

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 579**

51 Int. Cl.:
G01N 24/08 (2006.01)
G01R 33/46 (2006.01)
G01R 33/465 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08784763 .8**
96 Fecha de presentación: **15.07.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2171436**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2010**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA DETECTAR UNA SUBSTANCIA DIANA MEDIANTE RESONANCIA
MAGNETICA NUCLEAR.**

30 Prioridad:
23.07.2007 EP 07014383

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.11.2011

73 Titular/es:
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
GRENZACHERSTRASSE, 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**SCHLOTTERBECK, Götz;
ROSS, Alfred y
SENN, Hans**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 368 579 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 para detectar una sustancia diana mediante resonancia magnética nuclear.

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar una sustancia diana en una muestra mediante resonancia magnética nuclear.

Antecedentes de la invención

10 La espectroscopia por resonancia magnética nuclear es una técnica bien conocida que se aplica de forma extensible para análisis cuantitativos y cualitativos de una gran variedad de muestras. La técnica generalmente comprende la grabación de un espectro de resonancia magnética nuclear, de ahora en adelante denominado espectro RMN, bajo condiciones que sean selectivas para un isótopo nuclear preseleccionado con un momento angular de giro diferente a 0, tal como ^1H , ^{13}C o muchos otros. En general, un espectro RMN obtenido a partir de una muestra que contiene una especie molecular comprende una pluralidad de picos de señales que resultan de los núcleos del isótopo preseleccionado. Cada pico de señal se corresponde con una frecuencia de resonancia particular que es atribuible a uno o varios núcleos que experimentan un campo magnético local particular como consecuencia del entorno molecular particular. Consecuentemente, la frecuencia de resonancia a la cual se observa un pico de señal RMN, habitualmente expresada en téRMnos del denominado desplazamiento químico dado en partes por millón (ppm) con respecto a una señal de referencia, es inicialmente una indicación de la ubicación molecular del núcleo o de los núcleos que producen la señal pico, pero también depende de condiciones de la muestra tales como el valor del pH, el contenido de sal, etc.

20 Una ventaja importante de la espectroscopia por RMN en comparación con muchas otras técnicas analíticas descansa en el hecho de que bajo ciertas condiciones bien conocidas la integral de un pico de señal es directamente proporcional al el número de núcleos resonantes (consulte, por ejemplo R. R. Ernst, G. Bodenhausen y A. Wokaun, Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions, Oxford Science Publication, 1988, 91 - 157). Por lo tanto las integrales de los diferentes picos de señal en un espectro RMN reflejan el número de núcleos que contribuyen a cada pico de señal.

25 A causa de lo anteriormente mencionado, la proporcionalidad entre las integrales de los picos de señal y el número de núcleos resonantes, la integral absoluta de un pico de señal RMN está directamente relacionada con el número de moléculas que contienen los núcleos resonantes que están presentes en el volumen de detección del espectrómetro RMN. Sin embargo, la integral absoluta de todos los picos de señal RMN en una muestra dada generalmente reaccionará de la misma forma en un anfitrión en condiciones experimentales. Sin embargo, el análisis cuantitativo por medio de espectroscopia RMN puede realizarse de una manera bastante sencilla si las señales integradas de una sustancia de interés pueden compararse con las señales integradas de una sustancia de referencia presente en una concentración conocida.

30 Un problema en muchas aplicaciones analíticas de espectroscopia RMN viene provocado por el hecho de que una señal RMN de una sustancia de interés puede superponerse con señales de otras sustancias haciendo así difícil sino imposible la cuantificación. En particular, este problema se encuentra a menudo en muestras biológicas, en las cuales la probabilidad de una superposición no deseable de señales es bastante grande debido a un espectro RMN muy apiñado. Sin embargo, en muchas situaciones es posible desplazar la posición de una señal de interés de la región espectral apiñada hasta una región espectral básicamente vacía. Por ejemplo, la posición de una señal RMN de una sustancia en una solución puede depender de diferentes factores, tales como el pH, la fuerza iónica, la composición salina y la concentración salina de la solución. Consecuentemente, puede conseguirse un desplazamiento deseable en la posición de la señal cambiando cualquiera de estos parámetros o añadiendo un agente conocido para desplazar la posición de la señal.

45 Una dificultad del procedimiento de desplazamiento de las señales antes mencionado se debe al hecho de que en muchas situaciones no es posible identificar de manera no ambigua una señal desplazada, ya que la cantidad de desplazamiento de la señal puede depender de varios parámetros y así no se puede predecir de forma precisa. Además, un desplazamiento concurrente en la posición de la señal se inducirá a menudo en las señales de otras especies presentes en la muestra. Por lo tanto, el procedimiento de desplazamiento de señales conocido tiene la desventaja de que una señal desplazada de interés puede estar muy cerca de al menos otra señal de la que debe diferenciarse.

50 La publicación WO 02/056048 A1 describe un procedimiento para identificar sustancias diana en mezclas por medio de espectroscopia RMN y sugiere hacer uso de un espectro de referencia que tenga características que coincidan con las características de un espectro de ensayo producido a partir de la mezcla de muestras.

También el documento WO 02/052293 A1 presenta la posibilidad de efectuar una comparación con espectros de

materiales auténticos y/o mediante la adición a la muestra de un estándar de referencia auténtico, por ejemplo para la asignación de espectros RMN ^1H de biofluidos. El problema ya conocido de la superposición espectral es tratado en el artículo "Use of ^{15}N labeling for automated three-dimensional sorting of cross peaks in protein 2D NMR spectra", Weber P. L. y colaboradores, JMR, 1989, vol. 81, núm. 2, pág. 430 - 434. La superposición se reduce introduciendo una dimensión de desplazamiento químico adicional.

De acuerdo con el artículo "Qualitative análisis of carbon-13 NMR spectra by computer-assisted structure elucidation. II. Extensión to qualitative análisis of mixtures", Hashimoto M. S. y colaboradores, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, vol. 4, núm. 3, 1988, pág. 251 - 259, se evalúa una similitud de los desplazamiento químicos de los compuestos de referencia con los del espectro de la muestra por medio de un análisis de correlación.

Resumen de la invención

El principal objeto de la presente invención es vencer las limitaciones y desventajas de los procedimientos actualmente conocidos de RMN para la detección cualitativa y cuantitativa de sustancias, particularmente en muestras biológicas.

El anterior y otros objetos se consiguen mediante un procedimiento de la presente invención. De acuerdo con la reivindicación 1 se proporciona un procedimiento para detectar una sustancia diana conocida en una muestra por medio de resonancia magnética nuclear (RMN) de especies preseleccionadas contenidas en la sustancia diana. El procedimiento comprende los pasos de:

a) suministrar una muestra de inicio que se conoce o se sospecha que contiene la sustancia diana;

b) añadir a la muestra de inicio una cantidad de sustancia diana etiquetada con isótopos, obteniendo así una muestra compuesta, pudiéndose obtener la sustancia diana etiquetada con isótopos a partir de la sustancia diana sustituyendo al menos un núcleo de la misma por otro isótopo de la misma, en la que dicha sustitución induce un cambio en la posición o multiplicidad de al menos una señal RMN de la sustancia diana;

c) obtener señales RMN de las especies nucleares preseleccionadas a partir de la muestra compuesta;

d) determinar las posiciones reales de un conjunto auxiliar de señales RMN de la sustancia diana etiquetada con isótopos;

e) calcular las posiciones reales de un conjunto principal de señales RMN de la sustancia diana a partir de las posiciones reales del conjunto auxiliar de señales y a partir de una relación predeterminada entre las posiciones relativas de las señales de la sustancia diana etiquetada con isótopos y de las señales de la sustancia diana;

f) detectar al menos una señal de la sustancia diana situada en una posición real calculada mediante el paso e).

