

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 461 865**

51 Int. Cl.:

B82Y 25/00 (2011.01)

G01R 33/12 (2006.01)

G01R 33/465 (2006.01)

G01N 24/08 (2006.01)

G01R 33/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2007 E 07868161 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 1981996**

54 Título: **Método de resonancia magnética para detectar analitos**

30 Prioridad:

19.01.2006 US 759788 P

27.03.2006 US 786033 P

12.10.2006 US 549064

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

21.05.2014

73 Titular/es:

MENON BIOSENSORS, INC. (100.0%)
16550 West Bernardo Drive, Building 5, Suite 525
San Diego, CA 92127 , US

72 Inventor/es:

MENON, SURESH M.;
NEWMAN, DAVID E. y
CHAN, STEVEN C.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 461 865 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

Método de resonancia magnética para detectar analitos

Antecedentes**1. Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere en general al campo de detección de analitos y adicionalmente se refiere a detectar analitos usando resonancia magnética.

2. Técnica relacionada

10 La tecnología de la detección para analitos específicos se extiende sobre un amplio intervalo de instrumentación y técnicas de laboratorio incluyendo (por sus siglas en inglés): cromatografía líquida y de gases (LC y GC, respectivamente), espectroscopía de masa (MS), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), espectroscopía óptica y fluoroscopia, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) e instrumentos de movilidad iónica. Los instrumentos de análisis químicos de hoy en día son, sin embargo, grandes y caros, requieren un operario cualificado, implican la preparación de muestras complejas y requieren cantidades sustanciales de tiempo para análisis.

15 Hay una necesidad crítica en todo el mundo de detección mejorada de productos químicos específicos y microbios. Por ejemplo, en el área de la seguridad nacional, se requiere un sistema para detectar agentes biológicos, toxinas y armas químicas para proporcionar una alerta temprana en caso de un ataque terrorista. Dicha capacidad de detección también se podía usar para investigar sitios clandestinos donde se preparan o se producen dichas armas, permitiendo así la acción para prevenir su uso. También se requiere un sistema para escanear correo y paquetes para detectar un ataque terrorista.

20 También se requiere detección mejorada de patógenos para la medicina. La detección sensible de ADN o proteínas asociadas a gripe aviar, encefalopatía espongiforme bovina (más comúnmente referida como "enfermedad de las vacas locas") o síndrome respiratorio agudo grave (SARS, por sus siglas en inglés) permitiría la intervención para evitar una pandemia. El amplio uso clínico de dicho sistema ayudaría en la identificación de enfermedades ordinarias o enfermedades graves, ayudando enormemente a los médicos en el diagnóstico.

25 También se requiere la detección de diversos productos químicos para aplicaciones industriales para detectar productos químicos industriales tóxicos (los TIC) y materiales industriales tóxicos (los TIM) (ambos por sus siglas en inglés). Dicho sistema permitiría detección de fugas, control de procedimientos, detección de degradación de materiales, control de concentración y un receptor de otras aplicaciones de los procedimientos en un amplio intervalo de industrias.

30 También se requiere detección mejorada en agricultura y producción de alimentos, así como un medio para detectar contaminación, pudrición o envenenamiento de los alimentos. La comida incluye por ejemplo, artículos tales como agua potable y zumos de fruta. También hay necesidad en el estudio forense, incluyendo por ejemplo, investigación de secuencias de ADN específicas en una muestra en el sitio investigado.

35 Se están desarrollando técnicas de detección por resonancia magnética que implican partículas paramagnéticas a escala de nanómetros (nanopartículas) que se han usado previamente como agentes de contraste de MRI. Las partículas comprenden un núcleo de material paramagnético o superparamagnético (ambos referidos en general en la presente memoria como paramagnético), recubierto por una carcasa de material no magnético que se dota con moléculas de agentes reaccionantes para activar la unión a células diana tales como patógenos, células tumorales, etc. Se inyectan nanopartículas a un paciente previamente a análisis MRI. Se unen a las células diana, causan un cambio local en las propiedades de la MRS y permiten la detección o localización de las células diana.

40 También se han usado las nanopartículas in vitro. Disueltas o suspendidas en un medio líquido, las nanopartículas se unen a células o moléculas diana en el medio. Las nanopartículas y los analitos pueden formar agregados que incorporan docenas a cientos de nanopartículas. Dichos agregados son detectables por dispersión de luz, microscopía de fuerza atómica, microscopía electrónica y en algunos casos por efectos de NMR. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.254.460 para Josephson et al.

45 Los agentes reaccionantes específicos de la diana se pueden montar sobre las nanopartículas para proporcionar selectividad específica del analito. Una desventaja es la necesidad de formar agregaciones que comprendan una pluralidad de nanopartículas y una pluralidad de células o moléculas diana, debido a que tiene lugar agregación sólo cuando cada nanopartícula se une a múltiples analitos y cada analito se une a múltiples nanopartículas. La agregación se puede inhibir por efectos geométricos tales como una variación en tamaño entre nanopartículas. Se puede requerir un tiempo sustancial para que se formen agregaciones.

50 Se realizaron estudios previos sobre aglomeración en relaxómetros de sobremesa e instrumentos de RM de alto campo. La preparación e inserción de la muestra manual en el tubo de NMR pueden ser tediosas. Procesos

importantes tales como unión del analito a las nanopartículas pueden fracasar. Se requiere un instrumento compacto y automatizado para acelerar las mediciones. También, es importante entender los fenómenos que describen los cambios observados en la medición desde un punto de vista físico y bioquímico básico.

5 Los estudios previos no demostraron el cambio en los efectos de T2 desde un punto de vista físico. Se observaron efectos de aglomeración simples por medios ópticos (microscopios) para establecer los fenómenos que relacionan el cambio en T2. Además, los estudios previos no aprovecharon el control de la estequiometría de las nanopartículas para adaptar los parámetros medidos para diversas aplicaciones conduciendo a productos de NMR específicos.

10 Los estudios previos usaron muestras que fueron puras y no fueron sometidas a interferencias tales como polvo, ácidos, etc. Por otra parte, no hubo requerimiento de mediciones rápidas combinadas con falta de interferencia de perturbación y moléculas vecinas cercanas, coste de sistema total, pocas falsas alarmas y alta probabilidad de detección. Tampoco hubo un intervalo definido de concentraciones de analito para detectar.

Los estudios previos no consideraron el uso de materiales paramagnéticos mejorados tales como compuestos de hierro, cobalto y níquel que conducen a una magnetización más fuerte y sensibilidad mejorada.

15 Los estudios previos no consideraron el uso de campos magnéticos para influir en las interacciones entre nanopartículas o entre moléculas unidas a nanopartículas. No se ha tenido en cuenta el uso de campos magnéticos para controlar la formación o configuración geométrica de estructuras que comprenden nanopartículas y analitos. No se tuvo en cuenta previamente el uso de campos magnéticos para concentrar agentes reaccionantes para que se aceleren las interacciones seleccionadas.

20 El artículo Perez J. M. et al., "Use of Magnetic Nanoparticles as Nanosensors to Probe for Molecular Interactions", ChemBioChem 2004, 5, 261-264 describe un método para detectar la presencia de un analito, que comprende las etapas de: formar una muestra llevando partículas paramagnéticas a escala de nanómetro a un líquido para unión a dicho analito por formación de complejos nanopartícula-analito, aplicar un campo magnético para realización de resonancia magnética y excitar señales de resonancia magnética de dicho líquido y determinar el T2 del líquido analizando dichas señales de resonancia magnética y determinar si el analito está presente en la muestra comparando el T2 medido con un valor predeterminado.

Sumario

Se proporciona un método que puede detectar analitos diana basado en mediciones de resonancia magnética. Se detectan analitos usando nanopartículas específicas en la forma de nanosensores de resonancia magnética. La reacción entre las nanopartículas y los analitos se controla por la aplicación de un campo magnético.

30 Según un aspecto de la presente invención, un método para detectar la presencia de un analito comprende las etapas de:

formar una muestra llevando partículas paramagnéticas de escala nanómetro a un líquido para unirse a dicho analito formando complejos nanopartícula-analito;

35 aplicar un primer campo magnético no uniforme a dicha muestra, de manera que dicho primer campo magnético impulse dichas partículas en la dirección de intensidad creciente del campo, causando de ese modo movimiento de los complejos y potenciando las interacciones entre sí y concentrando complejos nanopartícula-analito;

desplazar la muestra a un segundo campo magnético uniforme para realizar resonancia magnética y excitar señales de resonancia magnética de dicho líquido y determinar el T2 del líquido analizando dichas señales de resonancia magnética y

40 determinar si el analito está presente en la muestra por comparación del T2 medido con un valor predeterminado.

En las reivindicaciones dependientes se exponen las realizaciones preferidas.

45 El analito puede ser cualquier molécula, complejo molecular, microbio, compuesto químico o material que pueda estar contenido en el medio líquido y que desplace el líquido cuando esté así contenido. Ejemplos de analitos incluyen bio-moléculas tales como proteínas, ADN, ARN o fragmentos o complejos de los mismos; enzimas, moléculas pequeñas, organismos, microbios tales como virus completos o rotos o bacterias; células completas o rotas de otras especies incluyendo seres humanos, compuestos químicos no biológicos tales como moléculas que sean armas químicas, explosivos, insecticidas, productos farmacéuticos y compuestos químicos industriales.

50 El líquido puede ser cualquier material fluido que incluya un centro con espín no cero. Sólo los centros con espín no cero dan lugar a los fenómenos de NMR. El líquido incluye dichos centros cuando las moléculas que comprenden el líquido comprenden un centro con espín no cero, tal como hidrógeno en la molécula de agua. Alternativamente, el líquido puede incluir dichos centros como solutos o suspensiones, tales como un soluto fluorado que genere señales de resonancia magnética a la frecuencia de Larmor de ^{19}F .

La intensidad o magnitud del campo magnético no uniforme varía por todo el volumen de muestra. Preferiblemente,

- el campo magnético presenta intensidad máxima en un pequeño subvolumen del volumen de muestra. El campo magnético genera una fuerza en las nanopartículas además de las fuerzas dipolo-dipolo mutuas entre nanopartículas, siendo la fuerza adicional tal como para sacar las nanopartículas hacia la región que tiene la magnitud más alta de campo magnético. Respondiendo a esa fuerza, las nanopartículas o binarios derivan hacia el subvolumen, aumentando enormemente de ese modo la concentración de las nanopartículas o binarios en ese subvolumen y agotando la concentración en el resto del volumen de muestra. Como muchas interacciones químicas presentan velocidades de reacción que dependen de la concentración de los agentes reaccionantes, las interacciones entre las nanopartículas o analitos o binarios se pueden acelerar en el subvolumen y se inhiben en el resto del volumen de muestra.
- Basándose en resultados experimentales y representación con modelo teórica, un cambio de T2 positivo es debido a que el analito desplaza moléculas de agua en la unión a las nanopartículas y el cambio de T2 negativo es debido a desfase repetido de moléculas de agua dentro de una estructura de jaula formada por múltiples nanopartículas. Además, el cambio de T2 positivo o negativo se puede activar por tratamiento y estequiometría. Por ejemplo, las relaciones de nanopartículas y el reactivo se pueden ajustar para proporcionar cambios de T2 negativos o positivos.
- En algunas circunstancias puede ser importante medir los efectos de T2 tanto negativos como positivos de manera que se detecte analito a pesar de que haya un interferente presente en la disolución de la muestra. Por ejemplo, una muestra de ensayo contaminada con un ión paramagnético, tal como ácido húmico con hierro quelado, causa una reducción en el T2 de la mezcla. Si la muestra contiene un analito mezclado con el ácido húmico, el analito se puede detectar a pesar del interferente de la siguiente manera. Primero, medir la muestra previamente a mezclar las nanopartículas, para generar un primer valor de medición de T2. Después, mezclar las nanopartículas en la disolución y realizar una segunda medición de T2, completando esa medición antes de que el analito haya tenido tiempo de interactuar con las nanopartículas. Después permitir que interaccione el analito con las nanopartículas y después medir T2 una tercera vez. La medición inicial revela la presencia del interferente ácido húmico a fin de que se puedan justificar los efectos de T2 resultantes. La segunda medición de T2, en comparación con el primer valor, proporciona una comprobación de que son correctos la concentración de nanopartículas y otros parámetros de mezcla. La tercera medición revela el analito como un cambio en T2 relativo a la segunda medición, siendo el cambio debido a las interacciones analito-nanopartícula.
- Alternativamente, en algunas circunstancias no se puede tomar una medición de referencia separada o no se puede conocer cuando el analito interactúa con las nanopartículas. Sin embargo muchos interferentes, incluyendo ácido húmico, causan un desplazamiento negativo en T2. En ese caso las nanopartículas se pueden mezclar de manera que se genere un desplazamiento positivo de T2 en la unión al analito. Cuando el desplazamiento de T2 positivo es mayor que el desplazamiento negativo del interferente, el analito se puede detectar así.
- Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, las reivindicaciones y los dibujos adjuntos.
- Breve descripción de los dibujos**
- Los detalles de la presente invención, tanto en cuanto a su estructura como operación, se pueden deducir en parte por estudio de los dibujos adjuntos, en que los números de referencia iguales se refieren a partes iguales y en que:
- La Figura 1 es una representación esquemática de una nanopartícula que muestra el campo magnético aplicado y el segundo campo magnético alrededor de la nanopartícula.
- La Figura 2 es un gráfico del campo magnético neto que rodea a la nanopartícula de la Figura 1.
- La Figura 3 es una representación gráfica de la magnitud del gradiente de campo magnético alrededor de la nanopartícula.
- La Figura 4 es una representación gráfica de la magnitud del gradiente de campo a lo largo del eje de la partícula.
- La Figura 5 es una representación esquemática de las fuerzas mutuas entre nanopartículas en un campo magnético.
- La Figura 6 es una representación esquemática de la formación de una estructura de cadena de nanopartículas y analito.
- La Figura 7 que es un diagrama de bloque funcional de un sistema de resonancia magnética.
- Las Figuras 8a-d son una representación de cuatro configuraciones de la antena.
- La Figura 9 es una representación esquemática de un imán.
- La Figura 10 es un diagrama de circuito de un oscilador amortiguado.
- La Figura 11 es una ilustración esquemática de una instalación que tiene un control y múltiples unidades sensoriales.

La Figura 12 es una representación esquemática de un sistema analizador adecuado para uso con un sistema HVAC.

La Figura 13 es una representación de un sistema de imán concentrador.

La Figura 14 es una representación de un sistema de imán concentrador alternativo.

5 La Figura 15 es un gráfico de datos de resonancia magnética con y sin tratamiento magnético.

Las Figuras 16a-e representan una realización de un sistema de instalación fija y tres tomas colectoras.

La Figura 17 es una vista en perspectiva frontal de un sistema portátil.

La Figura 18 es un diagrama de bloque de un sistema adaptado a una aplicación de diagnóstico médico.

Descripción detallada

10 Después de la lectura de esta descripción será evidente para un experto en la materia cómo poner en práctica la invención en diversas realizaciones alternativas y aplicaciones alternativas. Sin embargo, aunque se describirán diversas realizaciones de la presente invención en la presente memoria, se entiende que estas realizaciones se presentan a modo de ejemplo sólo y sin limitación. Como tal, esta descripción detallada de diversas realizaciones alternativas no se debería interpretar un límite al alcance o cobertura de la presente invención como se explica en las reivindicaciones adjuntas.

Resonancia magnética

Se proporciona en la presente memoria un breve resumen de los elementos técnicos usados en ciertas realizaciones. El analito o molécula diana está contenido en un medio, preferiblemente un líquido tal como agua, que incluye un centro atómico que tiene un espín no cero, tal como hidrógeno. Como se sabe, (véase por ejemplo, Pulse Methods in 1D & 2D Liquid -Phase NMR, Wallace S. Brey, Academic Press 1988), que el componente magnético de dicho centro llega a estar polarizado o espacialmente orientado en un campo magnético y se puede inducir a precesión de resonancia magnética a una frecuencia proporcionada por:

$$f_{\text{Larmor}} = \gamma B/2\pi$$

25 donde B es la intensidad del campo magnético en la posición del centro, γ es la relación magnetogirica del centro y f_{Larmor} es la frecuencia de resonancia o la frecuencia de Larmor ($\gamma = 2,675 \times 10^8 \text{ Tesla}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para el centro de hidrógeno). Los componentes magnéticos, o momentos magnéticos, de los centros son cantidades vectoriales y se suman para proporcionar un vector de magnetización volumétrica resultante esto es la señal de NMR medida por espectrómetros de NMR.

30 Después de una perturbación tal como la empleada en registrar señales de NMR (véase a continuación), el vector de magnetización volumétrica se recupera a su equilibrio original con el tiempo; este procedimiento se refiere como relajación magnética nuclear. Se usan dos constantes de tiempo fundamentales para describir esta relajación en términos de un procedimiento exponencial único. La recuperación de la magnetización volumétrica a lo largo de la dirección del primer campo magnético se describe por el tiempo de relajación espín-red o tiempo de relajación longitudinal, designado como T1. Típicamente, T1 es del orden de milisegundos a segundos. El decaimiento exponencial único de la magnetización volumétrica en el plano perpendicular a la dirección del primer campo magnético se describe por el tiempo de relajación espín-espín o tiempo de relajación transversal, designado como T2. Para señales líquidas, T2 está en general en el intervalo de 100 milisegundos o más. Las muestras sólidas por otra parte, presentan en general valores de T2 en el intervalo de 1 a 100 microsegundos.

40 Se realiza una medición de la resonancia magnética aplicando uno o más pulsos de energía de RF (radiofrecuencia) a la muestra y midiendo la magnetización volumétrica que llega a ser reorientada por el pulso. Los pulsos de RF presentan una frecuencia igual a la frecuencia de Larmor y duración suficiente para causar que el vector de magnetización volumétrica se reoriente en un plano perpendicular al primer campo magnético, donde el vector de magnetización volumétrica (la señal de NMR) se puede registrar con el tiempo. Los pulsos de RF por lo tanto, son normalmente múltiplos de 90 grados.

45 La relajación espín-espín se mide típicamente por una serie de pulsos de RF para dar lugar a señales de eco de espín. Se genera un eco de espín por un pulso de 90 grados seguido por un tiempo de decaimiento pequeño (típicamente designado como τ), seguido por un pulso de 180 grados ($90^\circ\text{-}\tau\text{-}180^\circ$). Un segundo τ , idéntico en tiempo al primero, se usa antes de que se registre el vector de magnetización volumétrica. La serie de pulsos de RF y tiempos de decaimiento se usa para primer desfase de los momentos magnéticos nucleares que comprenden la magnetización volumétrica en el plano perpendicular al primer campo magnético durante el primer τ , y volver a fijar la magnetización volumétrica restante en este plano durante el segundo τ . Esta última nueva fijación crea una señal de eco, que se puede registrar. El método más común para medir la relajación espín-espín es el descrito originalmente por Carr y Purcell (Carr, H. Y. y Purcell, E. M.: Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear

Magnetic Resonance Experiments, Physical Review 94, nº 3 (1954): 630-638), una modificación del método descrito anteriormente por Meiboom y Gill (Meiboom, S. y Gill, D.: Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times, The Review of Scientific Instruments 29, nº 8 (1958): 688-691). El método Meiboom-Gill modificado por Carr-Purcell (CPMG) usa una serie de pequeños decaimientos del tiempo seguido por pulsos de 180 grados después de la secuencia 90° - τ - 180° inicial descrita anteriormente. Esto a su vez va seguido por el vector de magnetización volumétrica resultante $[90_x^\circ - (-\tau - 180_y^\circ - \tau - \text{registro})_n]$. Las amplitudes de las señales de eco de espín son proporcionales a la magnetización volumétrica que queda en el momento del eco, que llega a ser sucesivamente más pequeña a medida que aumenta el número de secuencias (ya que el valor de n aumenta). Por lo tanto, medir la amplitud del vector de magnetización volumétrica después de diversos valores de n y fijar los datos a un solo decaimiento exponencial con T2 ya que el tiempo de relajación proporciona una medida directa de T2.

