

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 880**

51 Int. Cl.:

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2009 E 13170392 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2637026**

54 Título: **Procedimiento no proteolítico de determinación de analitos en estructuras queratinizadas**

30 Prioridad:

29.04.2008 US 111914

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.01.2016

73 Titular/es:

**PSYCHEMEDICS CORPORATION (100.0%)
125 Nagog Park Suite 200
Acton, MA 01720, US**

72 Inventor/es:

**HILL, VIRGINIA;
ATEFI, MOHAMMAD y
SCHAFFER, MICHAEL I.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 556 880 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

Procedimiento no proteolítico de determinación de analitos en estructuras queratinizadas

Campo de la técnica

5 La presente divulgación se refiere a materiales y procedimientos para determinar la presencia y la cantidad de uno o más analitos de interés en estructuras no queratinizadas de un sujeto y, más particularmente, a materiales y procedimientos para lo mismo que no requieren procesamiento proteolítico de las estructuras queratinizadas.

Antecedentes

10 La presente divulgación se refiere a un procedimiento analítico mejorado que permite la liberación relativamente rápida y el análisis directo de analitos, incluidos analitos orgánicos, tales como ciertas drogas o metabolitos de las mismas, presentes en el pelo y en otras estructuras queratinizadas, por ejemplo las uñas de los dedos de los pies y las uñas de los dedos de las manos. El procedimiento permite la detección selectiva de dichos analitos sin que afecte a la estructura de los analitos y sin que sea perjudicial para las sondas de analitos, por ejemplo anticuerpos, ARN/ADN y sondas de bioreceptores, que se pueden usar para detectar el analito. Por ejemplo, en algunas realizaciones se puede añadir directamente una sonda de analito a una estructura queratinizada que se sospecha que contiene uno o más analitos y que se ha tratado como se describe en el presente documento. De este modo, se puede evaluar la identidad de uno o más analitos, así como la extensión y la duración del consumo del uno o más analitos por un sujeto.

20 El análisis del pelo y otras estructuras queratinizadas tiene ciertas ventajas sobre las técnicas de análisis de orina, sangre y fluidos orales para la detección de analitos de interés. Estas incluyen facilidad de manipulación y almacenamiento, una amplia ventana de detección, y correlación de la presencia y la cantidad de fármaco con el tiempo de uso y la dosis ingerida. Se sabe que las técnicas en orina, sangre y fluidos orales son desventajosas en cuanto a que la duración y la intensidad de uso o de exposición no se pueden determinar. Estas técnicas pueden, como mucho, proporcionar información a corto plazo concerniente a los analitos ingeridos. Además, también hay problemas con la interpretación de estos resultados. Por ejemplo, la detección de un nivel bajo de la droga ingerida o del metabolito de la droga ingerida en orina podría significar que un sujeto ha ingerido una cantidad pequeña de la droga muy recientemente o una cantidad mayor varios días antes. Por tanto, normalmente, el uso crónico de una droga no se puede determinar con estos procedimientos sin repetir las pruebas.

30 En respuesta a los problemas de establecer un procedimiento fiable y preciso que mida la duración y la intensidad de los analitos de interés, los trabajos realizados por el Dr. Werner A. Baumgartner, como se indica en "Radioimmunoassay of Hair for Determining Opiate Abuse Histories", J. Nucl Med 20:749-752 (1979), determinaron que los historiales de exposición prolongada a drogas se pueden obtener mediante el análisis de vello corporal de mamífero, ya que estas sustancias quedan "atrapadas" dentro de las fibras de cabello individuales durante la síntesis de las fibras. A este respecto, se demostró que actuaba como una grabadora, es decir, los historiales de exposición pasada se pueden evaluar mediante un análisis seccional de las muestras de pelo. Por ejemplo, se encontró que la morfina, una vez que está en la circulación sanguínea, encuentra su camino hacia el cabello a medida que el pelo se sintetiza.

40 Se ha determinado que varias sustancias químicas, incluidas las drogas, quedan atrapadas por el pelo durante su síntesis, estas sustancias quedan "encerradas" en el pelo durante esencialmente el tiempo en el que está presente el vello en el cuerpo. Se descubrió que esto era cierto para el cabello de la cabeza y el vello corporal, así como para otras estructuras queratinizadas tales como las uñas de los dedos de la mano; véase Suzuki *et al.*, Forensic Sci. International, 24:9-16, 1984. Estas sustancias atrapadas no se pueden eliminar del pelo y anteriormente se pensaba que solo se liberaban completamente después de la destrucción completa, o caso completa de la fibra de pelo.

45 Procedimientos previos de extracción de un analito procedente del cabello incluyen someter el cabello a soluciones calientes de metanol, o incubación del cabello durante horas (normalmente durante la noche) en un medio alcalino o ácido; Yegles, *et al.*, en: Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair, CRC Press, 2007, pp. 73 - 94; Jurado, C. en: Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair, CRC Press, 2007, pp. 95-125; Cheze, M. *et al.* en: Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair, CRC Press, 2007, pp. 163 - 185). Procedimientos anteriores también han incluido el uso de ultrasonidos o de un mortero y martinete junto con un disolvente para ayudar a la extracción.

50 Los procedimientos de extracción de disolvente pueden sufrir varios problemas para determinar con precisión la presencia y la cantidad de un analito ingerido. Uno de estos problemas es que los procedimientos de extracción de disolvente con frecuencia solo extraen una pequeña fracción desconocida y variable del analito total presente en la muestra de pelo. Otra desventaja es que diferentes analitos pueden requerir diferentes disolventes o diferentes tiempos y temperaturas para la extracción. Además, para el análisis mediante inmunoensayo, se tienen que evaporar los disolventes y muchos de los disolventes son tóxicos y peligrosos.

Otros procedimientos previos usaron una combinación de tratamientos proteolíticos y reductores para digerir completamente y reducir las estructuras queratinizadas con el fin de liberar el uno o más analitos. Véase, por

ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.466.579; 5.324.642; 6.022.693; 6.582.924; y 6.949.344, que proporcionan ejemplos de procedimientos de detección para ensayos de detección selectiva y confirmatorios para analitos de interés, incluyendo procedimientos de inmunoensayo tales como procedimientos radioinmunoensayo y de inmunoensayo enzimático. Dichos procedimientos de tratamiento proteolítico y reductor combinados, aunque
 5 eficientes, son relativamente caros debido a los costes de la enzima proteolítica, que también pueden interferir en los posteriores ensayos de detección de analitos mediante escisión proteolítica de las sondas de detección de analitos tales como antibióticos, evitando de este modo el uso de ciertas técnicas analíticas muy sensibles o requiriendo el uso de etapas intermedias de neutralización, separación o purificación de proteasas.

Por tanto, existe la necesidad de un procedimiento de detección de analitos eficiente y relativamente barato que
 10 pueda liberar rápida y completamente analitos de estructuras queratinizadas del cuerpo, tal como pelo, uñas de las manos y uñas de los pies, y que pueda permitir la determinación directa de la identidad de los analitos y su duración de uso en un sujeto sin que destruya ni interfiera con los analitos de interés y/o las sondas de detección de analitos, tales como procedimientos de inmunoensayos. En el documento US 6 949 344 describe procedimientos para el análisis directo de estructuras queratinizadas, por ejemplo pelo. Los procedimientos comprenden el uso de una
 15 enzima proteolítica. Nielen *et al.* (Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences & Applications (2006) 830:126-134) y Ahrens *et al.* (Fresenius Journal of Analytical Chemistry (1992) 344:559-560) describen procedimientos para detectar determinadas drogas en el pelo. También, Gratacos-Cubarsi *et al.* (Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences & Applications (2006) 834:14-25) describen procedimientos para analizar el pelo para
 20 monitorización de drogas veterinarias en la producción de ganado. Gleixner (Fleischwirtschaft (1997), 77(12):1108-1110) describe la extracción de hormonas esteroides de pelo pulverizado. No obstante, los procedimientos descritos en dichos documentos difieren de la materia sujeto de la presente invención, entre otros en las condiciones de pH y el tipo de agente reductor usado.

