de sangre y ADN directamente.

25 El Ejemplo 2 muestra el uso eficaz de ciertos anticuerpos en la detección de sangre. Los anticuerpos pueden unirse a núcleos que contienen metal u óxido metálico de una forma análoga al procedimiento mostrado en el Ejemplo 1.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la detección fluorescente de una sustancia en una huella dactilar de un ser humano sobre una superficie de un sustrato, procedimiento que comprende:

proporcionar partículas que comprenden un núcleo de metal o de óxido metálico, en el que uno o más anticuerpos opcionalmente fluorescentemente marcados u oligómeros de ácido nucleico de péptido específico humano (PNA) para la unión con una sustancia está/están unido/s, directamente o indirectamente, a la superficie del metal u óxido metálico;

poner en contacto un sustrato, que puede o puede no tener la sustancia sobre su superficie, con las partículas durante un tiempo suficiente para permitir que el anticuerpo/oligómero de PNA se una a la sustancia;

eliminar aquellas partículas que no se han unido al sustrato;

si los anticuerpos u oligómeros de PNA no están fluorescentemente marcados, poner en contacto el sustrato con uno o más fluoróforos que se unen selectivamente al anticuerpo y/o sustancia, luego lavar opcionalmente el sustrato para eliminar los fluoróforos sin unir;

e iluminar el sustrato con radiación apropiada para mostrar los fluoróforos sobre el sustrato, en el que el sustrato tiene una huella dactilar de un ser humano sobre una superficie sobre la que las partículas se ponen en contacto.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el núcleo comprende uno o más metales seleccionados de oro, plata, platino y cobre.

3. El procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el núcleo comprende un óxido de hierro.

4. El procedimiento según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que las partículas tienen un núcleo que comprende un óxido de hierro, teniendo el núcleo una capa de metal sobre el mismo, estando el metal seleccionado de oro, plata, platino y cobre.

5. El procedimiento según la reivindicación 3 ó 4, en el que el óxido de hierro es Fe_3O_4 o Fe_2O_3 .

6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos algunos de los núcleos de partículas tienen un diámetro inferior a 100 nm.

7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el uno o más anticuerpos u oligómeros de PNA están directamente unidos a la superficie del metal u óxido metálico.

8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el uno o más anticuerpos u oligómeros de PNA están unidos a la superficie del metal u óxido metálico mediante un ligador que contiene azufre.

9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 8, en el que el uno o más anticuerpos u oligómeros de PNA están unidos a la superficie del metal u óxido metálico mediante proteína A o proteína G.

10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 8 y 9, en el que el uno o más anticuerpos u oligómeros de PNA están unidos a la superficie del metal u óxido metálico del siguiente modo:

[anticuerpo u oligómero de PNA]-[Proteína A o G]-NH-CO-(CH₂)_n-S-[superficie de metal o de óxido metálico]

en la que n es 1 a 5 y NH es parte de la proteína A o la proteína G.

11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el uno o más anticuerpos se unen selectivamente a histona H1, cocaína, benzoilecgonina, nicotina, cotinina, uno o más esteroides, TNT o RNX.

12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el uno o más anticuerpos se seleccionan de amilasa salival humana, antígeno específico de la próstata, proteína glucoforina de la membrana eritrocitaria (CD235a), albúmina de suero humano, antígeno leucocitario común (CD45) y un anticuerpo citoplásmico anti-neutrófilo (ANCA) opcionalmente seleccionado de (i) p-ANCA (mieloperoxidasa) y (ii) c-ANCA (proteínasa 3 (PR3)).