Campos de nanopartículas paramagnéticas

Se emplean nanopartículas para influir en el campo magnético en una región próxima a las nanopartículas. El núcleo paramagnético o superparamagnético de la nanopartícula llega a magnetizarse cuando se le aplica un campo magnético externo. El superparamagnetismo está relacionado con el ferromagnetismo en que el tamaño del cuerpo magnetizado es demasiado pequeño para formar un dominio magnético. El núcleo superparamagnético presenta un campo de alta permeabilidad y bastante alta saturación comparable a hierro, pero poca o ninguna histéresis ($H_c \sim 0$). Cuando se pone en un campo magnético, el núcleo llega a magnetizarse fuertemente paralelo a la dirección del campo aplicado. Cuando se retira el campo externo, el núcleo pierde esencialmente toda su magnetización. Sin tener en cuenta los efectos de anisotropía y forma, el momento magnético inducido del núcleo está proporcionado por:

$$m_{\text{núcleo}} = (4\pi/3) (r_{\text{núcleo}}^3) (\chi B_0)$$

donde $m_{\text{núcleo}}$ es el momento dipolar del núcleo, $r_{\text{núcleo}}$ es su radio, B_0 es el campo aplicado y χ es la susceptibilidad. Normalmente $\chi \approx 0$ para materiales no magnéticos, $\chi \gg 1$ para materiales superparamagnéticos cuando B_0 está por debajo de un campo de saturación, y $1 \leq \chi \leq 0$ para B_0 por encima de saturación. Por ejemplo, la magnetita (Fe_3O_4) es superparamagnética con una susceptibilidad de aproximadamente 1 para campos por debajo de saturación de aproximadamente 0,5 Tesla.

El núcleo magnetizado produce un campo magnético que normalmente se aproxima al campo del dipolo o el campo magnético producido por un dipolo magnético ideal situado en el centro del núcleo paramagnético de la nanopartícula. En posiciones fuera del núcleo de la nanopartícula, el campo magnético del dipolo se parametriza como sigue:

$$B_r = 2 m_{\text{núcleo}} \cos\theta / r^3$$

$$B_\theta = -m_{\text{núcleo}} \text{sen}\theta / r^3$$

Aquí B_r es el componente radial del campo dipolar, B_θ es el componente circunferencial, r es la distancia desde el centro del núcleo, θ es el ángulo polar relativo al campo aplicado y $m_{\text{núcleo}}$ es el momento dipolar.

El campo dipolar se suma linealmente al campo aplicado (como vectores), dando como resultado el campo magnético neto. La frecuencia de Larmor se determina por el campo magnético neto experimentado por el centro polarizado. Los componentes del campo del dipolo ortogonal al campo aplicado causan principalmente una rotación del campo, mientras los componentes dipolares paralelos al campo aplicado cambian directamente la magnitud del campo neto y por lo tanto cambian la frecuencia de Larmor, relativa al campo aplicado no distorsionado. El campo neto B_{neto} , sin tener en cuenta términos de segundo orden y para $r \gg r_{\text{núcleo}}$, es como sigue:

$$B_{\text{neto}} = B_0 (1 + 4\pi/3 (r_{\text{núcleo}}/r)^3 \chi (2 \cos^2 \theta - \text{sen}^2 \theta))$$

En algunas realizaciones, la magnitud del gradiente del campo magnético neto también es importante. El gradiente del campo se proporciona por:

$$\nabla B_{\text{neto}} = B_0 \chi 8\pi (r_{\text{núcleo}}^3/r^4) (-\{r\} \cos^2 \theta + \{\theta\} \cos \theta \text{sen} \theta)$$

donde las llaves indican vectores unitarios en las direcciones r o θ .

Difusión en un líquido

La invención hace uso de un medio líquido. El líquido contiene el analito y el centro que emite las señales de resonancia magnética. Esas señales están influenciadas por la difusión, en particular la difusión de las moléculas del líquido por el líquido o autodifusión molecular. La difusión se formula como sigue:

$$\sigma_{\text{trayecto}} = (2 D_{\text{molec}} t)^{1/2}$$

donde σ_{trayecto} es la distancia promedio recorrida en un trayecto aleatorio tridimensional isotrópico en el tiempo t y

D_{molec} es el coeficiente de difusión de desplazamiento. Por ejemplo, $D_{\text{molec}} = 1,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ para agua a temperatura ambiente.

5 Las mediciones de resonancia magnética también están influenciadas por difusión de espín, un fenómeno en que se intercambia el espín o la polarización de un centro con el de un centro cercano del mismo tipo. La difusión de espín puede distribuir efectos dependientes del espín, tales como despolarización, por toda la muestra. Por ejemplo, si una pequeña fracción de los núcleos de hidrógeno en agua experimenta una fuerza de despolarización, la difusión de espín puede causar que todo el hidrógeno en la muestra asuma un valor de polarización promediado.

Un modelo

10 Este modelo estudia las interacciones dependientes del espín entre nanopartículas y disolvente y proporciona un entramado útil para cuantificar los efectos de T2 observados. Se usa en algunas realizaciones como la base para análisis de medición y detección. Se asume que una nanopartícula simplificada consiste en un núcleo esférico de material superparamagnético, rodeado por una carcasa esférica de material no magnético, todo en agua. Sin embargo, el modelo puede aplicarse o modificarse para uso con nanopartículas de otras formas y para uso con otros disolventes. El modelo sugiere los siguientes mecanismos para los cambios de T2 observados:

15 1) Las nanopartículas en disolución reducen T2 relativo a agua. El modelo sugiere que la despolarización es debida a un campo magnético dipolar producido por el núcleo magnetizado. La distorsión del campo hace que los espines precedan a diferentes frecuencias, conduciendo a interferencia destructiva. Aunque CPMG normalmente se centra en los efectos de no uniformidad de campo estático, el movimiento Browniano de las moléculas de agua hace que entren y salgan de las distorsiones del campo en un tiempo más corto que el intervalo de eco, haciendo de ese modo la dispersión del espín dependiente del tiempo y destruyendo el efecto de centrarse de CPMG.

20 (2) Cuando las nanopartículas reaccionan con analito, pero no se aglomeran, el T2 aumenta. Esto puede ser debido a las moléculas de analito que ocupan parte de la región de campo distorsionado alrededor de la nanopartícula, excluyendo de ese modo agua de esa región, reduciendo así la dispersión del espín y aumentando T2. De manera similar, cuando se forman estructuras de tipo cadena o hilo de nanopartículas y analito, T2 aumenta. La formación de las cadenas se describe a continuación en relación al uso de campos magnéticos.

25 3) T2 disminuye cuando se aglomeran nanopartículas y analito. Esto puede ser debido a la formación de una estructura de tipo jaula llena de agua en que las moléculas de agua experimentan colisiones de dispersión de espín repetidas con las nanopartículas circundantes. La suficiente repetición de despolarización incrementada reduciría T2, a pesar de que el analito ocluya porciones de las regiones de campo no uniformes.

30 4) Un solo exponencial normalmente se ajusta a la curva de decaimiento de polarización. Esto es a pesar del hecho de que el hidrógeno próximo a las nanopartículas está fuertemente desfasado, mientras que el disolvente general sólo observa un campo uniforme, un sistema de dos poblaciones. Sin embargo, las poblaciones de espín se equilibran rápidamente por la muestra por difusión de espín vía interacciones *flip-flop* homonucleares, dando como resultado un T2 promedio único.

35 Se representa la nanopartícula modelo en sección transversal en la Figura 1 en presencia de un campo magnético aplicado indicado por la flecha 101. La nanopartícula comprende un núcleo 102 magnetizable, una carcasa 103 no magnética y moléculas 104 de unión. El núcleo 102 es preferiblemente paramagnético y más preferiblemente es superparamagnético. El campo 105 conformado por dipolo local inducido de la nanopartícula se representa por las líneas discontinuas. El radio del núcleo 102 debería ser suficientemente grande para producir una distorsión de campo magnético significativa en una región suficientemente grande para producir un cambio en T2 del líquido en esa región. El radio del núcleo 102 debería ser suficientemente pequeño para que el núcleo 102 no llegue a ser ferromagnético. Típicamente, el radio del núcleo es aproximadamente 1 a 20 nm. Las propiedades deseables del núcleo 102 incluyen alta susceptibilidad a la intensidad del campo magnético aplicado, campo de alta saturación preferiblemente en exceso de la intensidad de campo magnético aplicado, compatibilidad química con el medio líquido y campo remanente muy bajo. La última característica es deseable para evitar que las nanopartículas se agrupen entre sí debido a atracción magnética. El material del núcleo puede ser cualquier material magnetizable tal como óxido de hierro, cobalto y compuestos de níquel. Las nanopartículas pueden ser no tóxicas y biodegradables si se usa un núcleo de hierro. El núcleo está recubierto por una o más carcasas 103 de material no magnético, por ejemplo, dextrano o sílice. Los recubrimientos de sílice son estables y robustos y pueden evitar la necesidad de refrigeración. Se pueden considerar otros recubrimientos poliméricos tales como poliestireno, poli(ácido acrílico), poliacrilamida y alcohol polivinílico.

La magnitud del campo neto en la posición (r, θ) alrededor de la nanopartícula presenta variaciones tanto positivas como negativas relativas a un campo uniforme. Esto se muestra en el gráfico de la Figura 2.

55 Mientras el procedimiento de CPMG se centra en no uniformidades de campo estático, esas moléculas de agua que se desplazan de una región del campo a otra, en el tiempo entre pulsos de reorientación, no se reorientan y producen efectos de T2. Así, los cambios de T2 se refieren al gradiente del campo neto.

Para considerar un ejemplo específico, el núcleo es Fe_3O_4 , con un diámetro de 4-8 nm y el resto de la partícula es

una carcasa de dextrano, con un diámetro promedio de 50 nm. La susceptibilidad y campo de saturación dependen de la composición, estructura del cristal y diámetro del núcleo. Los valores del campo de saturación oscilan de 0,2 a 0,5 T y la susceptibilidad oscila de 0,2 a 2. Se preparó una simulación numérica usando saturación de 0,5 T y 0,5 para la susceptibilidad. El campo neto en las inmediaciones de esta nanopartícula se muestra en la Figura 2. Se observan mejoras de campo fuertes en los dos "polos" de la partícula, relativo a la reducción del campo alrededor del "ecuador". El campo dentro de la carcasa no tiene interés y no se calcula; se representa gráficamente como B_0 .

El gradiente de campo magnético se muestra en la Figuras 3 y 4. La Figura 3 es una representación gráfica de la magnitud del gradiente de campo alrededor de la nanopartícula. La Figura 4 es una representación gráfica de la magnitud del gradiente de campo a lo largo del eje de la partícula. De nuevo, no se analizan los campos dentro de la partícula.

Para un intervalo de eco de $T_{Eco} = 4$ ms, la distancia de trayecto promedio es aproximadamente 3,5 micrómetros. Esto es mucho mayor que la escala de longitud de las regiones de campo distorsionado; por lo tanto es seguro asumir que la molécula de agua tiene suficiente tiempo para entrar y salir de la región de campo distorsionado entre pulsos centrados.

El desfase de espín producido por la molécula de agua que pasa por la región de campo distorsionado se puede estimar como sigue. La frecuencia de precesión instantánea es proporcional al campo magnético neto en la posición de la molécula de agua. Por simplicidad se asume que la molécula se desplaza de manera aleatoria por la región de campo distorsionado de una nanopartícula, durante un intervalo de eco, que empieza y que termina en el disolvente exterior a la región de campo distorsionado. Así la trayectoria de la molécula empieza y termina en el campo aplicado de B_0 pero pasa por la región de campo distorsionado entre los ecos de CPMG. Mientras la molécula está dentro del campo distorsionado, acumula precesión extra comparado con moléculas en el resto del disolvente. Esa porción del avance de fase debido al campo B_0 se centra después como de costumbre por los 180 pulsos, pero la fase de precesión extra, acumulada durante el tiempo invertido en el campo distorsionado, no se centrará. El incremento de fase no centrada debido a recorrido a través de una distorsión del campo es la integral del campo experimentado por la partícula, menos que en el campo aplicado solo:

$$d_{fase} = \int \gamma (B_{net}(r) - B_0) dt$$

donde d_{fase} es la diferencia de fase acumulada entre un hidrógeno que pasa por B_{net} (aquí una función explícita de espacio) frente a un resto en el campo uniforme B_0 , γ es de nuevo el coeficiente de Larmor y la integral es sobre el tiempo entre pulsos centrados. Para obtener una estimación aproximada del desplazamiento de la fase, la ecuación previa se puede simplificar asumiendo que la molécula reside en un campo constante durante un tiempo necesario para difundirse por la región de campo distorsionado, dando como resultado la siguiente aproximación:

$$d_{fase} = [X_{dis}^2 / (2 D_{moléc})] [B_{net} - B_0] \gamma$$

Usando los supuestos tamaños de nanopartícula y campo discutidos anteriormente, el campo magnético neto se desvía del campo aplicado por típicamente 20 mT. Los espines dentro de ese campo rotarán aproximadamente 850 kHz más rápido que en el campo no distorsionado. Una escala de longitud típica para esta distorsión es $x_{dis} = 20$ nm. El tiempo requerido para difundir 20 nm es 133 ns. Durante ese tiempo, los espines rotan una $d_{fase} \text{ extra} = 0,1$ radianes. Esto representa un desfase sustancial en un solo intervalo de eco por un solo recorrido molecular a través, que si no se centra por CPMG dará como resultado un T2 corto. En la muestra, muchas moléculas de agua estarán interactuando con el campo no uniforme de manera continua y cada una experimentará un desplazamiento de fase positivo o negativo dependiendo de la ruta específica. En el conjunto, la dispersión de espines extra causa interferencia destructiva y despolarización total.

El coeficiente de difusión de espín en agua está en el intervalo de $D_{espín} \approx 10^{-15}$ a 10^{-16} m²/s, dependiendo de la temperatura y otros factores. Aunque la difusión de espín es más lenta que la difusión molecular, es suficiente para extender la despolarización entre muchas moléculas de agua en unos ms. Curiosamente, las velocidades de difusión de espín en estado sólido tienden a ser mucho mayores, del orden de 10^{-9} m²/s que es comparable a la difusión molecular en agua libre. Si la carcasa presenta rápida difusión de espín, puede servir como un conducto para distribuir polarización entre todas las moléculas de agua que se ponen en contacto con la superficie de la nanopartícula.

Diversos experimentos han demostrado un incremento de T2 de 20 a 200 ms. El modelo sugiere que esto es debido a las moléculas de analito que obstruyen la superficie de la nanopartícula, evitando de manera eficaz que las moléculas de agua muestreen las regiones de campo distorsionado en la superficie de la nanopartícula.

Cuando las moléculas de analito se unen a la superficie de una nanopartícula, una porción de la superficie se ocluye. La velocidad de despolarización global disminuye y T2 aumenta. El cambio en la velocidad de decaimiento es aproximadamente proporcional a la fracción del volumen de campo distorsionado ocupado por el analito. Si se unen múltiples moléculas de analito, todas contribuyen a un cambio de T2 similar de promedio. Si el analito invierte sólo parte de su tiempo cubriendo la superficie de la nanopartícula, entonces el cambio de T2 se realiza a escala de manera proporcional.

También se puede observar una disminución en T2 por cambio de la relación de las nanopartículas a anticuerpos. Aquí anticuerpo se usa como un ejemplo de la conexión al analito. Esto se define como control estequiométrico. Dependiendo del nivel de detección de analito se puede ajustar la estequiometría para permitir la rápida detección de analito.

5 Los reactivos y las condiciones del tratamiento se pueden ajustar para causar una disminución en T2. La formación de agregados extendidos de nanopartículas y analitos está correlacionada con dicha disminución de T2. El modelo plantea que los agregados son estructuras de tipo jaula, abiertas, por las que las moléculas de agua pueden pasar fácilmente. Esto no se explica en estudios previos. En una realización, la información de espines se difunde dentro y fuera de la estructura del aglomerado rápidamente, a fin de que la despolarización que tiene lugar dentro de la jaula se equilibre por toda la muestra.

10 El modelo sugiere que la disminución de T2 para los aglomerados es debida a desfase repetido cuando las moléculas de agua dentro de la jaula encuentran repetidamente campos despolarizantes. Dicho desfase repetido representa un sumidero de polarización más eficaz que las nanopartículas aisladas en el líquido libre debido a que la molécula de agua en la jaula queda cerca de numerosas superficies de nanopartícula. Mientras las porciones de los volúmenes de campo distorsionado de la nanopartícula están ocluidas por analito, la molécula de agua podría invertir una fracción significativa de su tiempo muestreando campos que difieren del campo principal y así llegaría a estar totalmente desfasado en un tiempo corto comparado con el intervalo de eco. Después, por polarización límite con moléculas vecinas incluyendo aquéllas fuera del aglomerado, resultaría un T2 uniformemente reducido.

15 El modelo presenta utilidad debido a que conduce a nuevas mediciones y nuevas maneras de realización de mediciones referidas a analito en la muestra. El modelo explica cómo las interacciones del analito con nanopartículas producen tanto aumentos como disminuciones en T2 y sugiere maneras para controlar los efectos por ajuste de concentraciones de reactivo. Observando que la velocidad de detección es un parámetro crítico para muchas aplicaciones, el modelo sugiere que el método de aumento de T2 debido a la unión analito-nanopartícula proporcionará las señales más rápido que la disminución de T2 a partir de agregación, debido a que la unión debe tener lugar antes de las aglomeraciones. El modelo también guía el desarrollo de nanopartículas más sensibles usando material de núcleo de mayor susceptibilidad y carcasas no magnéticas más delgadas. El modelo también conduce a etapas para anular errores sistemáticos, tal como midiendo el T2 de la disolución de nanopartículas y la muestra por separado, antes de mezclar, para cuantificar mejor cualquier cambio en T2 a partir de la unión. El modelo también explica cómo participan los efectos térmicos y los efectos de difusión y se puede aprovechar para acelerar la detección o confirmar reacciones del analito. El modelo también guía el desarrollo de productos que aprovechan los métodos inventivos por cuantificación de la señal y ruido frente a tamaño de la muestra y otros parámetros de diseño.

Descripción del método

35 La preparación de la mezcla de muestras líquidas puede incluir el uso de un líquido que contenga un átomo con un núcleo con espín no cero. Los átomos pueden ser una parte intrínseca del líquido o se pueden añadir como soluto. La etapa de preparar una muestra líquida puede incluir mezclar o agitar para asegurar que el analito alcanza las nanopartículas. La mezcla se puede conseguir de numerosas maneras, incluyendo conducir los fluidos de la muestra por conductos retorcidos usando una bomba y dicho movimiento puede ser unidireccional o recíproco para producir el nivel deseado de mezclamiento. Alternativamente, las nanopartículas y el analito pueden estar contenidos en el mismo tipo de líquido, a fin de que cuando las nanopartículas y el analito se pongan en el mismo envase, lleguen a mezclarse espontáneamente sin la necesidad de agitación física. Por ejemplo, las nanopartículas y el material de muestra se pueden disolver en agua y después entremezclar por difusión en el contenedor de medición. La mezcla por sí sola también se puede disponer por uso de disolventes muy miscibles, tales como alcohol y agua, para los diversos ingredientes.

40 El método también puede incluir usar un campo magnético para mejorar las reacciones entre las nanopartículas y el analito. El campo magnético para mejorar las reacciones puede ser el mismo campo que el usado para mediciones de resonancia magnética o los dos campos magnéticos pueden ser diferentes. Las etapas de un método para mejorar las reacciones entre las nanopartículas y el analito son: (1) poner el analito y las nanopartículas en un medio fluido y dejar que las nanopartículas se unan al analito para formar complejos; (2) aplicar un campo magnético a los complejos, magnetizando de ese modo las nanopartículas; (3) después dejar que el campo magnético ejerza fuerzas sobre las nanopartículas y dejar que las nanopartículas magnetizadas ejerzan fuerzas magnéticas entre sí y (4) dejar que los complejos se muevan respondiendo a esas fuerzas. Según la invención, el campo magnético aplicado no es uniforme a fin de que los complejos sean extraídos a una región donde el campo magnético sea el más fuerte y se concentren en esa región. Las interacciones se aceleran entonces debido a la concentración aumentada de los complejos.

55 En diferentes realizaciones, las etapas (1), (2) y (3) tienen lugar en diversos órdenes y de manera simultánea. Las nanopartículas y el analito se pueden poner primero en un medio fluido y después se unen con el analito para formar complejos o los complejos se pueden formar en otro sitio y después se añaden al medio fluido. La unión de los agentes reaccionantes a nanopartículas puede ser cualquier asociación suficientemente fuerte a fin de que el agente reaccionante se pueda transportar junto con la nanopartícula cuando la nanopartícula se mueva por el medio fluido

bajo la influencia de fuerzas magnéticas. El campo magnético se puede aplicar antes o después de que el analito se una a las nanopartículas. Este método también se puede combinar con la mezcla y/o ciclación de la temperatura descrita.

5 El campo magnético para mejorar las reacciones puede ser un campo altamente no uniforme y puede presentar una forma o dirección particular y se puede generar por medios externos y se pueden generar o conformar en cooperación con los agentes reaccionantes o las nanopartículas o perlas paramagnéticas otras entidades magnéticas. El campo magnético para mejorar las reacciones se puede generar por electroimanes, imanes permanentes, imanes superconductores o cualquier fuente de campo magnético. La intensidad del campo magnético es suficiente para magnetizar las nanopartículas, que normalmente cae en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 10 20 Tesla. El campo puede estar todo el tiempo, como con un imán permanente o puede ser transitorio, como con un electroimán pulsado. La magnetización de las nanopartículas es esencialmente instantánea cuando entran en el campo magnético.

