

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 495 718**

51 Int. Cl.:

**G01R 33/465** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01R 33/48** (2006.01)

**G01N 24/08** (2006.01)

**G01R 33/28** (2006.01)

**G01R 33/383** (2006.01)

**G01R 33/56** (2006.01)

**G01R 33/34** (2006.01)

**G01R 33/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2006 E 06849669 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 1869466**

54 Título: **Un método de resonancia magnética para detectar y confirmar analitos**

30 Prioridad:

**07.04.2005 US 669019 P**

**21.04.2005 US 673382 P**

**20.01.2006 US 335995**

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

**17.09.2014**

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.;**  
**HENDERSON, TERRY J. y**  
**PEREZ, J. MANUEL**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 495 718 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

Un método de resonancia magnética para detectar y confirmar analitos

### Solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de las solicitudes provisionales de EE.UU. n° de serie 60/673.382 presentada el 21 de abril de 2005, titulada BIO-HAZARD SUBSTANCE DETECTOR AND IDENTIFIER, y número de serie 60/669.019 presentada el 07/04/2005, titulada SHIPPING CONTAINER INSPECTION DEVICE.

### Interés del gobierno

10 La presente invención se hizo con la financiación del gobierno de EE.UU. bajo uno o más de los siguientes contratos: Centro de Asuntos de Guerra Aérea Naval n68335-02-c-3120, contratos del Departamento de Seguridad Nacional NBCHC060017 y HSHQPA-05-9-0039. El gobierno de EE.UU. tiene ciertos derechos en la presente invención.

### Antecedentes

#### 1. Campo de la invención

15 La presente invención se refiere generalmente al campo de la detección de analitos y adicionalmente se refiere a detectar analitos usando resonancia magnética.

#### 2. Técnica relacionada

20 La tecnología de detección de analitos específicos abarca una amplia variedad de instrumentación y técnicas de laboratorio que incluyen instrumentos de cromatografía de líquidos y de gases (CL y CG, respectivamente), espectrometría de masas (EM), espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), espectroscopia óptica y fluoroscopia, espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) y de movilidad iónica. Sin embargo, los instrumentos de análisis químico de hoy en día son grandes y caros, requieren un operario experto, implican una compleja preparación de muestras y requieren cantidades sustanciales de tiempo para el análisis.

25 Hay una necesidad crítica en el mundo de mejorar la detección de sustancias químicas y microbios específicos. Por ejemplo, en el área de la seguridad nacional, se necesita un sistema para detectar agentes biológicos, toxinas y armas químicas para proporcionar una alerta temprana en caso de ataque terrorista. Una capacidad de detección tal también podría usarse para buscar sitios clandestinos en los que estén en desarrollo o en producción tales armas, permitiendo así la acción para prevenir su uso. También se necesita un sistema para escanear correo y paquetes para detectar un ataque terrorista.

30 También se necesita la detección mejorada de patógenos para la ciencia médica. La detección sensible de ADN o proteínas asociadas a gripe aviar, encefalopatía espongiforme bovina (más comúnmente denominada la "enfermedad de las vacas locas") o el síndrome respiratorio agudo grave (SRAG) permitiría la intervención para evitar una pandemia. El amplio uso clínico de un sistema tal ayudaría en la identificación de enfermedades comunes o enfermedades graves, ayudando enormemente a los médicos en el diagnóstico.

35 También se necesita la detección de diversas sustancias químicas para aplicaciones industriales para detectar sustancias químicas industriales tóxicas (SQIT) y materiales industriales tóxicos (MIT). Un sistema tal permitiría la detección de fugas, control de procesos, detección de la degradación de materiales, control de concentración, y un sinnúmero de otras aplicaciones de procesos en una amplia variedad de industrias.

40 También se necesita la detección mejorada en la agricultura y la producción de alimentos, además de un medio para detectar la contaminación, podredumbre o envenenamiento de alimentos. Los alimentos incluyen, por ejemplo, artículos tales como agua potable y zumos de frutas. También hay una necesidad en las pruebas forenses que incluye, por ejemplo, búsqueda de secuencias de ADN específicas en una muestra en el sitio de búsqueda.

45 Están en desarrollo técnicas de detección por resonancia magnética que implican partículas paramagnéticas a escala nanométrica (nanopartículas) que previamente se han usado como agentes de contraste de IRM. Las partículas comprenden un núcleo de material paramagnético o superparamagnético (ambos se denominan generalmente en el presente documento paramagnético), recubierto por una vaina de material no magnético que está adornado con moléculas reactivas para promover la unión a células diana tales como patógenos, células tumorales, etc. Las nanopartículas se inyectan en un paciente antes del análisis de IRM. Se unen a las células diana, producen un cambio local en las propiedades de las imágenes IRM y permiten la detección o localización de las células diana.

50 Las nanopartículas también se han usado *in vitro*. Disueltas o en suspensión en un medio líquido, las nanopartículas se unen a células diana o moléculas en el medio. Las nanopartículas y los analitos pueden formar agregados que incorporan de docenas a miles de nanopartículas. Tales agregados son detectables por dispersión de la luz,

microscopía de fuerza atómica, microscopía electrónica, y en algunos casos por efectos de RMN. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.254.460 a Josephson y col.

5 Los reactivos específicos para diana pueden montarse sobre las nanopartículas para proporcionar selectividad específica por 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 la agregación solo se produce cuando cada nanopartícula está unida a múltiples analitos y cada analito está unido a múltiples nanopartículas. La agregación puede inhibirse por efectos geométricos tales como una variación en el tamaño entre nanopartículas. Puede requerirse tiempo sustancial para que se formen las agregaciones.

10 Se realizaron estudios previos sobre la aglomeración en relajómetros de mesa e instrumentos de RM de alto campo. La preparación e inserción de muestras en el tubo de RMN es tediosa. La mezcla a mano de cada muestra y luego la inserción de la muestra requiere tiempo y se pierde el importante evento de unión que tiene lugar pronto cuando el analito se une a la nanopartícula. Se requiere un instrumento compacto y automatizado para acelerar las mediciones. Por tanto, es importante entender los fenómenos que describen los cambios observados en la medición desde un punto de vista físico y bioquímico básico.

15 Estudios previos no modelaron el cambio en los efectos de T2 desde un punto de vista físico. Los simples efectos de la aglomeración se observaron por medios ópticos (microscopios) para establecer los fenómenos referentes al cambio en T2. Además, estudios previos no aprovecharon el control de la estequiometría de las nanopartículas para adaptar los parámetros medidos para diversas aplicaciones que condujeran a productos de RMN específicos.

20 Estudios previos usaron muestras que eran puras y no estaban sometidas a interferencias tales como polvo, ácidos, etc. Además, no hubo requisito de mediciones rápidas combinadas con la no interferencia de moléculas vecinas desordenadas y próximas, coste del sistema global, bajas falsas alarmas y alta probabilidad de detección. Tampoco hubo intervalo definido de concentraciones del analito que iba a detectarse.

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

25 El documento WO 02-098364 desvela proporcionar composiciones de conjugados de resto de unión-nanopartícula, agregados de estos conjugados, y nuevos métodos de uso de estos conjugados, y agregados. Las nanopartículas en estos conjugados pueden ser óxidos metálicos magnéticos, tanto monodispersos como polidispersos. Los restos de unión pueden ser, por ejemplo, oligonucleótidos, polipéptidos o polisacáridos. Las composiciones pueden usarse en ensayos para detectar moléculas diana, tales como ácidos nucleicos y proteínas, in vitro o como agentes de contraste de resonancia magnética (RM) para detectar moléculas diana.

### 30 Resúmen

Se proporciona un método que puede detectar analitos diana basándose en mediciones de resonancia magnética. En un aspecto, los analitos se detectan usando nanopartículas específicas en forma de nanoconmutadores de resonancia magnética.

35 Según la presente invención, se proporciona un método como se explica en la reivindicación 1. Las características preferidas de la invención se explican en las reivindicaciones dependientes.

40 En un aspecto, los sistemas y métodos detectan analitos elegidos como diana con especificidad muy alta, a pesar de la interferencia vecina próxima, suciedad, desorden, interferentes biológicos tales como esporas de moho, interferentes proteínicos tales como leche desnatada y albúmina de huevo, interferentes paramagnéticos tales como hemoglobina y ácido húmico (que contiene hierro quelatado), interferentes medioambientales tales como el llamado polvo de Arizona, hollín de diesel, etc.

Un aspecto incluye un sistema y método de detección de analitos en un medio líquido. En otro aspecto, los analitos pueden introducirse como aerosol, hidrosol, y en medios complejos tales como alimentos.

45 El sistema incluye un sistema de resonancia magnética para detectar señales de resonancia del líquido, un campo magnético que pasa a través de ese líquido, y una región dentro del líquido en la que el campo magnético tiene una propiedad distinta tal como un valor o gradiente particular. El líquido dentro de esa región produce señales de resonancia magnética que dependen de la propiedad del campo, y el líquido fuera de esa región también puede influirse por la región debido a la difusión. Un material que tiene afinidad particular por el analito está adyacente a la región. El analito se une a o es retenido por el material de afinidad y desplaza líquido de esa región, alterando así las señales de resonancia magnética y revelando el analito.