El término "RMN" o "resonancia magnética nuclear" tal como aquí se utiliza incluye, aunque no en sentido limitativo, RMN unidimensional (por ejemplo, RMN ^1H), RMN bidimensional (por ejemplo, HSQC o HMQC, NOESY, TOCSY, COSY), RMN tridimensional (por ejemplo, NOESY - TOCSY, HMQC - TOCSY) y la formación de imágenes mediante resonancia magnética (IRM). La técnica generalmente comprende el establecimiento de una condición de resonancia para una especie nuclear preseleccionada en un campo magnético. Tal como se conoce en la técnica la RMN requiere que la especie nuclear preseleccionada sea un isótopo con un momento angular de giro nuclear diferente de cero, tal como ^1H , ^{13}C y muchas otras.

El término "isótopos" se usa generalmente para diferenciar núcleos que tienen el mismo número de protones pero un número diferente de neutrones. Sin embargo, en el contexto de la química y la biología, el término "isótopo" a menudo se extiende para incluir un átomo que tiene un cierto núcleo isotópico.

El término "sustancia diana" tal como aquí se utiliza se refiere a cualquier sustancia que pueda detectarse mediante RMN y que pueda etiquetarse con un isótopo tal como se explica adicionalmente a continuación. El peso molecular de la sustancia diana no está limitado ya que la sustancia diana puede detectarse mediante RMN. Preferiblemente, el peso molecular de la sustancia diana es inferior a 40 kDa, pero más preferiblemente es inferior a 5 kDa, e incluso más preferiblemente es inferior a 500 Da. La sustancia diana incluye, aunque no en sentido limitativo, proteínas, péptidos, polipéptidos, aminoácidos, carbohidratos, ácidos orgánicos, genes, ácidos nucleicos, compuestos químicos y polímeros. Preferiblemente, la sustancia diana es un aminoácido y más preferiblemente, la sustancia diana es glicina. En una realización, la sustancia diana puede ser un marcador, tal como un marcador para la diagnosis, un marcador para estudiar el comportamiento de un medicamento (por ejemplo, la absorción, la

distribución, el metabolismo, la excreción), un marcador para estudiar la efectividad o los efectos secundarios de un tratamiento o un medicamento.

El término "muestra" tal como aquí se utiliza se refiere a cualquier muestra que comprenda una sustancia diana o tenga la posibilidad de comprender una sustancia diana. Habitualmente, la muestra es una mezcla y comprende no solo una sustancia diana sino también otras sustancias. La muestra incluye, aunque no en sentido limitativo, muestras biológicas aisladas a partir de un mamífero, sobrenadantes de cultivos celulares, productos bacterianos fermentados, extractos vegetales, extractos de células procarióticas, extractos unicelulares eucarióticos y extractos de células de animales. En una realización preferida, la muestra usada en el procedimiento de la presente invención es una muestra biológica aislada a partir de un mamífero. El mamífero incluye, aunque no en sentido limitativo, humanos, roedores (por ejemplo, ratones, ratas, hamsters), monos, perros y gatos. Preferiblemente, la muestra biológica se aísla a partir de un humano. La muestra biológica incluye, aunque no en sentido limitativo, sangre, fluido intersticial, plasma, orina, fluido extravascular, fluido cerebroespinal (CSF), fluido sinovial, fluido de articulaciones, fluido pleural, suero, fluido linfático, fluido seminal y saliva. En una realización, la muestra puede ser una muestra aislada a partir de un mamífero que recibió o recibirá una medicación o un tratamiento.

El procedimiento de la presente invención se inicia con una muestra que se sabe o que se sospecha que contiene la sustancia diana. Para mayor claridad, esta se denominará "muestra de inicio". Posteriormente, se añade una cantidad conocida de sustancia diana etiquetada con isótopos, obteniéndose así lo que se denominará "muestra compuesta". Debe enfatizarse que no se requiere necesariamente mezclar la sustancia diana etiquetada con isótopos. En otras palabras la muestra compuesta puede estar formada de la muestra de inicio y de la sustancia diana etiquetada presente en dos fases o contenedores separados. Preferiblemente, sin embargo, el paso de adición comprenderá efectivamente el paso de mezcla.

De acuerdo con la presente invención, la sustancia diana etiquetada con isótopos que se añade a la muestra de inicio debe poder obtenerse a partir de la sustancia diana sustituyendo al menos un núcleo de la misma por otro isótopo de la misma, en la que dicha sustitución induce un cambio en la posición o multiplicidad de al menos una señal RMN de la sustancia diana. Tal como se explicará posteriormente, dicha sustitución isotópica provocará generalmente cambios en la señal RMN, es decir, al menos una señal RMN tendrá una posición lineal y/o multiplicidad diferentes en la sustancia diana etiquetada con isótopos en comparación con la sustancia diana. Debe entenderse que el tipo de sustitución isotópica más adecuada en una situación particular se seleccionará de manera que tenga efectos isotópicos suficientemente fuertes sobre las señales RMN detectadas.

Preferiblemente, la sustitución isotópica comprende la sustitución de al menos un ^{12}C por ^{13}C o la sustitución de al menos un ^1H por ^2H . Sin embargo, son posibles otras sustituciones. En principio, es posible que el isótopo original o el sustituido o ambos sean radioactivos. Sin embargo, en la mayoría de los casos será preferible usar exclusivamente isótopos estables. Por ejemplo, la sustitución isotópica puede comprender la introducción de ^{13}C , ^2H , ^{15}N , ^{17}O , ^{33}S , ^7Li , ^{11}B , ^{29}Si o ^{31}P . Preferiblemente, comprende la introducción de ^{13}C , ^2H o ^{15}N . Además, es preferible que al menos uno de los núcleos involucrados en la sustitución de isótopos tenga un espín diferente de cero de forma que el cambio de requisitos en posición o multiplicidad será provocado por acoplamiento J. No obstante, incluso la sustitución de un núcleo con espín nuclear cero por un isótopo del mismo que también tiene espín cero puede inducir un leve cambio de desplazamiento químico que podría utilizarse en el sentido de la presente invención.