15 El campo magnético es producido por un imán, que puede ser un electroimán, un imán permanente, un imán superconductor o cualquier otra fuente de campo magnético. El tipo de imán preferido depende del tamaño de la muestra. Para pequeños volúmenes de muestra del orden de 1 mililitro o menos, se prefieren imanes permanentes debido a que no requieren energía eléctrica, no generan calor óhmico y no requieren un criostato. Una amplia variedad de formas de imán permanente fuertes están disponibles, incluyendo NdFeB (neodimio hierro boro) cuya forma proporciona una intensidad (producto de energía de campo) de 239 a 438 kJ/m³ (30 a 55 MGOe) a coste moderado. Cuando se monta en un circuito magnético adecuado, estos imanes permanentes son capaces de 20 generar campos que exceden del campo de saturación de la ferrita, que es el componente paramagnético en muchas nanopartículas y de producir fuertes gradientes de campo de 1 Tesla/cm o mayor. Dichos campos y gradientes de campo son suficientes para muchas aplicaciones de separación magnética incluyendo concentración de nanopartículas, magnetización de perlas paramagnéticas y formación de cadenas.

25 En la etapa (3), el campo magnético para mejorar las reacciones ejerce fuerzas sobre las nanopartículas, no es uniforme y las impulsa en la dirección de aumentar la intensidad del campo. Las nanopartículas ejercen fuerzas entre sí, impulsando las nanopartículas vecinas a alineación con el campo magnético aplicado, extrayéndolas juntas cuando se alinean así y repeliéndolas cuando se colocan perpendiculares al campo. Las diversas fuerzas tienen lugar de manera continua y esencialmente instantáneamente.

30 En la etapa (4) el analito y las nanopartículas se mueven del mismo modo debido a que están suficientemente fuertemente unidas, que las fuerzas magnéticas no separan el analito. Con frecuencia el movimiento neto es para llevar los analitos más próximos juntos, activando de ese modo las interacciones entre ellos. Ese es el caso cuando el campo aplicado no es uniforme, concentrando así los complejos en la región de campo más fuerte. Por ejemplo, si el campo magnético no uniforme extrae los complejos a un sub-volumen que comprende un décimo del volumen de la mezcla inicial, entonces la distancia promedio entre agentes reaccionantes se reduce por un factor de 2,16 que, 35 para procedimientos limitados por difusión, aumenta la velocidad de reacción por un factor de 4,7. El efecto neto de fuerzas magnéticas mutuas entre nanopartículas es también principalmente para hacer que los complejos se unan, cuando los complejos están libres para moverse, debido a que esas fuerzas primero realinean los complejos con el campo y después los extrae juntos.

40 Si el campo magnético de las etapas (3) y (4) es sustancialmente uniforme (que no es una realización de la invención), las nanopartículas ejercen fuerzas magnéticas mutuas entre sí, debido a los campos magnéticos conformados por dipolos generados por los núcleos magnetizados de las nanopartículas. Estas fuerzas dipolo-dipolo hacen que las nanopartículas se muevan de diversas formas y los movimientos influyen en las interacciones de las nanopartículas y de los analitos unidos. Las fuerzas entre nanopartículas magnetizadas se ilustran en la Figura 5. La dirección del campo magnético aplicado para activar las reacciones se proporciona por la flecha 501. Se muestra 45 una nanopartícula 502 particular y nanopartículas 503, 504 y 505 vecinas. Todas las nanopartículas en la Figura 5 se magnetizan en la misma dirección, como se indica por las pequeñas flechas blancas. Las nanopartículas 502 y 503 se alinean con el campo aplicado y así se atraen entre sí. La fuerza ejercida sobre la nanopartícula 503 por la nanopartícula 502 se muestra por una flecha 506 gris, que señala a la nanopartícula 502 que significa que la nanopartícula 503 es atraída hacia la nanopartícula 502. Una fuerza igual opuesta ejerce sobre la nanopartícula 502, 50 pero para claridad gráfica no se muestra.

También en la Figura 5, otra nanopartícula 504 está en alineación paralela con 502 pero en el otro lado de la nanopartícula 502. La nanopartícula 504 también es atraída hacia 502 como se muestra por la flecha 507.

55 La nanopartícula 505 está orientada de manera perpendicular respecto a 502 y el campo. Igualmente, la fuerza dipolo-dipolo ejercida sobre 505 es repulsiva, como se muestra por la flecha 508. No se muestran fuerzas adicionales que ejerzan las nanopartículas 503, 504 y 505 periféricas entre sí. En la mezcla real, todas las nanopartículas ejercen fuerzas entre sí de manera continua.

Las fuerzas dipolo-dipolo tienden a producir estructuras de tipo cadena lineal. Como ejemplo, las nanopartículas pueden incluir un medio de unión representado como A con la nanopartícula representada como N. El medio de unión representado por A puede ser policlonal o puede unirse a múltiples nanopartículas. De acuerdo con esto, en la

etapa (1) los agentes reaccionantes se unen a nanopartículas formando complejos simbolizados como A-N. Después las interacciones de la etapa (4) pueden producir estructuras de la forma N-A-A-N cuando los agentes reaccionantes se unen como parejas idénticas o de la forma N-A-N-A cuando los agentes reaccionantes se unen a una nanopartícula. Además se pueden añadir complejos para formar cadenas largas en cualquier supuesto. Alternativamente, dos diferentes medios de unión de tipo A (una sonda 3') y C (una sonda 5') se pueden unir a la misma nanopartícula. Después los complejos son de la forma C-N-A-B y las cadenas son después de la forma C-N-A-B-C-N-A-B-C-N-A-B-C-N.

La Figura 6 es una representación esquemática de la formación de una estructura de cadena de nanopartículas y analito. La estructura de la cadena del ejemplo representada en la Figura 6 se puede formar usando los métodos y sistemas descritos anteriormente con un campo uniforme o no uniforme. El tipo de formación de cadenas formado depende del tipo de nanopartícula empleado. Una nanopartícula 601 y un analito 602 están en un campo magnético con una dirección indicada por la flecha 603. La nanopartícula 601 es del tipo que se puede unir a múltiples agentes reaccionantes, esto es, por ejemplo, una nanopartícula policlonal. El analito 602 es del tipo que puede formar uniones a múltiples nanopartículas. Un ejemplo es la proteína G que se puede unir a dos nanopartículas tratadas para recibir dichos agentes reaccionantes. En la etapa (1) se unen la nanopartícula 601 y el agente reaccionante 602, por ejemplo por la mezcla de proteína G con nanopartículas adecuadas en agua e incubándolas durante 4 horas a 37°C. Esto produce un complejo 604 nanopartícula-agente reaccionante. Muchos de esos complejos se unen en el campo 603 magnético y forman una cadena 605 del tipo general N-A-N-A-N-A-N etc.

El método también puede incluir ciclación de la temperatura en la que una muestra se puede calentar o enfriar en una posición fijada o la muestra se puede mover entre posiciones mantenidas a temperaturas altas o bajas. El método puede incluir tomar mediciones antes, durante y después de que cambie dicha temperatura. Por ejemplo, se puede tomar una medición para T2 inmediatamente en la mezcla de la muestra y de nuevo después de un periodo de calentamiento y enfriamiento cuando la muestra llega a la temperatura de equilibrio. La comparación de los valores de T2 antes y después de tratamiento térmico revelará reacciones, tal como unión de analito a nanopartículas, que tiene lugar durante el tratamiento térmico.

El método puede incluir las etapas de cambiar la temperatura de la muestra y medir después el parámetro T2. La temperatura afecta a las interacciones de las nanopartículas y la medición de la resonancia magnética. La unión selectiva entre el analito y las moléculas de afinidad sobre las nanopartículas se puede acelerar por elevación de la temperatura, en particular para reacciones limitadas por difusión. Así el método puede incluir medir el T2 de una mezcla de nanopartículas y desconocidos dentro del líquido a una primera temperatura, preferiblemente una temperatura suficientemente baja para que el analito no haya reaccionado con las nanopartículas cuando se hace la medición. El método puede incluir después la etapa de calentar la muestra a una segunda temperatura suficiente para activar las interacciones analito-nanopartícula. El método puede incluir medir el T2 a la segunda temperatura para observar los efectos de la unión. El método puede incluir un cambio de temperatura más, tal que vuelva a la primera temperatura y mediciones de T2 adicionales para confirmar que el T2 de la muestra después de los diversos cambios de temperatura difiere del T2 de la muestra antes de que cambie la temperatura. Las etapas proporcionan muchas ventajas, incluyendo discriminación mejorada contra interferentes, demostración de que el cambio de T2 se debe a unión específica del analito y una comprobación para errores instrumentales.

El método puede incluir calentamiento de la muestra a una temperatura suficiente para romper las agregaciones de analito-nanopartícula, produciéndose así una disolución de binarios analito-nanopartícula, con un correspondiente cambio de T2. La temperatura se puede elevar además hasta que el analito se separa de las nanopartículas, liberándose así de nuevo analito a la disolución y causando un cambio más de T2. La temperatura se puede disminuir después hasta que se restablece la unión o agregación, con el correspondiente restablecimiento de T2 al valor anterior. Este comportamiento en T2 frente a la temperatura discriminaría enormemente contra interferentes o errores instrumentales y confirmaría la presencia de analito.

El método puede incluir la etapa de medir el T2 del material de la muestra previamente a la mezcla con nanopartículas. Esto revelaría un material de muestra que causa un desplazamiento en T2, tal como una disolución de alta viscosidad o hierro quelado en la muestra. Cuando el material de la muestra causa sólo un pequeño desplazamiento de T2, la medición puede transcurrir como siempre, pero en el análisis el T2 de la muestra tratada se puede comparar al observado inicialmente en la muestra sin tratar para determinar si está presente analito. Cuando la muestra produce un desplazamiento de T2 grande, puede ser ventajoso diluir la muestra hasta que sus efectos sean suficientemente bajos para permitir las mediciones de resonancia magnética. El analito en la muestra diluida se puede detectar después como se describe. Cuando la muestra produce dicho desplazamiento de T2 grande esas mediciones de resonancia magnética están prohibidas, la invención puede señalar esa muestra como no ensayable evitándose de ese modo una falsa alarma o se puede archivar la muestra para análisis adicional.

El método puede incluir la preparación de un campo magnético de una manera particular. El campo puede ser preparado generando primero un primer campo magnético sustancialmente uniforme con suficiente intensidad para permitir mediciones de resonancia magnética y perturbar después ese campo localmente para producir un segundo campo magnético, distinto del primero, dentro de una región especial. El segundo campo es distinto del primero cuando las señales de resonancia magnética del líquido fuera de la región especial están influenciadas por o se pueden distinguir de las señales del líquido en el interior de la región especial. Por ejemplo, el segundo campo se

5 puede crear por la mezcla o disolución de partículas paramagnéticas, por ejemplo, esas nanopartículas descritas anteriormente, en el líquido. Las nanopartículas generan después espontáneamente el segundo campo magnético, en una región próxima exterior a las nanopartículas, como resultado de magnetización de las nanopartículas por el primer campo magnético. Alternativamente, los iones paramagnéticos tales como hierro quelado o gadolinio se podían emplear en vez de nanopartículas. Una ventaja de esta propuesta es que las velocidades de reacción limitadas por difusión se pueden aumentar debido a la mayor movilidad de quelatos de iones de metal. Se usan iones similares en Resonancia Magnética Nuclear (Gd-DTPA y Gd-DOTA.).

10 Mantener el analito dentro de la región especial se puede llevar a cabo haciendo reaccionar o uniendo o atrayendo de otro modo el analito a una superficie material o molécula por la que el analito tenga una afinidad particular. Dicho mantenimiento se puede llevar a cabo por enlaces de hidrógeno, fuerzas iónicas, enlaces covalentes, fuerzas de van der Waals, fuerzas electrostáticas o cualquier otro tipo de unión molecular o material. Por ejemplo, el mecanismo de mantenimiento puede ser un anticuerpo producido contra una proteína de analito o ADN complementario a secuencias de ADN de analito y puede incluir cualquier superficie material o molécula por la que el analito presenta una afinidad. Preferiblemente, el mecanismo de mantenimiento también presenta afinidad nula o afinidad negativa para todos los solutos distintos del analito que pueden estar presentes. Preferiblemente, el mecanismo de mantenimiento se asegura próximo a la región especial, a fin de que el analito se soporte dentro de la región especial. Por ejemplo, cuando la región especial es exterior a una nanopartícula, se pueden unir anticuerpos al analito o los otros mecanismos de mantenimiento mencionados anteriormente, a la superficie de la nanopartícula, a fin de que el analito se soporte adyacente a la nanopartícula dentro de esa región y se excluya el líquido. 20 Opcionalmente, la nanopartícula puede incluir múltiples anticuerpos o ADN complementario u otros agentes de unión de manera que interactúe con una serie de analitos diferentes, pero seleccionados. Por ejemplo, la nanopartícula se puede dotar de ADN complementario para ántrax, anticuerpos para ricina y secuencias de ADN complementario para viruela, permitiendo de ese modo la detección de cualquiera de estos analitos en una sola mezcla.

25 Las mediciones de resonancia magnética y el análisis para determinar si el analito ocupa la región especial pueden incluir analizar las señales de resonancia magnética por análisis espectral para buscar un componente de frecuencia característico de la región especial. Ese componente de frecuencia, si hay, indica que el líquido está en la región especial y por lo tanto el analito no está presente. Alternativamente, la etapa podía incluir aplicar el procedimiento CPMG y analizar las señales para determinar el T2 del líquido. La distribución de T2 puede ser un solo componente exponencial o puede incluir una multitud de componentes, dependiendo de la velocidad de difusión de espín. En cualquier caso, sin embargo, un T2 que es mayor que el T2 del caso de referencia (líquido con las nanopartículas y no analito) indica la presencia del analito. 30

Una variación del método incluye formar un agregado que comprende una pluralidad de entidades de analito. Después, una reducción en T2 (comparado con los valores de referencia) indica la presencia del analito. Por ejemplo, un agregado de nanopartículas con mecanismos de unión y moléculas de analito se puede formar cuando tanto las nanopartículas como las moléculas de analito presentan múltiples puntos de unión. Como la agregación da como resultado una disminución en T2, mientras la unión de analito a nanopartículas da como resultado un aumento en T2, es importante calibrar previamente las señales, a fin de que se conozca con antelación la señal esperada de cambio de T2. Se puede ajustar la estequiometría de las nanopartículas para evitar la aglomeración o causar aglomeración dependiendo del procedimiento de medición que se tenga que usar. 35

40 En una realización, el analito causa que las nanopartículas formen agregados extendidos. Se usan filtros de membrana para separar esos agregados del medio líquido. El tamaño de poro del filtro es preferiblemente mayor que el tamaño de las nanopartículas o del analito, pero más pequeño que los agregados. Cuando se filtra una muestra aglomerada, el líquido filtrado presenta una concentración reducida de tanto nanopartículas como analito, que son así enormemente concentradas como una torta de masa filtrante. Cuando se desean medios de análisis secundarios, por ejemplo para confirmar la detección de un microbio, la torta de masa filtrante se usa para ese análisis secundario. Asimismo, el líquido filtrado se puede volver a medir usando el sistema inventivo como una comprobación adicional, puesto que el T2 del líquido filtrado debería ser mucho mayor que de la disolución de nanopartículas inicial cuando se ha filtrado la mayoría de las nanopartículas. 45

50 El método puede incluir las etapas de: medir el valor de T2 de un patrón. Aquí un patrón es cualquier material que presenta un T2 conocido. Preferiblemente, el T2 del patrón es invariable en el tiempo y es conocido a partir de previas mediciones de calibración. Por ejemplo el patrón puede ser una disolución de nanopartículas o de sulfato de cobre con una concentración ajustada para proporcionar un valor particular de T2. Los patrones permiten detección y corrección de derivas de instrumentación. El patrón puede ser un líquido que no es una disolución, tal como un aceite seleccionado para tener un T2 en el intervalo deseado. El patrón se puede disponer para que tenga un T2 sustancialmente igual al de una muestra exenta de analito, en cuyo caso se denomina un comparador negativo. El patrón puede presentar un T2 próximo al producido por el analito, un comparador positivo. El método puede incluir medir el T2 de múltiples patrones con diferentes valores de T2. 55

60 El método puede incluir la etapa de ensayar un control positivo y/o uno negativo. Un control positivo puede ser un analito benigno, tal como bacillus subtilis junto con nanopartículas sensibles a él. El control positivo se puede analizar en cualquier momento y se debería detectar de la misma manera que un analito de riesgo. Preferiblemente el cambio de T2 producido por el control positivo es conocido a partir de calibración previa y ensayar el control

positivo siempre debería producir el cambio de T2 esperado y el fracaso en hacerlo así revelaría un fallo en el sistema. Un control negativo es un analito benigno junto con nanopartículas sensibilizadas a algunos otros materiales, por ejemplo bacillus subtilis combinado con nanopartículas sensibilizadas a ántrax. El control negativo nunca debería producir un cambio de T2 debido a que el analito y las nanopartículas no se acoplan. Si un control negativo produce un cambio de T2, revelaría un fallo del sistema. Una ventaja de realizar controles positivos y negativos es que la completa recogida de muestras, fluidos, tratamiento de muestras y fases de detección se ensayan de manera realista. Por comparación, los patrones comparadores positivos y negativos discutidos en párrafo anterior ensayan sólo la porción de resonancia magnética del sistema, no las fases de tratamiento de la muestra.

El método puede incluir las etapas de producir tanto un aumento como una disminución en T2 de la muestra. El aumento o disminución en T2 depende de las propiedades de las nanopartículas, relaciones de otros reactivos tales como anticuerpos y de otros parámetros del procedimiento. Así se puede ensayar en una muestra un aumento de T2 usando etapas del procedimiento para generar un aumento de T2 cuando hay analito y después se puede ensayar en la misma muestra una disminución de T2 por adición de los ingredientes o etapas del procedimiento que producen una disminución de T2. La observación de los valores de T2 tanto aumentando como disminuyendo mejoraría la fiabilidad del análisis y reduciría la tasa de falsas alarmas. Alternativamente, se pueden tratar dos alícuotas extraídas de la misma muestra para generar un aumento de T2 en una y una disminución en la otra.

Los interferentes son materiales que, si hay en una muestra, causan un cambio en T2 que simula el del analito diana. La mayoría de los interferentes produce un T2 más pequeño, incluyendo los materiales que contienen hierro quelado y los materiales que causan un aumento en la viscosidad del líquido. Así los efectos de analito e interferentes se pueden discriminar por tratamiento de la muestra a fin de que el analito produzca un aumento de T2. Para discriminación analito-interferente incluso mayor, se pueden disponer tanto aumentos como disminuciones en T2, por tratamiento secuencial de la misma muestra o por comparación de alícuotas paralelas.

El método puede incluir la etapa de medir el T2 de una mezcla de nanopartículas previamente a añadir el material de la muestra a esa mezcla. La ventaja de esta etapa es que cualquier error en la concentración o propiedades de las nanopartículas se revelaría antes de que se usara el material de la muestra. Si la disolución de nanopartículas presenta un valor inesperado de T2 (por ejemplo debido a una concentración de nanopartículas alta o baja de un error de medición) entonces se puede descargar la disolución de nanopartículas y se puede preparar una nueva disolución de nanopartículas. Si la disolución de nanopartículas presenta un valor de T2 próximo al esperado, entonces se puede emplear la disolución de nanopartículas. Preferiblemente, el valor de T2 medido se usa después en el análisis para comparación contra el T2 de la muestra mezclada y hecha reaccionar, negando de ese modo los errores debidos a concentración de nanopartículas y mejorando también la reproducibilidad.

El método puede incluir las etapas de mezclar el material de la muestra y nanopartículas en el líquido, midiendo después el T2 de la mezcla, activando después las reacciones entre analito y nanopartículas y midiendo después el T2 después de dichas reacciones. Por ejemplo, la muestra se puede agitar o calentar para activar las reacciones. La mezcla y calentamiento simultáneos se pueden usar para acelerar las reacciones. La comparación del T2 de la mezcla antes y después de las reacciones revela el analito. Una ventaja de estas etapas es que cualquier error en los volúmenes de muestra y nanopartículas se detectaría y se negaría.

En una realización en general no se requieren compuestos químicos peligrosos. Por ejemplo, se pueden ensayar analitos usando sólo agua, sales, nanopartículas y reactivos proteínicos inofensivos tales como anticuerpos.