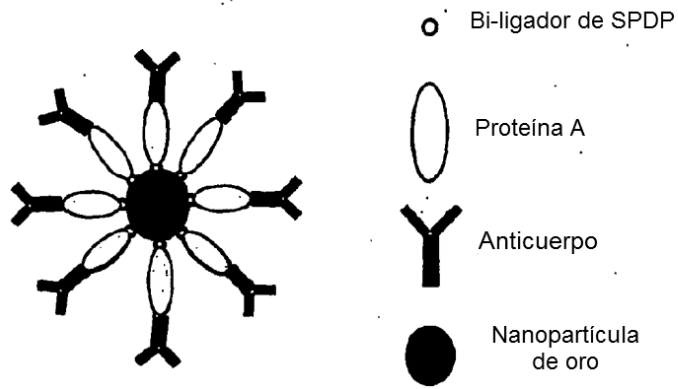


FIG. 1

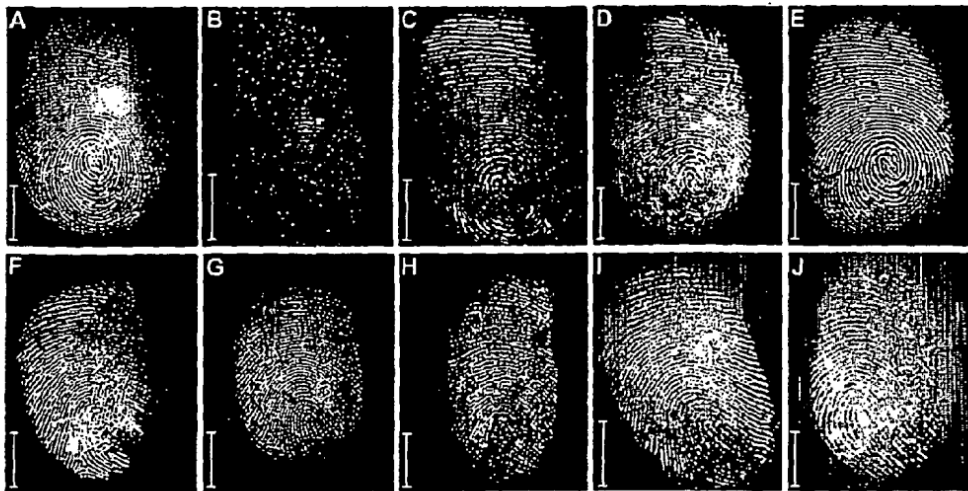


FIG. 2



FIG. 3

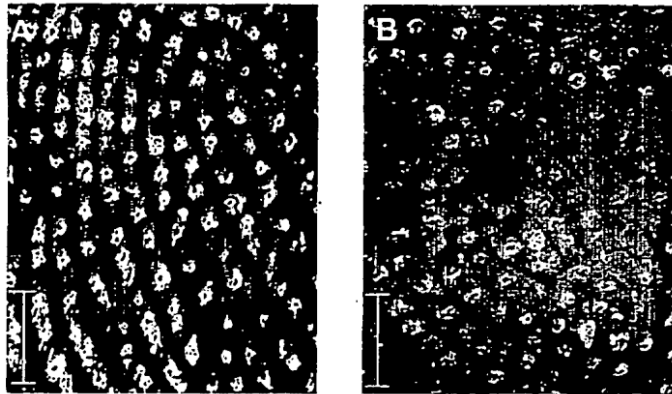


FIG. 4

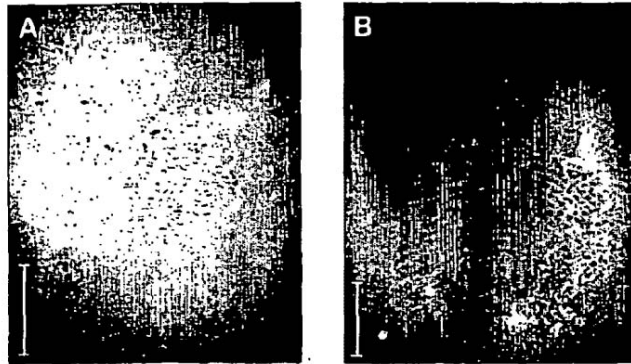


FIG. 5

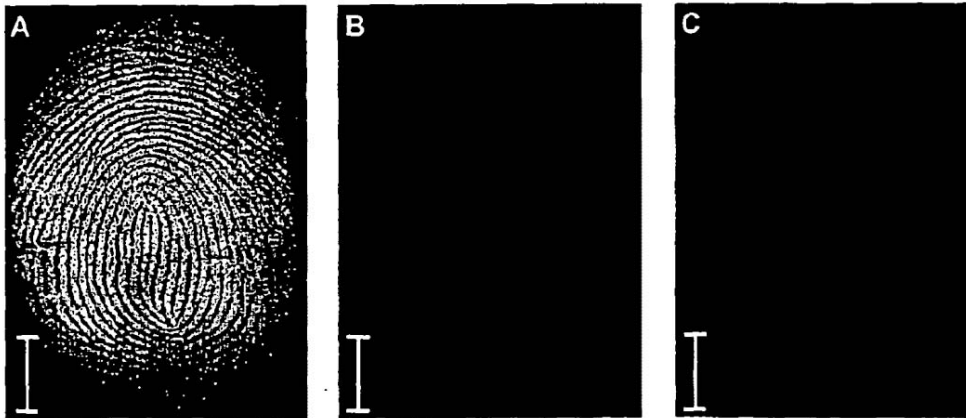


FIG. 6

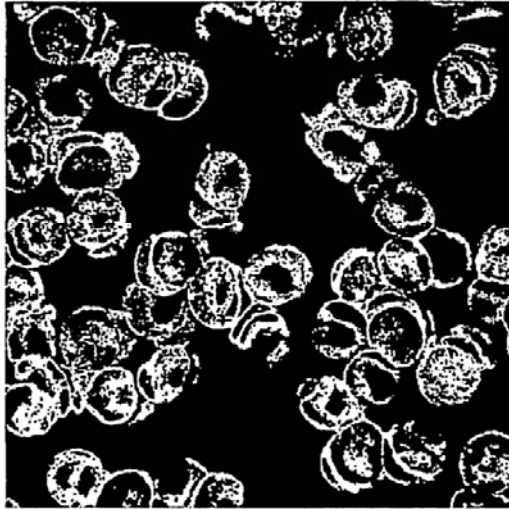


FIG. 7