El procedimiento de acuerdo con esta invención comprende además la adquisición de señales NRM de las especies nucleares preseleccionadas a partir de la muestra compuesta y la determinación de las posiciones actuales del conjunto auxiliar de señales RMN de la sustancia diana etiquetada con isótopos. Posteriormente, se calculan las posiciones reales de un conjunto principal de señales RMN de la sustancia diana a partir de las posiciones reales del conjunto auxiliar de señales explotando una relación predeterminada entre las posiciones relativas o multiplicidades de las señales de la sustancia diana etiquetada con isótopos y de las señales de la sustancia diana. Un ejemplo de dicha relación es una línea simple en el espectro RMN de la sustancia diana que se divide en un doblete en el espectro RMN de la sustancia diana etiquetada con isótopos, en el que la posición espectral del centro del doblete es básicamente idéntica a la posición central de la línea simple. En este ejemplo simple, la adición de la sustancia diana etiquetada con isótopos llevará a la aparición de un par de nuevas señales; la línea simple correspondiente de la sustancia diana no etiquetada se identificará entonces fácilmente entre la pluralidad de señales ligeramente separadas seleccionando la situada en la posición central entre el nuevo par de señales. Consecuentemente, esto permitirá la detección de al menos una señal de la sustancia diana situada en una posición real calculada por medio de la relación antes mencionada, permitiendo posteriormente el análisis cualitativo y cuantitativo.

Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención vence las desventajas de los procedimientos de la técnica anterior de detección por RMN, particularmente en muestras biológicas u otras muestras con espectros apiñados.

Realizaciones ventajosas se definen en las reivindicaciones adjuntas.

De acuerdo con una realización el procedimiento comprende además el paso de a1) adquirir señales RMN de la muestra de inicio para la especie nuclear preseleccionada, este paso se ejecuta entre los pasos a) y b), y el paso d) se lleva a cabo sustrayendo las señales RMN adquiridas en el paso a1) de las señales RMN adquiridas en el paso c). Con el paso de sustracción, se obtiene rápidamente el espectro RMN real de la sustancia diana etiquetada con isótopos, necesario para los posteriores pasos del procedimiento. Esta es una situación particularmente útil en la que se aplica alguna clase de técnica de desplazamiento tal como se mencionó en la introducción para desplazar la o las señales de la sustancia diana no etiquetada con isótopos a una región espectral comparativamente no apiñada. Ya que el desplazamiento resultante también se producirá en las líneas RMN de la sustancia diana etiquetada con isótopos, el paso de sustracción es de una ayuda substancial para encontrar las líneas desplazadas.

De acuerdo con otra realización, el paso d) se efectúa mediante una técnica de edición de isótopos que suprime selectivamente las señales RMN de la sustancia diana no etiquetada.

De acuerdo con una realización particularmente preferida, el procedimiento comprende además el paso de cuantificar la sustancia diana en relación con la cantidad de sustancia diana añadida etiquetada con isótopos basándose en las intensidades relativas de las señales del conjunto principal y auxiliar de señales RMN. Esta realización, requiere la ejecución de mediciones RMN en un régimen en el que la integral de un pico de señal es directamente proporcional con el número de núcleos resonantes. Obviamente, si se conoce de forma absoluta la cantidad de sustancia diana etiquetada con isótopos, el procedimiento permitirá la cuantificación absoluta de la sustancia diana.

El procedimiento de acuerdo con esta invención es aplicable a varios tipos de RMN, incluyendo, aunque no en sentido limitativo, la RMN unidimensional, la RMN bidimensional y la formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (IRM).

La cantidad de sustancia diana etiquetada con isótopos añadida a la muestra puede seleccionarse en una amplia gama y dependerá generalmente de diferentes factores tales como la cantidad de muestra, la cantidad de sustancia diana en la muestra, el tipo de isótopo, el peso molecular de la sustancia diana, el tipo de procedimiento o aparato de RMN. Es preferible que la concentración de sustancia diana etiquetada con isótopos sea lo más pequeña posible pero debe ser lo suficientemente alta para que la sustancia diana etiquetada con isótopos pueda detectarse de forma fiable mediante medición RMN. Preferiblemente, la cantidad de sustancia diana etiquetada con isótopos añadida a la muestra está entre 0,01 mM y 100 mM, más preferiblemente entre 0,1 mM y 10 mM.

En el procedimiento de la presente invención, puede detectarse una sustancia diana simple, pero también es posible detectar dos o más sustancias diana diferentes al mismo tiempo. El número de sustancias diana etiquetadas con isótopos añadidas a la muestra no está limitado ya que al menos se añade una sustancia diana etiquetada con isótopos a la muestra. Si se detectan dos o más sustancias diana diferentes al mismo tiempo, pueden añadirse dos o más sustancias diana etiquetada con isótopos.

El número de átomos sustituidos por isótopos en la sustancia diana etiquetada con isótopos en principio no está limitado ya que al menos se sustituye un átomo para un isótopo del átomo. Si la sustancia diana comprende dos o más átomos isotópicamente sustituidos, esos isótopos pueden ser los mismos isótopos o isótopos diferentes. Por ejemplo, si se usa ^{13}C para el etiquetado de la sustancia diana y la sustancia diana comprende varios átomos de carbono, solamente puede sustituirse un átomo de carbono por ^{13}C , o más de un átomo de carbono –incluso todos los átomos de carbono, pueden sustituirse por ^{13}C . Además, la sustancia diana también puede sustituirse con otro tipo de isótopo tal como ^{15}M además de la sustitución con ^{13}C . Tal como se mencionó anteriormente, el propósito de la sustitución isotópica es provocar la aparición de nuevos patrones de señales en el espectro RMN de manera que se permita la identificación de al menos una señal de la sustancia diana no etiquetada.

La sustancia diana etiquetada con isótopos puede prepararse mediante procedimientos convencionales conocidos por una persona experta en la materia. Por ejemplo, la sustancia diana etiquetada con isótopos puede prepararse cultivando células o microorganismos que producen la sustancia diana en un medio de cultivo que comprende el isótopo. La sustancia diana etiquetada con isótopos puede también prepararse mediante síntesis química usando el isótopo o un compuesto etiquetado con isótopo como material inicial. Un gran número de sustancias diana etiquetadas con isótopos está comercialmente disponible y pueden ser utilizadas para el procedimiento de la presente invención.

El procedimiento de la presente invención puede usarse para una variedad de propósitos. Por ejemplo, puede usarse para la diagnosis de enfermedades detectando un marcador de diagnóstico tal como una sustancia diana. Muchos marcadores de diagnóstico son bien conocidos en la técnica y una persona experta en la materia puede utilizar fácilmente un marcador de diagnóstico como sustancia diana.

Además, el procedimiento de la presente invención puede usarse para estudiar el comportamiento de un

medicamento tal como la absorción, distribución, metabolismo o excreción detectando el medicamento o un metabolito del mismo. Una muestra usada en el procedimiento puede aislarse a partir de un mamífero después de la administración del medicamento. Una muestra aislada a partir del mamífero antes de la administración del medicamento también puede usarse como muestra de control.

- 5 Además, el procedimiento de la presente invención puede usarse para estudiar la efectividad o los efectos secundarios de un tratamiento o medicamento. En este caso pueden utilizarse como muestras la muestra aislada a partir de un mamífero antes del tratamiento o administración de un medicamento y una muestra aislada a partir del mamífero después del tratamiento o administración de un medicamento. En particular, una sustancia diana detectada por el procedimiento de la presente invención puede ser una sustancia cuya concentración o cantidad en una muestra cambia si un medicamento funciona o si se producen efectos secundarios.