50 Un sistema para detectar un analito comprende: una muestra que contiene el analito dentro de un medio líquido, medios para generar un primer campo magnético dentro del líquido, medios para generar un segundo campo magnético dentro de una región especial dentro del líquido, medios para retener el analito dentro de la región especial, un instrumento de resonancia magnética que puede medir señales de resonancia magnética del líquido, y  
55 medios para analizar aquellas señales para determinar si el líquido ocupa o no la región especial. Alternativamente,

el líquido que pasa por la región especial influye en las señales de resonancia magnética del líquido restante. El segundo campo magnético es distinto del primer campo magnético de manera que las señales del líquido que reside dentro de la región especial se diferencian detectablemente de las señales del líquido localizado exterior a la región especial. Si está presente, un analito desplaza líquido de la región especial. Así, si las señales muestran que el líquido ocupa la región especial, el analito debe estar ausente. Si las señales muestran que el líquido es desplazado de la región especial, entonces el analito debe estar presente, y así se detecta.

El analito puede ser cualquier molécula, complejo molecular, microbio, sustancia química o material que pueda estar contenido en el medio líquido, y que desplace el líquido cuando entonces está contenido. Ejemplos de analitos incluyen biomoléculas tales como proteínas, ADN, ARN, o fragmentos o complejos de los mismos; enzimas, moléculas pequeñas, organismos, microbios tales como virus o bacterias completas o alteradas; células completas o alteradas de otras especies que incluyen seres humanos, sustancias químicas no biológicas tales como moléculas de armas químicas, explosivos, insecticidas, productos farmacéuticos y sustancias químicas industriales.

En una realización, el líquido contiene el analito. Aquí "contiene" significa que el analito está disuelto, en suspensión, emulsionado, o de otro modo completamente encerrado en y disperso dentro del líquido. Por tanto, el analito desplaza el líquido, que significa que las moléculas del analito no pueden ocupar conjuntamente espacio con moléculas del líquido.

El líquido puede ser cualquier material fluido que incluya un núcleo que tenga espín no cero. Solo los núcleos con espín no cero dan lugar a los fenómenos de RMN. El líquido incluye tales núcleos cuando las moléculas que comprenden el líquido comprenden un núcleo con espín no cero, tal como el hidrógeno en la molécula de agua. Alternativamente, el líquido puede incluir núcleos tales como solutos o suspensiones, tales como un soluto fluorado que genera señales de resonancia magnética a la frecuencia de Larmor de  $^{19}\text{F}$ .

En otro aspecto, un sistema incluye un primer campo magnético que pasa por el líquido. El primer campo magnético puede producirse por un electroimán, imán permanente, bobina superconductora, o cualquier otra fuente. Normalmente, el primer campo magnético es un campo magnético estático y sustancialmente uniforme que puede estar en el intervalo de 0,01 Tesla a 20 Tesla, y es una parte del sistema de resonancia magnética.

Un segundo campo magnético se genera en una región especial de la muestra. El segundo campo magnético es distinto del primer campo magnético en algún parámetro que es detectable usando resonancia magnética. Por ejemplo, el segundo campo magnético puede diferenciarse del primer campo magnético en magnitud, orientación, uniformidad, gradiente, o cualquier otro parámetro detectable. Un segundo generador de campo magnético o medio para generar el segundo campo magnético puede ser una nanopartícula, en suspensión en el líquido y sumergida en el primer campo magnético o campo aplicado. En una realización, la nanopartícula se magnetiza y produce un campo con forma de dipolo que se suma vectorialmente al campo aplicado, produciendo un campo magnético neto. La región especial es ese volumen ocupado por el campo magnético distinto. Si el campo magnético distinto se produce por una nanopartícula, la región especial es ese volumen de escala nanométrica adyacente a, pero exterior a, la superficie de la nanopartícula, en la que el campo neto se diferencia sustancialmente del campo magnético aplicado. Alternativamente, la región de campo magnético especial podría producirse por iones paramagnéticos tales como hierro o gadolinio quelatado en lugar de nanopartículas. Una ventaja de este enfoque es que las velocidades de reacción limitadas por la difusión pueden aumentarse debido a la mayor movilidad de quelatos de iones metálicos. Se usan iones similares en IRM (Gd-DTPA y Gd-DOTA).

Alternativamente, la región de campo magnético especial se produce por partículas o estructuras que tienen un tamaño superior a la escala nanométrica, a condición de que las señales de resonancia magnética se diferencien detectablemente cuando el analito está presente o ausente. Por ejemplo, las estructuras magnéticas con forma pueden proporcionar dos valores específicos del campo magnético en dos regiones, y las moléculas de unión del analito podrían acoplarse con solo una de las regiones de campo. Entonces, la medición de la detección es un análisis espectral de la señal de resonancia magnética compuesta, que presentará dos picos de frecuencia correspondientes a las dos regiones de campo cuando no esté presente analito, o solo un único pico cuando el analito oculte una de las regiones de campo.

En un aspecto se usa ciclo de temperatura para acelerar la unión entre el analito y la nanopartícula. Esto acorta el tiempo del evento de unión aumentando la movilidad del analito y/o la nanopartícula. Cuando una barrera de energía inhibe la unión, mayores temperaturas mejoran la tasa de unión. El ciclo de temperatura puede incluir calentamiento y refrigeración o viceversa. Entonces, la muestra se mide en el instrumento de resonancia magnética.

En un aspecto, el sistema incluye un mecanismo o agente de unión para retener el analito en la región especial, para desplazar el líquido de la región especial, conduciendo a la detección del analito. Un agente de unión tal puede incluir cualquier superficie o molécula de material por la que el analito tenga afinidad. Tal retención puede llevarse a cabo por enlaces de hidrógeno, fuerzas iónicas, enlaces covalentes, puentes de sulfuro, fuerzas de van der Waals, fuerzas electrostáticas, o cualquier otro tipo de unión molecular o de material o ligando de afinidad. El agente de unión está posicionado adyacente a la región de campo magnético con forma de manera que la molécula diana, cuando se una, ocupe esa región y excluya el líquido de la misma. Por ejemplo, el agente de unión puede ser un anticuerpo producido contra una proteína del analito, o ADN complementario a las secuencias de ADN del analito.

Preferentemente, el agente de unión también tiene afinidad nula o afinidad negativa por todos los solutos distintos del analito que puedan estar presentes. Además del ADN pueden usarse otros medios de retención tales como aptámeros, moléculas pequeñas, etc. Las dianas incluyen, pero no se limitan a, las siguientes:

- a. Un anticuerpo que reconoce y se une a un antígeno.
- 5 b. Una secuencia de oligonucleótido o de ADN complementaria a una diana de ADN o ARN.
- c. Un aptámero de ADN o ARN que se une a una proteína diana, bacteria, virus, levadura u hongo.
- d. Una proteína o péptido que se une a una proteína diana, bacteria, virus, levadura u hongo.
- e. Un pseudopéptido compuesto de aminoácidos no naturales con una unión más fuerte a una diana o mejor estabilidad medioambiental.
- 10 f. Una molécula pequeña o combinación de moléculas pequeñas que puedan unirse a una diana.
- g. Monosacáridos, polisacáridos, hidratos de carbono y azúcares que puedan unirse a una proteína diana, bacteria, virus, levadura u hongo.

Otro aspecto incluye un instrumento de resonancia magnética, que puede excitar y detectar señales de resonancia magnética del medio líquido. Los sistemas de resonancia magnética existentes pueden realizar esta función. Más preferentemente, el instrumento es un sistema de resonancia magnética simple, compacto, automatizado y de propósito único que puede realizar la medición de detección automáticamente. El sistema mide señales relacionadas con la presencia o ausencia de líquido, afectadas por el segundo campo magnético en la región especial. Por ejemplo, si la magnitud del campo magnético en la región especial se diferencia de la del resto del líquido, entonces el sistema de resonancia magnética puede medir el contenido espectral de las señales de resonancia magnética para determinar el campo magnético del que emergieron las señales. Así, analizando para la frecuencia de Larmor del líquido en la región especial, el sistema determina si el líquido ocupa o no esa región.

Una medición alternativa es el tiempo de relajación espín-espín ( $T_2$ ) del líquido.  $T_2$  se afecta cuando el campo magnético en la región especial tiene fuertes gradientes, y particularmente cuando el líquido difunde a través de aquellos campos de gradiente en tiempos cortos en comparación con la medición. Así, el sistema puede determinar la presencia del analito midiendo el  $T_2$  del líquido para determinar si se está produciendo despolarización en la región especial.

En un aspecto, el sistema de resonancia magnética compacto puede medir tanto un cambio positivo como negativo en  $T_2$ . La aglomeración se describe en la patente de Josephson como la formación de un gran ensamblaje supermolecular de moléculas. La aglomeración se produce necesariamente más tarde en el tiempo que el evento de unión. En el caso de aglomeración, todas las mediciones muestran un cambio de  $T_2$  negativo. Asimismo, el parámetro definido como “ $1/T_2$  positivo” en Josephson representa un cambio negativo en  $T_2$ . La aglomeración se describe por Josephson como un método en el que varias moléculas se unen entre sí y forman ensamblajes suficientemente grandes como para cambiar el  $T_2$  del agua. En una realización, el sistema inventivo mide cambios de  $T_2$  debido al evento de unión del analito, conduciendo a cambios de  $T_2$  positivos y negativos antes de la aglomeración.