Sumario

La invención se puede definir en las reivindicaciones adjuntas.

De acuerdo con una realización de la invención se proporciona un procedimiento para determinar la presencia de un
 25 analito en una muestra de estructura queratinizada de un sujeto, comprendiendo el procedimiento: (a) proporcionar una muestra de estructura queratinizada lavada opcionalmente; (b) poner en contacto la muestra queratinizada con una solución acuosa de un agente reductor que comprende ditiotreitolo (DTT) o ditioeritrol (DTE) para dar una solución de ensayo, en la que la etapa de contacto se realiza a un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente
 30 0,5 y (c) determinar si el analito está presente en la solución de ensayo, en la que el procedimiento no comprende poner en contacto la muestra de estructura queratinizada con una enzima proteolítica o en la que el procedimiento no comprende escindir proteolíticamente la muestra de estructura queratinizada.

Las estructuras queratinizadas como el pelo con macroensamblajes complejos de cadenas polipeptídicas de
 35 queratina que están reticuladas con numerosos puentes disulfuro, tanto intramolecularmente como intermolecularmente, para proporcionar la rigidez y la fuerza de la estructura final. Por ejemplo, el pelo está compuesto de cadenas polipeptídicas de queratina enrolladas en superhélice que se ensamblan para formar una "protofibrilla"; después, un conjunto de protofibrillas se agrupan en un círculo alrededor de dos o más protofibrillas para formar un cable de múltiples hebras conocido como "microfibrilla"; cientos de estas microfibrillas en conjunto dan como resultado un haz fibroso que se denomina "macrofibrilla". Las microfibrillas forman las capas de la corteza
 40 (o el cuerpo principal) de la fibra de pelo.

Un analito de interés puede quedar atrapado en las estructuras queratinizadas de un sujeto a medida que estas
 45 estructuras crecen. En los procedimientos anteriores para detectar analitos incluidos en dichas estructuras se usaron procedimientos proteolíticos y reductores para digerir completamente y degradar la estructura queratinizada, escindiendo la estructura proteinácea de la queratina (p. ej., rompiendo los enlaces amida (enlace peptídico) en la queratina) y reduciendo los puentes disulfuro intra e intermoleculares a sulfhidrilos, lo que da como resultado el estiramiento, desenrollado y rotura peptídica de estas macroestructuras proteicas complejas. Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que dicha escisión proteolítica de la estructura queratinizada no es
 50 necesaria para liberar los analitos incluidos y que el tratamiento de la estructura queratinizada con un agente reductor tal como ditiotreitolo ("DTT") en ausencia de una enzima proteolítica es suficiente para liberar los analitos de un modo cuantitativo en comparación con los procedimientos anteriores. Por tanto, los inventores han descubierto que la sinergia descrita anteriormente entre un agente reductor tal como DTT y una enzima proteolítica, en el que cada agente facilitó la penetración adicional y la actividad del otro agente en la estructura del pelo, aunque útil, no es necesario para liberar los analitos de interés. El procedimiento resultante es tanto rentable como eficaz en el tiempo
 55 respecto a los procedimientos anteriores, al tiempo que proporciona una detección sensible de uno o más analitos de interés. Además, el procedimiento resultante se puede usar en ensayos tanto de detección selectiva como confirmatorios para analitos de interés y, a modo de ejemplo, también es compatible con el inmunoensayo.

De acuerdo con esto, en el presente documento se proporciona para determinar la presencia de un analito en una muestra de estructura queratinizada de un sujeto, que comprende:

- (a) proporcionar una muestra de estructura queratinizada lavada opcionalmente;

- (b) poner en contacto la muestra queratinizada con una solución acuosa de un agente reductor, en el que el contacto no escinde proteolíticamente la estructura queratinizada, para dar lugar a una solución de ensayo; y
- (c) determinar si el analito está presente en la solución de ensayo de la etapa (b).

5 El procedimiento puede comprender además determinar la cantidad del analito en la solución de ensayo, si está presente el analito. En algunas realizaciones, el procedimiento puede comprender además desactivar el agente reductor residual presente en la solución de ensayo de la etapa (b) antes de la etapa (c), en la que la desactivación no escinde proteolíticamente la estructura queratinizada, para dar como resultado una solución de ensayo desactivada, y determinar si el analito está presente en la solución de ensayo desactivada. En algunas realizaciones, el procedimiento puede comprender además purificar la solución de ensayo de la etapa (b) para separar la muestra queratinizada residual de la solución de ensayo, en el que la purificación no escinde proteolíticamente la estructura queratinizada, para dar como resultado una solución de ensayo desactivada, y determinar si el analito está presente en la solución de ensayo desactivada.

También se proporciona un procedimiento para determinar la presencia de un analito en una muestra de estructura queratinizada de un sujeto, en el que el procedimiento consiste esencialmente en:

- 15 (a) proporcionar una muestra de estructura queratinizada lavada opcionalmente;
- (b) poner en contacto la muestra queratinizada con una solución acuosa de un agente reductor en una solución de ensayo;
- (c) desactivar el agente reductor residual en la solución de ensayo de (b) para dar como resultado una solución de ensayo desactivada;
- 20 (d) purificar la solución de ensayo desactivada de la etapa (c) para eliminar la muestra queratinizada residual y para dar como resultado una solución de ensayo desactivada purificada; y
- (e) determinar si el analito está presente en la solución de ensayo desactivada purificada de la etapa (d). En algunas realizaciones, el procedimiento puede comprender además determinar la cantidad del analito en la solución de ensayo desactivada purificada, si está presente el analito.

25 También se proporciona un procedimiento para determinar la presencia de un analito en una muestra de estructura queratinizada de un sujeto, que comprende:

- (a) proporcionar una muestra de estructura queratinizada lavada opcionalmente;
- (b) poner en contacto la muestra queratinizada con una solución acuosa de un agente reductor en una solución de ensayo; y
- 30 (c) determinar si el analito está presente en la solución de ensayo,

en el que el procedimiento no comprende poner en contacto la muestra de estructura queratinizada con una enzima proteolítica. El procedimiento puede comprender, además, determinar la cantidad del analito en la muestra de ensayo, si el analito está presente, y/o desactivar el agente reductor residual en la solución de ensayo y/o purificar la solución de ensayo para eliminar la muestra queratinizada residual.

35 También se proporciona un procedimiento para determinar la presencia de un analito en una muestra de estructura queratinizada de un sujeto, que comprende:

- (a) proporcionar una muestra de estructura queratinizada lavada opcionalmente;
- (b) poner en contacto la muestra queratinizada con una solución acuosa de un agente reductor en una solución de ensayo; y
- 40 (c) determinar si el analito está presente en la solución de ensayo,

en el que el procedimiento no comprende escindir proteolíticamente la muestra de estructura queratinizada. El procedimiento puede comprender, además, determinar la cantidad del analito en la muestra de ensayo, si el analito está presente, y/o desactivar el agente reductor residual en la solución de ensayo y/o purificar la solución de ensayo para eliminar la muestra queratinizada residual.