Descripción del sistema

Un sistema que puede realizar o poner en práctica las técnicas de medición o detección descritas anteriormente se describirá ahora con referencia a la Figura 7, que es un diagrama de bloques funcional de un sistema de resonancia magnética en general indicado como 700. El sistema incluye imán o sistema 712 de imanes. En una realización, el imán 712 es un imán permanente configurado para producir un campo magnético de 0,5 Tesla con 0,01% de uniformidad dentro de un área de muestra o volumen 714 de 1 ml. Alternativamente, el sistema de imán puede incluir un electroimán, un arrollamiento superconductor o cualquier otra fuente de campo magnético. Un arrollamiento o antena 716 se sitúa adyacente al volumen de muestra. En una realización, el arrollamiento circunda el volumen 714 de muestra. Se acopla un generador 718 de pulsos al arrollamiento 716 para proporcionar pulsos electromagnéticos a la frecuencia de Larmor deseada para el volumen 714 de muestra. Se puede poner un amplificador 719 entre el generador de pulsos y la antena para amplificar la señal del generador de pulsos. También se acopla un receptor 720 al arrollamiento 716 de manera que se reciban señales recogidas por el arrollamiento. Se puede poner un preamplificador 721 entre el receptor y la antena para amplificar las señales de la antena. El receptor 720 convierte las señales recibidas en una forma digital. Un control 722 está en comunicación con el generador 718 de pulsos y el receptor 720. El control controla la operación del receptor y el generador de pulsos. El control también recibe las señales recibidas por el receptor después de que se hayan convertido en la forma digital. El control 722 puede ser un procesador de fines generales, un procesador de señales digitales (DSP), un circuito integrado específico de la aplicación (ASIC), una matriz de puertas programable de campo (FPGA) (todos por sus siglas en inglés) u otro dispositivo lógico programable, puerta discreta o componentes de soporte físico discretos, lógicos de transistor o cualquier combinación de los mismos diseñada para realizar las funciones descritas en la presente memoria.

Alternativamente, las funciones del control , generador de pulsos, receptor e interfaz de usuario se pueden combinar en una sola unidad tal como un ASIC o FPGA o una placa que integra dichos circuitos. Se acopla un sistema 724 de interfaz de usuario con el control 722. El sistema 724 de interfaz de usuario proporciona un mecanismo para interacción entre un usuario y el sistema 700. El sistema de interfaz puede incluir, por ejemplo, una pantalla tal como una pantalla de cristal líquido, luces indicadoras, un teclado, un ratón, una salida de audio, un micrófono, sensores o una pantalla táctil.

Se proporciona un imán 704 de concentración que incluye una pieza 705 polar de concentración de campo fabricada en, por ejemplo, acero. El imán 704 puede ser un imán NdFeB permanente y se magnetiza como se indica por la flecha 706 blanca. El imán 704 y la pieza 705 polar producen un campo magnético que pasa por el volumen 714 de la muestra. La forma de la pieza 705 polar se selecciona a fin de que el campo magnético sea altamente no uniforme y produzca un fuerte gradiente por todo el volumen 714 de la muestra. La región donde el campo magnético es el más fuerte en el volumen de la muestra es en la región más próxima a la pieza 705 polar. El imán 704 de concentración se puede montar dentro del imán 712 o puede comprender una porción del imán 712. Por ejemplo, el imán 712 puede producir un campo magnético uniforme en una primera región y un campo no uniforme en una segunda región. Después la muestra se puede mover entre las regiones del imán 712 para realizar diferentes tareas. Por ejemplo la muestra se puede mover de manera que se concentren agentes reaccionantes usando la región de campo no uniforme y después se mueve a la región de campo uniforme para mediciones.

Alternativamente, el imán de concentración se puede situar lejos del imán 712. En esa realización, la muestra se puede exponer al campo del imán de concentración y después se puede poner en el arrollamiento 716.

En una realización, el gradiente de campo producido por el imán de concentración actúa sobre la magnetización de los complejos (analito más nanopartícula) para extraerlos a un sub-volumen del volumen de muestra. En ese sub-volumen, la concentración local de complejos aumenta y continúa aumentando ya que los complejos adicionales continúan llegando del resto de la muestra. Para reacciones que están limitadas por difusión de los agentes reaccionantes, aumentar la concentración de los agentes reaccionantes reduce la distancia de difusión promedio entre parejas de agentes reaccionantes y acelera la velocidad de reacción igualmente. Para las reacciones limitadas por una barrera de reacción, la velocidad de reacción aumenta debido a fuerzas magnéticas atractivas entre los complejos.

El arrollamiento de RF se puede fabricar suficientemente pequeño para examinar volúmenes de tamaño de microlitro. El arrollamiento se puede fabricar suficientemente grande para tener cabida para litros de muestra. Las Figuras 8a-d son una representación de cuatro configuraciones de la antena, cada una en vista en perspectiva. En la parte a de la figura, se muestra un arrollamiento solenoidal con una densidad de los devanados que es constante a lo largo de la longitud del arrollamiento. La muestra se pone dentro del arrollamiento para medición. El arrollamiento actúa como una antena para acoplar energía de RF en los núcleos de la muestra y también para acoplar la señal de resonancia magnética de los núcleos fuera para el resto del sistema.

En la parte b de la figura, se muestra un arrollamiento solenoidal con una densidad de devanado variable. Las densidades de devanado son mayores en los extremos del arrollamiento que en el medio. Una ventaja de usar una densidad de devanado variable es que el campo magnético de RF generado por el arrollamiento se puede hacer más uniforme que el de un arrollamiento del mismo tamaño con densidad de devanado constante.

En la parte c de la figura, se muestra un arrollamiento de un solo lado de dos vueltas. Una ventaja de esta configuración es que se puede insertar y retirar un contenedor alargado tal como un conducto sin desconectar el arrollamiento o el conducto.

En la parte d de la figura, se muestra una configuración de arrollamiento en la que cuatro bucles generan conjuntamente un campo magnético de RF transversal. Las muestras alargadas se pueden insertar sin desconectar el arrollamiento o el conducto.

La interfaz de usuario específica y la salida del sistema dependen mucho de la aplicación, pero incluirán típicamente la transmisión de información dependiente de la detección de analito. Por ejemplo, dicha comunicación puede implicar registrar o archivar resultados de ensayos, mostrar un mensaje de alerta de amenaza, iluminar una alarma o faro o activar una alarma acústica. La comunicación de datos también incluye enviar señales a otros dispositivos, tales como corte automático de un sistema HVAC o secuestro de una muestra de ensayo responsable de detección de analitos seleccionados. La comunicación vía la interfaz de usuario puede incluir medios electrónicos, ópticos, infrarrojos, radio, microondas, mecánicos o acústicos o cualquier otro medio para transmitir datos u órdenes sensibles a los resultados de ensayo de analito. Adicionalmente, la interfaz de usuario puede incluir interfaces de comunicación remota tales como una tarjeta de interfaz de red y una tarjeta de acceso inalámbrico que estén en comunicación con el control. Estas pueden permitir que un operador u otro dispositivo se comunique con el sistema, para transmitir órdenes o recuperar datos o transferir una alarma. La comunicación puede incluir transmitir información por internet, por una red local o por enlace electrónico directo o inalámbrico.

En una realización, el sistema se configura en dos chasis separados, uno con el imán 712, el generador 718 de pulsos y el receptor 720. El otro chasis presenta el control 722 y la interfaz 724 de usuario. Los dos chasis

intercambian información tal como órdenes y datos por un enlace de comunicación electrónico, por ejemplo, cables, un enlace inalámbrico o un enlace de fibra óptica. En una realización preferida, el enlace de comunicación comprende una interfaz USB que emplea conexiones USB patrón en cada chasis.

5 El sistema 700 de resonancia magnética puede estimular señales de resonancia magnética de los núcleos de hidrógeno en agua en el volumen 714 de muestra por aplicación de pulsos electromagnéticos, por ejemplo pulsos de radiofrecuencias (RF), generados por el generador 718 de pulsos vía el arrollamiento. El sistema detecta las señales de resonancia magnética de los núcleos de hidrógeno en el agua recogiendo de manera inductiva las señales en el arrollamiento 716. El receptor procesa las señales recibidas usando amplificadores, mezcladores y convertidores de analógico a digital.

10 En una realización, el sistema 700 mide el T2 del agua por el procedimiento o la técnica CPMG bajo el gobierno del control 722. La medición incluye un pulso de RF de 90 grados generado por el generador de pulsos seguido por un retardo de 2 ms y después una sucesión de 2.000 pulsos de 180 grados a intervalos de 4 ms. La fase de los pulsos de 180 grados es ortogonal al del pulso de 90 grados. El procedimiento genera ecos de espín en intervalos de 4 ms que son recibidos por el receptor 720. En una realización, el control 722 realiza una rutina de análisis que determina y registra los ecos de espín, realiza análisis FFT para obtener picos espectrales, encuentra el máximo valor de los picos y ajusta los valores de los picos a una fórmula con tres variables: la amplitud y tiempo de decaimiento de un exponencial, más un fondo independiente del tiempo. El valor de T2 observado es el tiempo de decaimiento exponencial mejor ajustado.

20 El análisis realizado por el control incluye una comparación entre el valor de T2 observado y un valor de T2 calibrado o medido previamente. El analito es detectado por el sistema cuando el valor de T2 observado de la muestra difiere del de una muestra exenta de analito. El valor de T2 calibrado previamente se puede determinar midiendo una disolución de agua con la misma concentración de nanopartículas que se usa para la medición del analito. El T2 del agua está influenciado por la concentración de nanopartículas. El T2 también está influenciado por analito que se une a las nanopartículas y que ocupa la región de alto gradiente alrededor de la nanopartículas. En la realización preferida, la concentración de nanopartículas se controla por formulación de la disolución. Los valores de T2 de la disolución sin analito y con diversas concentraciones del analito, también son conocidos por calibración previa.

25 En una realización, las nanopartículas se disuelven o suspenden en un medio acuoso. Las nanopartículas presentan un núcleo de magnetita superparamagnético con un diámetro de 8 nm, rodeado por una carcasa con un diámetro de 50 nm. Las moléculas de anticuerpo (u otro mecanismo de unión o atracción como se describe en la presente memoria) específicas para el analito se unen a la carcasa. Cuando las nanopartículas están en la muestra 714, el núcleo se magnetiza por el campo aplicado por el imán 712. El núcleo magnetizado produce un campo local de dipolo que se añade al campo aplicado. El campo neto resultante incluye gradientes espaciales de hasta 0,1 T/nm, dentro de una región que se extiende de manera radial desde la superficie de la nanopartícula a aproximadamente 30 20 nm de la superficie. Las nanopartículas son lo más eficaces para fines de detección y medición en concentraciones bajas de aproximadamente 1:10.000 en agua. Eso da como resultado muy poco consumo de las nanopartículas por ensayo. En una realización, el imán 712 del sistema 700 de resonancia magnética usa un imán permanente para este fin. El imán permanente no requiere energía, se puede fabricar compacto de manera arbitraria y es económico. La mayoría de los sistemas de resonancia magnética anteriores emplearon electroimanes o arrollamientos superconductores para generar el campo magnético. No es factible reducir de manera arbitraria el tamaño de electroimanes o imanes superconductores. Si un electroimán es de tamaño a escala reducida, el campo magnético se pondera de manera proporcional. Si el campo se mantiene constante, entonces la densidad de corriente en los arrollamientos del electroimán se debe aumentar. La densidad de corriente no se puede aumentar de manera arbitraria debido a un límite fundamental, la conductividad de cobre. Por encima de un cierto límite de densidad de corriente, aproximadamente 100 A/cm², los arrollamientos se deben enfriar en agua. Por encima de un segundo límite, aproximadamente 200 A/cm², los arrollamientos se autodestruyen. No son factibles arrollamientos de 40 45 cobre de estado estacionario, de alto campo, pequeños.

No es factible asimismo reducir el tamaño de imanes superconductores de manera arbitraria. Los arrollamientos superconductores se pueden fabricar mucho más pequeños y más potentes que los arrollamientos no superconductores y pueden soportar altas densidades de corriente. Sin embargo, los arrollamientos superconductores deben estar rodeados por un criostato aislado a vacío, normalmente con múltiples carcasas mantenidas a diferentes temperaturas criogénicas. También, las diversas carcasas están interconectadas de manera mecánica y de manera térmica por puntales de soporte. No es posible fabricar el criostato arbitrariamente delgado debido a la conductividad térmica de los miembros del soporte. El criostato limita la miniaturización factible en imanes superconductores.

50 Los imanes permanentes no presentan ninguno de estos defectos. Un diseño de imán determinado usando imanes permanentes se ponderará de manera precisa, sin cambio de geometría o campo o calidad de campo, a dimensiones arbitrariamente grandes o pequeñas. La única limitación fundamental es el tamaño del dominio ferromagnético, aproximadamente 1 micrómetro. Diseñando sistemas de imanes permanentes, los imanes se pueden ponderar a un tamaño determinado por el volumen de muestra, las propiedades del arrollamiento de RF, u otros parámetros del sistema, en vez de forzar que los otros parámetros satisfagan la escala del imán. Como resultado, es factible miniaturizar el sistema electromagnético completo. Esto conduce a sensibilidad de la detección

mejorada en volúmenes de muestra más pequeños, coste reducido y peso de la porción de sensor del sistema y energía de RF reducida requerida.

Una realización del imán 712 se representa de manera esquemática en sección transversal en la Figura 9. El imán incluye un armazón 910, tal como un armazón de acero hueco. En una realización, la altura H del armazón es menor que 50 cm y puede ser menor que 5 cm. La anchura W también puede ser menor que 50 cm y puede ser menor que 5 cm. Un imán 914 de disco permanente superior se une a una sección superior del armazón y un imán 916 de disco permanente inferior, situado opuesto al imán permanente superior, se une a una sección inferior del armazón. Por ejemplo, los discos se pueden unir de manera mecánica usando tornillos o pernos y/o se pueden unir con un adhesivo. Una pieza 918 polar superior con forma de disco se sitúa sobre el imán permanente superior y opuesto a una pieza 920 polar inferior con forma de disco situada sobre la pieza polar inferior. Alrededor de la periferia de cada pieza polar hay ocho agujeros de roscas finas con pernos de ajuste, que se pueden variar para mejorar la uniformidad del campo. El imán se monta atornillando el armazón junto, deslizando los discos de imán permanente a la posición, deslizando las piezas polares a la posición y después homogenización. Los discos de imán permanente están unidos muy fuertemente al armazón de acero y las piezas polares se unen muy fuertemente a los discos de imán permanente. Las atracciones, y la fricción resultante entre los diversos miembros de contacto, proporcionan estabilidad mecánica para soportar el conjunto junto. Se puede obtener más robustez aplicando grapas o adhesivos a los discos de imán o piezas polares, preferiblemente no interfiriendo con la homogenización del campo o mediciones de resonancia magnética. Las fuerzas sobre los componentes del imán permanente son fuertes y potencialmente peligrosas. No se muestran las plantillas y herramientas usadas para controlar el procedimiento del conjunto a la vista de las fuertes fuerzas implicadas.

La homogenización es el procedimiento de ajustar un imán, tal como el imán 712, para producir la uniformidad necesaria. Como están contruidos, la mayoría de los imanes proporciona insuficiente uniformidad debido a tolerancias de fabricación. La homogenización consiste en medir la distribución del campo, ajustar los parámetros intrínsecos del imán y repetir hasta que se consigue la uniformidad deseada. En una realización, se utiliza un diseño de homogenización simple que se centra en los parámetros del campo más importantes, en vez de proporcionar una serie exhaustiva de parámetros que en su mayoría nunca se requieren.

Primero, se iguala la magnetización de los dos discos de imán permanente. Basándose en el gradiente axial observado, se fijan una o más láminas ferromagnéticas delgadas por atracción magnética de manera circunferencial alrededor de sólo el más fuerte de los dos imanes. El ajuste iterativo del número y espesor de las láminas da como resultado la negación casi perfecta del gradiente axial. Las láminas se pueden asegurar después por grapas o adhesivos.

Después, se ajusta uno o más de los pernos de miniatura, por ejemplo el perno 922, en la periferia de las piezas polares. Estos pernos se presionan contra los discos de imán permanente para impulsar ligeramente las piezas polares como se requiera para anular los gradientes de campo transversales. Cualquiera de piezas polares o las dos se pueden ajustar, dependiendo de los detalles del campo observado. El ajuste final de los diversos pernos da como resultado una anulación casi perfecta de los gradientes transversales.

Típicamente no es necesario modificar la forma de las piezas polares, aunque se pueden desmontar y revisar su forma si es necesario para conseguir el campo deseado. Alternativamente, el espaciado entre las piezas polares se puede reducir ligeramente apretando todos los pernos alrededor de las dos piezas polares. Dicho ajuste es casi equivalente, magnéticamente, a ajustar la profundidad de la etapa de repuesto de la pieza polar.

Para fabricar las partes del imán, se pueden poner metales en polvo tales como hierro o acero en el interior de un molde de la forma deseada. Después en la prensa se aplica presión y calor para generar la parte final. Mientras se pueden fabricar sólo pequeñas partes por esta técnica, se puede conseguir fabricación en masa. Alternativamente se puede usar mecanizado para fabricar las partes individuales.

Las piezas polares se pueden diseñar para proporcionar la uniformidad de campo y volumen de campo más altos para ensayo de la muestra, con la restricción de que la abertura sea suficiente para insertar y poner a punto el arrollamiento de la muestra de resonancia magnética. Las restricciones del diseño incluyen el campo máximo en las piezas polares para limitar la saturación, el número mínimo de parámetros de homogenización para conseguir uniformidad del campo diana y uso de componentes del imán permanente comerciales de bajo coste cuando sea posible.

El material del imán permanente proporciona densidad de magnetización muy alta, pero es sensible a la temperatura. En aplicaciones en que se puede ajustar la frecuencia al campo, la deriva térmica del campo magnético no es un problema. Para mediciones de precisión de T₂, sin embargo, es necesario estabilizar el campo magnético. Se puede usar un recinto de temperatura controlada. En una realización, el recinto se puede construir usando aislamiento de espuma y un par de parches calentadores. Un sensor termopar y control completan la disposición.

La determinación precisa de T₂ usando el procedimiento CPMG se mejora con un oscilador local extremadamente estable con ruido de fase mínimo en una escala de tiempo de al menos el espaciado de eco del espín. Incluso los osciladores de cristal de alto coste no proporcionan normalmente suficiente estabilidad debido a las líneas

eléctricas del ordenador ruidosas. Se puede obtener suficiente estabilidad usando osciladores de cristal integrados económicos amortiguando tanto la entrada de energía de CC como la salida de reloj de RF. Dicha disposición se representa de manera esquemática en la Figura 10. En una realización, el oscilador mostrado en la Figura 10 se usa en el generador 718 de pulsos de la Figura 7. En general, la entrada de energía de CC (corriente continua) se amortigua por cableado de dos o más reguladores de voltaje en serie. El circuito representado en la Figura 10 incluye un primer regulador 1002 de voltaje (por ejemplo un regulador de 8 voltios que recibe una entrada de +12V). Un segundo regulador 1004 de voltaje recibe la salida del primer regulador de voltaje y proporciona su salida al oscilador 1006 (por ejemplo, un regulador de 5 voltios, que recibe la salida del regulador de 8 voltios). Un tercer regulador 1008 de voltaje (por ejemplo, un regulador de 5 voltios) también puede recibir la salida del primer regulador de voltaje y puede proporcionar su salida a una puerta 1010 lógica digital con alta velocidad y alto aislamiento de la fuente, tal como el conductor de línea 74F3037 NAND (disponible en Philips Semiconductors y otros). La puerta 1010 lógica digital amortigua la salida del oscilador.

El sistema 700 de resonancia magnética (Figura 7) interactúa con la muestra usando la antena 716 que, en funcionamiento, se acopla de manera electromagnética a los núcleos de rotación de la muestra. En una realización, el arrollamiento se monta en una plataforma intercambiable, modular, para permitir cambiar el tamaño de la muestra, reemplazando el arrollamiento en caso de contaminación u otros cambios necesarios.

La antena se puede encapsular en un material resistente a la contaminación. La contaminación es un problema serio cuando se tienen que ensayar múltiples muestras que soportan múltiples enfermedades o toxinas. Las antenas anteriores son difíciles de limpiar debido a que son geométricamente muy retorcidas e incluyen materiales del aislante y el conductor no higiénicos. La encapsulación de la antena puede resolver este problema. Por ejemplo, la antena podría ser un arrollamiento de cobre embebido en una forma de Teflón cilíndrica hueca a fin de que cualquier contaminación que venga del contenedor de la muestra encontraría sólo una superficie de Teflón, nunca el conductor real. Como el Teflón no es absorbente y es relativamente fácil de limpiar, los problemas de contaminación se reducen mucho. También, la antena encapsulada sería más estable y mecánicamente resistente que un arrollamiento montado libremente. Se pueden usar señales de resonancia magnética de un elemento en el encapsulante, tal como deuterio o flúor, para controlar una frecuencia o un campo magnético.