En un aspecto, el sistema de resonancia magnética compacto mide primero el  $T_2$  del nivel inicial en las nanopartículas o disolución de nanopartículas, que luego se mezcla con el analito y  $T_2$  se mide de nuevo para determinar si se ha producido o no un cambio en  $T_2$ . Esto se hace para garantizar la correcta concentración de nanopartículas y estequiometría coherente, además de para neutralizar errores de dosificación y de mezcla, variaciones en las propiedades de las nanopartícula, errores de transporte fluido, etc.

En una realización, el sistema puede detectar analito midiendo señales de resonancia magnética de la muestra en un único momento. Alternativamente, el sistema puede realizar una serie de mediciones que abarcan un periodo de tiempo y puede comparar o analizar las mediciones para mejorar la detección del analito. Por ejemplo, la unión entre analito y nanopartículas puede continuar durante un intervalo que es mayor que el tiempo requerido para una medición particular. Entonces, el sistema puede realizar las mediciones repetidamente para observar los cambios producidos por la unión. Como otro ejemplo, el analito puede primero unirse a nanopartículas para formar binarios, provocando un desplazamiento positivo en  $T_2$ , y más adelante los binarios pueden combinarse para formar aglomerados, provocando un desplazamiento negativo en  $T_2$ . Tales datos pueden potenciar enormemente la calidad del resultado reduciendo la tasa de falsas alarmas, proporcionando un menor umbral de detección y potenciando la probabilidad de detección para una cantidad dada de analito.

El sistema puede derivar parámetros relacionados con la cinética de reacción de mediciones repetidas en la misma muestra, incluyendo una tasa de cambio de un parámetro o un parámetro de reacción acumulado. Estos resultados pueden entonces usarse para orientar mediciones adicionales para confirmar o cancelar la indicación inicial. Por ejemplo, si una muestra presenta un cambio pequeño, pero sospechoso, de  $T_2$  poco después de la mezcla, el sistema puede iniciar una serie de pruebas para determinar la tasa de cambio en  $T_2$  durante un periodo de tiempo.

Entonces, si aquellos resultados posteriores confirman que el analito está presente, puede emitirse una alarma, pero si las mediciones de continuación indican que no hay analito, entonces puede disiparse la sospecha inicial, evitando así una falsa alarma. Usando un protocolo de re-escaneo provisional, combinado con un análisis de la magnitud de la tasa, el sistema potencia tanto la fiabilidad como la sensibilidad del umbral.

5 Basándose en resultados experimentales y modelado teórico, un cambio de T2 positivo es debido a analito que desplaza moléculas de agua tras la unión a las nanopartículas, y el cambio de T2 negativo es debido a desfase repetido de las moléculas de agua dentro de una estructura de jaula formada por múltiples nanopartículas. Además, el cambio de T2 positivo o negativo puede promoverse por procesamiento y estequiometría. Por ejemplo, las relaciones de nanopartículas y el reactivo pueden ajustarse para proporcionar cambios de T2 negativos o positivos.  
10 En algunas circunstancias puede ser importante medir tanto efectos de T2 negativos como positivos para eliminar la interferencia de la muestra base. Por ejemplo, una muestra de prueba contaminada con un ión paramagnético, tal como ácido húmico con hierro quelatado, produce una reducción en el T2 de la mezcla. Así, si hay un analito mezclado con el ácido húmico, puede medirse del siguiente modo. Primero, medir la muestra antes de mezclar las nanopartículas, para generar la medición de T2 del nivel inicial. Luego mezclar las nanopartículas y medir el cambio  
15 en T2, positivo o negativo, para revelar el analito. Alternativamente, en el caso de que no pueda tomarse una medición del nivel inicial separada, es útil mezclar nanopartículas que conducen a una diferencia de T2 positiva tras la unión del analito, de manera que el analito pueda detectarse a pesar del contaminante.

“Mezclas multiplexadas de nanopartículas” son preparaciones de nanopartículas sensibilizadas a múltiples analitos. Hay dos escenarios de multiplexación. Primero, cada nanopartícula en la mezcla está sensibilizada a un analito específico. Segundo, una única nanopartícula está sensibilizada a múltiples analitos.  
20

En una realización, un sistema de monitorización de aire automatizado incluye entradas para admitir la muestra junto con aire, un colector que reúne el material de muestra y lo concentra en una forma líquida, llamada una muestra en bruto, y un sistema fluido. El sistema fluido contiene la muestra en bruto, por ejemplo, en un recipiente y proporciona dosificación coherente de la muestra en bruto, por ejemplo, mediante un tubo de salida usando una  
25 bomba tal como una bomba peristáltica. La muestra dosificada se mezcla con nanopartículas seleccionadas que pueden estar en agua, por ejemplo, sacada de depósitos mediante una salida por una bomba. Tan pronto como tiene lugar la reacción, el sistema fluido mueve la muestra al área de muestra del sistema de resonancia magnética para la medición, por ejemplo, mediante un tubo accionado por una bomba. Alternativamente, la mezcla y el procesamiento de la muestra pueden tener lugar dentro del sistema de resonancia magnética. El sistema fluido puede incluir medios para el lisado de células en los que el sistema fluido puede lisar o alterar células o virus en la muestra para liberar proteínas, ARN o ADN de la célula diana. El sistema fluido puede también tener un control de temperatura incorporado para acelerar el evento de unión. El sistema fluido también puede tener un disolvente de limpieza del sistema global para eliminar contaminación. El disolvente de limpieza o agente de aclarado puede sacarse de un depósito y bombearse a través del tubo que distribuye las muestras al área de muestra. El sistema  
30 fluido también permite pruebas de control positivo y negativo para garantizar que el sistema global sea funcional, y realiza pruebas de calibración usando patrones de calibración.  
35

En una realización se usan quelatos en lugar de nanopartículas para generar la región de campo magnético distinta y para unirse al analito. Una ventaja del uso de iones quelatados es que permite la difusión más rápida a través del medio líquido para acelerar los procesos limitados por la difusión. Por otra parte, con nanopartículas pueden confeccionarse las moléculas de afinidad para seleccionar el analito deseado, mientras que los quelatos se producen solo en formas moleculares específicas. Las nanopartículas tienen más área para unir las moléculas de afinidad en comparación con los quelatos. Las nanopartículas pueden decorarse con quelatos para unirse a analitos, explosivos y sustancias químicas.  
40

En un aspecto, la segunda región de campo magnético, que es generada por núcleos paramagnéticos o quelatos u otras estructuras magnéticas, tiene un tamaño comparable al tamaño del analito, de manera que el analito unido llena exactamente la segunda región de campo magnético, excluyendo el líquido de esa región, proporcionando así la mayor señal y la mayor sensibilidad. Por ejemplo, si el analito es una molécula relativamente pequeña tal como una molécula de vapor explosiva o una molécula de arma química, entonces el tamaño de la segunda región de campo magnético se elige preferentemente para estar en el intervalo de 1 a 10 nm. Para detectar un analito mayor,  
45 tal como una toxina o ADN o partícula de virus, entonces el tamaño de la segunda región de campo magnético sería de 10 a 100 nm. Si el analito es un objeto incluso mayor tal como una bacteria, el tamaño de la segunda región de campo magnético puede ser 100 a 1000 nm o más, según se necesite para coincidir con el analito.  
50

Las nanopartículas pueden incluir estructuras que proporcionan una firma óptica. Por ejemplo, colorantes o centros fluorescentes pueden unirse a o incluirse dentro de las nanopartículas, y pueden exponerse a fotones de energía suficiente para excitar fluorescencia, provocando la emisión de fotones de fluorescencia que tienen una energía diferente de, y normalmente inferior a, la de los fotones de excitación. Los fotones de excitación y fluorescencia pueden estar en el intervalo ultravioleta, visible o infrarrojo. La detección de los fotones de fluorescencia proporciona una medida de la concentración de nanopartículas. Además, las estructuras pueden modificarse cuando el analito se une a la nanopartícula, y tal acción puede producir un cambio detectable en la fluorescencia, tal como un cambio en  
55 la intensidad o energía de los fotones de fluorescencia. La detección de este cambio proporcionaría una indicación, independiente de las mediciones de resonancia magnética, de que se ha producido la unión del analito y así ese  
60

analito está presente en la muestra.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes de la siguiente descripción detallada, las reivindicaciones y los dibujos adjuntos.

### Breve descripción de los dibujos

- 5 Los detalles de la presente invención, tanto en cuanto a su estructura como operación, pueden deducirse en parte por estudio de los dibujos adjuntos, en los que números de referencia similares se refieren a partes similares, y en los 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.
- 10 La Figura 2 es una gráfica del campo magnético neto que rodea la nanopartícula de la Figura 1.
- La Figura 3 es un gráfico de la magnitud del gradiente de campo magnético alrededor de la nanopartícula.
- La Figura 4 es un gráfico de la magnitud del gradiente de campo a lo largo del eje de la partícula.
- La Figura 5 es un diagrama de bloques funcional de un sistema de resonancia magnética.
- Las Figuras 6a-d es una representación de cuatro configuraciones de la antena.
- 15 La Figura 7 es una representación esquemática de una realización de un imán.
- La Figura 8 es un diagrama de circuitos de un oscilador amortiguado.
- La Figura 9 es una ilustración esquemática de una instalación que tiene un controlador y múltiples unidades de sensor.
- La Figura 10 muestra un esquema de un sistema de monitorización de HVAC.
- 20 Las Figuras 11 a-e representan una realización de un sistema de instalación fija y tres entradas de colector.
- La Figura 12 es una vista en perspectiva frontal de un sistema portátil.
- La Figura 13 es un diagrama de bloques de un sistema adaptado a una aplicación de diagnóstico médico.