45 También se proporciona un procedimiento para determinar la presencia de un analito en una muestra de estructura queratinizada de un sujeto, que comprende:

- (a) proporcionar una muestra de estructura queratinizada lavada opcionalmente;
- (b) tratar la muestra de estructura queratinizada de un modo tal que se reduzcan los puentes disulfuro presentes en la muestra de estructura queratinizada pero que no se escindan los enlaces peptídicos en la muestra, para dar como resultado una solución de ensayo; y
- 50 (c) determinar si el analito está presente en la solución de ensayo. El procedimiento puede incluir, además, determinar la cantidad del analito en la muestra de ensayo, si el analito está presente, y/o desactivar el agente reductor residual en la solución de ensayo y/o purificar la solución de ensayo para eliminar la muestra queratinizada residual.

55 En cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el agente reductor puede comprender DTT o DTE.

En cualquiera de los procedimientos, la etapa de desactivación puede comprender poner en contacto la solución de ensayo con una solución acuosa de una sal metálica, en la que el catión metálico de la sal se selecciona del grupo que consiste en Cu⁺⁺, Zn⁺⁺, Mn⁺⁺, Fe⁺⁺⁺, Fe⁺⁺, Pb⁺⁺, Cd⁺⁺, Hg⁺⁺, Ag⁺⁺, As⁺⁺⁺ y Co⁺⁺.

5 En cualquiera de los procedimientos, la etapa de purificación puede comprender separar, filtrar o centrifugar la solución de ensayo.

En cualquiera de los procedimientos, se puede determinar que el analito está presente o no usando un inmunoensayo específico del analito; y en cualquiera de los procedimientos, el inmunoensayo específico del analito puede incluir usar un anticuerpo específico del analito. En algunas realizaciones, el inmunoensayo es un radioinmunoensayo. En algunas realizaciones, el inmunoensayo es un inmunoensayo enzimático.

10 En algunas realizaciones del procedimiento se determina que un analito está presente o no usando una técnica de espectrometría de masas.

En algunas realizaciones se determina que un analito está presente o no usando una técnica cromatográfica.

15 En algunas realizaciones de los procedimientos, el pH al cual se realiza la etapa de contacto o la etapa de tratamiento es de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 10,5, por ejemplo el pH al cual se realiza la etapa de contacto o la etapa de tratamiento es de entre aproximadamente 5 a aproximadamente 8,8 y aproximadamente 10,5.

En algunas realizaciones del procedimiento del procedimiento, la temperatura a la cual se realiza la etapa de contacto o de tratamiento es entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 40 °C.

20 En algunas realizaciones del procedimiento, la etapa de contacto o de tratamiento se produce durante un periodo de tiempo de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 12 horas, por ejemplo durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 horas o durante un periodo de tiempo de aproximadamente 2 horas.

En algunas realizaciones, el analito es una droga o metabolito de la misma, un medicamento de prescripción o metabolito del mismo, un analgésico o metabolito del mismo, un nutriente o un analito endógeno o una sal de cualquiera de los anteriores.

25 Una droga o metabolito del mismo se puede seleccionar del grupo que consiste en: cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, norcocaína, PCP, amfetamina, metanfetamina, cannabinoide, THC, carboxi-THD, heroína, codeína, morfina, 6-monoacetilmorfina (MAM), oxycodona, 3,4-metilendioxianfetamina (MDA) y 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA).

30 Una muestra de estructura queratinizada puede comprender pelo, una uña de los dedos de las manos o una uña de los dedos de los pies.

En algunas realizaciones, la muestra de estructura queratinizada, por ejemplo, muestra de cabello, se lava.

En algunas realizaciones, la droga o metabolito de la misma, el medicamento de prescripción o metabolito del mismo, el analgésico o metabolito del mismo es un opioide, cannabinoide, AINE, esteroide, amfetamina, benzodiazepina, barbitúrico, tricíclico o efedrina, o metabolito de los mismos.

35 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que la presente divulgación pertenece entiende habitualmente. En caso de conflicto, la presente especificación, incluidas las definiciones, tendrá prioridad.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

40 **Breve descripción de las figuras**

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

Las **FIG. 1 y 2** demuestran vistas transversales de pelo para demostrar cómo resulta la macroestructura compleja a partir del ensamblaje de una serie de estructuras más pequeñas (alfa hélices de queratina; protofibrillas enrolladas en superhélice, microfibrillas y microfibrillas), todas las cuales se reticular extensamente con puentes disulfuro.

45 **Descripción detallada**

En el presente documento se proporcionan procedimientos que permiten la liberación rápida de uno o más analitos del pelo de la cabeza o del vello del cuerpo u otras estructuras queratinizadas de un individuo (que previamente ha inferido uno o más de los analitos), seguido de la identificación del uno o más analitos mediante técnicas analíticas conocidas, incluyendo, por ejemplo, ensayos de receptores altamente sensibles, inmunoensayos o técnicas instrumentales tales como espectrometría de masas o espectrometría de absorción atómica. La liberación del uno o

más analitos en una solución reductora del interior de la estructura queratinizada se produce sin dañar al analito y sin producir efectos dañinos sobre la sonda de detección del analito usada después (p. ej., un anticuerpo). Los procedimientos también permiten la detección de patrones de uso pasados en un sujeto durante periodos extendidos de tiempo sin realizar pruebas repetidas según sea necesario en procedimientos de ensayo convencionales que miden el contenido del analito en muestras de sangre, orina o fluidos orales. Como se ha sabido previamente, la cantidad de analito atrapado en el pelo del mismo individuo es directamente proporcional a la cantidad de analito ingerido y un análisis transversal de una muestra de pelo puede proporcionar información sobre el uso histórico.

En los procedimientos, primero se recoge una muestra de estructura queratinizada, por ejemplo pelo, del sujeto, por ejemplo un sujeto que puede haber ingerido un analito concreto o se sospecha que lo ha hecho. Como se usa en el presente documento, el término "analito" hace referencia a cualquier compuesto, producido de forma endógena o introducido de forma exógena en un sujeto.

Por tanto, en algunas realizaciones se puede introducir un analito en el sujeto de forma exógena, es decir que normalmente no está presente en el sujeto sino que se introduce mediante un procedimiento exógeno, tal como mediante inhalación, administración parenteral (p. ej., vías i.v., transdérmica, subcutánea o i.m.) o ingestión (p. ej., vías oral, bucal o transmucosa). Como se usa en el presente documento, un metabolito o producto de degradación de un analito introducido de forma exógena es un analito exógeno de interés, a pesar del hecho de que se fabrique de forma endógena *in vivo* en un sujeto, porque derivó de un analito introducido de forma exógena.

En algunas realizaciones, un analito de interés puede ser una droga, un medicamento de prescripción, un analgésico, un compuesto orgánico, un nutriente, un metal, una sustancia química tóxica, un pesticida o un metabolito o producto de degradación de los mismos introducidos de forma exógena. Ejemplos de drogas, analgésicos o medicamentos de prescripción o metabolitos de los mismos incluyen un opiode, cannabinoide, AINE, esteroide, anfetamina, benzodiacepina, barbitúrico, tricíclico o efedrina, o metabolito de los mismos.