Breve descripción de los dibujos

El anterior procedimiento y otras características y objetos de la invención y la forma de conseguirla serán más evidentes y la invención misma se entenderá mejor en referencia a la siguiente descripción de diferentes realizaciones de esta invención tomadas en conjunción con los dibujos adjuntos en los que:

- 15 La figura 1 muestra una representación esquemática de espectros RMN unidimensionales de un núcleo que tiene un espín de número entero o semi-entero que interactúa con al menos otro núcleo que tiene un espín de $\frac{1}{2}$ que se introdujo como etiqueta de isótopos.

- 20 La figura 2 muestra una representación esquemática de espectros RMN unidimensionales de un núcleo que tiene un espín entero o semi-entero que interactúa con otro núcleo que tiene un espín de 1 que se introdujo como etiquetas de isótopos.

La figura 3 muestra un espectro RMN ^1H de una muestra de CSF que comprende ^{13}C glicina (panel principal) y una expansión de la misma en la región espectral alrededor de la señal de ^{12}C (panel del inserto, traza superior), el resultado de una convolución aplicando una función gaussiana a los picos (panel de inserto, traza media) y el resultado del espectro RMN ^{13}C filtrado (panel de inserto, traza inferior).

- 25 La figura 4 muestra una representación esquemática de un procedimiento de cuantificación aplicado a la espectroscopía RMN bidimensional.

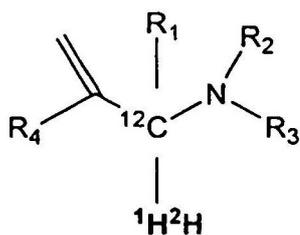
La figura 5 muestra una representación esquemática de un procedimiento de cuantificación aplicado a la formación de imágenes por resonancia magnética.

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1

- 30 En las figuras 1 y 2 se muestra un resumen de diferentes topologías de sistemas-espín que pueden usarse para identificar y cuantificar una sustancia diana conocida en un espectro RMN apiñado. En estos ejemplos, el espín detectado (número entero o semi-entero, por ejemplo ^1H con un espín de $\frac{1}{2}$ o ^2H con un espín de 1) mostrado en negrita en las fórmulas estructurales más adelante, llega a una línea RMN simple en el caso de la sustancia diana.
- 35 Mediante modificación de las condiciones de la muestra (pH, sal, T), esta señal de interés puede desplazarse a una región espectral sin superposición. Sin embargo, no siempre es sencillo identificar la línea desplazada. En la sustancia diana etiquetada con isótopos, el mismo espín interactúa con los núcleos isotópicos sustituidos en la misma. Esta interacción puede utilizarse para identificar la señal de interés y cuantificar la señal de moléculas de contrapartida del mismo tipo no etiquetadas.

- 40 En particular la figura 1 muestra situaciones en las que la etiqueta de isótopos es un núcleo de espín $\frac{1}{2}$. Comenzando con la sustancia diana (1) no etiquetada



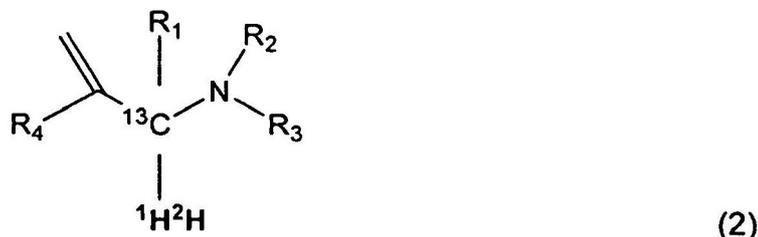
45

El espín nuclear relevante (es decir, ^1H o ^2H mostrado en negrita en la estructura) caracterizado por cierto desplazamiento químico se observa a través de RMN. Este espín no interactúa a través de un acoplamiento J con

ningún otro espín. Los residuos R_1 a R_4 no tienen ningún espín. El espectro RMN es un singlete, según se muestra en la figura 1 (a).

Volviendo ahora a una sustancia (2) etiquetada con isótopos en la que se ha introducido un núcleo de un espín de $\frac{1}{2}$ (es decir, ^{13}C dentro de la molécula),

5



10 el espín observado experimenta un acoplamiento J heteronuclear simple, visible como un doblete en RMN. La amplitud total de la señal está ahora distribuida sobre dos señales según se muestra en la figura 1 (b).

En una mezcla de 1:1 de sustancia no etiquetada (1) y sustancia etiquetada (2) se encuentra un espectro como el mostrado en la figura 1 (c) donde el desplazamiento químico de la sustancia no etiquetada (singlete) está en el centro de las dos señales de doblete (flechas). Así puede identificarse la señal del singlete del compuesto no etiquetado y, además, puede cuantificarse la cantidad de sustancia si se conoce la cantidad del compuesto etiquetado. Incidentalmente, el espectro de la figura 1 (c) podría simplificarse con respecto al doblete mostrado en la figura 1 (b) por medio de técnicas de edición espectral (consulte G. Otting, H. Senn, G. Wagner, K. Wüthrich, (1986) J. Magn. Reson, 70, 500; y G. Otting, K. Wüthrich, (1989) J. Magn. Reson, 85, 586).

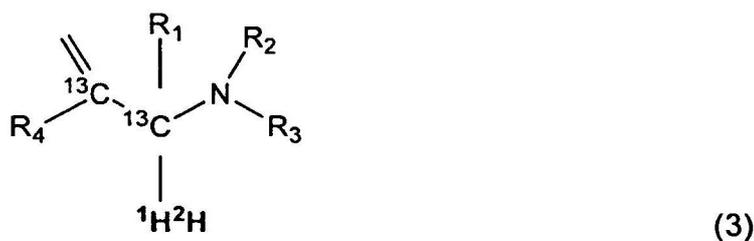
15

En mezclas reales, sin embargo, la señal de singlete no está exactamente en el centro del doblete (flecha) a causa de un desplazamiento de los isótopos, tal como se muestra en la figura 1 (d). No obstante, este desplazamiento de los isótopos es pequeño y conocido *a priori*. Consecuentemente, todavía es posible la identificación y cuantificación de la sustancia.

20

Si se introduce más de un compañero de acoplamiento de espín $\frac{1}{2}$ dentro de la sustancia etiquetada, se ven multipletes más complejos. La figura 1 (e) muestra el caso de una mezcla real de sustancia 3 no etiquetada y doblemente etiquetada con ^{13}C , que da como resultado un doblete de un doblete. Las anteriores observaciones sobre el desplazamiento de los isótopos siguen aplicándose; la identificación de la señal y la cuantificación de la sustancia aun son posibles.