### Descripción detallada

- 25 Después de leer esta descripción será evidente para un experto en la materia cómo implementar la invención en diversas realizaciones alternativas y aplicaciones alternativas. Sin embargo, aunque diversas realizaciones de la presente invención se describirán en el presente documento, se entiende que estas realizaciones se presentan a modo de ejemplo solo, y no limitación. Como tal, esta descripción detallada de diversas realizaciones alternativas no debe interpretarse que limita el alcance o amplitud de la presente invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

### 30 Resonancia magnética

- En el presente documento se proporciona un breve resumen de los elementos técnicos usados en ciertas realizaciones. El analito o molécula diana está contenido en un medio, preferentemente un líquido tal como agua, que incluye un núcleo atómico que tiene un espín no cero, tal como hidrógeno. Como es muy sabido (véase, por ejemplo, Pulse Methods in 1D & 2D Liquid-Phase NMR, Wallace S. Brey, Academic Press 1988), el componente magnético de un núcleo tal se polariza o se orienta espacialmente en un campo magnético, y puede inducirse en precesión de resonancia magnética a una frecuencia dada por:

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

- en la que B es la intensidad del campo magnético en la posición del núcleo,  $\gamma$  es la razón magnetogirica del núcleo y  $f_{\text{Larmor}}$  es la frecuencia de resonancia o frecuencia de Larmor ( $\gamma = 2,675 \times 10^8 \text{ Tesla}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para el núcleo de hidrógeno).
- 40 Los componentes magnéticos, o momentos magnéticos, de los núcleos son cantidades vectoriales y se suman para dar un vector de magnetización del volumen resultante que es la señal de RMN medida por espectrómetros de RMN.

- Tras una perturbación tal como la empleada en registrar las señales de RMN (véase más adelante), el vector de magnetización del volumen se recupera a su estado estacionario original con el tiempo; este proceso se denomina relajación magnética nuclear. Se usan dos constantes de tiempo fundamentales para describir esta relajación en términos de un proceso exponencial simple. La recuperación de la magnetización del volumen 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 T1. Normalmente, T1 es del orden de milisegundos a segundos. La disminución exponencial

simple de la magnetización del volumen 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 T2. Para señales de líquidos, T2 está generalmente en el intervalo de 100 milisegundos o más. Por otra parte, muestras sólidas generalmente tienen valores de T2 en el intervalo de 1 a 100 microsegundos.

5 Una medición de resonancia magnética se realiza aplicando uno o más pulsos de energía de RF (radiofrecuencia) a la muestra y midiendo la magnetización del volumen que se reorienta por el pulso. Los pulsos de RF tienen una frecuencia igual a la frecuencia de Larmor, y duración suficiente para hacer que el vector de magnetización del volumen se reoriente en un plano perpendicular al primer campo magnético, en el que el vector de magnetización del volumen (la señal de RMN) puede registrarse con el tiempo. Por tanto, los pulsos de RF son normalmente  
10 múltiplos de 90 grados.

La relajación espín-espín se mide normalmente por una serie de pulsos de RF para dar lugar a señales de eco de espín. Un eco de espín se genera por un pulso de 90 grados seguido de un pequeño tiempo de retardo (normalmente designado  $\tau$ ), seguido de un pulso de 180 grados ( $90^\circ\text{-}\tau\text{-}180^\circ$ ). Se usa un segundo  $\tau$ , idéntico en tiempo al primero, antes de registrar el vector de magnetización del volumen. La serie de pulsos de RF y retardos de  
15 tiempo se usa para primero desfasar los momentos magnéticos nucleares que comprenden la magnetización del volumen en el plano perpendicular al primer campo magnético durante el primer  $\tau$ , y reenfoque la magnetización del volumen restante en este plano durante el segundo  $\tau$ . Este último reenfoque crea una señal de eco, que puede registrarse. El método más común para medir la relajación espín-espín es el originalmente descrito 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 de Meiboom-Gill modificado por Carr-Purcell (CPMG) usa una serie de pequeños retardos de tiempo seguidos de pulsos de 180 grados después de la secuencia de  $90^\circ\text{-}\tau\text{-}180^\circ$  inicial descrita anteriormente. Esto va seguido a su vez del vector de magnetización del volumen resultante  $[90_x^\circ\text{-}$   
20  $(\text{registro de } \tau\text{-}180_y^\circ\text{-}\tau)_n]$ . Las amplitudes de las señales de eco de espín son proporcionales a la magnetización del volumen restante en el momento del eco, que se vuelven sucesivamente más pequeñas a medida que aumenta el número de secuencias (a medida que aumenta el valor de n). Por tanto, el medir la amplitud del vector de magnetización del volumen después de diversos valores de n y ajustar los datos a una disminución exponencial simple con T2 como tiempo de relajación proporciona una medida directa de T2.

### 30 Campos de nanopartículas paramagnéticas

En una realización preferida se emplean nanopartículas para influir en el campo magnético en una región próxima a las nanopartículas. El núcleo paramagnético o superparamagnético de la nanopartícula se magnetiza cuando se le aplica un campo magnético externo. El superparamagnetismo está relacionado con el ferromagnetismo en el que el tamaño del cuerpo magnetizado es demasiado pequeño como para formar un dominio magnético. El núcleo  
35 superparamagnético presenta una alta permeabilidad y campo de saturación bastante alto comparable al hierro, pero poca o ninguna histéresis ( $H_c \sim 0$ ). Cuando se pone en un campo magnético, el núcleo se magnetiza fuertemente paralelamente a la dirección del campo aplicado. Cuando se quita el campo externo, el núcleo pierde esencialmente toda su magnetización. Ignorando la anisotropía y los efectos de forma, el momento magnético inducido del núcleo se facilita por:

$$40 \quad m_{\text{núcleo}} = (4\pi/3)(r_{\text{núcleo}}^3)(\chi B_0)$$

en la que  $m_{\text{núcleo}}$  es el momento dipolar del núcleo,  $r_{\text{núcleo}}$  es su radio,  $B_0$  es el campo aplicado y  $\chi$  es la susceptibilidad. Normalmente,  $\chi \approx 0$  para materiales no magnéticos,  $\chi \approx 1$  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 la saturación. Por ejemplo, la magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) es superparamagnética con una susceptibilidad de aproximadamente 1 para campos por debajo  
45 de la saturación de aproximadamente 0,5 Tesla.

El núcleo magnetizado produce un campo magnético que normalmente se aproxima a un campo dipolar, o el campo magnético producido por un dipolo magnético ideal localizado en el centro del núcleo paramagnético de la nanopartícula. En localizaciones fuera del núcleo de la nanopartícula, el campo magnético dipolar se parametriza del siguiente modo:

$$50 \quad B_r = 2 m_{\text{núcleo}} \cos\theta / r^3$$

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

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

55 El campo dipolar se suma linealmente al campo aplicado (como vectores), produciendo el campo magnético neto. La frecuencia de Larmor se determina por el campo magnético neto experimentado por el núcleo polarizado. Los componentes del campo dipolar ortogonales al campo aplicado producen principalmente una rotación del campo,

mientras que los componentes dipolares paralelos al campo aplicado cambian directamente la magnitud del campo neto y, por tanto, cambian la frecuencia de Larmor, con respecto al campo aplicado sin distorsionar. El campo neto  $B_{\text{neto}}$ , sin considerar los términos de segundo orden, y para  $r \gg r_{\text{núcleo}}$ , es el siguiente:

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

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

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

en la que los corchetes indican vectores unitarios en las direcciones  $r$  o  $\theta$ .

### Difusión en un líquido

- 10 Algunas realizaciones incluyen un medio líquido. El líquido contiene el analito y el núcleo que emite las señales de resonancia magnética. Aquellas señales están influidas por la difusión, particularmente la difusión de las moléculas del líquido a través del líquido, o auto-difusión molecular. La difusión se formula del siguiente modo:

$$\sigma_{\text{recorrida}} = (2 D_{\text{moléc}} t)^{1/2}$$

- 15 en la que  $\sigma_{\text{recorrida}}$  es la distancia promedio recorrida en un recorrido aleatorio tridimensional isotrópico en el tiempo  $t$ , y  $D_{\text{moléc}}$  es el coeficiente de difusión translacional. Por ejemplo,  $D_{\text{moléc}} = 1,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  para agua a temperatura ambiente.