Ejemplos específicos incluyen: cocaína, (y los metabolitos benzoilecgonina, cocaetileno y norcocaína), opioides y metabolitos de los mismos (morfina, heroína, 6-monoacetilmorfina, diacetilmorfina, codeína, oxicodona, hidrocodona, hidromorfona, oximorfona y metadona), cannabinoides, fenciclidina (PCP), anfetaminas, metanfetaminas, MDMA (éxtasis, metilendioximetanfetamina), MDA (metilendioxfanfetamina), marihuana (y THC y metabolitos carboxi-THC), propoxifeno, meperidina, benzodiazepinas, carisoprodol, tramadol, fentanilo, buprenorfina, naltrexona, tricíclicos, nicotina (y su metabolito cotinina), eve (metilendioxi-etilafentamina), flunitrazepam, ácido lisérgico (LSD), digoxina, metilfenidato, acetaminofen, salicilatos, fluoxetina, sertralina, dextrometorfano, efedrina, fenetilaminas, pseudoefedrina y sinefrina. Los pesticidas incluyen, entre otros, paration, malation, clorpirifos, diazinon, diclorvos y tetraclorvinfos.

En otras realizaciones se produce de forma endógena un analito de interés, por ejemplo en una cantidad que se correlaciona con la presencia o ausencia de un estado de enfermedad o un estado metabólico de un sujeto. Ejemplos de analitos endógenos incluyen ésteres de ácido graso (p. ej., como marcadores de consumo de alcohol); cromo (p. ej., como medida de la tolerancia a la glucosa y la diabetes de tipo 2); glucosa (p. ej., como medida de la tolerancia a la glucosa y la diabetes de tipo 2); y grupos glicosilo (p. ej., como medida de la hiperglucemia crónica).

La muestra queratinizada puede tener un tamaño variable desde aproximadamente 4 a aproximadamente 16 mg por ml de solución de agente reductor, por ejemplo de aproximadamente 5 a aproximadamente 12 mg, de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 7 a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg o de aproximadamente 8 a aproximadamente 14 mg por ml de solución de agente reductor. La muestra se puede lavar primero mediante procedimientos conocidos para eliminar analitos o contaminantes que se pueden haber depositado sobre la superficie mediante contacto externo más que mediante consumo real.

La muestra de estructura queratinizado se trata después para liberar analitos atrapados. Es importante el hecho de que el procedimiento de tratamiento de la estructura queratinizada no incluye poner en contacto la estructura queratinizada con una o más enzimas proteolíticas, tal como papaína, quemopapaína y proteinasa K. Por tanto, el procedimiento de tratamiento no escinde proteolíticamente los enlaces peptídicos (amida) en la estructura, por ejemplo no los escinde sustancialmente. En algunas realizaciones, el procedimiento reduce, por ejemplo reduce sustancialmente los enlaces disulfuro presentes en la muestra de estructura queratinizada pero no escinde los enlaces peptídicos (p. ej., no los escinde sustancialmente) en la muestra. Normalmente, el procedimiento de tratamiento comprende una etapa de reducción, una etapa de desactivación opcional y una etapa de purificación opcional (p. ej., separación, filtración o centrifugación).

En la etapa de reducción, la muestra se pone en contacto con una solución de un agente reductor (solución reductora), tal como ditiotreitól ("DTT"), para reducir los puentes disulfuro inter e intramoleculares en la macroestructura de queratina, de modo que se libere el analito atrapado. En algunas realizaciones, la muestra de estructura queratinizada se puede poner en contacto con una solución de reducción que consiste en, esencialmente, el agente reductor, o se puede poner en contacto con una solución de reducción que no comprende una enzima proteolítica. En algunas realizaciones, la etapa de contacto no tiene como resultado la rotura sustancial de los enlaces de estructura peptídica (es decir, enlaces amida) en las cadenas polipeptídicas de queratina.

Después de la puesta en contacto con la solución de reducción, la muestra de estructura queratinizada reducida se puede tratar opcionalmente para desactivar el agente reductor residual. Como con la etapa de contacto, la etapa de desactivación se realiza en ausencia de una enzima proteolítica (p. ej., en una solución que consiste esencialmente en el agente de desactivación o en una solución que no comprende una enzima proteolítica).

- 5 Con el fin de determinar la presencia y, opcionalmente, la concentración de uno o más analitos, se puede obtener una muestra de ensayo de la muestra de estructura queratinizada, bien después de la etapa de contacto con la solución de reducción o bien después de la etapa de desactivación opcional. La muestra se puede obtener directamente, después de la etapa de desactivación opcional o después de una etapa de purificación opcional (p. ej., separación, centrifugación o filtración).
- 10 El agente reductor para la inclusión en la solución de reducción puede ser cualquier agente reductor capaz de reducir los enlaces disulfuro en las estructuras queratinizadas. Ejemplos típicos incluyen DTT (2,3-dihidroxitbutano-1,4-ditiol) o su isómero DTE (2,3-dihidroxitbutano-1,4-ditiol), tioglicolato, cisteína, sulfitos, bisulfitos, sulfuros, bisulfuros o TCEP (*tris*(2-carboxietil)fosfina), o formas salinas de cualquiera de los anteriores. TCPE puede ser particularmente útil en los ensayos realizados a intervalos de pH menores, por ejemplo de 5,5 a aproximadamente 8.
- 15 Normalmente, la concentración del agente reductor en solución acuosa durante la etapa de contacto es de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 g/l, por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, de aproximadamente 2 a aproximadamente 14, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15, de aproximadamente 10 a aproximadamente 18, de aproximadamente 3 a aproximadamente 12, de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 g/l. Como reconocería el experto en la técnica, la cantidad de agente reductor puede variar según la duración del tiempo de reacción y la metodología de detección que se va a usar.

En algunas realizaciones, los procedimientos se pueden realizar a la temperatura ambiente o cercana a ella o a un pH casi neutro. Por ejemplo, el procedimiento se puede realizar a una temperatura de entre aproximadamente 20 °C y 60 °C (p. ej., aproximadamente 20, 25, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, o 60 °C) y a un pH de entre aproximadamente pH 5 y aproximadamente 10,5. En algunas realizaciones, el pH del procedimiento está entre aproximadamente 8,8 y 9,7 (p. ej., 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,45, 9,5, 9,55, 9,6, 9,65) y el procedimiento se produce a una temperatura de aproximadamente 37 °C. En otras realizaciones, por ejemplo cuando un analito de interés o un metabolito o producto de degradación del mismo es sensible a pH básicos, se puede usar un pH menor, por ejemplo entre aproximadamente 5 a aproximadamente 8,7 (p. ej., aproximadamente 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 7,0, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8, 8,0, 8,2, 8,4, 8,6, o 8,7). Un experto en la técnica puede determinar fácilmente las condiciones de reacción adecuadas, incluyendo la temperatura de reacción, el tiempo y el pH. Para información adicional, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.466.579; 5.324.642; 6.022.693; 6.582.924; y 6.949.344, que trata los procedimientos para conservar la estructura química de un analito de interés (p. ej., metabolitos de la heroína, cocaína) realizando los ensayos a pH menores.

El DTT y el DTE son particularmente útiles como agentes reductores. Se ha descubierto que el uso de DTT o DTE en los procedimientos descritos tiene como resultado la liberación de los analitos atrapados dentro de un periodo de tiempo relativamente corto (dependiendo de la cantidad y el tipo de la muestra queratinizada) por ejemplo en de aproximadamente 0,5 a aproximadamente cuatro horas o de aproximadamente 1 hora a aproximadamente cuatro horas o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 horas o de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5 horas. En ciertas realizaciones, el tratamiento durante aproximadamente 2 horas es suficiente, por ejemplo para aproximadamente 5 – 15 mg de muestra queratinizada tal como pelo.

Una vez que se han liberado el uno o más analitos en la mezcla de solución, el agente reductor activo residual se puede desactivar opcionalmente mediante procedimientos conocidos para los expertos en la técnica, incluyendo simplemente esperar un periodo de tiempo suficiente para que se produzca de forma natural la desactivación. Normalmente, este periodo de tiempo es de aproximadamente 1 a aproximadamente 14 horas después del contacto inicial del agente reductor con la muestra queratinizada, dependiendo de la concentración y la cantidad de agente reductor usado, el pH, la temperatura, el tamaño de la muestra etc.