La anulación de ruido, señales de interferencias, compensaciones de los valores de referencia y otros efectos del fondo se pueden mejorar realizando mediciones de resonancia magnética múltiples veces con diversas fases de RF alternadas. Esto se puede poner en práctica bajo el gobierno del control. Por ejemplo, la excitación se puede alternar entre rotación de fase positiva y negativa de los espines durante pulsos de RF. Durante el tratamiento de la señal por el control, la fase del oscilador de receptor también se puede rotar por 90 grados o su múltiplo. El programa informático para análisis en el control que gobierna estas modificaciones de fase también realiza la correspondiente adición o sustracción de los datos digitalizados para acumular la señal deseada mientras se anulan los fondos.

Se pueden proporcionar varias interfaces de usuario con el sistema. Por ejemplo, el sistema 700 representado en la Figura 7 puede realizar mediciones para detectar un analito o analitos seleccionados e indica los resultados por emisión de una alarma si se detecta o proporciona una indicación visual o informa vía la interfaz 724 de usuario. En una versión, el operador inserta una muestra mezclada en el sistema y presiona un solo botón en la interfaz del usuario para iniciar una serie preparada previamente de instrucciones para que el control realice y analice la muestra. Si se tiene que buscar más de un analito, las instrucciones dirigen automáticamente la mezcla de nanopartículas sensibilizadas para cada analito y soporta las mediciones de manera secuencial. En otra versión del instrumento, un interruptor mecánico u óptico detecta la inserción de la muestra en el sistema de resonancia magnética e inicia de manera automática la secuencia de medición.

En una realización, un cambio de T2 es el indicador principal de que está presente analito. Para comprobar derivas o errores que podían afectar a la medición de T2, el sistema puede comparar el T2 medido de la muestra, con el de una muestra de calibración sellada con un valor de T2 medido previamente. La muestra sellada puede contener sulfato de cobre en agua, aceite de parafina u otro líquido con un T2 estable para comparación. Alternativamente, la muestra de calibración sellada se puede medir de manera periódica.

Se puede usar una amplia diversidad de mecanismos para presentar la muestra en el sistema de resonancia magnética. La muestra, que comprende medio líquido, analito y nanopartículas, se puede mezclar en un contenedor tal como un tubo de NMR de vidrio, un tubo o vial de plástico, un contenedor desechable tal como un tubo de microcentrifuga o matriz de plástico u otro contenedor adecuado. Un polímero ventajoso es PEEK (polieteretercetona) debido a su tenacidad, inactividad y aptitud para ser mecanizado. El contenedor se puede recubrir con un material para evitar que se adhieran nanopartículas a las paredes, se aglutinen o precipiten de la mezcla. Por ejemplo, el recubrimiento puede ser una proteína tal como BSA (albúmina de suero bovino). El contenedor que incluye la muestra se puede insertar, de manera manual o por un alimentador mecánico, al sistema de resonancia magnética. Alternativamente, se puede usar un contenedor fijado en el sistema de resonancia magnética para múltiples mediciones de la muestra insertando líquidos de muestra en el contenedor, por ejemplo bombeando la muestra o sus ingredientes por conductos al contenedor. Después de las mediciones, se extrae después la muestra del contenedor fijado usando bombas, conductos, válvulas y dispositivos de flujo de fluido relacionados. Se puede realizar una etapa de lavado o enjuague entre muestras. El tratamiento ultravioleta de depósitos que soportan agua destilada y nanopartículas se puede llevar a cabo para evitar la formación de bacterias.

Alternativamente, se puede mezclar un fungicida tal como azida de sodio en el agua destilada en cantidades traza para evitar el crecimiento de bacterias y algas en el agua.

En una realización representada de manera esquemática en la Figura 11, se conectan múltiples unidades sensoriales a un solo control. Por ejemplo, un sistema de sitio fijado, automático, puede consistir en un control 1102 central con suministros de energía y un generador de pulsos o transmisor, conectado por cables a múltiples cabezales 1106 a y b de sensores remotos. Aunque sólo se representan dos cabezales sensoriales, se pueden usar más. Cada cabezal 1106 incluye un aparato de preparación de la muestra junto con nanopartículas seleccionadas, un imán de resonancia magnética, un preamplificador y un arrollamiento, por ejemplo como se describió en relación con la Figura 7. Se envían pulsos de energía de RF a las unidades sensoriales por un multiplexor 1108 de salida que se gobierna por el control 1102. Las señales de las unidades sensoriales se envían al receptor 1110 por el multiplexor 1112 de entrada, también gobernado por el control. Las interconexiones son preferiblemente por cable coaxial. Alternativamente, cada unidad sensorial puede incluir un amplificador de RF. Cuando el amplificador de RF se sitúa en la unidad sensorial, las interconexiones no llevan pulsos de RF de alta energía y así pueden ser inalámbricos, fibras ópticas u otros medios de comunicación así como cable coaxial. Los elementos del sistema representado en la Figura 11 operan de la manera descrita anteriormente.

En una realización, la materia en forma de partículas suspendida en aire se puede extraer de aire libre, canales de HVAC, espacios interiores tales como centros comerciales, trenes del metro y otras áreas de tránsito de masas o cualquier otro sistema de aire para ensayar enfermedades o ataque terrorista. (HVAC representa calentamiento, ventilación y aire acondicionado.) La recogida preferiblemente incluye extraer materia en forma de partículas en el sistema o concentrar partículas del aire en el medio líquido. La Figura 12 muestra un esquema de dicho sistema de vigilancia. El colector 1202 puede estar situado dentro de un canal o en cualquier otra área que se tenga que vigilar y pueden incluir una envoltura (no mostrada) para excluir suciedad e insectos. El colector 1202 puede incluir un concentrador electrostático para atraer analito o material de muestra. Un sistema 1204 fluídico transporta el analito del colector 1202 al sistema 1205 de imán concentrador donde la muestra se expone a un campo magnético no uniforme como se ha descrito anteriormente. El sistema fluídico transporta después la muestra del imán concentrador al área de la muestra del analizador o sistema 1206 de resonancia magnética. El sistema 1206 de resonancia magnética puede ser el sistema descrito en relación con la Figura 7. El sistema 1204 fluídico puede incluir un mezclador de microfluidos automatizado para mezclar analito con un líquido, tal como el medio acuoso y con nanopartículas configuradas para uno o más analitos que se tienen que detectar. Un depósito de las nanopartículas y el agua 1208 también pueden ser parte del sistema fluídico. La muestra mezclada se transfiere después por el sistema fluídico al sistema 1205 de imán concentrador donde la muestra se expone a un campo magnético no uniforme. El sistema fluídico transporta después la muestra al área de la muestra del sistema de resonancia magnética donde se realizan mediciones. En una realización un sistema de transporte fluídico está en comunicación con el mezclador y se extiende al área de la muestra. Dependiendo de los resultados de la medición, la muestra se puede descargar a un contenedor de residuos, almacenar como material de archivo o enviar a sistemas de análisis secundario. El agua residual se puede reciclar para usarse de nuevo por pase por un filtro.

Las Figuras 13 y 14 son representaciones esquemáticas de sistemas de concentrador magnético. El sistema representado en la Figura 14 es una realización de un sistema que se puede usar como concentrador 705 magnético para realizar los métodos descritos en la presente memoria. La realización mostrada en la figura es un recipiente de celda de flujo que incluye un sistema de separación magnética de tipo externo. Una celda 1301 de flujo contiene la mezcla nanopartícula-analito (representada por el punteado claro). Los conductos 1302 llevan la mezcla a y fuera de la celda 1301 de flujo. Un imán 1303 permanente y un concentrador 1304 de flujo por ejemplo, una pieza polar de concentración de campo, se sitúan cerca de la celda 1301 de flujo. El imán 1303 presenta un campo magnético asociado con una dirección indicada por la flecha. El concentrador 1304 de flujo transfiere flujo magnético del imán 1303 a la celda 1301 de flujo y produce un campo magnético no uniforme y un fuerte gradiente de campo por toda la celda 1301 de flujo. Una región 1305 de campo alto (punteado oscuro) donde la intensidad del campo es la mayor se crea en la celda de flujo adyacente al concentrador 1304 de flujo. El concentrador 1304 de flujo se conforma en esta realización de manera que se produzca una región 1305 de campo alto aproximadamente lineal que se extiende a lo largo de la superficie de la celda 1301 de flujo. Los complejos nanopartícula-analito en la mezcla de fluidos se extraen hacia la región 1305 de campo alto, aumentando de ese modo la concentración de complejos y mejorando la velocidad de interacción.

La Figura 14 es una vista en planta superior combinada y una vista transversal alzada de un sistema concentrador magnético que se puede usar con los sistemas analizadores descritos en la presente memoria. Los tubos 1412 y 1413 de centrifuga que contienen la mezcla nanopartícula-analito (mostrado en punteado) se ponen en el conjunto 1411 de imanes. El conjunto 1411 de imanes incluye un imán 1414 permanente en forma de disco que es un disco de imán permanente de NdFeB con una intensidad de 334 kJ/m^3 (42 MGOe) y una dirección de magnetización como se indica por la flecha. Cubriendo el imán 1414 permanente hay una pieza 1415 polar que es un disco de acero del que se han cortado seis entallas 1416 semi-circulares. La pieza 1415 polar en colaboración con el imán 1414 permanente genera un campo 1417 magnético altamente no uniforme, fuerte, en el espacio entre las entallas circulares y en que se ponen los tubos 1412 y 1413 de centrifuga. El fin de la pieza 1415 polar conformada es redirigir flujo magnético del imán 1414 permanente y emitir ese flujo de manera radial tan cerca de los tubos 1412 y 1413 de centrifuga como sea posible. La carcasa externa del conjunto 1411 de imanes puede ser acero para confinar la región de tratamiento y llevar flujo de vuelta al imán 1414 permanente. La realización mostrada produce

un campo magnético de 0,7 Tesla en el volumen de muestra más próximo a la pieza 1415 polar y cayendo a aproximadamente 0,2 Tesla en el lado opuesto del tubo 1412 de centrifuga. Se tratarán magnéticamente seis muestras de manera simultánea, convirtiendo complejos nanopartícula-analito brutos en disolución, en un depósito concentrado de cadenas reaccionadas, en unos minutos.

5 La Figura 15 es un gráfico de datos de resonancia magnética con y sin tratamiento magnético. Los datos se recogieron como parte de un experimento para detectar material de amenaza biológica midiendo el parámetro T2 de resonancia magnética. La gráfica muestra el cambio en T2, relativo al valor inicial, por un periodo de 20 horas para diversas condiciones. La línea en negrita (superior) muestra el promedio de tres mediciones en que ántrax (ADN de bacillus anthracis, plásmido px01, concentración 20 ng/ml) interactúa con nanopartículas vía unión selectiva a sondas adecuadas unidas a las nanopartículas y con tratamiento magnético según el método inventivo. Aquí la mezcla de muestra se expuso a un campo magnético no uniforme que oscila de aproximadamente 0,8 Tesla en un lado de la mezcla, a aproximadamente 0,2 Tesla en el lado opuesto de la muestra, para la duración del ensayo excepto cuando la medición de T2 se hizo en realidad. También se muestran como x las mediciones individuales. Se observó una señal sustancial o cambio de T2 de aproximadamente 23 milisegundos para la muestra con tanto analito como tratamiento magnético. La línea fina continua muestra los resultados para el mismo analito pero sin tratamiento magnético. Se observa un efecto de T2 insignificante. Las líneas de puntos y discontinuas muestran la misma medición para muestras de control que no tienen analito, con y sin tratamiento magnético. La conclusión de este experimento es que el tratamiento magnético inventivo mejora mucho la señal de resonancia magnética detectable de concentraciones bajas de ADN de ántrax.

20 Las Figuras 16a-e representan una realización de un sistema de instalación fija como se describe en relación con la Figura 12 y tres tomas colectoras. La Figura 16a es una vista en perspectiva y la Figura 16b es una vista alzada del sistema que muestra la toma 1602 y una pantalla 1604. Los otros elementos representados en la Figura 12a están contenidos dentro del revestimiento. Las Figuras 16 c-e representan tres opciones de entrada para el sistema. Una vez en marcha el control hace que el sistema recoja muestras de manera periódica para análisis. El sistema también se puede hacer funcionar de manera manual. Se puede proporcionar una interfaz de usuario por botones o una pantalla táctil. La pantalla 1604 puede mostrar el estado de operación. El acceso del usuario puede ser controlado por, por ejemplo, identificación biométrica, tal como identificación de huella dactilar o una contraseña.

30 La Figura 17 es una vista en perspectiva frontal de un sistema portátil. El sistema puede funcionar en un modo de operación autónomo de un solo botón. Se puede introducir una muestra mediante viales y tubos. Se puede introducir una muestra en un contenedor 1702 al sistema por un receptáculo o abertura 1704 en la parte superior. Dentro del sistema el sistema fluido manipulará la mezcla y traslado de la muestra al sistema de NMR de la manera descrita anteriormente en relación a la Figura 10a. La interfaz 1706 de usuario puede incluir áreas iluminadas "biopeligro" y "seguro" en una pantalla de salida. Para empezar el funcionamiento, se proporciona un botón de puesta en marcha en la pantalla táctil. El estado de funcionamiento del sistema se indica en la pantalla.

35 Una realización de un sistema que puede realizar o poner en práctica las técnicas de medición o detección descritas anteriormente para fines de diagnóstico médico se describirán ahora con referencia a la Figura 18 que es un diagrama de bloques funcional de un sistema de ensayo de muestras automatizado. Para aplicaciones clínicas, la muestra comprende un espécimen de material de un paciente. El material puede incluir material celular vivo o muerto tal como piel, sangre, priones, médula, pelo, muestras de biopsia u otro tejido o material biológico no celular tal como saliva, moco, esputo, fluido intravenoso, orina, heces, pus, líquido cefalorraquídeo y contenido del estómago o intestinos o cualquier otro material de muestra obtenido de un ser humano o cuerpo de animal. Recoger ese material comprende un paciente o individuo que produce el material, un médico que extrae el material del cuerpo de un paciente o individuo, un investigador que recupera material de la muestra de una escena del crimen o accidente o cualesquiera otras etapas que den como resultado la acumulación de material biológico para ensayo.

45 Primero, el sistema 1802 fluido extrae un espécimen 1804 del paciente o una porción del mismo o una disolución del mismo, a un mezclador que mezcla el material de la muestra con un disolvente, por ejemplo se almacena en un depósito 1806 de disolvente y uno o más tipos de nanopartículas se almacenan en los depósitos 1808a-c. Cada tipo de nanopartícula puede ser sensibilizada para uno o más compuestos químicos o analitos en relación con enfermedades o afecciones. La Figura 18 muestra tres tipos de nanopartículas, pero se puede usar cualquier número de tipos de nanopartículas, cada una sensibilizada a uno o más analitos en relación con una o más afecciones. Las enfermedades incluyen patógenos contagiosos tales como virus y bacterias y enfermedades no contagiosas tales como cáncer o hipercolesterolemia. Los compuestos químicos incluyen enzimas u otros marcadores producidos por el cuerpo, toxinas y fármacos. En una realización, el usuario selecciona los tipos de nanopartículas que se tienen que usar en ensayar un espécimen del paciente particular. Por ejemplo, un médico puede extraer una muestra de sangre de un paciente para comprobar la concentración de una medicación de manera que se controle la dosis o los guardas en un aeropuerto o cruce de frontera pueden tomar muestras de tejido de pollos vivos o muertos para comprobar la gripe aviar. Las etapas de tratamiento adicionales pueden incluir lisar la muestra para liberar ADN o ARN u otros componentes de la muestra, calentando o enfriando la muestra, ajustando el pH de la muestra u otras etapas necesarias para activar la reacción selectiva entre las nanopartículas y el analito. La muestra mezclada, o una alícuota de la misma, se transfiere después al sistema 1810 de resonancia magnética, tal como el sistema representado en la Figura 7. El sistema representado en la Figura 18 también incluye un imán concentrador como se describió en relación con las Figuras 7 y 14 anteriores con las muestras que se exponen al

campo magnético no uniforme previamente al sistema de resonancia magnética. La muestra se puede mezclar alternativamente con nanopartículas dentro de un contenedor que está dentro del instrumento de resonancia magnética, evitándose de ese modo la etapa de transferir la muestra mezclada y se pueden tomar etapas de tratamiento adicionales mientras la muestra esté dentro del instrumento de resonancia magnética.

- 5 El instrumento de resonancia magnética después mide señales de la muestra, tal como el T2 de la muestra y analiza esas señales para determinar la presencia o ausencia o concentración de los analitos seleccionados. Después, basándose en resultados de la medición, un médico puede diagnosticar después la enfermedad del paciente.

10 En una realización de los sistemas descritos anteriormente, el sistema detecta analito midiendo señales del líquido, estando referidas las señales al campo magnético. Específicamente, las señales son sensibles al distinto campo magnético en la región especial alrededor de las nanopartículas. Cuando se une analito al correspondiente anticuerpo u otro agente de unión, se ocasiona que el analito permanezca en la región especial y así en el distinto campo magnético. El analito desplaza el líquido de esa región, así el líquido ya no emite señales de resonancia magnética características del campo magnético en esa región. También, es importante observar que el analito no emite señales de resonancia magnética o al menos no emite señales que sean similares a las del líquido. Esto es debido a que el analito se sujeta firmemente a la nanopartícula sólida, causando que el analito presente el T2 pequeño característico de los sólidos. Así, en una realización, el analito, mientras ocupa la región especial, no produce señales que imiten al líquido.

20 La aglomeración puede causar un cambio en T2 pero no en T1, mientras tanto T1 como T2 cambian en respuesta a concentración aumentada de nanopartículas. Por lo tanto, se puede usar una medición de T1 como una calibración o una medición independiente de concentración de nanopartículas. En una realización, el sistema mide tanto T1 como T2 de la muestra, aplica análisis relativo al valor de T1 para determinar la concentración de nanopartículas y el valor de T2 para detectar analito. Alternativamente, están disponibles otros métodos para medir el contenido en hierro y por lo tanto concentración de nanopartículas, en la muestra.

25 La etapa de tratamiento de los datos realizada por el control incluye ajustar los datos por parámetros relacionados con la presencia de analito, tal como un cambio de T2 en datos de CPMG. Normalmente el tren de eco en CPMG se ajusta a una sola fórmula exponencial, un ajuste de tres parámetros para amplitud, constante de tiempo y fondo. Una manera simple pero eficaz para llevar a cabo esto es una búsqueda de red en que se estiman primero los tres parámetros de los datos y después se genera una red tridimensional de valores por variación de los tres parámetros por encima y por debajo de los valores estimados. Después se seleccionan los mejores valores como el chi-cuadrado mínimo o desviación cuadrada media de los datos de la fórmula. Partiendo del mejor valor, se calcula de nuevo una nueva red de búsqueda, se calculan las desviaciones y se derivan de nuevo los mejores valores. Este procedimiento se repite una serie de veces (típicamente 9) para obtener el mejor ajuste global. Opcionalmente, la escala de la red se puede reducir por un factor (típicamente 0,95) cada vez que se usa, a fin de que los mismos valores no aparezcan de manera repetida.

35 Los subsistemas primarios del sistema de resonancia magnética son el generador de pulsos, el receptor de la señal y el control. Estos subsistemas pueden residir en placas separadas, interconectadas por cables. Alternativamente, los subsistemas pueden estar integrados como un solo circuito en una sola placa del ordenador. La ventaja de lo último es que no se requieren interconexiones de cable y también que se puede usar para todo una sola base de tiempo.

40 El sistema puede ser alimentado por batería. El sistema usa muy poca energía durante la adquisición de datos y se puede programar para usar energía esencialmente cero en un modo de suspensión.

45 El sistema puede incluir un detector de radiación interconectado al control. El fin del detector de la radiación es detectar materiales radiactivos en la muestra. El detector de la radiación puede ser cualquier sensor de radiación, preferiblemente sensible a rayos gamma, tales como semiconductor, detector de centelleo y contadores rellenos de gas. El detector se puede colocar próximo al medio de recogida de muestras, el sistema de mezcla de muestras o una cámara de soporte colocada aguas abajo del sistema de resonancia magnética.

50 Insectos tales como arañas pueden tapar las entradas de aire y los colectores. La primera barrera para entrar para estos insectos son los filtros. Para instalaciones exteriores, se puede incorporar un insecticida de liberación lenta, preferiblemente inofensiva para seres humanos y animales domésticos. Dichos insecticidas se pueden implementar a lo largo del eje de la entrada o cerca de la boca de la entrada.