- Las mediciones de resonancia magnética también están influidas por la difusión de espín, un fenómeno en el que el espín o la polarización de un núcleo se intercambia con la de un núcleo próximo del mismo tipo. La difusión de espín puede distribuir efectos dependientes de espín, tales como despolarización, en toda la muestra. Por ejemplo, si una pequeña fracción de los núcleos de hidrógeno en agua experimenta una fuerza despolarizante, la difusión de espín puede hacer que todo el hidrógeno en la muestra asuma un valor de polarización promedio.
- 20

### Un modelo

- Este modelo trata interacciones dependientes de espín entre nanopartículas y disolvente, y proporciona una estructura útil para cuantificar los efectos de T2 observados. Se usa en algunas realizaciones como base para medir y detectar analitos. Se supone una nanopartícula simplificada que consiste en un núcleo esférico de material superparamagnético, rodeado por una vaina esférica de material no magnético, todo en agua. Sin embargo, el modelo puede aplicarse o modificarse para su uso con nanopartículas de otras formas y para su uso con otros disolventes. El modelo sugiere los siguientes mecanismos para los cambios de T2 observados:
- 25

- (1) Las nanopartículas en disolución reducen T2 con respecto al agua pura. 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 precesen a diferentes frecuencias, conduciendo a interferencia destructiva. Aunque CPMG normalmente reenfoca los efectos de no uniformidad del 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 la dispersión de espín dependiente del tiempo y rompiendo el efecto de reenfoque de CPMG.
- 30

- (2) Cuando las nanopartículas reaccionan con el analito, pero no se aglomeran, aumenta T2. Esto puede ser debido a las moléculas de analito que ocupan parte de la región de campo distorsionado alrededor de la nanopartícula, excluyendo de este modo el agua de esa región, reduciendo así la dispersión de espín y aumentando T2.
- 35

- (3) T2 disminuye cuando se aglomeran las nanopartículas y el analito. Esto puede ser debido a la formación de una estructura tipo jaula llena de agua en la que las moléculas de agua sufren colisiones de dispersión de espín repetidas con las nanopartículas de alrededor. La suficiente repetición de la despolarización de incrementos graduales reduciría T2, a pesar de las porciones que ocluyen analito de las regiones de campo no uniformes.
- 40

- (4) Una exponencial simple normalmente ajusta la curva de disminución de la polarización. Esto es a pesar del hecho de que los hidrógenos próximos a las nanopartículas están fuertemente desfasados, mientras que el disolvente general solo ve un campo uniforme, un sistema de dos poblaciones. Sin embargo, las poblaciones de espín se equilibran rápidamente a través de la muestra por difusión de espín mediante interacciones biestables homonucleares, produciendo un único T2 promediado.
- 45

- La nanopartícula del modelo se representa en sección transversal en la Figura 1 en presencia de un campo magnético aplicado indicado por la flecha 110. La nanopartícula consiste en un núcleo 112 magnetizable que preferentemente es paramagnético y más preferentemente es superparamagnético. El campo con forma de dipolo local inducido de la nanopartícula se representa por las líneas discontinuas. El radio del núcleo debe ser suficientemente grande como para producir una distorsión significativa del campo magnético en una región suficientemente grande como para producir un cambio en T2 del líquido en esa región. El radio del núcleo debe ser
- 50

suficientemente pequeño de manera que el núcleo no se vuelva ferromagnético. Normalmente, el radio del núcleo tiene aproximadamente 1 a 20 nm. Propiedades deseables del núcleo incluyen alta susceptibilidad a la intensidad del campo magnético aplicado, campo de alta saturación, preferentemente superior a la intensidad del campo magnético aplicado, compatibilidad química con el medio líquido, y campo remanente muy bajo. La última característica se desea para prevenir que las nanopartículas se agreguen juntas debido a la atracción magnética. El material del núcleo puede ser cualquier material magnetizable tal como compuestos de óxido de hierro, cobalto y níquel. Las nanopartículas pueden ser no tóxicas y biodegradables si se usa un núcleo de hierro. El núcleo está recubierto por una o más vainas 114 de material no magnético, por ejemplo, dextrano o sílice. Los recubrimientos de sílice son estables y robustos, y pueden evitar la necesidad de refrigeración. Pueden considerarse otros recubrimientos poliméricos tales como poliestireno, ácido poliacrílico, poliacrilamida y poli(alcohol vinílico).

La magnitud del campo neto en la localización  $(r, \theta)$  alrededor de la nanopartícula tiene tanto variaciones positivas como negativas con respecto a un campo uniforme. Esto se muestra en el gráfico de la Figura 2.

Mientras que el método de CPMG reenfoca las no uniformidades del campo estático, aquellas moléculas de agua que se mueven de una región de campo a otra, en el tiempo entre pulsos de reenfoque, no se reenfocan y producen efectos de T2. Así, los cambios de T2 están relacionados con el 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 vaina, con un diámetro de 50 nm global. La susceptibilidad y el campo de saturación dependen de la composición, estructura cristalina 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 0,5 T de saturación y 0,5 para la susceptibilidad. El campo neto en la proximidad de esta nanopartícula se muestra en la Figura 2. Se observan fuertes aumentos del campo en los dos "polos" de la partícula, con respecto a la reducción de campo alrededor del "ecuador". El campo dentro de la vaina no es de interés y no se calcula; se representa como  $B_0$ .

El gradiente de campo magnético se muestra en las Figuras 3 y 4. La Figura 3 es un gráfico de la magnitud del gradiente de campo alrededor de la nanopartícula. La Figura 4 es un gráfico 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 ecos de  $T_{eco} = 4$  ms, la distancia recorrida promedio es aproximadamente 3,5 micrómetros. Ésta es mucho más grande que la escala de longitud de las regiones de campo distorsionado; de ahí que sea seguro suponer que la molécula de agua tiene tiempo suficiente para entrar y salir de la región de campo distorsionado entre pulsos de reenfoque.

El desfase de espín producido por la molécula de agua que pasa a través de la región de campo distorsionado puede estimarse del siguiente modo. La frecuencia de precesión instantánea es proporcional al campo magnético neto en la localización de la molécula de agua. Por simplicidad, los presentes inventores suponen que los recorridos aleatorios de la molécula a través de la región de campo distorsionado de una nanopartícula, durante un intervalo de ecos, empiezan y terminan en el disolvente principal que solo tiene el campo aplicado de  $B_0$ . Aunque la molécula está dentro del campo distorsionado, acumula precesión adicional en comparación con el resto del disolvente. El avance de fase debido al campo  $B_0$  se reenfoca luego como siempre por los pulsos de 180, pero no se reenforará la fase de precesión adicional del tiempo gastado en el campo distorsionado. El incremento de fase sin reenfoque debido al recorrido de una distorsión de campo es la integral del campo experimentado por la partícula, menos aquella en el disolvente principal:

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

en la que  $d_{fase}$  es la diferencia de fase acumulada entre un hidrógeno que pasa por  $B_{neto}$  (aquí una función explícita del espacio) frente a uno que se queda en el campo uniforme  $B_0$ ,  $\gamma$  es de nuevo el coeficiente de Larmor y la integral es con el tiempo entre pulsos de reenfoque. Para obtener un cálculo estimado aproximado del desplazamiento de fase, la ecuación previa puede simplificarse suponiendo que la molécula reside en un campo constante durante un tiempo necesario para difundir a través de la región de campo distorsionado, resultando la siguiente aproximación:

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

Usando los tamaños de nanopartícula y las suposiciones de campo tratadas anteriormente, el campo magnético neto se desvía del campo aplicado normalmente 20 mT. Los espines dentro de ese campo precesarán aproximadamente 850 kHz más rápido que en el disolvente principal. Una escala de longitud típica para esta distorsión es  $x_{dis} = 20$  nm. El tiempo necesario para difundir 20 nm es 133 ns. Durante ese tiempo, los espines precesan una  $d_{fase} = 0,1$  radianes adicional. Esto representa un desfase sustancial en un único intervalo de ecos por un único recorrido molecular, que si no es reenfoque por CPMG producirá un T2 corto. En la muestra, muchas moléculas de agua estarán interactuando con el campo no uniforme continuamente, y cada una experimentará un desplazamiento de fase positivo o negativo dependiendo de la trayectoria específica. En el conjunto, la dispersión de espín adicional produce interferencia destructiva y despolarización global.

El coeficiente de difusión de espín en agua está en el intervalo de  $D_{espín} \approx 10^{-15}$  a  $10^{-16}$  m<sup>2</sup>/s, dependiendo de la temperatura y otros factores. Aunque la difusión de espín es más lenta que la difusión molecular, es suficiente para

propagar la despolarización entre muchas moléculas de agua en algunos ms. De forma interesante, las tasas de difusión de espín en estado sólido tienden a ser mucho mayores, del orden de  $10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s, que es comparable a la difusión molecular en agua libre. Si la vaina presenta difusión de espín rápida, podría servir de conducto para distribuir la polarización entre todas las moléculas de agua que están en contacto con la superficie de la nanopartícula.

5

Varios experimentos han demostrado un aumento 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, previniendo eficazmente que se muestreen moléculas de agua de las regiones de campo distorsionado en la superficie de la nanopartícula.

10

Cuando las moléculas de analito se unen a la superficie de una nanopartícula, una porción de la superficie se ocluye. La tasa de despolarización global disminuye y T2 aumenta. El cambio en la tasa de disminución 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 en promedio. Si el analito pasa solo parte de su tiempo cubriendo la superficie de la nanopartícula, entonces el cambio de T2 se modifica proporcionalmente de escala.