Como alternativa, como saben los expertos en la técnica, el agente reductor residual se puede desactivar con la adición de ciertos iones metálicos, normalmente en forma de sales metálicas, a la solución de reducción. La adición de cantidades bajas, por ejemplo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 g/l en la solución de muestra final de dichas sales metálicas, a la solución de reducción después de ponerlas en contacto con la muestra puede acelerar significativamente el tiempo en el que la muestra reducida se puede someter al procedimiento de detección del analito, ya que no es necesario esperar que el agente reductor se desactive por sí mismo. Los más eficaces son ciertas sales metálicas que no precipitan en la solución después de unirse químicamente al agente reductor y desactivarlo, tal como DTT o DTE. Puede ser útil evitar la precipitación en la solución de reducción porque dicha precipitación podría dar lugar a una pérdida de analito mediante adsorción en el precipitado o atrapamiento en el mismo o podría producir interferencias mediante obstrucción con partículas de procedimientos de lectura óptica.

En ciertas realizaciones, la precipitación también se evita manteniendo el pH de la solución de reducción de aproximadamente 6 a aproximadamente 8 y lo más preferentemente a aproximadamente 7. Un modo mediante el cual se puede realizar es mediante la adición de BIS-TRIS uno molar para mantener el pH en aproximadamente 7.

Un pH de aproximadamente 7 también es un pH útil para la realización de ciertos procedimientos de detección de analitos, tales como radioinmunoensayo (RIA) o inmunoensayo enzimático.

Además de las sales de Cu^{++} (p. ej., sulfato de cobre) como se describe en las patentes de EE.UU. N° 5.466.579 y 5.324.642, las sales de Zn^{++} (p. ej., sulfato de cinc y nitrato de cinc); Mn^{++} (p. ej., sulfato de manganeso); Fe^{+++} (p. ej., sulfato férrico y cloruro férrico); y Fe^{++} (p. ej., sulfato ferroso) son eficaces. También son sales de Pb^{++} (p. ej., acetato de plomo y nitrato de plomo); Cd^{++} (p. ej., cloruro de calcio); Hg^{++} (p. ej., cloruro mercuríco); Ag^{++} (p. ej., nitrato de plata); y Co^{++} (p. ej., cloruro de cobalto). Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6.022.693 y 6.350.582.

En ciertas realizaciones se puede usar una sal de arsenito, tal como arsenito sódico (NaAsO_2), para eliminar el agente reductor residual (p. ej., DTT o DTE) mediante la formación de un compuesto precipitable. Normalmente, a 1 ml de solución con pelo digerido se añaden 100 microlitros de una solución de 10 mg/ml de arsenito sódico (concentración final de aproximadamente 10 g/l) para efectuar la desactivación del agente reductor. No obstante, no se prefiere el arsenito porque se puede desarrollar un precipitado, de modo que potencialmente se adsorbe o atrapa el analito. Normalmente, se pueden añadir de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 mg (p. ej., aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, o 1 mg) de una sal metálica en solución a aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,6 ml (p. ej., aproximadamente 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5 o 1,6 ml) de la solución de reducción en un periodo de tiempo desde aproximadamente 1 a aproximadamente 5 (p. ej., aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 o 5) horas después de poner en contacto la muestra con la solución de reducción. Normalmente, la desactivación se completa rápidamente, por ejemplo en menos de aproximadamente 30 minutos, tal como en menos de aproximadamente 20 minutos, menos de aproximadamente 10 minutos, menos de aproximadamente 5 minutos o menos de aproximadamente 2 minutos.

Una vez que el tratamiento de la muestra se ha completado, la solución con la muestra queratinizada reducida se puede someter a análisis directo mediante procedimientos de detección de analitos reconocidos, incluidos ensayos de receptores, procedimientos analíticos basados en proteínas, tales como inmunoensayos incluidos radioinmunoensayos (RIA) o inmunoensayo enzimático (EIA) y/o procedimientos instrumentales tales como técnicas cromatográficas de espectroscopia de masas o absorción atómica. Por tanto, sorprendentemente se ha descubierto que el agente reductor puede destruir los puentes disulfuro de la queratina pero no destruye las proteínas IgG (anticuerpos) usadas en un inmunoensayo.

En determinadas realizaciones se pueden usar procedimientos para confirmar los resultados positivos obtenidos en los procedimientos de inmunoensayo. Dado que estos procedimientos no se basan en proteínas, la etapa de desactivación del agente de reducción no es necesaria. La velocidad y la suavidad del procedimiento de tratamiento y la capacidad para cuantificar la eficiencia mediante la inclusión de un "contaminante", es decir la inclusión de una cantidad conocida del analito deuterado, hace del procedimiento de tratamiento divulgado en el presente documento también el procedimiento de elección para procedimientos de análisis instrumental, tales como cromatografía de gases, cromatografía de líquidos y espectrometría de masas.

El procedimiento se puede usar para detectar el uso y el uso previo de cualquier analito de interés descrito previamente, incluyendo drogas tales como cocaína, morfina/heroína y otros opioides, cannabinoides, marihuana, fenciclidina o "PCP", metacualona y anfetaminas. Además, el procedimiento puede ser eficaz para determinar antes del uso de fármacos tales como digoxina, metadona y benzodiazepinas. Se contempla que cualquier analito, en particular cualquier analito orgánico, presente en la circulación sanguínea de un individuo que se transfiere al pelo durante su síntesis se puede extraer y analizar de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento.

En ciertas realizaciones se puede usar un detergente para ayudar a la liberación de uno o más analitos de interés. Ciertos compuestos detergentes biológicos útiles para solubilizar los componentes de la membrana biológica ayudan a la liberación de los analitos a un pH relativamente bajo sin interferir en la reducción o posterior detección de analitos. Estos detergentes biológicos pueden ayudar al tratamiento de una muestra queratinizada a un pH en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10,5. Detergentes adecuados incluyen detergentes de ácidos biliares, tales como ácido glicocólico, ácido cólico, ácido taurocólico, ácido desoxicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurodesoxicólico y sales de los mismos, incluidas las sales de sodio. Otros detergentes para usar en los procedimientos son sulfobetainas, tales como los Zwittergents® y betainas, tales como Empigen BB (N-dodecil-N,N-dimetilglicina) (todos disponibles en Calbiochem Corp., La Jolla, CA). Otros detergentes incluyen alquilglucósidos, incluidos hexil-beta-D-glucopiranosido, heptil-beta-D-glucopiranosido, octil-beta-D-glucopiranosido, nonil-beta-D-glucopiranosido, decil-beta-D-glucopiranosido, dodecil-beta-D-glucopiranosido y octil-beta-D-tioglucopiranosido (OSGP). Las mezclas de alquilglucósidos, tales como el producto ELUGENT® (Calbiochem), también son eficaces.

Particularmente preferidos son los ácidos biliares ácido cólico y ácido glicocólico, que ayudan en la digestión del pelo a un pH en el intervalo de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 8. Los desoxicolatos tales como el ácido desoxicólico y ácido glicodesoxicólico son eficaces en la adición en la digestión del pelo a un pH superior a aproximadamente 7.