55 Los sistemas y métodos pueden detectar explosivos y materiales que sean armas químicas (no realización de la invención). Los sistemas y métodos pueden realizar la detección usando nanopartículas como se desveló anteriormente, en los que los sitios de unión específicos en las nanopartículas se unen al explosivo o moléculas que son armas químicas. Alternativamente, los sistemas y métodos pueden detectar explosivos o materiales que son armas químicas midiendo señales de resonancia magnética del propio material de la muestra, sin uso de nanopartículas. El sistema puede emplear el Efecto Overhauser Nuclear de Espín para detectar armas químicas y explosivos. No se requieren nanosensores en este caso. Otra configuración podría ser un sistema híbrido que incorpore cromatografía de gases, espectroscopía de masas, espectroscopía de movilidad iónica, otras técnicas

analíticas y NMR con o sin nanopartículas.

5 Una ventaja de los sistemas y métodos es que se pueden llevar a cabo ensayos de confirmación para ciertos analitos usando el mismo aparato. Por ejemplo, un ensayo de confirmación para explosivos comprende medir el parámetro T1 usando un sistema de resonancia magnética, puesto que el T1 para la mayoría de los explosivos es extremadamente largo (muchos segundos). Como otro ejemplo, una medición de confirmación para armas químicas tales como agentes neurotóxicos es un barrido de resonancia magnética para flúor o fósforo basado en las frecuencias de Larmor características de esos elementos.

10 El sistema puede detectar toxinas y armas biológicas en sobres de correos, ensayando materia en forma de partículas recogidas de correo (no realización de la invención). En esta aplicación, el sistema incluiría preferiblemente medios para extraer materia en forma de partículas de sobres, tales como agitación, vibración, soplando aire por la pieza del correo o comprimiendo los sobres. El sistema puede incluir medios para cortar sobres para recuperar polvo, preferiblemente sólo después de que otros sensores hayan dirigido la sospecha a una pieza de correo particular.

15 Una realización preferida para aplicaciones que muestrea aire incluye una entrada de aire, un colector, concentrador y un sistema fluido automatizado. La entrada de aire incluye un filtro para excluir suciedad e insectos y un ciclón para separar partículas de la muestra de aire. Las entradas pueden usar "impactador" o "pre-separador" o "fraccionador" y sirven la función de evitar que entren grandes (por ej., partículas con tamaños mayores que aproximadamente 10 micrómetros de diámetro aerodinámico) al detector o identificador. El fraccionador de partículas grandes es un componente integral en el muestreador ambiental - es la combinación de la boquilla interna y la placa que es normal a la boquilla. Para la unidad de HVAC o el muestreador del entorno ocupado, podía haber un cartucho preseparador opcional que se coloca aguas abajo de la entrada. Además, para el muestreador ambiental, podía haber una pantalla de insectos que se coloque justo aguas arriba del puerto de escape. El colector incluye medios concentradores incluyendo un impactador virtual para insertar las partículas de la muestra en un medio líquido. El sistema fluido mezcla después la muestra con nanopartículas.

25 En una realización, los sistemas y métodos se adaptan para inspeccionar contenedores de embarque, por ejemplo para detectar materiales peligrosos o drogas o microbios entre los artículos en un contenedor de embarque. La realización incluye medios para extraer aire del espacio interior del contenedor de embarque, medios para recoger o concentrar cualquier material suspendido u ocluido en ese aire, medios para mezclar el material con nanopartículas y medios para presentar esa mezcla al sistema de resonancia magnética para ensayo. La inspección se puede realizar abriendo una puerta del contenedor de embarque. Alternativamente, el aire interior se puede extraer por un puerto o abertura que se puede volver a cerrar en el contenedor de embarque. Se proporcionan más detalles en la Solicitud Provisional número de serie 60/669.019, presentada el 7/4/2005, titulada SHIPPING CONTAINER INSPECTION DEVICE.

35 Los expertos apreciarán además que los diversos bloques lógicos, módulos, circuitos y etapas de algoritmos ilustrativos descritos en relación con las realizaciones desveladas en la presente memoria con frecuencia se pueden implementar como soporte físico electrónico, soporte lógico de ordenador o combinaciones de los dos. Para ilustrar claramente esta capacidad para ser intercambiados de soporte físico y soporte lógico, se han descrito anteriormente diversos componentes, bloques, módulos, circuitos y etapas ilustrativos en general en términos de su funcionalidad. Si dicha funcionalidad se implementa como soporte físico o soporte lógico depende de la aplicación particular y las restricciones de diseño impuestas sobre el sistema global. Los expertos pueden implementar la funcionalidad descrita de maneras variables para cada aplicación particular, pero tales decisiones de implementación no se deberían interpretar como causantes de apartarse del alcance de la invención. Además, el agrupamiento de funciones dentro de un módulo, bloque, circuito o etapa es por facilidad de descripción. Se pueden trasladar funciones o etapas específicas de un módulo, bloque o circuito sin apartarse de la invención.

45 Los diversos bloques lógicos, módulos y circuitos ilustrativos descritos en relación con las realizaciones desveladas en la presente memoria se pueden implementar o realizar con un procesador de fin general, un procesador de señales digitales (DSP), un circuito integrado específico de la aplicación (ASIC), una matriz de puertas programable de campo (FPGA) u otro dispositivo lógico programable, componentes lógicos de puerta o transistor discretos, de soporte físico discreto o cualquier combinación de los mismos diseñada para realizar las funciones descritas en la presente memoria. Un procesador de fines generales puede ser un microprocesador, pero en la alternativa, el procesador puede ser cualquier procesador, control, microcontrol o máquina de estado. También se puede implementar un procesador como una combinación de dispositivos de computación, por ejemplo, una combinación de un DSP y un microprocesador, una pluralidad de microprocesadores, uno o más microprocesadores junto con un núcleo de DSP o cualquier otra configuración.

55 Las etapas de un método o algoritmo descritas en relación con las realizaciones desveladas en la presente memoria se pueden incorporar directamente en soporte físico, en un módulo de soporte lógico ejecutado mediante un procesador o en una combinación de los dos. Un módulo de soporte lógico puede residir en memoria RAM, memoria flash, memoria ROM, memoria EPROM, memoria EEPROM, registros, disco duro, un disco removible, un CD-ROM o cualquier otra forma de medio de almacenaje. Un medio de almacenaje ejemplar se puede acoplar al procesador tal que el procesador pueda leer información de, y escribir información a, el medio de almacenaje. En la alternativa, el

60

medio de almacenaje puede ser integral al procesador. El procesador y el medio de almacenaje pueden residir en un ASIC.

5 Se proporciona la descripción anterior de las realizaciones desveladas para permitir que cualquier experto en la materia realice o use la invención. Diversas modificaciones a estas realizaciones serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia y los principios genéricos definidos en la presente memoria pueden ser aplicados a otras realizaciones sin apartarse del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia de un analito, que comprende las etapas de:
formar una muestra llevando partículas paramagnéticas de escala de nanómetro a un líquido para unión a dicho analito formado complejos nanopartícula-analito;
- 5 aplicar un primer campo magnético no uniforme a dicha muestra, de manera que dicho primer campo magnético impulse dichas partículas en la dirección de aumentar la intensidad del campo, causando de ese modo movimiento de los complejos y potenciando interacciones entre sí y concentrando los complejos nanopartícula-analito;
mover la muestra a un segundo campo magnético uniforme para realizar resonancia magnética y excitar señales de resonancia magnética de dicho líquido y determinar el T2 del líquido analizando dichas señales de resonancia magnética y
10 determinar si el analito está presente en la muestra comparando el T2 medido con un valor predeterminado.
2. El método según la reivindicación 1, en el que los analitos se seleccionan del grupo de: moléculas, fragmentos moleculares, complejos moleculares, virus, células y bacterias.
3. El método según la reivindicación 1, en el que las interacciones son reacciones de uniones moleculares.
- 15 4. El método según la reivindicación 1, en el que el primer campo magnético no uniforme es el más fuerte en un subvolumen del líquido conocido y en el que se extraen los complejos en el subvolumen por el primer campo magnético no uniforme.
5. El método según la reivindicación 1, en el que el valor predeterminado es el T2 determinado de la combinación del líquido conocido con las nanopartículas.
- 20 6. El método según la reivindicación 1, en el que los complejos y el líquido conocido se mezclan previamente a realizar la medición relativa a las interacciones usando el segundo campo magnético.