15

También puede observarse una disminución en T2 cambiando la relación de las nanopartículas con respecto a anticuerpos. Aquí, anticuerpo se usa como un ejemplo de la conexión con el analito. Esto se define como control de la estequiometría. Dependiendo del nivel de detección del analito, la estequiometría puede ajustarse para permitir la rápida detección de analito.

20

Los reactivos y condiciones de procesamiento pueden ajustarse para producir una disminución en T2. La formación de extensos agregados de nanopartículas y analitos se correlaciona con una disminución de T2 tal. El modelo plantea que los agregados son estructuras tipo jaula abiertas a través de las cuales las moléculas de agua pueden pasar fácilmente. Esto no se explica en estudios anteriores. En una realización, la información de espín difunde dentro y fuera de la estructura del aglomerado rápidamente, de manera que la despolarización que se produce dentro de la jaula se equilibra en toda la muestra.

25

El modelo sugiere que la disminución de T2 para aglomerados es debida al desfase repetido cuando las moléculas de agua dentro de la jaula se encuentran repetidamente con campos despolarizantes. Tal desfase repetido representa un sumidero de polarización más eficaz que las nanopartículas aisladas en el líquido libre debido a que la molécula de agua enjaulada sigue en estrecha proximidad a numerosas superficies de nanopartículas. Aunque las porciones de los volúmenes de campo distorsionado de las nanopartículas están ocluidas por el analito, la molécula de agua podría pasar una fracción significativa de su tiempo muestreando campos que se diferencian del campo principal, y así se desfazaría totalmente en un tiempo corto en comparación con el intervalo de ecos. Entonces, intercambiando la polarización con moléculas vecinas que incluyen aquellas fuera del aglomerado, resultaría un T2 uniformemente reducido.

30

35

El modelo tiene utilidad debido a que conduce a nuevas mediciones y nuevas formas de realizar las mediciones relacionadas con el analito en la muestra. El modelo explica cómo las interacciones del analito con las nanopartículas producen tanto aumentos como disminuciones en T2, y sugiere formas de controlar los efectos ajustando concentraciones de reactivo. Señalando 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 de la agregación, debido a que la unión debe producirse antes de las aglomeraciones. El modelo también orienta el desarrollo de nanopartículas más sensibles usando material de núcleo de mayor susceptibilidad y vainas no magnéticas más delgadas. El modelo también conduce a etapas para cancelar errores sistemáticos, tales como medir el T2 de la disolución de nanopartículas y la muestra por separado, antes de la mezcla, para cuantificar mejor cualquier cambio de T2 de la unión. El modelo también explica cómo participan los efectos térmicos y los efectos de difusión, y puede explotarse para acelerar la detección o confirmar reacciones de analitos. El modelo también orienta el desarrollo de productos que explotan los métodos inventivos cuantificando la señal y el ruido frente al tamaño de muestra y otros parámetros de diseño.

45

#### Descripción del método

En una realización, un método de detección de uno o más analitos incluye: preparar una mezcla de muestra líquida, que puede contener el analito y otros materiales; aplicar un primer campo magnético al líquido; preparar un segundo campo magnético y distinto dentro de una región especial del líquido; mantener el analito, si está presente alguno, dentro de la región especial (por ejemplo, proporcionando medios para retener el analito, asegurando ese agente de unión adyacente a la región especial y permitiendo que el analito interactúe con el agente de unión); excitar señales de resonancia magnética de la mezcla mientras que el analito se mantiene dentro de la región especial; analizar las señales para determinar si el analito ocupa o no la región especial; y luego concluir que el analito está presente cuando las señales indican que el líquido se desplaza de la región especial.

50

55

En una realización, preparar la mezcla de muestra líquida incluye el uso de un líquido que contiene un átomo con un núcleo que tienen espín no cero. Los átomos pueden ser una parte intrínseca del líquido, o pueden añadirse como soluto. La etapa de preparación de una muestra líquida puede incluir mezclar o agitar para garantizar que el analito

5 llegue a las nanopartículas. La mezcla puede lograrse de numerosas formas, que incluyen conducir los fluidos de muestra por tubos corrugados usando una bomba, y tal movimiento puede ser unidireccional o recíproco para producir el nivel deseado de mezcla. Alternativamente, las nanopartículas y el analito pueden estar contenidos en el mismo tipo de líquido, de manera que cuando las nanopartículas y el analito se coloquen en el mismo recipiente, se mezclen espontáneamente sin la necesidad de agitación física. Por ejemplo, las nanopartículas y el material de muestra pueden disolverse en agua y luego entremezclarse por difusión en el recipiente de medición. También puede organizarse mezcla sin ayuda por uso de disolventes altamente miscibles, tales como alcohol y agua, para los diversos componentes.

10 El método también puede incluir ciclos de temperatura en los que una muestra puede calentarse o refrigerarse en una localización fija, o la muestra puede moverse entre localizaciones mantenidas a temperaturas altas o bajas. El método puede incluir tomar mediciones antes, durante y después de tales cambios de temperatura. Por ejemplo, una medición de T2 puede tomarse inmediatamente tras la mezcla de la muestra, y de nuevo después de un periodo de calentamiento y refrigeración cuando la muestra alcanza la temperatura de equilibrio. La comparación de los valores de T2 antes y después del procesamiento térmico revelará reacciones, tales como la unión del analito a nanopartículas, que se produjeron durante el procesamiento térmico.

15 El método puede incluir las etapas de cambiar la temperatura de la muestra y luego medir el parámetro T2. La temperatura afecta 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 puede acelerarse elevando la temperatura, particularmente para reacciones limitadas por la difusión. Así, el método puede incluir medir el T2 de una mezcla de nanopartículas y desconocidos dentro del líquido a una primera temperatura, preferentemente una temperatura suficientemente baja de manera que el analito no haya reaccionado con las nanopartículas cuando se hace la medición. El método puede luego incluir la etapa de calentar la muestra a una segunda temperatura suficiente para promover las interacciones analito-nanopartícula. El método puede incluir medir T2 a la segunda temperatura para observar efectos de la unión. El método puede incluir otro cambio de temperatura, tal como volver a la primera temperatura, y otras mediciones de T2 para confirmar que el T2 de la muestra después de los diversos cambios de temperatura se diferencia del T2 de la muestra antes de los cambios de temperatura. Las etapas proporcionan muchas ventajas, que incluyen discriminación mejorada contra interferentes, demostración de que el cambio de T2 es debido a la unión específica para analito, y una comprobación de errores instrumentales.

20 El método puede incluir calentar la muestra a una temperatura suficiente para afectar las agregaciones de analito-nanopartícula, produciendo así una disolución de binarios de analito-nanopartícula, con un cambio de T2 correspondiente. La temperatura puede elevarse adicionalmente hasta que el analito se separe de las nanopartículas, liberando así el analito de nuevo a la disolución y provocando otro cambio de T2. La temperatura puede entonces reducirse hasta que se restaure la unión o agregación, con inversión correspondiente de T2 al valor anterior. Este comportamiento en T2 frente a la temperatura discriminaría fuertemente a interferentes o errores instrumentales, y confirmaría la presencia de analito.

25 El método puede incluir la etapa de medir T2 del material de muestra antes de la mezcla con nanopartículas. Esto revelaría un material de muestra que produce un desplazamiento en T2, tal como una disolución de alta viscosidad o hierro quelatado en la muestra. Si el material de muestra produce solo un pequeño desplazamiento de T2, la medición puede continuar como siempre, pero en el análisis el T2 de la muestra procesada puede compararse con el inicialmente observado en la muestra en bruto para determinar si está presente o no el analito. Si la muestra produce un gran desplazamiento de T2, puede ser ventajoso diluir la muestra hasta que sus efectos sean suficientemente bajos como para permitir las mediciones de resonancia magnética. El analito en la muestra diluida puede entonces detectarse como se ha descrito. Si la muestra produce un desplazamiento de T2 tan grande que se prohíben las mediciones de resonancia magnética, la invención puede etiquetar esa muestra como que no puede probarse, evitando así una falsa alarma, o puede archivar la muestra para análisis posterior.

30 El método puede incluir preparar un campo magnético de una forma particular. El campo puede prepararse generando primero un primer campo magnético sustancialmente uniforme con intensidad suficiente para permitir mediciones de resonancia magnética, y luego perturbando ese campo localmente para producir un segundo campo magnético, distinto del primero, dentro de una región especial. El segundo campo es distinto del primer cuando las señales de resonancia magnética del líquido fuera de la región especial están influidas por o pueden distinguirse de las señales de líquido dentro de la región especial. Por ejemplo, el segundo campo puede crearse mezclando o disolviendo partículas paramagnéticas, por ejemplo, aquellas nanopartículas descritas anteriormente, en el líquido. Entonces, las nanopartículas generan espontáneamente el segundo campo magnético, en una región estrechamente exterior a las nanopartículas, como resultado de la magnetización de las nanopartículas por el primer campo magnético. Alternativamente, iones paramagnéticos tales como hierro o gadolinio quelatado podrían emplearse en lugar de nanopartículas. Una ventaja de este enfoque es que las velocidades de reacción limitadas por la difusión pueden aumentarse debido a la mayor movilidad de los quelatos de iones metálicos. Se usan iones similares en la obtención de imágenes IRM (Gd-DTPA y Gd-DOTA).