Los detergentes se pueden usar en el panel estándar de la industria de cinco drogas para las drogas más frecuentes en Estados Unidos, es decir marihuana, cocaína, fenciclidina, metanfetamina y opioides, se pueden medir usando los procedimientos descritos en el presente documento. Por tanto, no afectan a ninguno de los analitos o anticuerpos implicados en el panel de cinco drogas y no tienen como resultado falsos negativos o positivos. Los detergentes concretos más eficaces para usar en el panel de cinco drogas son colato, desoxicolato, ácido cólico, ácido desoxicólico, octil-beta-D-glucopiranosido y octil-beta-D-tioglucopiranosido. Los detergentes de ácidos biliares, alquilglucósidos, sulfobetainas y betainas se prefieren cuando se realizan un panel que incluye cocaína, opioides, fenciclidina, anfetaminas y aminas simpaticomiméticas. En un panel únicamente para cocaína, los detergentes preferidos son ácido cólico, Zwittergents®, alquilglucoides y N-dodecil-N,N-dimetilglicina.

- 5
- 10 En la práctica, el detergente biológico se mezcla con la solución reductora acuosa antes del contacto de la solución con la muestra queratinizada a un intervalo de temperaturas de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 °C. Normalmente se añaden 1-2 mg de detergente biológico a aproximadamente 1 ml de la solución de reducción.

15 Información adicional sobre los procedimientos descritos en el presente documento, incluido el uso de detergentes biológicos, resinas de intercambio iónico (p. ej., para eliminar sustancias de interferencia) y variación de los intervalos de pH para la digestión, se puede encontrar en las patentes de EE.UU. N° 6.022.693 y 6.350.582.

20 Los beneficios a obtener de los procedimientos divulgados en el presente documento son muchos, incluidos una determinación rápida, precisa y barata de la exposición anterior a un analito concreto. El procedimiento puede proporcionar un registro del consumo, o falta de consumo, durante periodos de tiempo muy largos. Mediante la eliminación de todas las etapas de tratamiento proteolítico se reducen los gastos de un procedimiento proteolítico y ciertas interferencias con agentes de detección de analitos biológicos. Sorprendentemente, no se requiere una interacción sinérgica entre una enzima proteolítica y un agente reductor para la difusión de cada agente en la estructura del pelo para una liberación eficiente de los analitos de interés. Además, la recogida de pelo es menos intrusiva y menos físicamente repulsiva que la recolección de sangre o de orina y las muestras no se pueden alterar ni sustituir, ni tampoco la detección se puede evadir mediante abstención a corto plazo o "lavado" (ingesta excesiva de fluidos) antes de unas pruebas programadas, por ejemplo pruebas previas a un empleo o exploración física anual. Las muestras se pueden almacenar indefinidamente sin refrigeración. Por último, los procedimientos facilitan la detección selectiva y los ensayos confirmatorios para detectar un analito de interés.

25

Los ejemplos, que no pertenecen a la invención, son únicamente para fines ilustrativos.

Ejemplos

30 Ejemplo I: Radioinmunoensayos de digestos no proteolíticos de muestras de pelo

A 8 mg de muestras de pelo en tubos de ensayo se añadieron 1,6 ml de ditiotreitol al 6 % (pH 9,5) y las muestras se incubaron a 37°C durante 2 horas. Las muestras se neutralizaron después con 140 ul de Bis Tris 1,0 M (pH 7) que contienen sulfato de cobre pentahidrato al 6 %, se mezclaron y se centrifugaron. Se obtuvieron muestras de sobrenadantes para detectar cocaína, opioides, PCP, anfetaminas y cannabinoides.

35 Los radioinmunoensayos se realizaron combinando alícuotas de las muestras con drogas marcadas con I¹²⁵ y un anticuerpo primario dirigido contra la droga. La droga marcada y no marcada en la muestra compiten por los sitios de unión sobre el anticuerpo primario. Después de la incubación se añadió un segundo anticuerpo dirigido contra el anticuerpo primario para precipitar la droga unida al anticuerpo. Después de centrifugar y decantar los sobrenadantes líquidos, con un contador gamma se contaron las fracciones unidas precipitadas.

40 Ejemplo de resultados de cocaína

	Porcentaje	Resultado de RIA comparativo*	Resultados de EM con muestras lavadas; ng/10 mg de pelo**			
			COC	BE	CE	NOR
NEGATIVO (Bo)	100					
Valor de corte (5 ng/10 mg de pelo)	53,9					
Muestra pos. 59498	12,5	12	31,6	13	6,3	1,1
Muestra pos. 59501	22,3	23	12,7	0,7	0	0

(continuación)

	Porcentaje	Resultado de RIA comparativo*	Resultados de EM con muestras lavadas; ng/10 mg de pelo**			
			COC	BE	CE	NOR
Muestra pos. 59571	27,8	29	9,4	1,3	0	0,3
Muestra neg. 59718	97,5	97,4				
Muestra neg. 59708	91,3	94,9				
Muestra neg. 58714	94,6	94,5				
menos 50 % control (2,5 ng/10 mg de pelo)	61,5					
más 50 % control (7,5 ng/10 mg de pelo)	44					
*Resultado de RIA comparativo usando procedimientos descritos en las patentes de EE.UU. 5.324.642 y 6.350.582.						
**EM = cuantificación por espectroscopia de masas de la droga presente en la muestra. COC = cocaína; BE=benzoilecgonina; CE=cocaetileno; NOR=norcocaína						

5

Nota: Explicación del porcentaje de B/Bo para los ensayos RIA – El valor negativo (Bo) de 100 % es el valor para el tubo de referencia que no contiene analito en la muestra y exhibe la unión máxima del anticuerpo al marcador radiactivo. Las muestras desconocidas se expresan como porcentaje de Bo negativo, denominado "porcentaje B/Bo." Las concentraciones de analito en las muestras varían inversamente con los valores del porcentaje de B/Bo. Una muestra positiva es una que contiene droga igual o mayor al calibrador de corte y, por tanto, un porcentaje de B/Bo igual o inferior al calibrador de corte.

Ejemplo de resultados de opioides

	Porcentaje	Resultado de RIA comparativo*	Resultados de EM con muestras lavadas; ng/10 mg de pelo**			
			Codeína	Morfina	MAM	Oxicodona
NEGATIVO (Bo)	100					
Valor de corte (2 ng/10 mg de pelo)	65					
Muestra pos. 59028	30,1	32,8	0,8	7,9	7,8	0,3
Muestra pos. 58641	15,7	9,6	3,6	48,8	85,4	0,8
Muestra pos. 58714	24,3	23,6	4,3	21,3	5,4	0
Muestra neg. 59051	92,8	96				
Muestra neg. 59498	98,2	98,2				

10

(continuación)

	Porcentaje	Resultado de RIA comparativo*	Resultados de EM con muestras lavadas; ng/10 mg de pelo**			
			Codeína	Morfina	MAM	Oxicodona
Muestra neg. 53429	93,6	92,5				
menos 50 % control (1 ng/10mg de pelo)	72,9					
más 50 % control (3 ng/10mg de pelo)	53,8					

*Resultado de RIA comparativo usando procedimientos descritos en las patentes de EE.UU. 5.324.642 y 6.350.582.

**EM = cuantificación por espectroscopia de masas de la droga presente en la muestra. MAM= 6-monoacetilmorfina

Ejemplo de resultados para pcp

	Porcentaje	Resultado de RIA comparativo*	Resultados de EM con muestras lavadas**
			PCP
NEGATIVO (Bo)	100		ng/10 mg de pelo
Valor de corte (3 ng/10 mg de pelo)	59		
Muestra pos. 53155	20,2	21,6	22,4
Muestra pos. 53429	17,5	20,1	22,6
Muestra pos. 53151	28,9	25,8	7,6
Muestra neg. 59718	97,3		
Muestra neg. 59740	95,7		
Muestra neg. 59666	95,5		
menos 50 % control (1,5 ng/10mg de pelo)	72,9		
más 50 % control (4,5 ng/10mg de pelo)	49,4		

*Resultado de RIA comparativo usando procedimientos descritos en las patentes de EE.UU. 5.324.642 y 6.350.582.