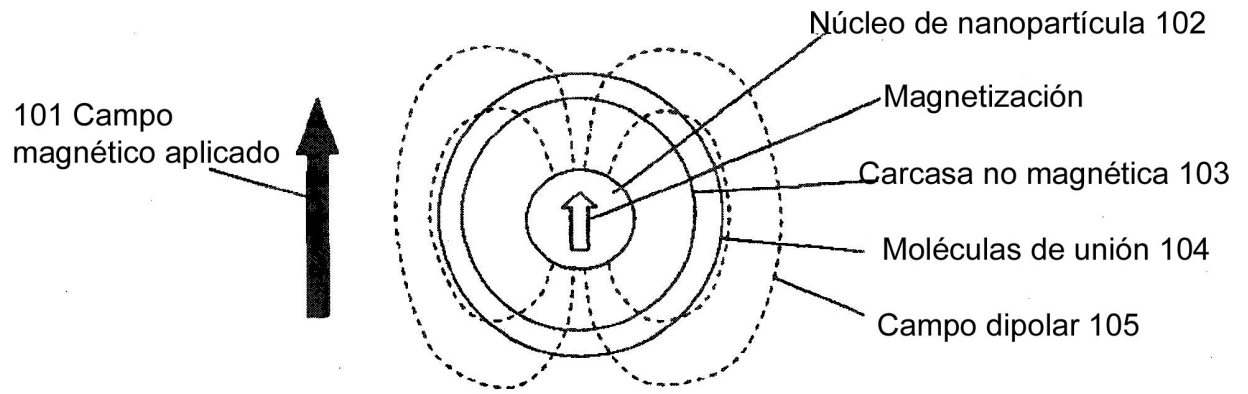


FIGURA 1

CAMPO MAGNÉTICO NANOPARTÍCULAS

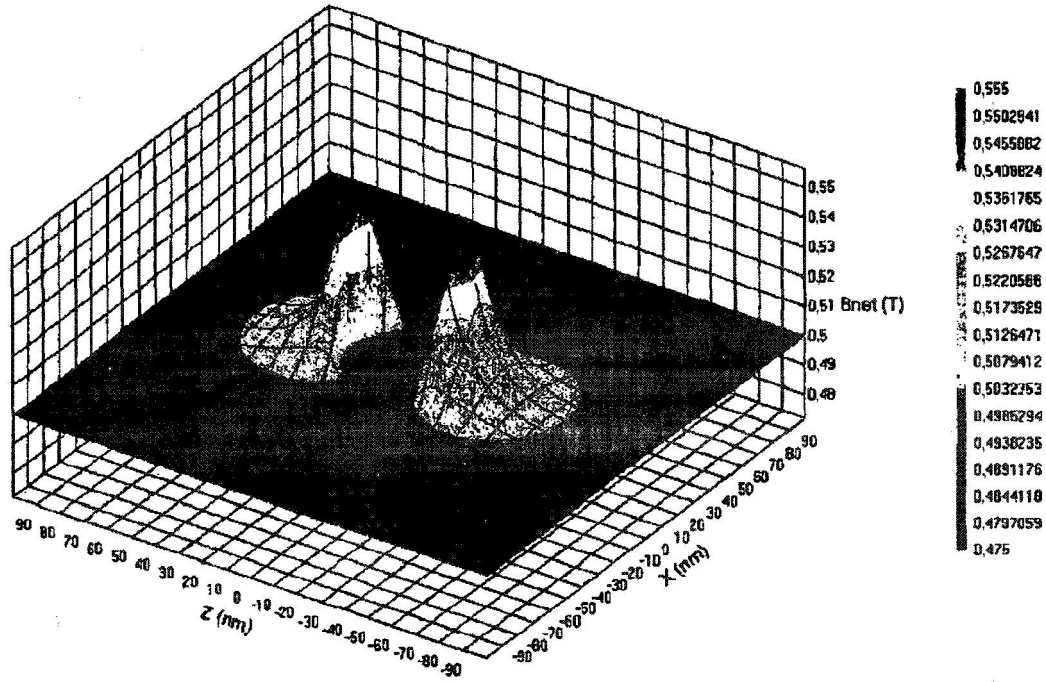


FIGURA 2

DISTRIBUCIÓN GRADIENTE CAMPO

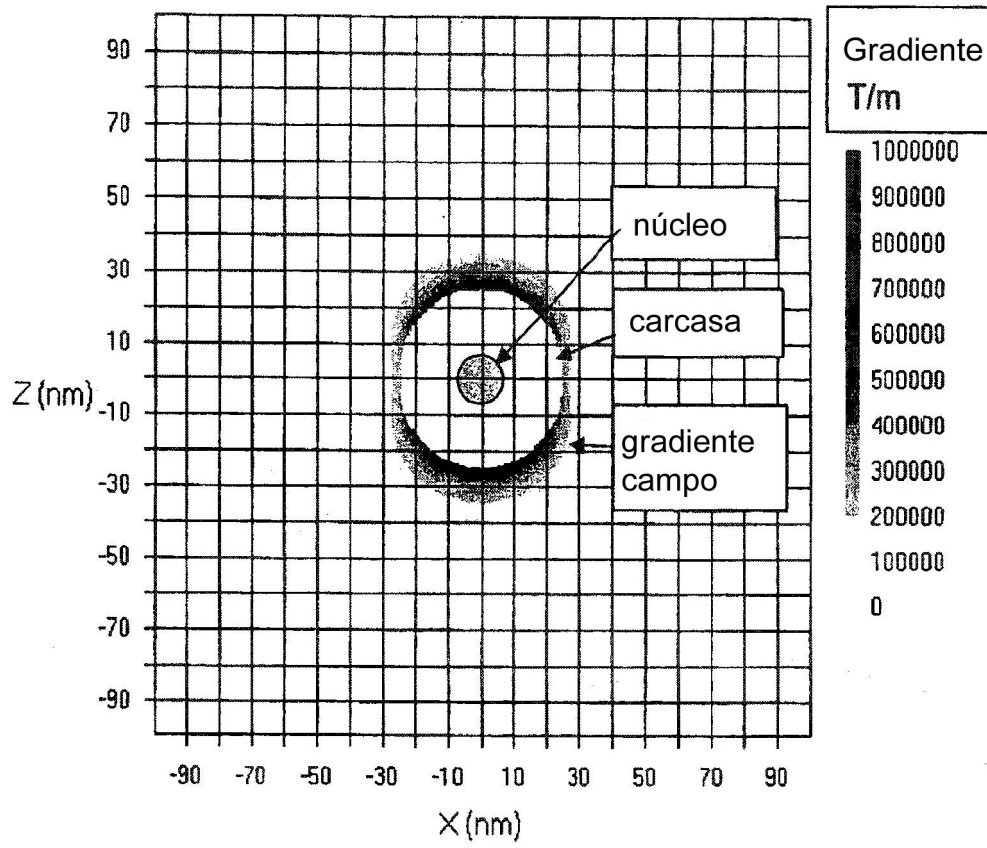


FIGURA 3

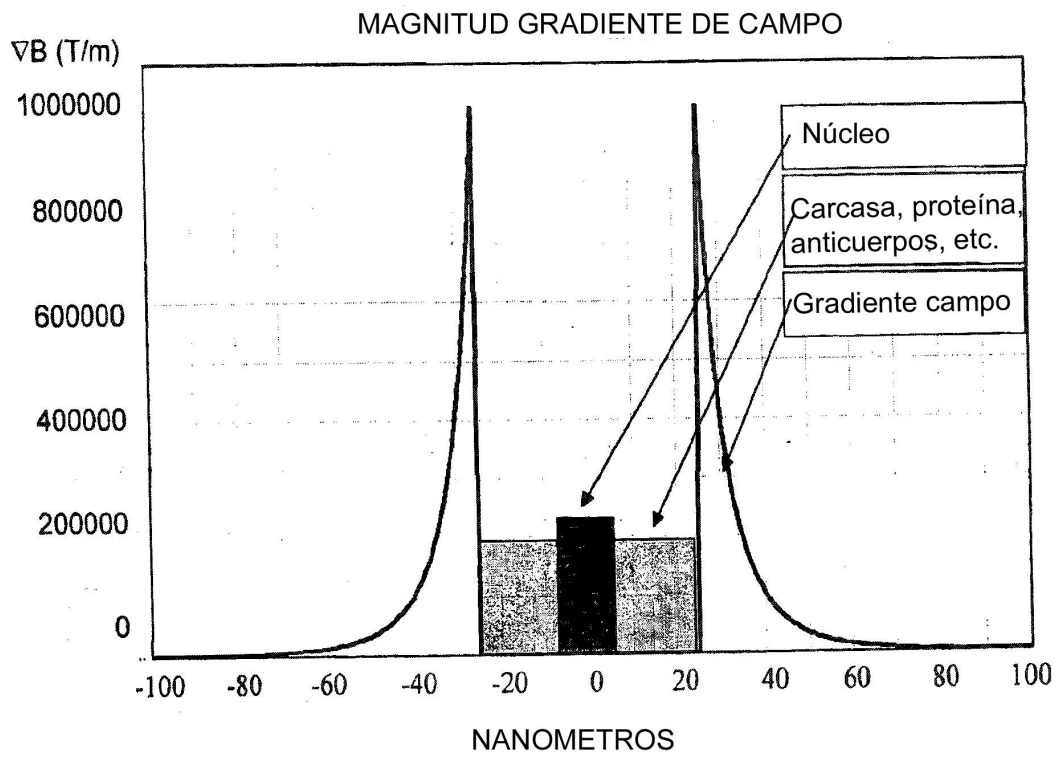


FIGURA 4

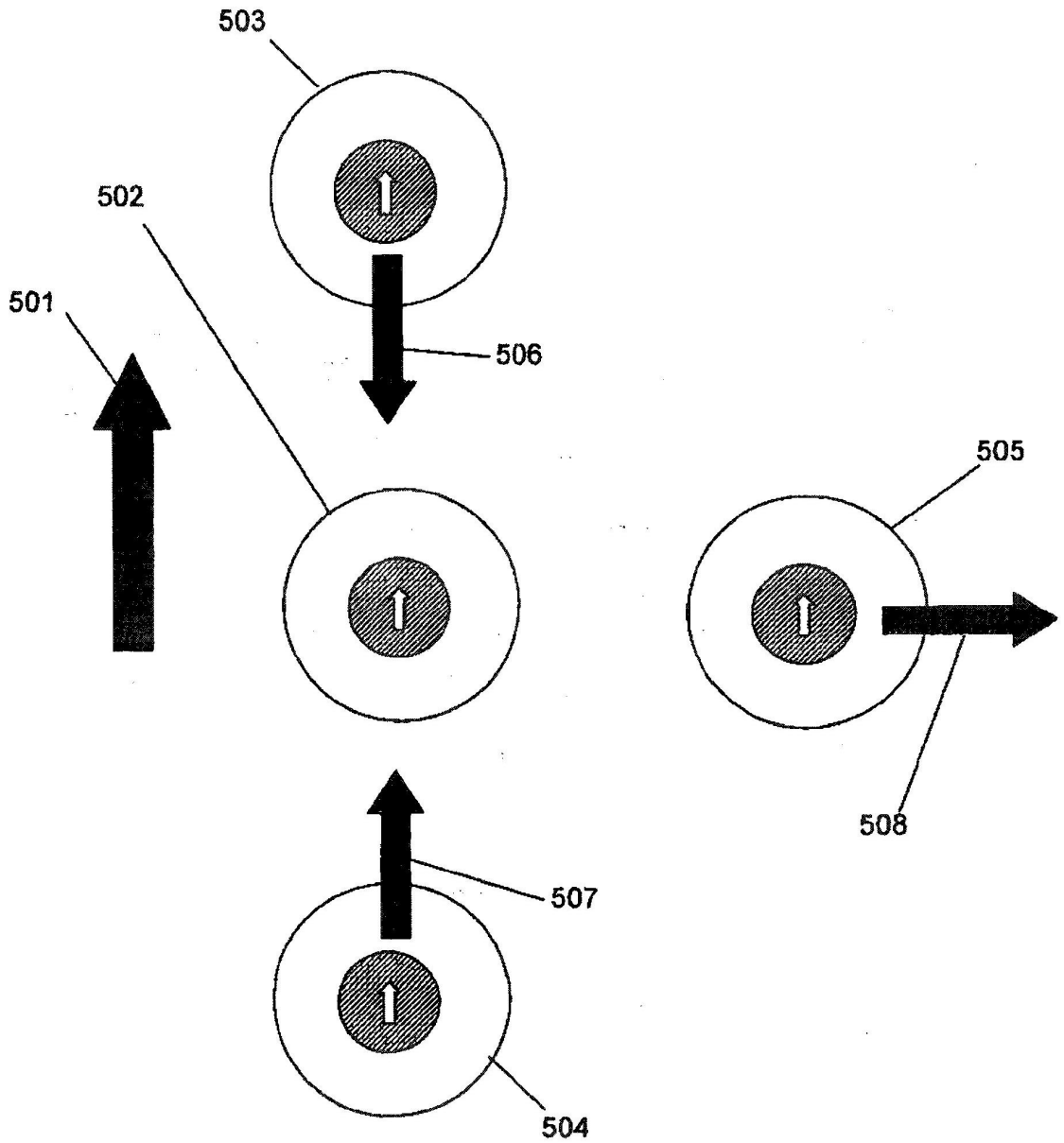


FIGURA 5

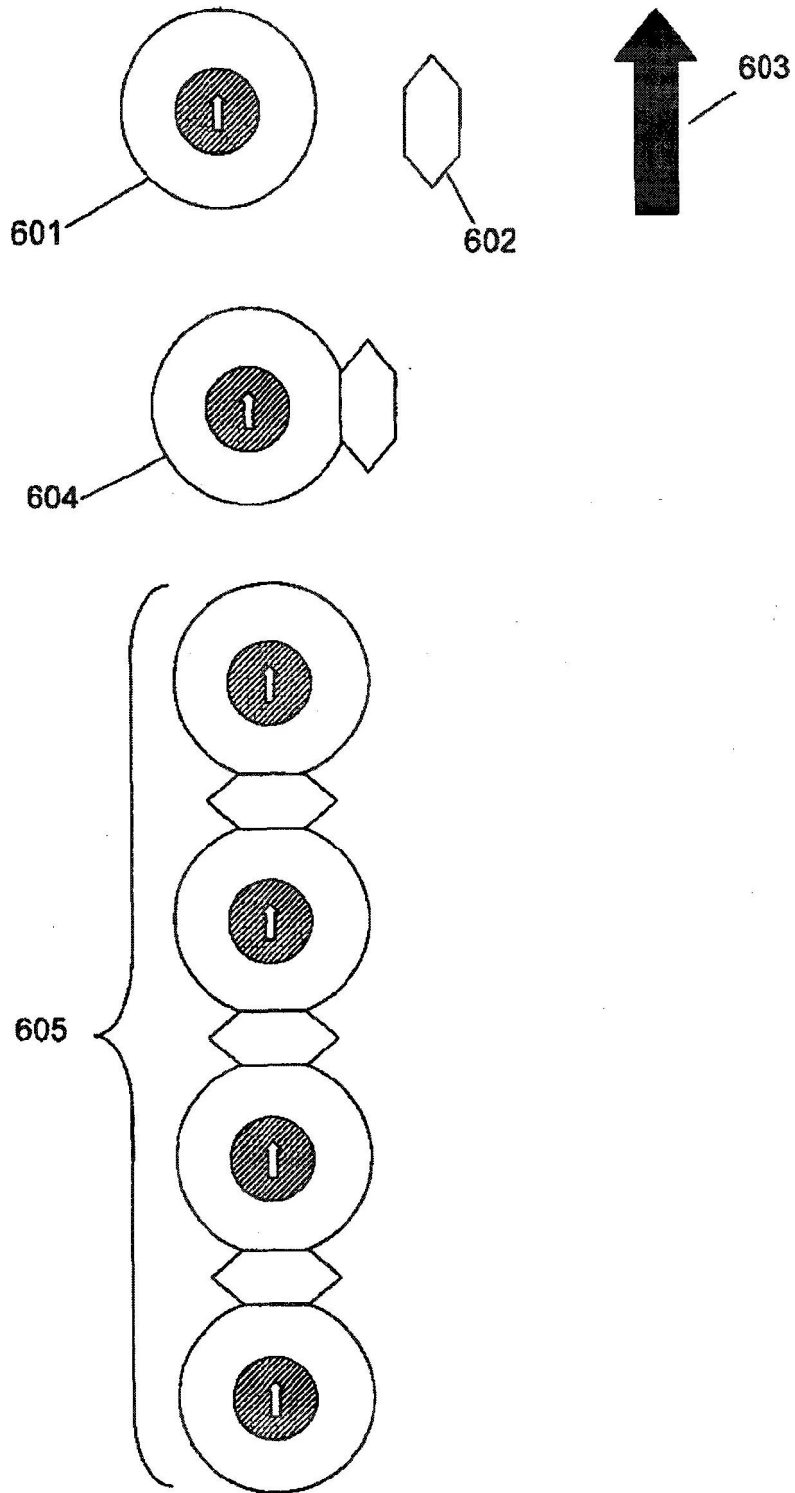


FIGURA 6

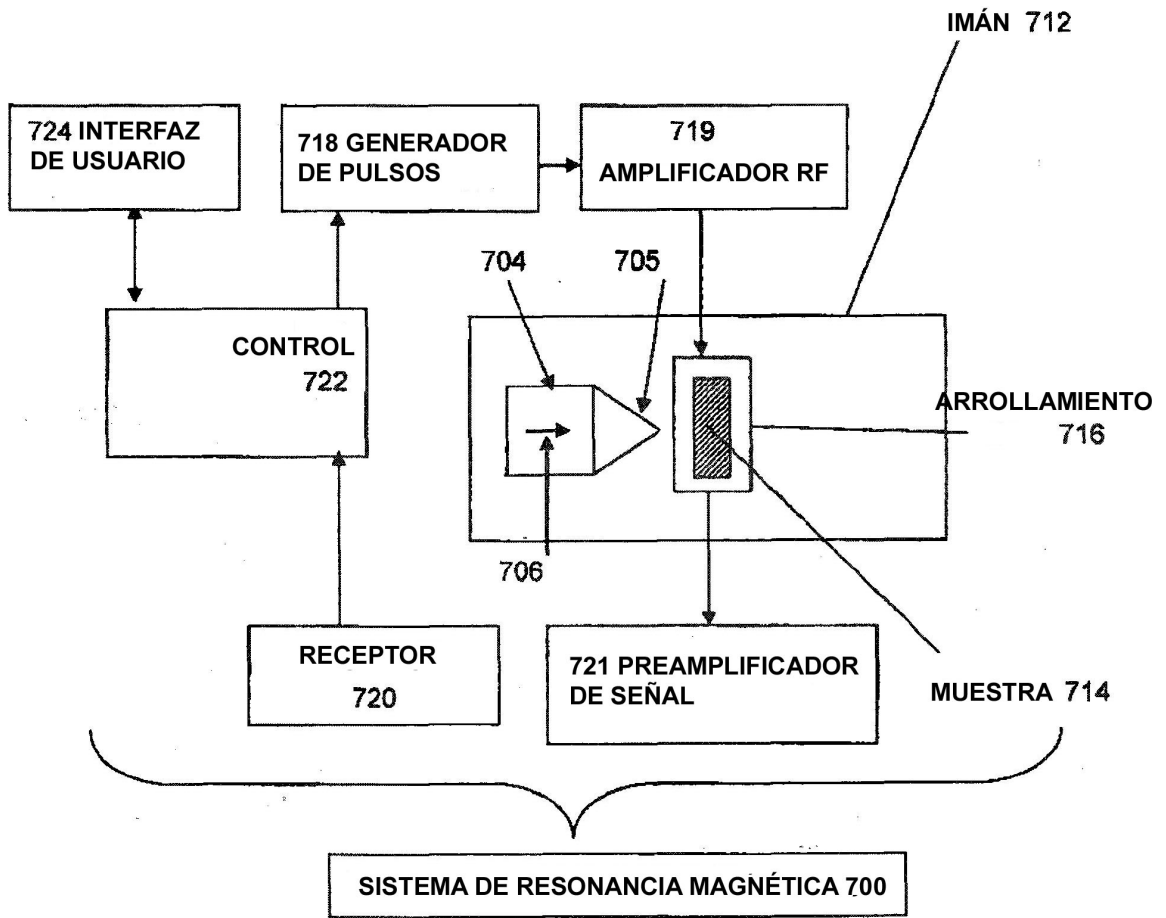


FIGURA 7

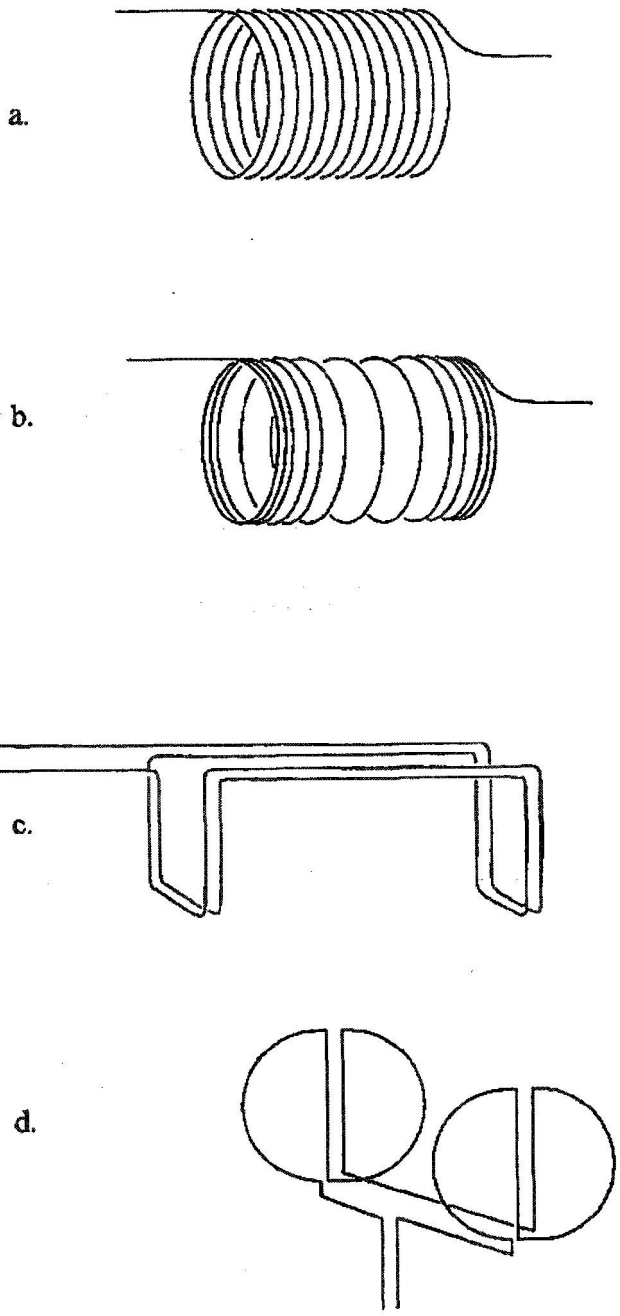


FIGURA 8a-d