35 El método puede incluir preparar un campo magnético de una forma particular. El campo puede prepararse generando primero un primer campo magnético sustancialmente uniforme con intensidad suficiente para permitir mediciones de resonancia magnética, y luego perturbando ese campo localmente para producir un segundo campo magnético, distinto del primero, dentro de una región especial. El segundo campo es distinto del primer cuando las señales de resonancia magnética del líquido fuera de la región especial están influidas por o pueden distinguirse de las señales de líquido dentro de la región especial. Por ejemplo, el segundo campo puede crearse mezclando o disolviendo partículas paramagnéticas, por ejemplo, aquellas nanopartículas descritas anteriormente, en el líquido. Entonces, las nanopartículas generan espontáneamente el segundo campo magnético, en una región estrechamente exterior a las nanopartículas, como resultado de la magnetización de las nanopartículas por el primer campo magnético. Alternativamente, iones paramagnéticos tales como hierro o gadolinio quelatado podrían emplearse en lugar de nanopartículas. Una ventaja de este enfoque es que las velocidades de reacción limitadas por la difusión pueden aumentarse debido a la mayor movilidad de los quelatos de iones metálicos. Se usan iones similares en la obtención de imágenes IRM (Gd-DTPA y Gd-DOTA).

40 La retención del analito dentro de la región especial puede llevarse a cabo haciendo reaccionar o uniendo o atrayendo de otro modo el analito a una superficie de material o molécula por la que el analito tiene afinidad particular. Tal retención puede llevarse 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 de material. Por ejemplo, el mecanismo de retención puede ser un anticuerpo producido contra una proteína del analito, o ADN complementario a las secuencias de ADN del analito, y puede incluir cualquier superficie o molécula de material por la que el analito tenga afinidad. Preferentemente, el mecanismo de retención también tiene afinidad nula o afinidad negativa por todos los solutos distintos del analito que puedan estar presentes. Preferentemente, el mecanismo de retención se asegura próximo a la región especial, de manera que el analito será retenido dentro de la región especial. Por ejemplo, cuando la región especial es exterior a una nanopartícula, los anticuerpos para el analito, u otros mecanismos de retención mencionados anteriormente, pueden unirse a la superficie de la nanopartícula, de manera que el analito será retenido adyacente a la nanopartícula dentro de esa región y se excluirá el líquido. Opcionalmente, la nanopartícula puede incluir múltiples anticuerpos, o ADN complementario, u otros agentes de unión que manera que interaccionen con varios analitos diferentes, pero seleccionados. Por ejemplo, la nanopartícula podría adornarse con ADN complementario para carbunco, anticuerpos para ricina y secuencias de ADN complementario para viruela, permitiendo así la detección de cualquiera de estos analitos en una única mezcla.

Las mediciones y análisis de resonancia magnética para determinar si el analito ocupa o no 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 está presente, indica que el líquido está en la región especial y, por tanto, el analito no está presente. Alternativamente, la etapa podría incluir aplicar el método de CPMG y analizar las señales para determinar el T2 del líquido. La distribución de T2 puede ser un único 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 T2 del caso del nivel inicial (líquido con las nanopartículas y sin analito) indica la presencia del analito.

Una variación del método incluye formar un agregado que comprende una pluralidad de entidades de analito. Entonces, una reducción en T2 (en comparación con el nivel inicial) indica la presencia del analito. Por ejemplo, un agregado de nanopartículas con mecanismos de unión y moléculas de analito puede formarse cuando tanto las nanopartículas como las moléculas de analito tienen múltiples puntos de unión. Como la agregación produce una disminución en T2, mientras que la unión del analito a las nanopartículas produce un aumento en T2, es importante calibrar previamente las señales, de manera que el signo esperado del cambio de T2 se conozca de antemano. La estequiometría de la nanopartícula puede ajustarse para prevenir la aglomeración o para producir la aglomeración dependiendo del método de medición que vaya a usarse.

En una realización, el analito hace que las nanopartículas formen extensos agregados. Se usan filtros de membrana para separar aquellos agregados del medio líquido. El tamaño de poro del filtro es preferentemente superior al tamaño de las nanopartículas o del analito, pero más pequeño que los agregados. Si se filtra una muestra aglomerada, el filtrado tiene una concentración reducida de tanto nanopartículas como analito, que están así ambos enormemente concentrados como una torta de filtración. Si se desean medios de análisis secundario, por ejemplo para confirmar la detección de un microbio, la torta de filtración se usa para ese análisis secundario. Asimismo, el líquido del filtrado puede volver a medirse usando el sistema inventivo como comprobación adicional, ya que el T2 del filtrado debe ser mucho mayor que el de la disolución de nanopartículas inicial cuando se han separado por filtración la mayoría de las nanopartículas.

El método puede incluir las etapas de medir el valor de T2 de un patrón. Aquí, un patrón es cualquier material que tenga un T2 conocido. Preferentemente, el T2 del patrón es invariable con el tiempo y se conoce de mediciones de calibración previas. 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 la detección y corrección de desviaciones de la instrumentación. El patrón puede ser un líquido que no es una disolución, tal como un aceite seleccionado por tener un T2 en el intervalo deseado. El patrón puede adaptarse para tener un T2 sustancialmente igual al de una muestra sin analito, en cuyo caso se llama un comparador negativo. El patrón puede tener 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.

El método puede incluir la etapa de probar un control positivo y/o negativo. Un control positivo puede ser un analito benigno, tal como *Bacillus subtilis* junto con nanopartículas sensibilizadas a él. El control positivo puede analizarse en cualquier momento, y debe detectarse de la misma forma que un analito de amenaza. Preferentemente, el cambio de T2 producido por el control positivo se conoce de una calibración previa, y la prueba del control positivo debe siempre producir el cambio de T2 esperado, y de lo contrario revelaría un mal funcionamiento 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 carbunco. El control negativo nunca debe producir un cambio de T2 debido a que el analito y las nanopartículas no están emparejados. Si un control negativo produce un cambio de T2, revelaría un mal funcionamiento del sistema. Una ventaja de ejecutar controles positivos y negativos es que las etapas de recogida de muestras completa, fluidica, procesamiento de muestras y de detección se prueban de manera realista. A efectos comparativos, los patrones de comparador positivo y negativo tratados en el párrafo previo prueban solo la porción de resonancia magnética del sistema, no las etapas de procesamiento de muestras.

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 de procesamiento. Así, una muestra puede probarse para un aumento de T2 usando etapas de procesamiento para generar un aumento de T2 cuando el analito está presente, y entonces la misma muestra puede probarse para una disminución de T2 añadiendo los componentes o etapas de procesamiento que producen una disminución de T2. La observación de tanto valores de T2 crecientes como decrecientes potenciaría la fiabilidad del análisis y reduciría la tasa de falsas alarmas. Alternativamente, dos alícuotas tomadas de la misma muestra pueden procesarse para generar un aumento de T2 en una y una disminución en la otra.

Los interferentes son materiales que, si están presentes en una muestra, producen un cambio en T2 imitando al del analito diana. La mayoría de los interferentes producen un T2 más corto, que incluyen materiales que contienen hierro quelatado y materiales que provocan un aumento en la viscosidad del líquido. Así, los efectos del analito e interferentes pueden discriminarse procesando la muestra de manera que el analito produzca un aumento de T2. Para discriminación de interferentes de analitos incluso mayor pueden organizarse tanto aumentos como disminuciones en T2, tanto por procesamiento secuencial de la misma muestra como por comparación de alícuotas paralelas.

El método puede incluir la etapa de medir el T2 de una mezcla de nanopartículas antes de añadir el material de 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 usar el material de muestra. Si la disolución de nanopartículas presenta un valor inesperado de T2 (por ejemplo, debido a una alta o baja concentración de nanopartículas de un error de dosificación), entonces la disolución de nanopartículas puede tirarse y puede prepararse una nueva disolución de nanopartículas. Si la disolución de nanopartículas presenta un valor de T2 próximo al esperado, entonces la disolución de nanopartículas puede emplearse. Preferentemente, el valor medido de T2 se usa luego en el análisis de comparación con el T2 de la muestra mezclada y reaccionada, invalidando así errores debidos a la concentración de nanopartículas y también mejorando la reproducibilidad.

El método puede incluir las etapas de mezclar el material de muestra y nanopartículas en el líquido, luego medir el T2 de la mezcla, luego promover las reacciones entre el analito y las nanopartículas, y luego medir el T2 después de tales reacciones. Por ejemplo, la muestra puede agitarse o calentarse para promover las reacciones. Pueden usarse mezcla y calentamiento simultáneo para acelerar las reacciones. La comparación de 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 e invalidaría.

En una realización, generalmente no se requieren sustancias químicas peligrosas. Por ejemplo, los analitos pueden probarse usando solo agua, sales, nanopartículas y reactivos proteínicos inocuos tales como anticuerpos.