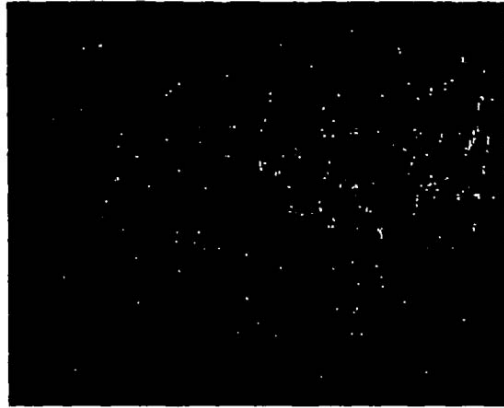


FIG. 8.

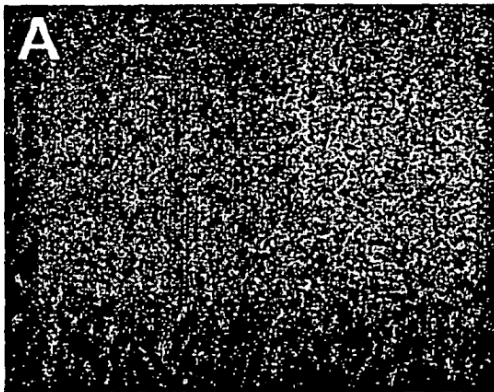


FIG. 9A

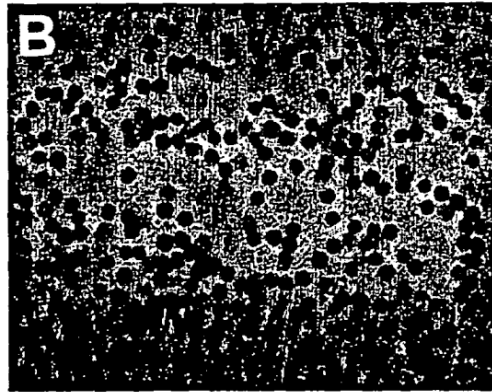


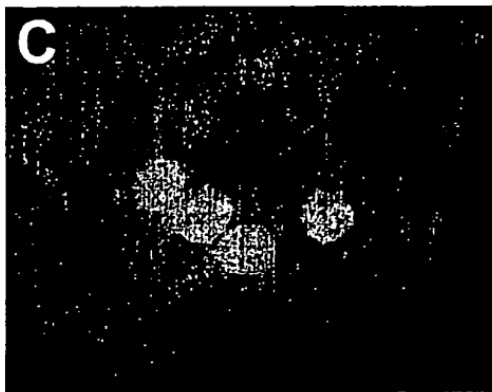
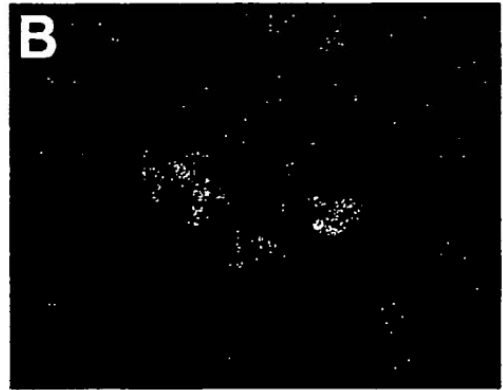
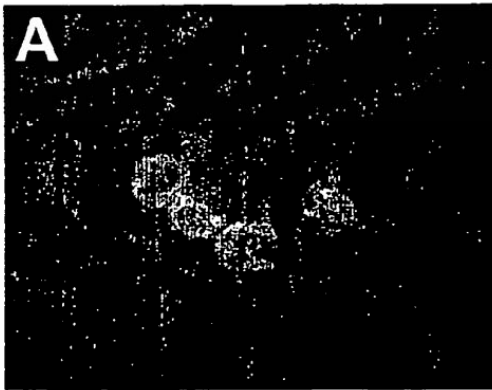
FIG. 9B



FIG. 10A



FIG. 10B



FIGS. 11A, 11B y 11C



FIG. 12