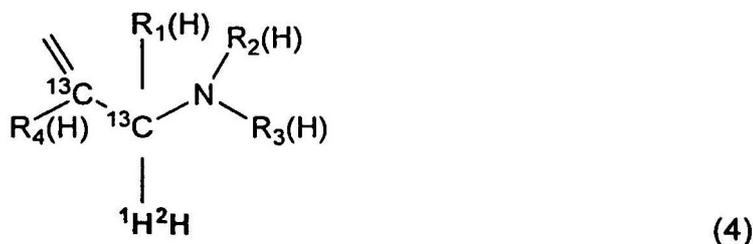
25



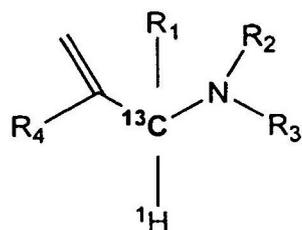
30

si los residuos R_1 - R_4 contienen otros espines que interactúan con los espines detectados a través del acoplamiento J, tal como puede ser el caso de una sustancia tal como (4),

35



40 se verán divisiones adicionales de todas las señales en la sustancia tanto no etiquetada como etiquetada, tal como se muestra en la figura 1 (f). Las anteriores observaciones acerca del desplazamiento de los isótopos todavía se aplican; la identificación y cuantificación de sustancias aún es posible. En contraste, la figura 2 muestra situaciones en las que la etiqueta de isótopos es un núcleo de espín 1. Empezando con la sustancia diana (5) no etiquetada

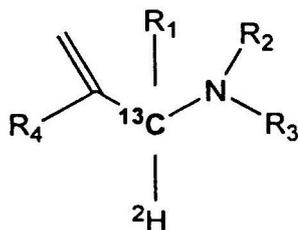


5

el espectro RMN de ^{13}C mostrará un doblete de un acoplamiento J de espín $\frac{1}{2}$, tal como se muestra en la figura 2 (a).

Si el espín detectado interactúa con un núcleo de espín 1 (por ejemplo, ^2H) tal como una sustancia (6) etiquetada con deuterio, en el espectro se verá un triplete, tal como se muestra en la figura (2)

10



15 En una mezcla 1:1 de sustancia diana (5) no etiquetada y de sustancia diana (6) etiquetada, puede identificarse el desplazamiento químico del doblete que pertenece a la sustancia no etiquetada usando la posición del triplete que pertenece a la sustancia etiquetada. Además, puede cuantificarse la cantidad de sustancia no etiquetada si se conoce la cantidad de sustancia etiquetada.

20 En una mezcla real, es necesario tener en cuenta el desplazamiento de los isótopos (consulte la figura 2 (c) ya que se conoce este desplazamiento, todavía es posible identificar la posición del triplete que pertenece a la sustancia etiquetada. Además, puede cuantificarse la cantidad de sustancia diana no etiquetada si se conoce la cantidad de sustancia diana etiquetada.

25 Debe observarse que aunque en los ejemplos anteriormente mostrados las sustancias etiquetadas con isótopos tienen señales RMN más complejas (es decir, señales con una mayor multiplicidad) que las sustancias diana no etiquetadas correspondientes, esto no es un requisito obligatorio. Al menos en principio, se puede usar un esquema de sustitución en el que un núcleo que soporta un espín se sustituye con un isótopo con un espín menor o incluso cero, dando así como resultado un espectro RMN con menos líneas. En cambio en el patrón espectral puede ser aún útil para identificar una señal de la sustancia diana no etiquetada.

Ejemplo 2

30 Los procedimientos de detección antes descritos se aplicaron para detectar glicina en el fluido cerebroespinal (CSF) recogido de la Cisterna Magna de ratas Wistar adultas macho (bajo entre un 3% y un 5% de anestesia gaseosa de isofluran). Después de la recolección, el CSF se almacenó inmediatamente a -80°C . Una parte alícuota adecuada de CSF se mezcló con 6 μl de 8,5 N NaOD, 10 μl de 1 mM ^{13}C -Glicina (ambos átomos de C etiquetados con ^{13}C) y una solución del 20% de D_2O en 80% de H_2O dando como resultado un volumen total de 200 μl . Después de agitar durante 30 segundos, la solución fue centrifugada a 13.000 rpm durante 1 minuto y el sobrenadante se transfirió al interior de un tubo de RMN de 3 mm. Las mezclas se prepararon directamente en fresco antes de la medición.

35 El espectro RMN ^1H del CSF se midió en un instrumento Broker Avance-II de 600 MHz equipado con una criosonda de 5 mm y controlado con XWINNMR 3,5 (Broker BioSpin, Fällanden, Suiza). Cada muestra se afinó y se hizo coincidir manualmente, y se compensó con la rutina de compensación de gradientes del proveedor. Se adquirieron 32k puntos de datos dentro de una ventana espectral de 8012,82 Hz de anchura dando como resultado un tiempo de adquisición de 2045 segundos a una temperatura de 300 K. Se suprimió la resonancia del agua mediante irradiación durante 1,9 segundos durante el retardo de relajación. Para cada muestra, se añadieron tantos transitorios como fue necesario para suministrar espectros con una razón suficientemente alta de señal / ruido (típicamente aproximadamente 1024 exploraciones). Antes de la transformación de Fourier se aplicó una función de ventana gaussiana con $l_b = 1,95$ Hz y $g_b = 0,16$. Esto fue seguido por una corrección manual de fase y de base de referencia. Se hizo una referenciación con respecto a la mitad del doblete de lactato definido como 1,31 ppm.

40 Para la determinación de la concentración de glicina, el espectro RMN resultante fue desentrelazado aplicando una función gaussiana a los picos. Este procedimiento se aplicó típicamente a los picos superpuestos con forma de

línea gaussiana para determinar el coeficiente de cada pico individual (figura 3, traza media de expansión). Para todos los espectros se aplicaron los mismos parámetros de procesamiento para asegurar que podían compararse los coeficientes obtenidos mediante este procedimiento. Los resultados del paso de desentrelazado, es decir, las áreas de los picos para la glicina ^{12}C no etiquetada y para la glicina ^{13}C añadida se utilizaron para calcular la concentración de glicina de la muestra de CSF. Para esto se tomó en cuenta el número de protones bajo las señales, la concentración de la glicina ^{13}C añadida y el volumen inicial de CSF usados para la medición.

Específicamente, la cuantificación se efectuó integrando una señal de una sustancia diana no etiquetada, dando como resultado I_T y mediante la integración de una señal de la sustancia diana etiquetada, dando como resultado I_S , usando el software de procesamiento RMN estándar (por ejemplo XWINNMR, Topspin, Amix; Broker Biospin AG, Fällanden, Suiza). La concentración de la diana puede calcularse a partir de las integrales detectadas de la sustancia diana no etiquetada (I_T) y de la sustancia etiquetada con isótopos (I_S) con la fórmula

$$C_T = (n_S/n_T) * C_S * (I_T/I_S)$$

en la que C_T es la concentración de sustancia diana no etiquetada, C_S es la concentración de la sustancia etiquetada con isótopos, n_T es el número de protones bajo la señal RMN integrada de la sustancia diana no etiquetada, n_S es el número de protones bajo la señal RMN integrada de la sustancia diana etiquetada con isótopos.

Debe observarse que con este procedimiento se cuantificó solamente glicina libre no enlazada a otros componentes del biofluido.