**EM = cuantificación por espectroscopia de masas de la droga presente en la muestra. PCP = fenciclidina

Ejemplo de resultados para anfetaminas

	Porcentaje	Resultado de RIA comparativo	Resultados de EM con muestras lavadas; ng/10 mg de pelo**				MDEA
			MET	AMP	MDMA	MDA	
NEGATIVO (Bo)	100						
Valor de corte (5 ng/10 mg de pelo)	56,4						
Muestra pos. 59708	8,1	8,9	2,6	0	214	6,7	0
Muestra pos. 59714	16,5	15,4	26,9	3,8	0	0	0
Muestra pos. 59718	36,6	55,5	6,7	0,7	0	0	0
Muestra neg. 59501	93,1	96,8					
Muestra neg. 59571	90,8	90					
Muestra neg. 59028	95,8	94,9					
menos 50 % control (2,5 ng/10mg de pelo)	60,3						
más 50 % control (7,5 ng/10mg de pelo)	47,4						
*Resultado de RIA comparativo usando procedimientos descritos en las patentes de EE.UU. 5.324.642 y 6.350.582.							
**EM = cuantificación por espectroscopia de masas de la droga presente en la muestra.							
MET= metanfetamina; AMP= anfetamina; MDA=3,4-metilendioxianfetamina; MDMA=3,4-metilendioximetanfetamina							

Ejemplo II: Inmunoensayo enzimáticos de digestos no proteolíticos de muestras de pelo usando microplacas revestidas con anticuerpo disponibles comercialmente

- 5 A 8 mg de muestras de pelo en tubos de ensayo se añadieron 0,8 ml de ditioneitol al 1,5 % (pH 9,5) y las muestras se incubaron a 37°C durante 2 horas. Las muestras se neutralizaron después con 70 ul de Bis Tris 1,0 M (pH 7) que contienen 1,25 % de cinc, se mezclaron y se centrifugaron. Se obtuvieron muestras de sobrenadantes para detectar PCP (fenciclidina) en una microplaca revestida co anticuerpos. Después de 1 hora de incubación de la muestra en los pocillos, los pocillos se variaron y se lavaron una vez antes de la adición de HRP-antígeno y continuaron el procedimiento descrito por el proveedor (Cozart Industries).
- 10

Ejemplo de resultados para pcp

		Resultados de EM**
	Porcentaje	PCP
		ng/10 mg de pelo
NEGATIVO (Bo)	100	
Valor de corte (3 ng/10 mg de pelo)	63,0	
Muestra pos. 53155	51,1	22,4
Muestra pos. 53429	53,6	22,6
Muestra pos. 53151	55,2	7,6
Muestra neg. 42647	101,1	
Muestra neg. 42650	99,4	
Muestra neg. 42665	99,8	
Muestra neg. 42677	101,6	
menos 50 % control (1,5 ng/10mg de pelo)	78,6	
más 100 % control (6 ng/10 mg de pelo)	53,2	
**EM = cuantificación por espectroscopia de masas de la droga presente en la muestra, PCP= fenciclidina		

Ejemplo III: Análisis instrumental de la digestión no proteolítica de pH bajo de muestras de pelo

- 5 A 12 mg de pelo en los tubos de ensayo se añadieron 1,2 ml de una solución Bis-Tris 1,0 M (pH 5,5) que contiene 12 % de ditiotretol y 0,2 % de ácido cólico. Las muestras se incuban durante la noche (8 - 12 horas) a 37°C con agitación a 120 oscilaciones/minuto. Los sobrenadantes de estas muestras digeridas se analizan después de la limpieza/extracción para los posteriores procedimientos analíticos (p. ej., EM).

Ejemplo IV: Demostración de que el agente reductor (p. ej., DTT) es el ingrediente activo en los digestos

- 10 Para demostrar que el DTT es el ingrediente activo en los procedimientos de digestión no proteolítica descritos en el presente documento se puso en contacto un alícuota de una muestra de pelo positiva para codeína con una solución tamponada con Tris a un pH de 9,5 (sin DTT) y otro alícuota de la muestra se puso en contacto con la solución a un pH de 9,5 que contiene 6 gramos de DTT/l. La solución a pH de 9,5 sin DTT recuperó 2,36 ng de codeína por 10 mg de pelo, mientras que la solución a pH de 9,5 que contiene DTT recuperó 19,34 ng de codeína por 10 mg de pelo.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación de la presencia de un analito en una muestra de estructura queratinizada de un sujeto, que comprende:
 - 5 (a) proporcionar una muestra de estructura queratinizada lavada opcionalmente;
 - (b) poner en contacto la muestra queratinizada con una solución acuosa de un agente reductor que comprende ditiotreitól (DTT) o ditioeritritól (DTE) para dar como resultado una solución de ensayo, en la que la etapa de contacto se realiza a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 10,5, y
 - 10 (c) determinar si el analito está presente en la solución de ensayo, en el que el procedimiento no comprende poner en contacto la muestra de estructura queratinizada con una enzima proteolítica o en la que el procedimiento no comprende escindir proteolíticamente la muestra de estructura queratinizada.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 que además comprende determinar la cantidad del analito en la muestra de ensayo, si está presente el analito.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que además comprende desactivar el agente reductor residual en la solución de ensayo.
 - 15 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende purificar la solución de ensayo eliminar la muestra queratinizada residual.
 5. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la etapa de desactivación comprende poner en contacto la solución de ensayo con una solución acuosa de una sal metálica, en el que el catión metálico de la sal está seleccionado del grupo que consiste en Cu^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Fe^{+++} , Fe^{++} , Pb^{++} , Cd^{++} , Hg^{++} , Ag^{++} , As^{+++} y Co^{++} .
 - 20 6. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la etapa de purificación comprende separar, filtrar o centrifugar la solución de ensayo.
 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se determina que el analito está presente o no usando un inmunoensayo específico del analito, una técnica de espectrometría de masas o una técnica cromatográfica.
 - 25 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el inmunoensayo específico del analito comprende usar un anticuerpo específico del analito.
 9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el inmunoensayo es un radioinmunoensayo o un inmunoensayo enzimático.
 - 30 10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el pH al cual se realiza la etapa de contacto o la etapa de tratamiento está entre aproximadamente 8,8 y aproximadamente 10,5.
 11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la temperatura a la cual se realiza la etapa de contacto o la etapa de tratamiento está entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 40 °C.
 - 35 12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de contacto o de tratamiento se produce durante un periodo de tiempo de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 12 horas, durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 horas o durante un periodo de tiempo de aproximadamente 2 horas.
 - 40 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el analito es una droga o metabolito de la misma, un medicamento de prescripción o metabolito del mismo, un analgésico o metabolito del mismo, un nutriente o un analito endógeno, o una forma de sal de cualquiera de los anteriores.
 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la droga o metabolito de la misma está seleccionada del grupo que consiste en: cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, norcocaína, PCP, anfetamina, metanfetamina, cannabinoide, THC, carboxi-THD, heroína, codeína, morfina, 6-monoacetilmorfina (MAM), oxicodona, 3,4-metilendioxfanfetamina (MDA) y 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA), o
 - 45 en el que la droga o metabolito de la misma, el medicamento de prescripción o metabolito del mismo, o el analgésico o metabolito del mismo es un opioide, cannabinoide, AINE, esteroide, anfetamina, benzodiacepina, barbitúrico, tricíclico o efedrina, o metabolito de los mismos.
 - 50 15. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra de estructura queratinizada comprende cabello, una uña de los dedos de la mano o una uña de los dedos del pie, opcionalmente en el que la estructura queratinizada comprende cabello y la muestra de cabello es lavada.