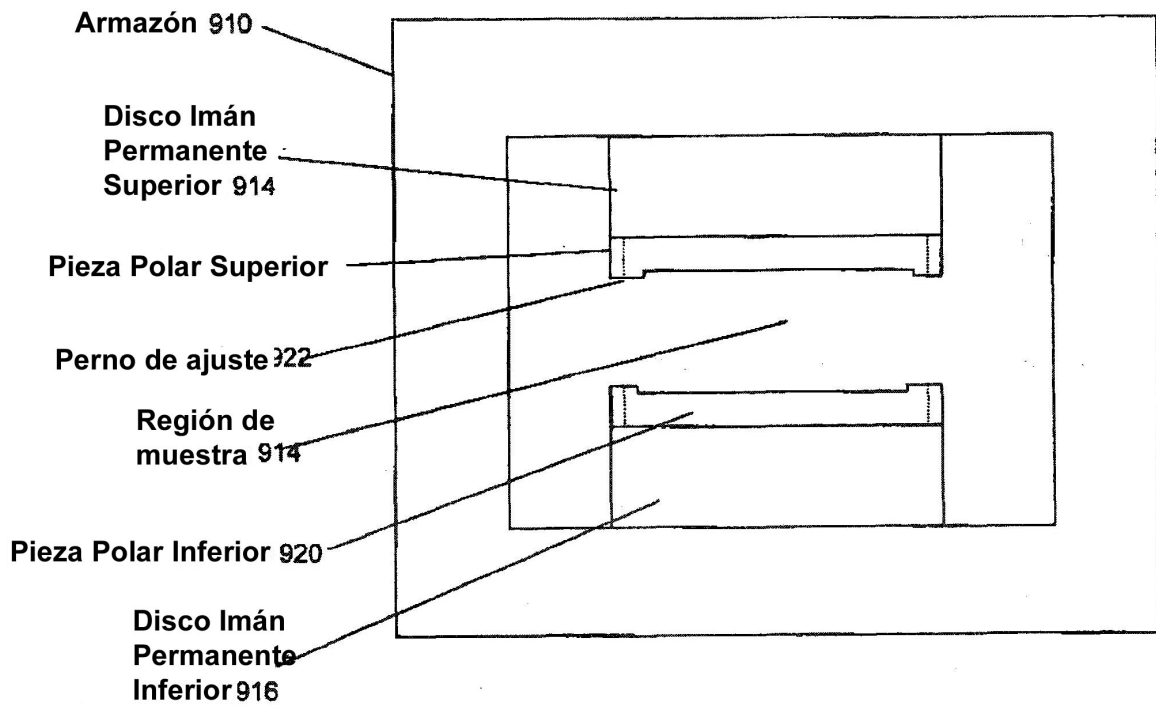


FIGURA 9

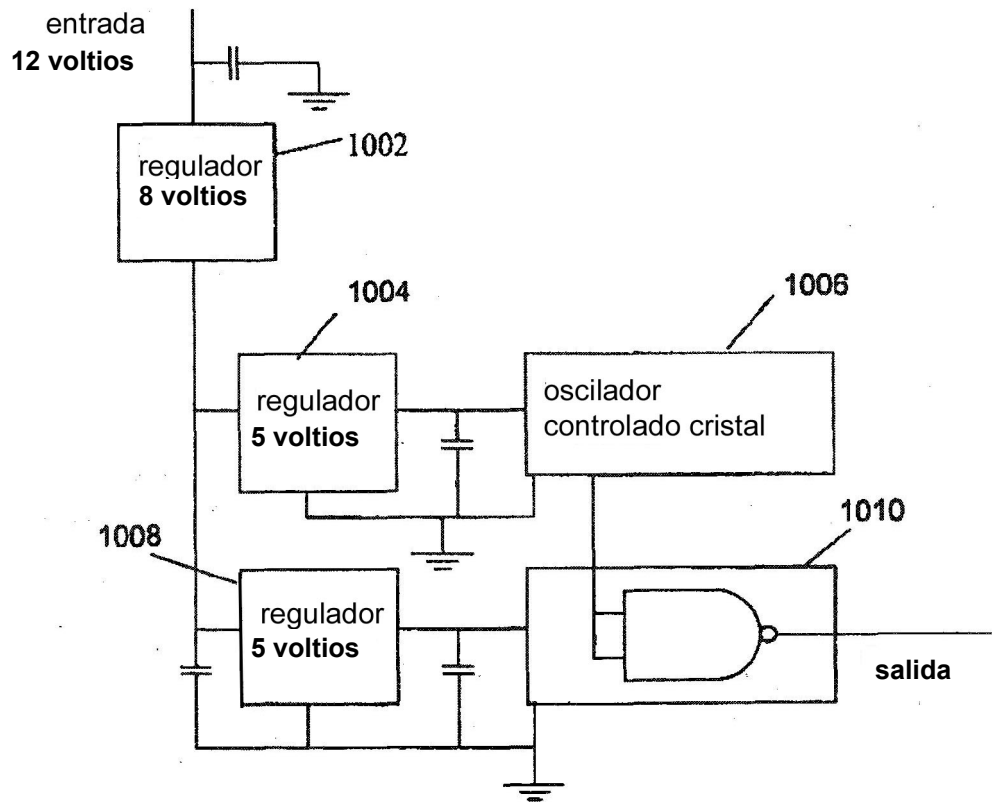


FIGURA 10

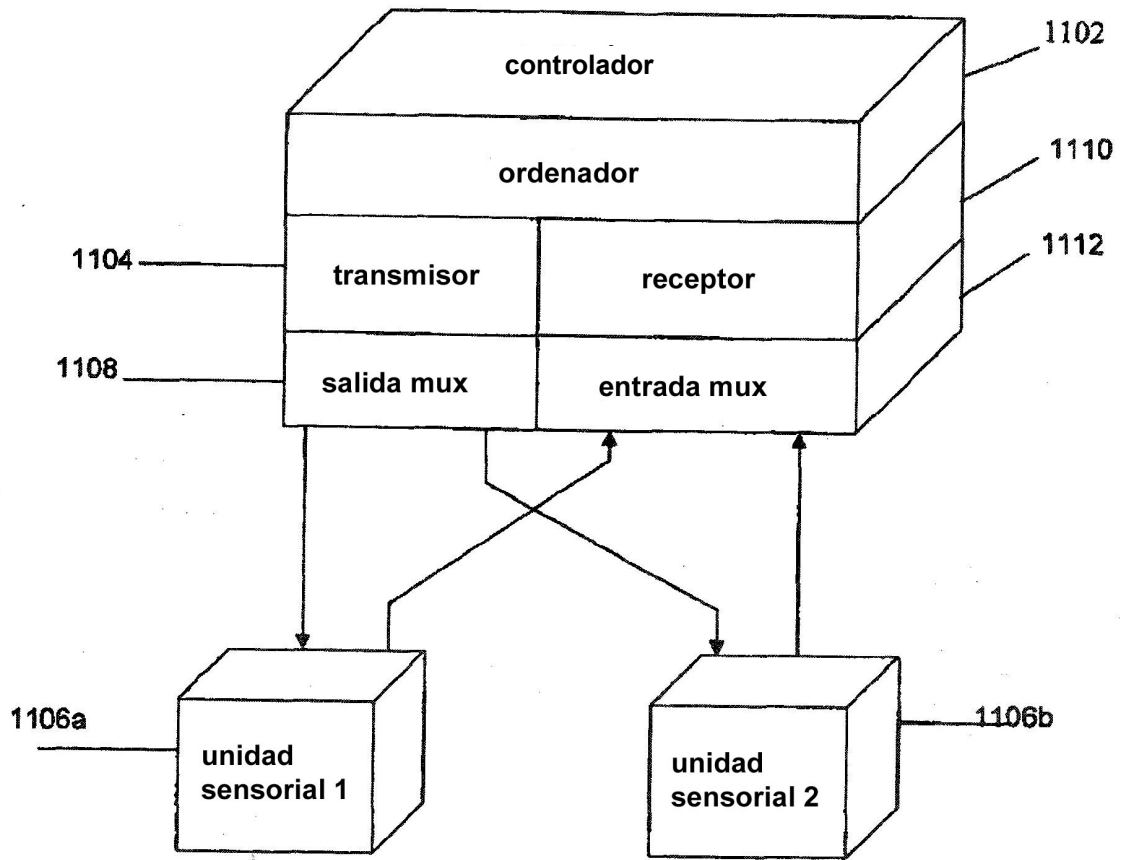


FIGURA 11

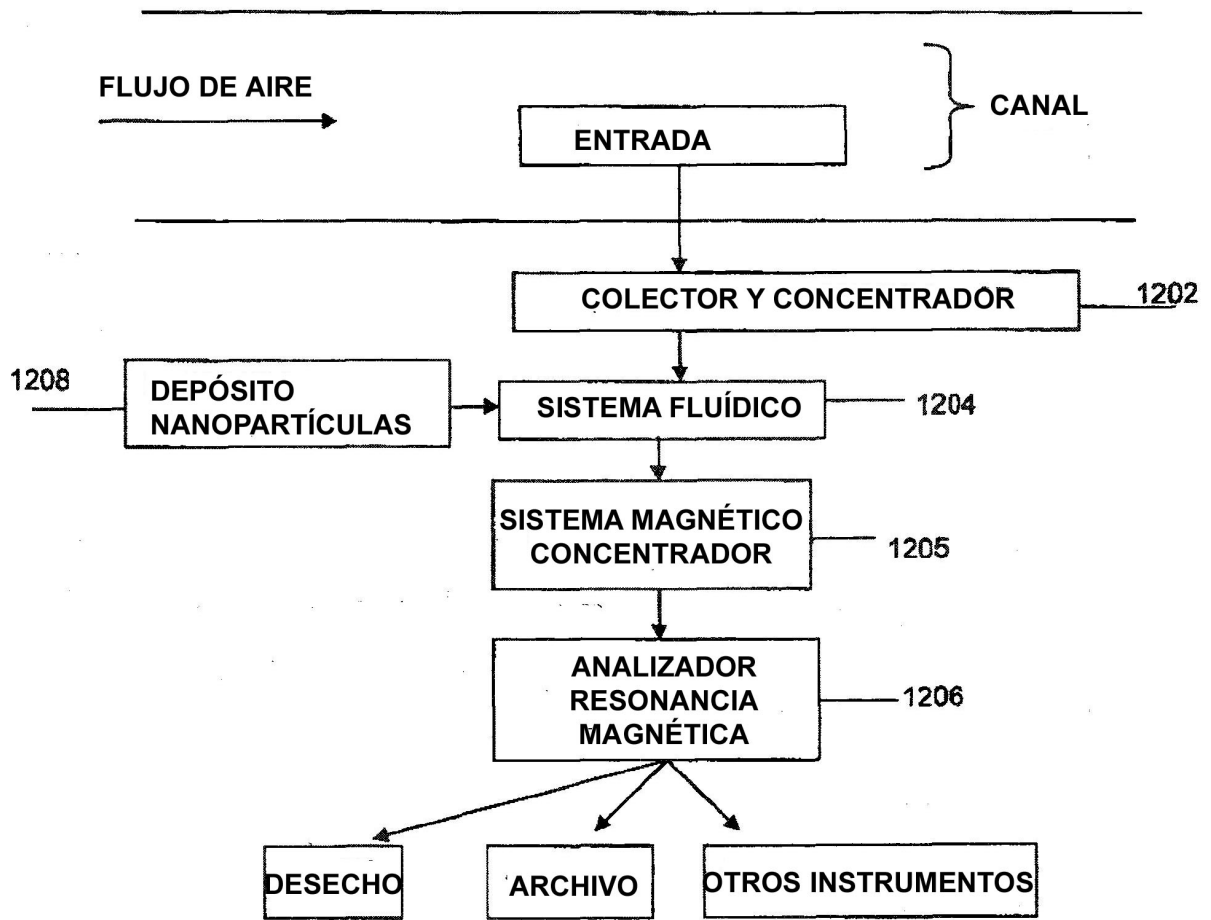


FIGURA 12

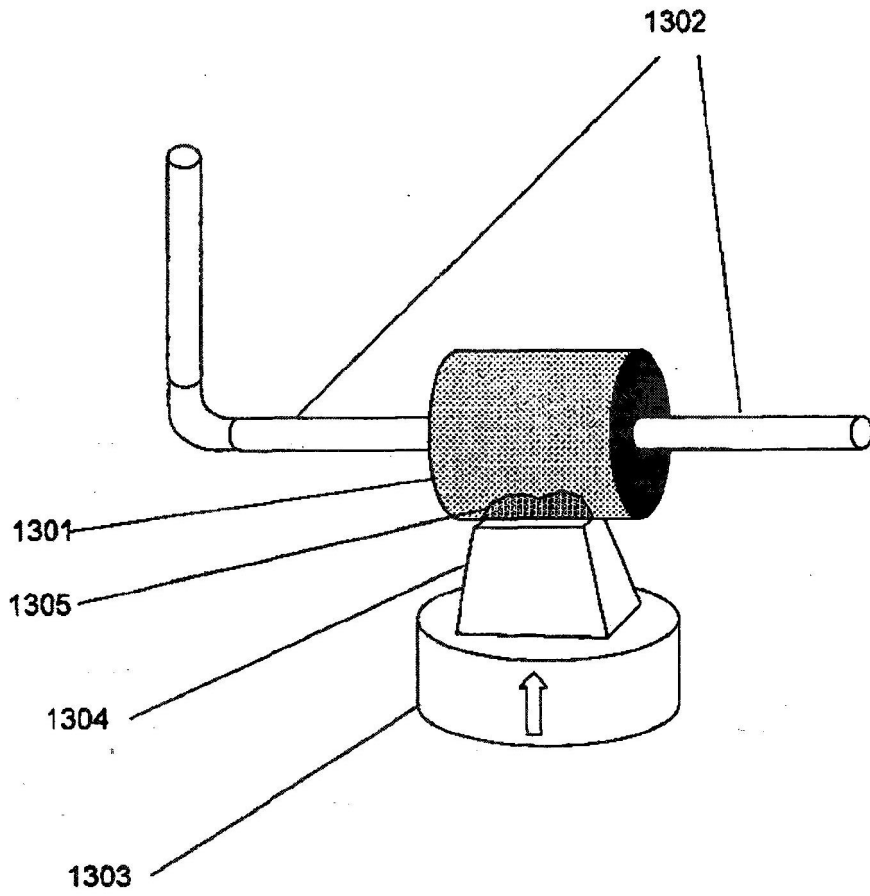


FIGURA 13

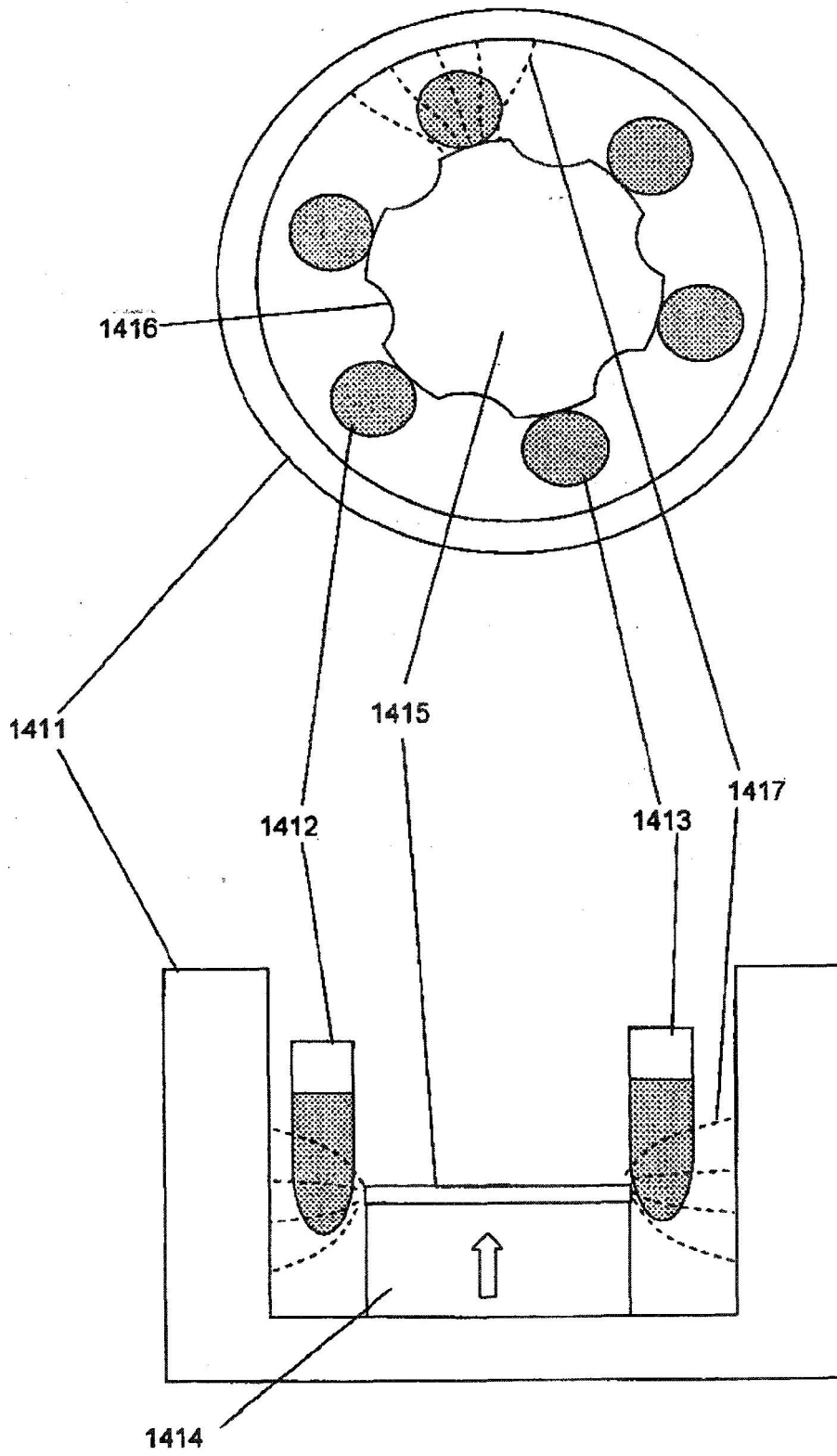
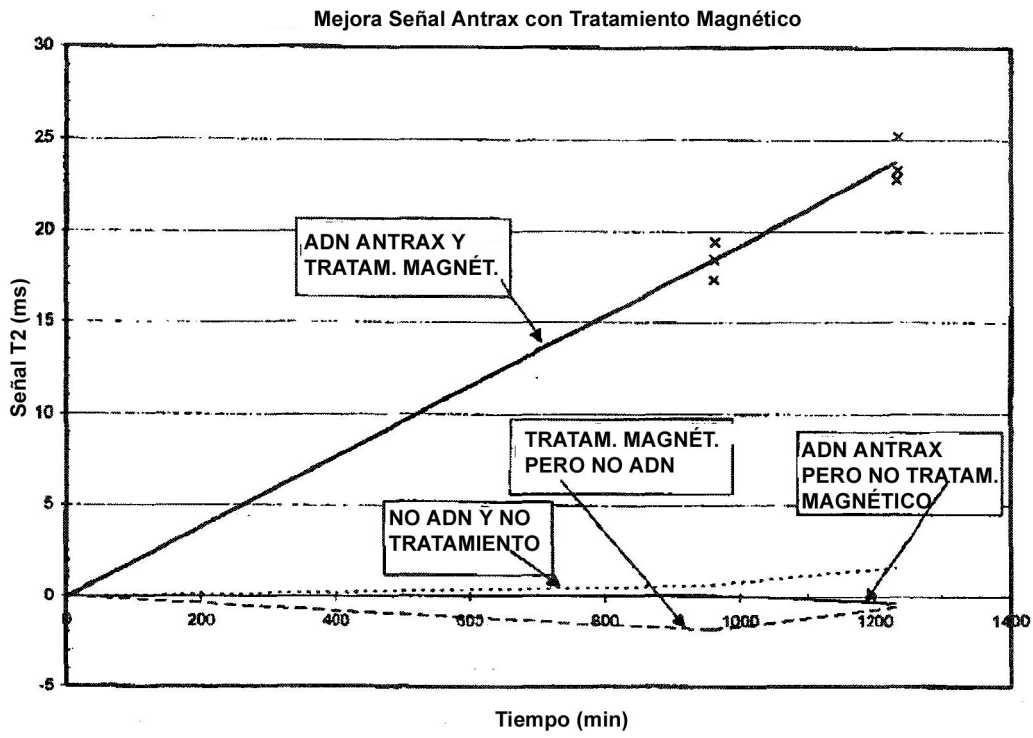


FIGURA 14



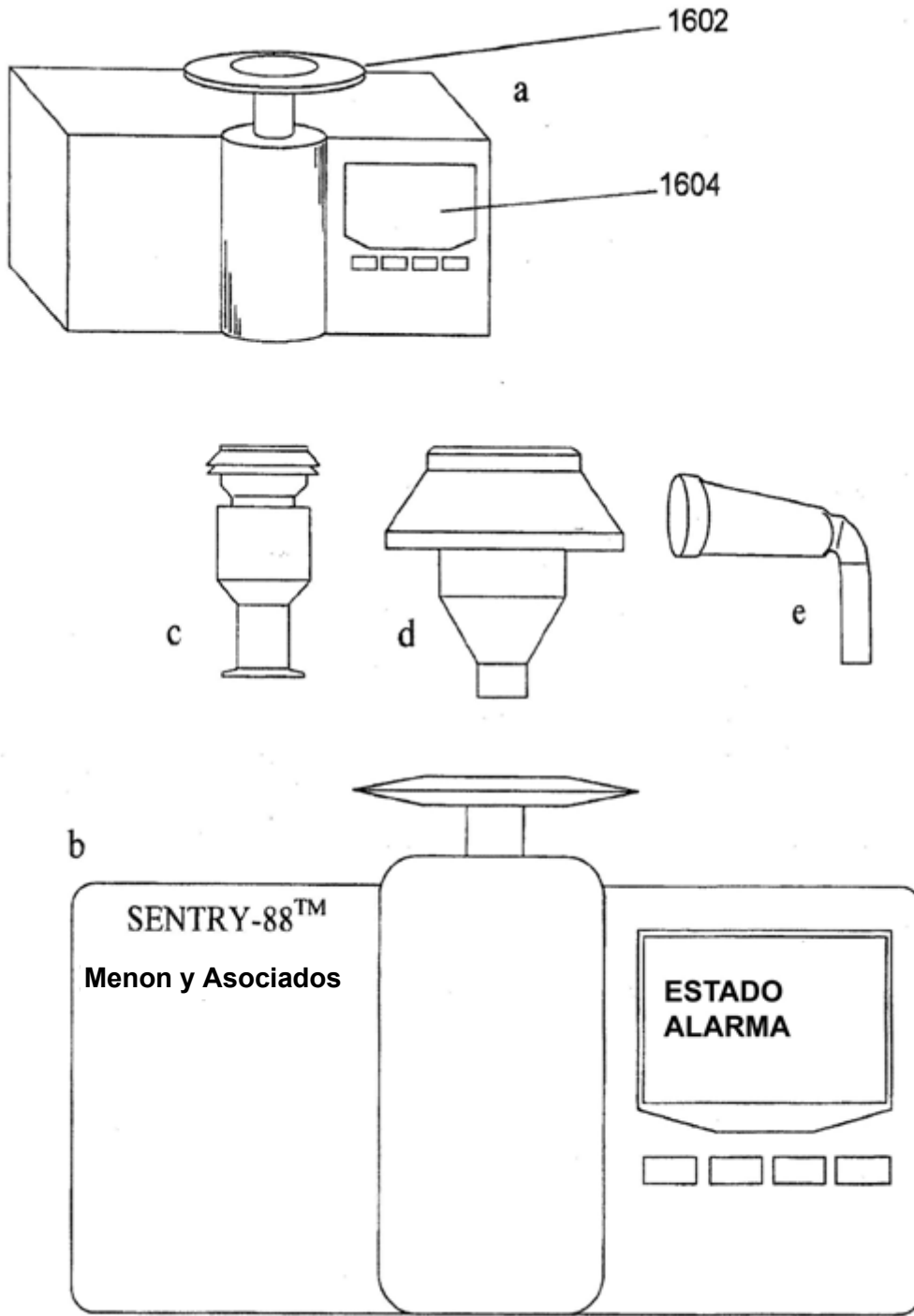


FIGURA 16

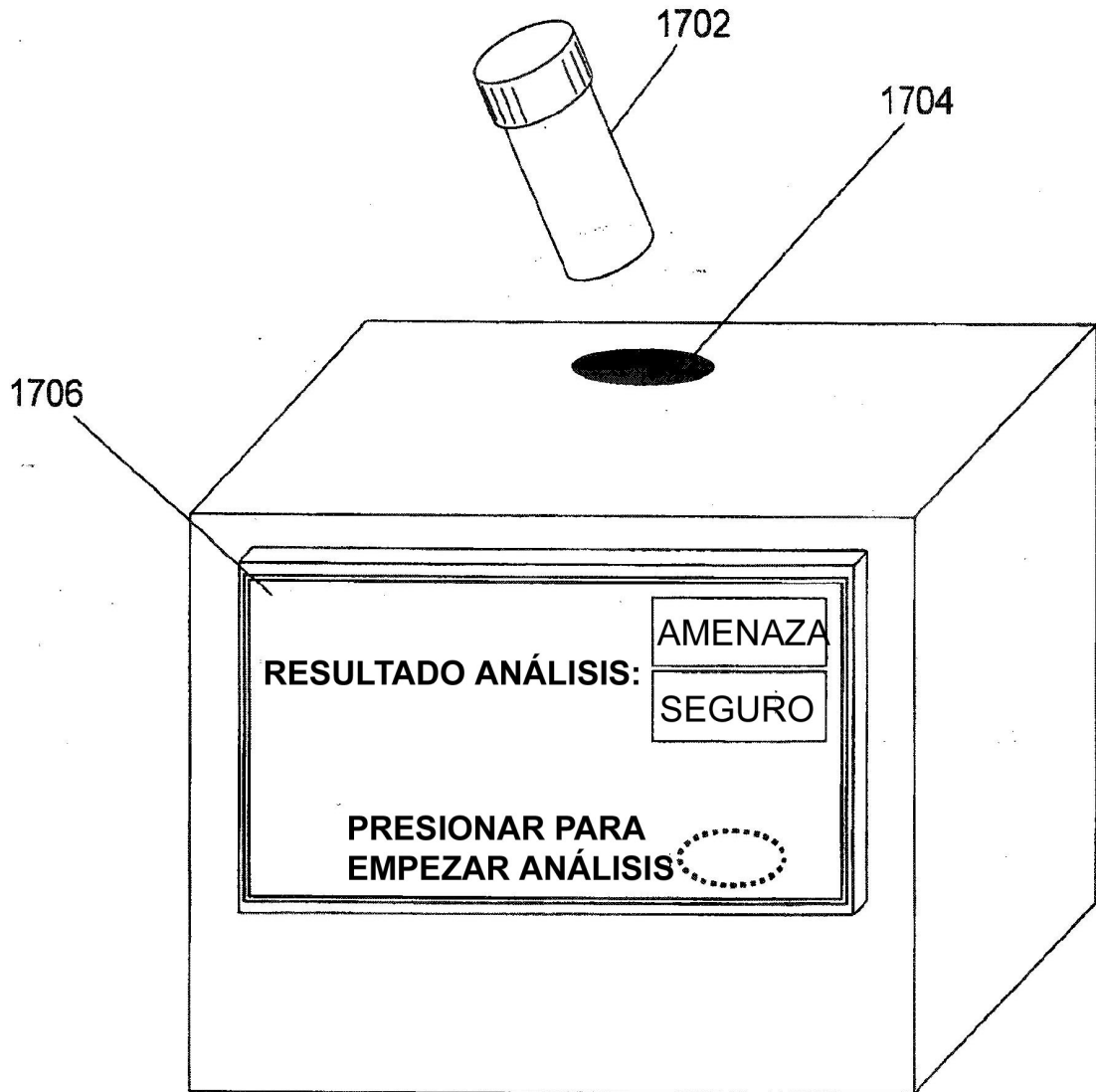


FIGURA 17

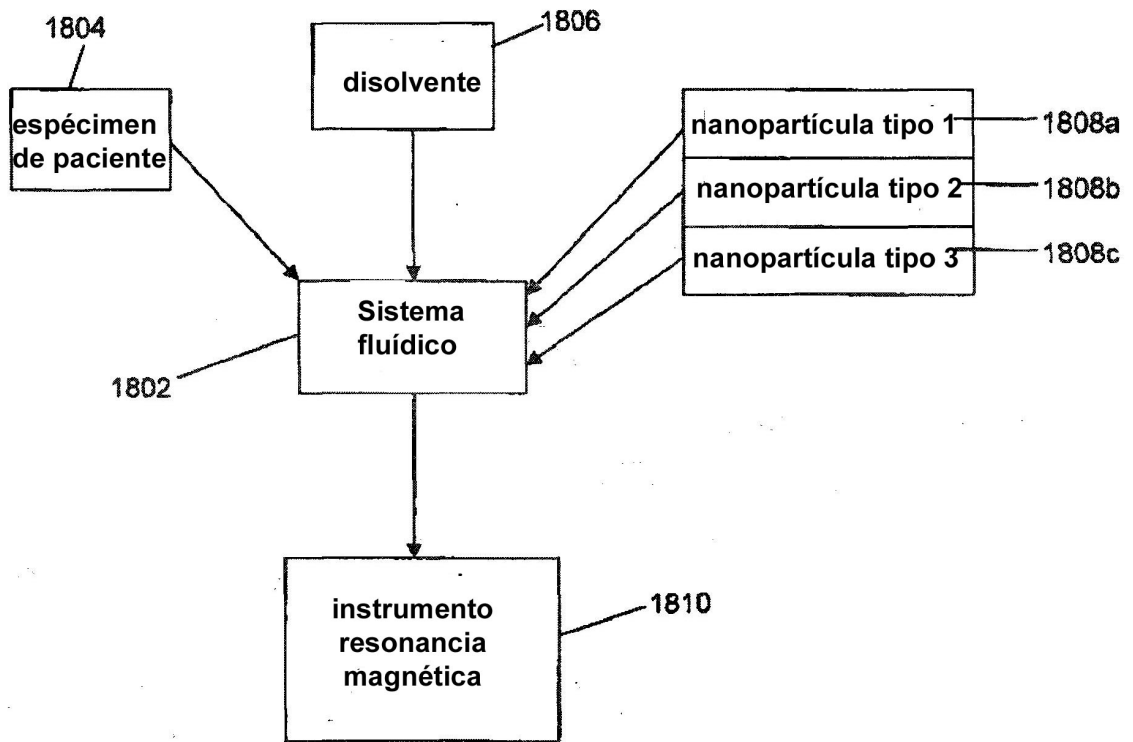


FIGURA 18