Ejemplo 3

En la figura 4 se muestra un dibujo esquemático de la estrategia de cuantificación aplicada para la espectroscopía RMN bidimensional. Un compuesto diana a cuantificar tiene una señal con un desplazamiento químico en la banda de entre 3,7 y 3,8 ppm dependiendo de las condiciones de la muestra. El espectro RMN ^1H unidimensional adquirido sobre la matriz biológica (figura 3, panel izquierdo) muestra una superposición severa de las señales. La aplicación de espectroscopía bidimensional TOCSY (consulte A. Bax y D.G. Davis (1985), *J. Magn. Reson.* 65, 355) mejora la situación mediante el aislamiento de las señales fuera de diagonal de la topología conocida del sistema espín, pero permanece la ambigüedad de las dos señales de triplete marcadas con una caja pequeña (figura 3, panel medio). Solamente después de la adición de la sustancia etiquetada con ^{13}C (figura 3, panel derecho), se identifica inequívocamente que el triplete de interés es menor de 1, ahora evidente como doblete de tripletes. La cuantificación de la sustancia diana se hace así posible mediante la integración de las señales de los tripletes RMN en la traza extraída mostrada en la caja de la figura 3, panel derecho, tomando el coeficiente de la señal de los tripletes satélites y las señales de los tripletes centrales. Si es necesario, podría adquirirse un espectro de referencia simplificado editado con ^{13}C que solamente contiene las señales del compuesto etiquetado (consulte G. Otting (1986) loc. cit. y G. Otting (1989) loc. cit.).

Ejemplo 4

En la figura 5 se muestra un dibujo esquemático de una estrategia de cuantificación aplicada a la formación de imágenes por resonancia magnética (IRM) (consulte P.G. Morris (1986) *Imaging Nuclear Magnetic Resonance in Medicine and Biology*, Clarendon Press, Oxford; y P. T. Callaghan (1991) *Micro-Imaging Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy*, Clarendon Press, Oxford; y P. Mansfield, P.G. Morris (1982) *NMR Imaging in Biomedicine*, *Adv. Magn. Reson (Suppl. 2)* Academia Press, New York; y D. M. Kramer (1981), en: *Nuclear Magnetic Resonance Imaging in Medicine*: L. Kaufman, L. E. Crooks, A. R. Margulis (eds); Iguku-Shoin, N. Y., 184). Mediante el uso de la formación de imágenes por desplazamiento químico (CSI) (consulte T. R. Brown, B. M. Kincaid y K. Ugurbil (1982) *Proc. Nat. Acad. Sci. EE. UU.* 79, 3523; y W. T. Dixon (1984) *Simple proton spectroscopic imaging. Radiologie* 152, 189) puede recogerse información de RMN espacialmente resuelta sobre objetos no homogéneos (por ejemplo, muestras biológicas o haces de tubos RMN (consulte A. Ross, G. Scholotterbeck, H. Senn y M. von Kienlin (2001), *Angew. Chem., Int Ed.*, 40, 3243 – 3245; y A. Ross, G. Scholotterbeck y H. Senn (2003) *Patente de EE. UU.* 6 504 368 B2). Como consecuencia, el desplazamiento químico y la sensibilidad de detección de un compuesto puede depender de la posición espacial del espectro extraído. Esto se indica en los 36 espectros dibujados anteriormente mediante un pequeño desplazamiento del centro espectral y la variación de la amplitud. Siempre que se ve una amplitud diferente debido a la diferencia real en la concentración del compuesto o debido a las diferencias en la sensibilidad de la detección puede responderse añadiendo un compuesto etiquetado con isótopos, teniendo en cuenta que se obtenga una distribución homogénea. La magnitud del desplazamiento espectral también contendrá información localizada en la matriz de la muestra (por ejemplo, valores de pH locales).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar una sustancia diana conocida en una muestra, por medio de resonancia magnética nuclear (RMN) de una especie nuclear preseleccionada contenida en la sustancia diana, el procedimiento comprende los pasos de:
- 5 a) suministrar una muestra de inicio que se sabe o se sospecha que contiene la sustancia diana;
- b) añadir a la muestra de inicio una cantidad de sustancia diana etiquetada con isótopos, obteniendo así una muestra compuesta, obteniéndose la sustancia diana etiquetada con isótopos a partir de la sustancia diana mediante la sustitución de al menos uno de sus núcleos por otro de sus isótopos, donde dicha sustitución induce un cambio en la posición o la multiplicidad de al menos una señal RMN de la sustancia diana;
- 10 c) adquirir señales RMN de la especie nuclear preseleccionada a partir de la muestra compuesta;
- d) determinar las posiciones reales de un conjunto auxiliar de señales RMN de la sustancia diana etiquetada con isótopos;
- e) calcular las posiciones reales de un conjunto principal de señales RMN de la sustancia diana a partir de las posiciones reales del conjunto auxiliar de señales y a partir de una relación predeterminada entre las posiciones relativas de las señales de la sustancia diana etiquetada con isótopos y de las señales de la sustancia diana;
- 15 f) detectar al menos una señal de la sustancia diana situada en una posición real calculada mediante el paso e).
- 20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que en dicha sustitución del paso b) al menos uno de dicho núcleo o de dicho isótopo que sustituye dicho núcleo tiene un espín nuclear diferente de 0.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el paso b) comprende la mezcla de la sustancia diana etiquetada con isótopos con la muestra de inicio.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además el paso de:
- 25 a1) adquirir señales RMN de la muestra de inicio para la especie nuclear preseleccionada que se lleva a cabo entre los pasos a) y b), en donde el paso d) se lleva a cabo sustrayendo las señales RMN adquiridas en el paso a1) de las señales RMN adquiridas en el paso c).
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el paso d) se lleva a cabo mediante una técnica de edición de isótopos que suprime selectivamente las señales RMN de la sustancia diana.
- 30 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además el paso de cuantificar la sustancia diana en relación con la cantidad de sustancia diana añadida etiquetada con isótopos basándose en las intensidades relativas de las señales del conjunto principal y auxiliar de señales RMN.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el conjunto auxiliar de señales RMN comprende al menos dos señales de la sustancia diana etiquetada con isótopos y en el que el conjunto principal de señales RMN comprende una señal simple de la sustancia diana.
- 35 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la especie nuclear preseleccionada es ^1H o ^{13}C .
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra de inicio es una muestra biológica.
- 40 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el otro isótopo de la sustancia diana etiquetada con isótopos se selecciona entre ^{13}C , ^2H y ^{15}N .
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la RMN es RMN unidimensional.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la RMN es RMN bidimensional.
- 45 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la RMN es la formación de imágenes mediante resonancia magnética nuclear.