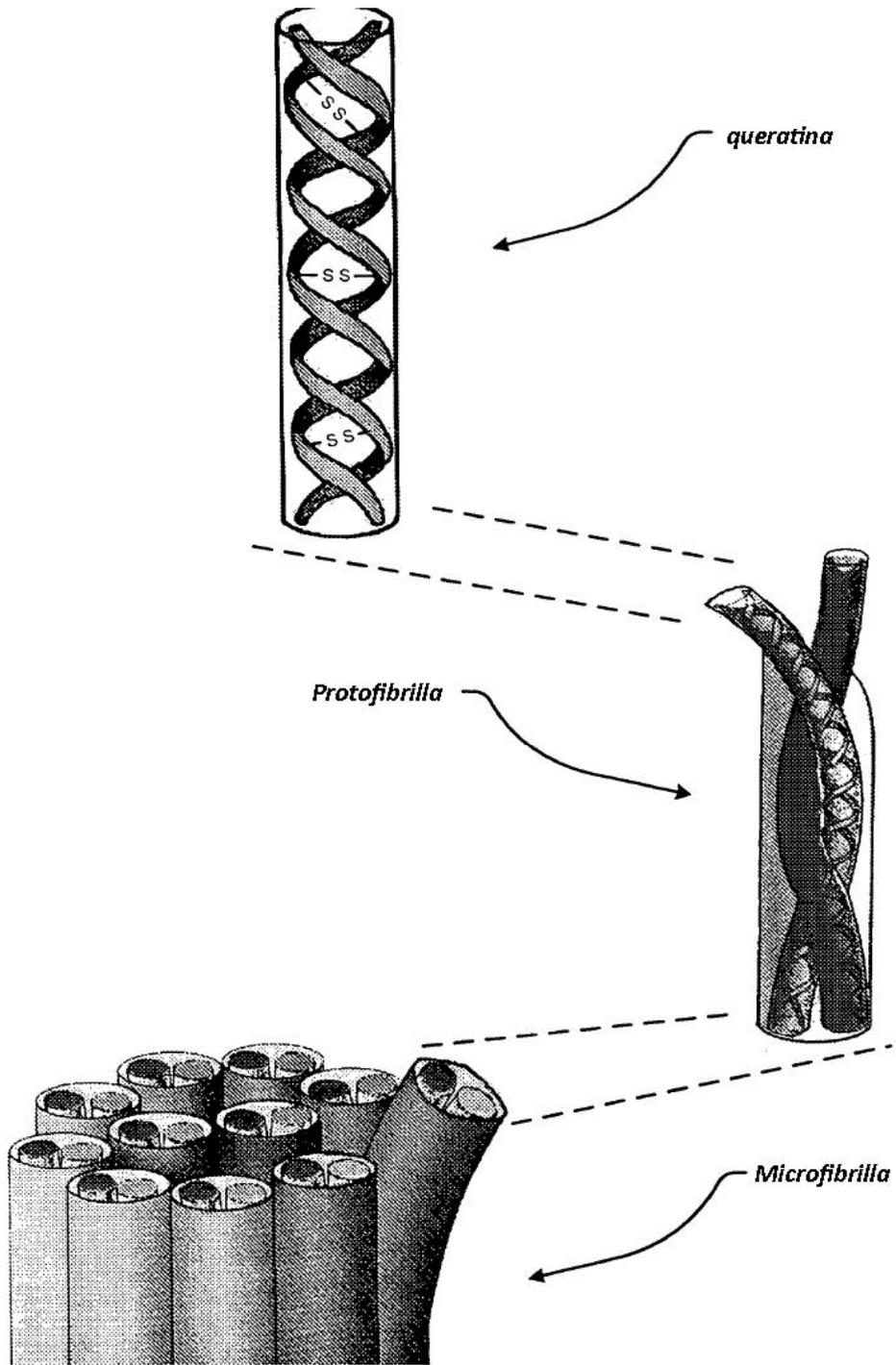


FIG. 1

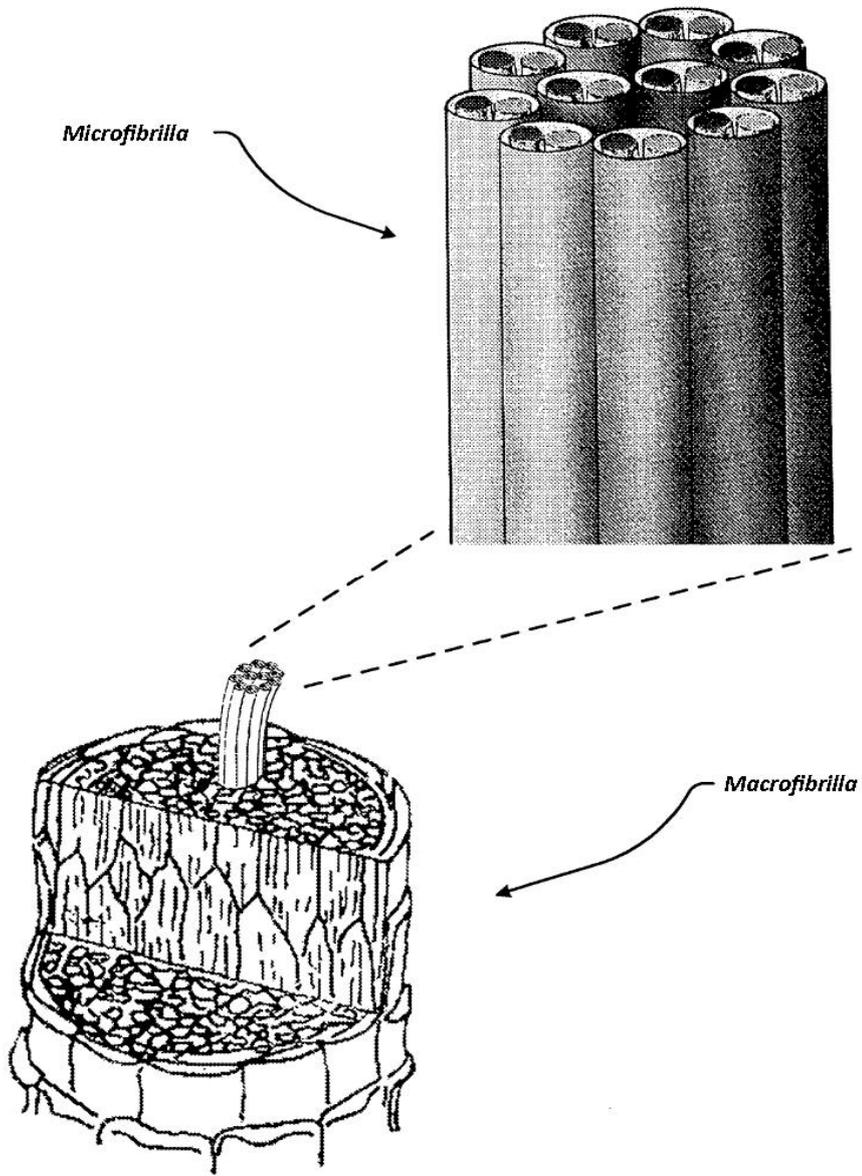


FIG. 2