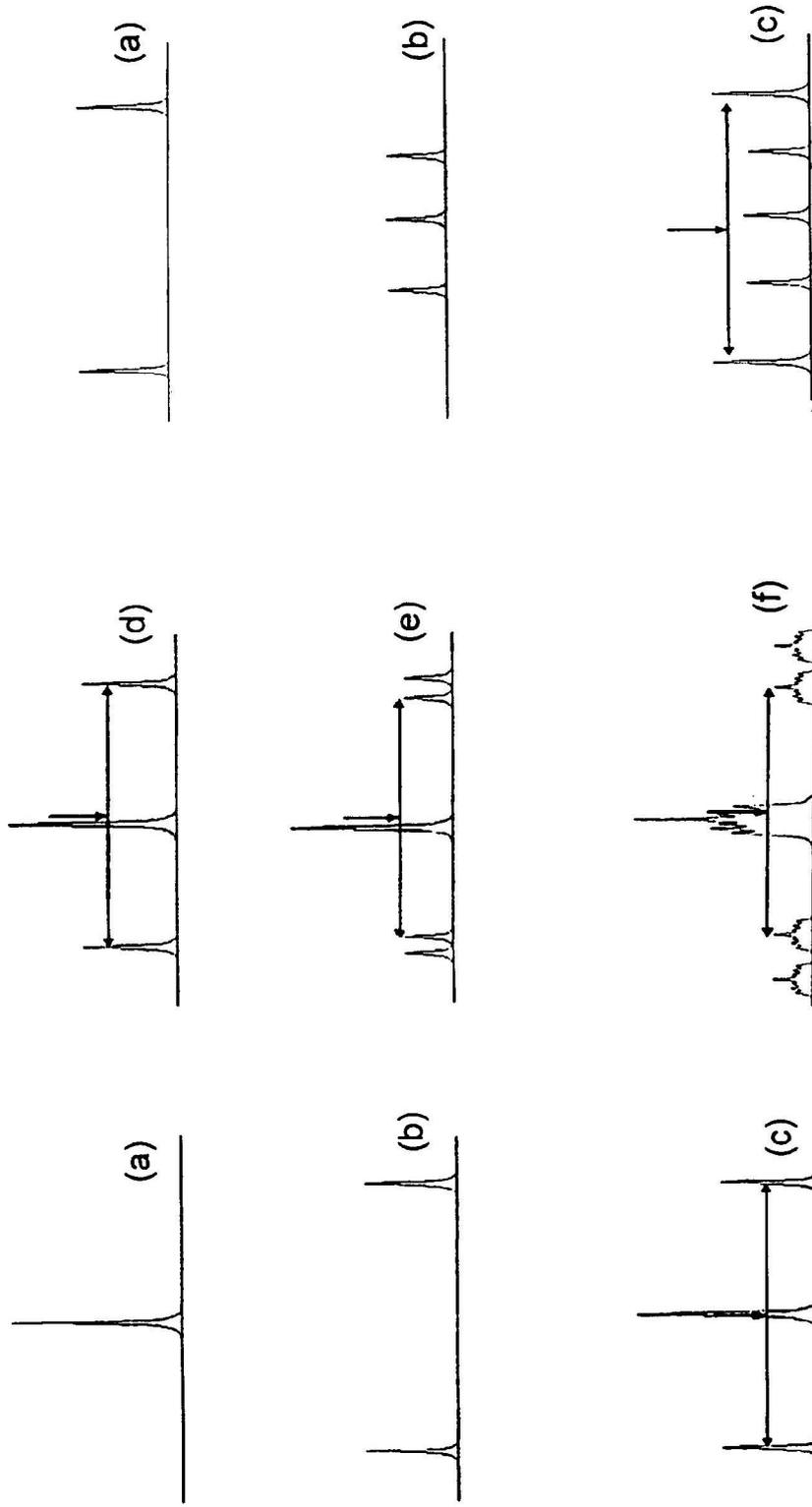


Fig. 1

Fig. 2

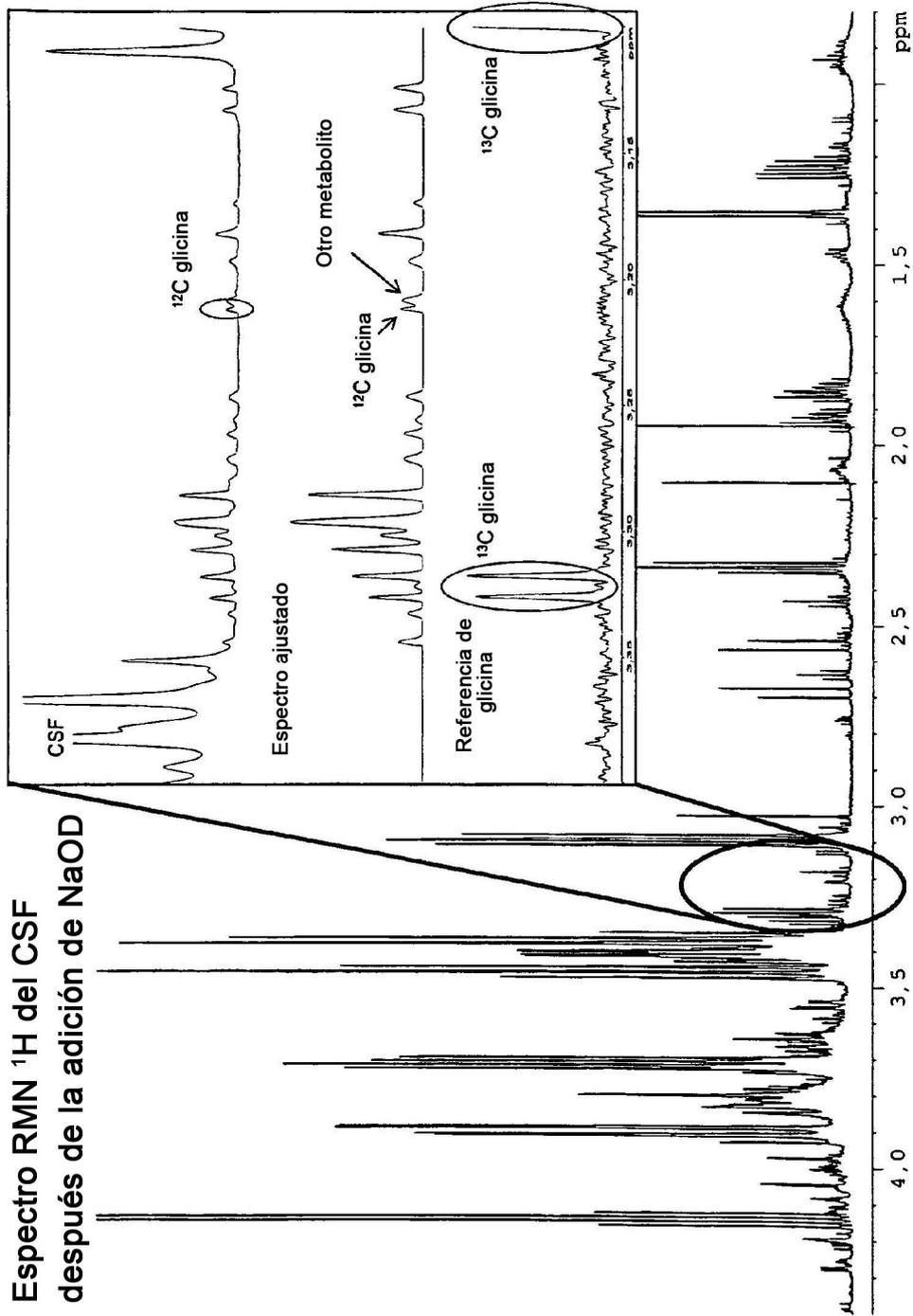


Fig. 3

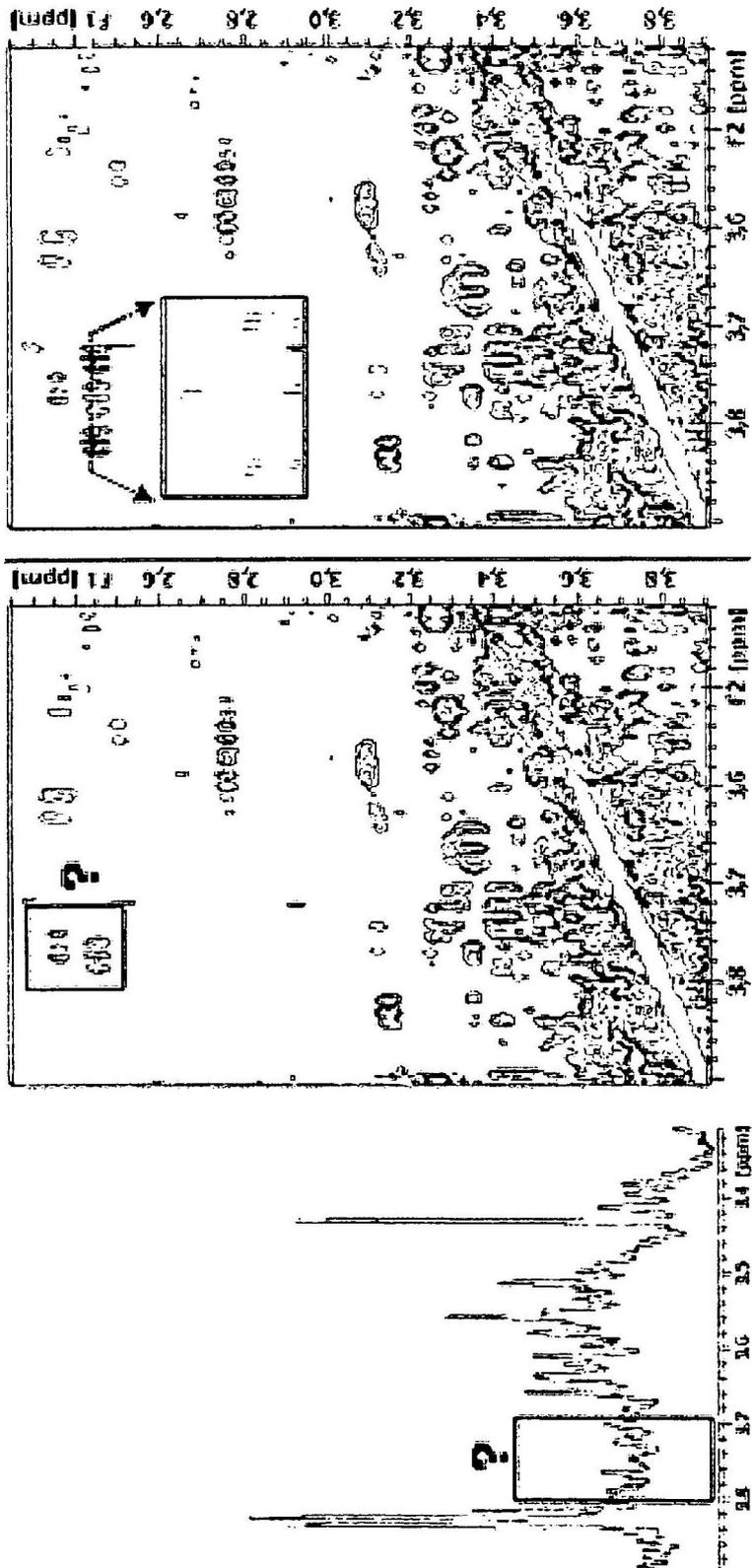


Fig. 4

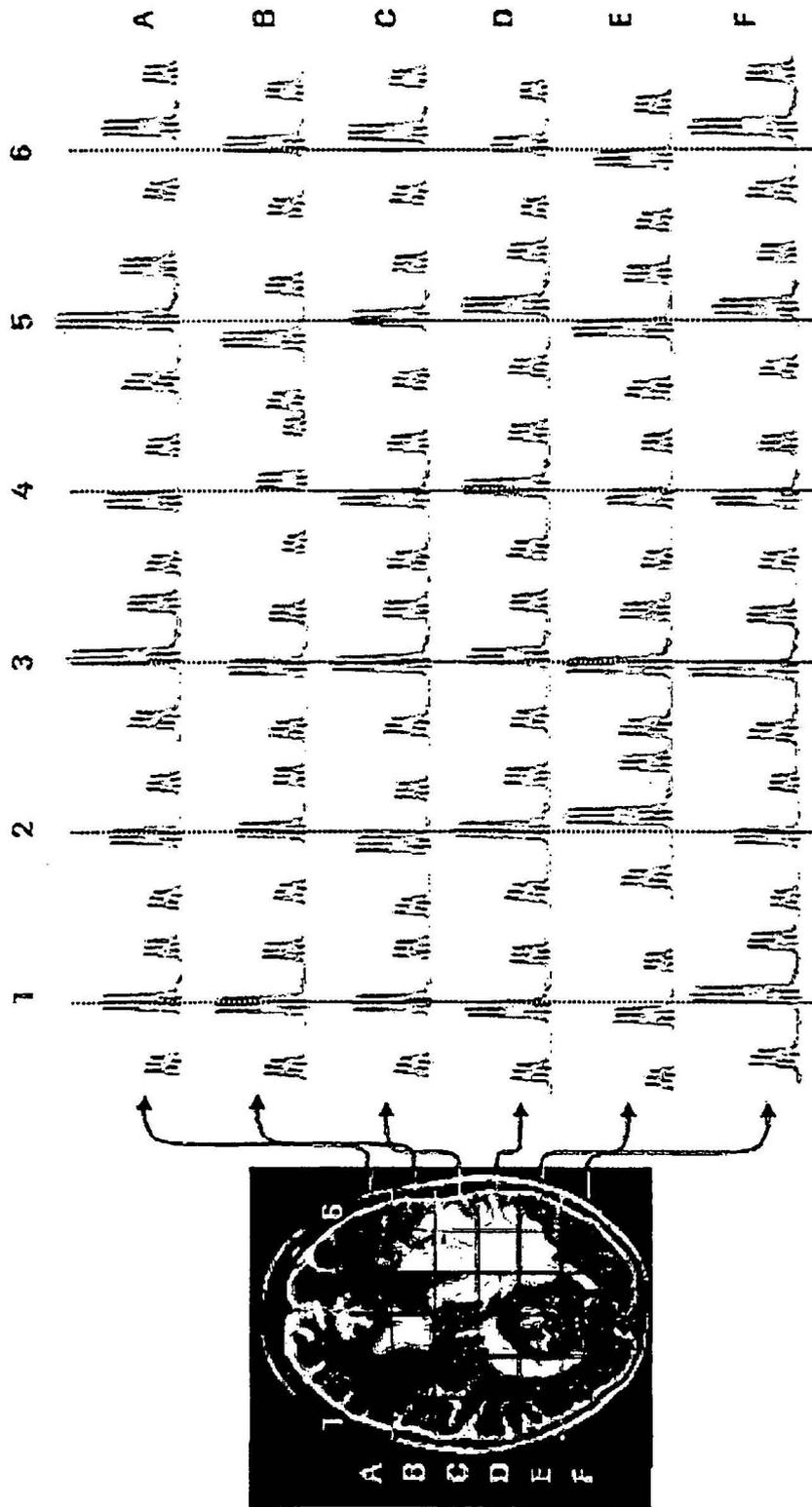


Fig. 5