#### Descripción del sistema

Una realización de un sistema que puede llevar a cabo o implementar las técnicas de medición o detección descritas anteriormente se describirá ahora con referencia a la Figura 5 que es un diagrama de bloques funcional de un sistema de resonancia magnética generalmente indicado como 500. El sistema incluye imán o sistema 512 de imán. En una realización, el imán 512 es un imán permanente configurado para producir un campo magnético de 0,5 Tesla con 0,01 % de uniformidad dentro de un área 514 o volumen de muestra de 1 ml. Alternativamente, el sistema de imán puede incluir un electroimán, una bobina superconductora, o cualquier otra fuente de campo magnético. Una bobina o antena 516 se localiza adyacente al volumen de muestra. En una realización, la bobina rodea el volumen 514 de muestra. Un generador 518 de pulsos se acopla a la bobina 516 para proporcionar pulsos electromagnéticos a la frecuencia de Larmor deseada al volumen 514 de muestra. Puede disponerse un amplificador 519 entre el generador de pulsos y la antena para amplificar la señal del generador de pulsos. Un receptor 520 también se acopla a la bobina 516 de manera que reciba señales recogidas por la bobina. Puede colocarse un preamplificador 521 entre el receptor y la antena para amplificar las señales de la antena. El receptor 520 convierte las señales recibidas en una forma digital. Un controlador 522 está en comunicación con el generador 518 de pulsos y el receptor 520. El controlador controla la operación del receptor y el generador de pulsos. El controlador también recibe las señales recibidas por el receptor después de haber sido convertidas en la forma digital. El controlador 522 puede ser un procesador de propósito general, un procesador de señales digitales (DSP), un circuito integrado para aplicaciones específicas (ASIC), una matriz de puertas programable por campo (FPGA) u otro dispositivo de lógica programable, puerta discreta o lógica de transistores, componentes de hardware discreto, o cualquier combinación de los mismos diseñados para realizar las funciones descritas en el presente documento. Alternativamente, las funciones del controlador, generador de pulsos, receptor e interfaz de usuario pueden combinarse en una única unidad tal como un ASIC o FPGA, o una tarjeta que integra tales circuitos. Un sistema 524 de interfaz de usuario se acopla con el controlador 522. El sistema 524 de interfaz de usuario proporciona un mecanismo para la interacción entre un usuario y el sistema 500. El sistema de interfaz puede incluir, por ejemplo, una pantalla tal como una pantalla de cristal líquido, luces indicadoras, un teclado, un ratón, un altavoz de audio, un micrófono, conmutadores o una pantalla táctil.

La bobina de RF puede hacerse lo suficientemente pequeña como para interrogar volúmenes de volúmenes de muestra de tamaño de microlitro o suficientemente grandes como para acomodar litros de muestra. Éste es un sistema escalable. Las Figuras 6a-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 una bobina de solenoide que tiene una densidad de arrollamientos que es constante a lo largo de la longitud de la bobina. La muestra se coloca dentro de la bobina para la medición. La bobina actúa de antena para acoplar la energía de RF en los núcleos de muestra, y también para acoplar la señal de resonancia magnética de los núcleos fuera del resto del sistema.

- 5 En la parte b de la figura se muestra una bobina de solenoide que tiene una densidad de arrollamientos variable. Las densidades de arrollamientos son mayores en los extremos de la bobina que en el centro. Una ventaja de usar una densidad de arrollamientos variable es que el campo magnético de RF generado por la bobina puede hacerse más uniforme que el de una bobina del mismo tamaño con densidad de arrollamientos constante.

- 10 En la parte c de la figura se muestra una bobina de un solo lado de dos vueltas. Una ventaja de esta configuración es que un recipiente alargado tal como un tubo puede insertarse y sacarse sin desconectar ni la bobina ni el tubo.

En la parte d de la figura se muestra una configuración de bobina en la que cuatro bucles generan cooperativamente un campo magnético de RF transversal. Las muestras alargadas pueden insertarse sin desconectar la bobina o el tubo.

- 15 La interfaz de usuario específica y la salida del sistema son altamente dependientes de la aplicación, pero normalmente incluirán transmisión de información dependiente de la detección del analito. Por ejemplo, tal comunicación puede implicar registrar o archivar los resultados de pruebas, mostrar un mensaje de alerta de amenaza, iluminar una alarma o luz giratoria, o activar una alarma acústica. La comunicación de datos también incluye enviar señales a otros dispositivos, tal como apagar automáticamente un sistema de HVAC o secuestrar una muestra de prueba sensible a la detección de analitos seleccionados. La comunicación mediante la interfaz de usuario puede incluir medios electrónicos, ópticos, infrarrojos, de radio, microondas, mecánicos o acústicos, o cualquier otro medio para transmitir datos o comandos sensibles a resultados de pruebas de analitos. 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 están en comunicación con el controlador. Éstos pueden permitir que un operario u otro dispositivo se comunique con el sistema, transmita comandos o recupere datos o, transmita una alarma. La comunicación puede incluir transmitir información por internet, por una red local o por conexión electrónica directa o inalámbrica.
- 20
- 25

- 30 En una realización, el sistema está configurado en dos chasis separados, uno con el imán 512, el generador 518 de pulsos y el receptor 520. El otro chasis tiene el controlador 522 y la interfaz 524 de usuario. Los dos chasis intercambian información tal como comandos y datos por una conexión de comunicación electrónica, por ejemplo, cables, una conexión inalámbrica o una conexión de fibra óptica. En una realización preferida, la conexión de comunicación comprende una interfaz de USB que emplea conexiones de USB estándar en cada chasis.

- 35 El sistema 500 de resonancia magnética puede excitar señales de resonancia magnética de los núcleos de hidrógeno en agua en el volumen 514 de muestra aplicando pulsos electromagnéticos, por ejemplo, pulsos de radiofrecuencia (RF), generados por el generador 518 de pulsos mediante la bobina. El sistema detecta las señales de resonancia magnética de los núcleos de hidrógeno en el agua recogiendo inductivamente las señales en la bobina 516. El receptor procesa las señales recibidas usando amplificadores, mezcladores y convertidores de analógico a digital.

- 40 En una realización, el sistema 500 mide el T2 del agua por el método o técnica de CPMG bajo el control del controlador 522. La medición incluye un pulso de RF de 90 grados generado por el generador de pulsos, seguido de un retardo de 2 ms, y luego una sucesión de 2000 pulsos de 180 grados a intervalos de 4 ms. La fase de los pulsos de 180 grados es ortogonal a la del pulso de 90 grados. El procedimiento genera ecos de espín en los intervalos de 4 ms que son recibidos por el receptor 520. En una realización, el controlador 522 realiza un análisis rutinario que determina y registra los ecos de espín, realiza análisis de FFT para obtener picos espectrales, encuentra el valor máximo de los picos y ajusta los valores de los picos a una fórmula con tres variables: la amplitud y el tiempo de disminución de una exponencial, más un ruido de fondo independiente del tiempo. El valor de T2 observado es el tiempo de disminución exponencial de mejor ajuste.
- 45

- 50 El análisis realizado por el controlador incluye una comparación entre el valor de T2 observado y un valor de T2 previamente calibrado o medido. El analito se detecta por el sistema cuando el valor de T2 observado de la muestra se diferencia del de una muestra sin analito. El valor de T2 previamente calibrado puede determinarse midiendo una disolución de agua con la misma concentración de nanopartículas que se usa para la medición del analito. El T2 del agua está influido por la concentración de nanopartículas. El T2 también está influido por la unión del analito a las nanopartículas y que ocupan la región de alto gradiente alrededor de las nanopartículas. En la realización preferida, la concentración de nanopartículas está controlada por la formulación de la disolución. Los valores de T2 de la disolución sin analito, y con diversas concentraciones del analito, también se conocen por calibración previa.

- 55 En una realización, las nanopartículas se disuelven o suspenden en un medio de agua. Las nanopartículas tienen un núcleo de magnetita superparamagnético con un diámetro de 8 nm, rodeado por una vaina con un diámetro de 50 nm. Las moléculas de anticuerpo (u otro mecanismo de unión o atracción como se describe en el presente documento) específicas para el analito están unidas a la vaina. Cuando las nanopartículas están en la muestra 514,

el núcleo se magnetiza por el campo aplicado por el imán 512, produciendo un campo dipolar local que se suma al campo aplicado. El campo neto resultante incluye gradientes espaciales de hasta 0,1 T/nm, dentro de una región que se extiende radialmente de la superficie de la nanopartícula a aproximadamente 20 nm de la superficie. Las nanopartículas son las más eficaces para los fines de detección y medición a concentraciones bajas de aproximadamente 1:10000 en agua. Esto produce un consumo muy pequeño de nanopartículas por prueba. En una realización, el imán 512 del sistema 500 de resonancia magnética usa un imán permanente para este fin. El imán permanente no requiere potencia, puede hacerse arbitrariamente compacto y es económico. La mayoría de los sistemas de resonancia magnética previos emplearon electroimanes o bobinas superconductoras para generar el campo magnético. No es factible reducir arbitrariamente el tamaño de los electroimanes o imanes superconductores. Si un electroimán se reduce en proporción en tamaño, el campo magnético se modifica proporcionalmente de escala. Si el campo se mantiene constante, entonces la densidad de corriente en las bobinas del electroimán debe aumentarse. La densidad de corriente no puede aumentarse arbitrariamente debido a un límite fundamental, la conductividad del cobre. Por encima de un cierto límite de densidad de corriente, aproximadamente 100 amps/cm<sup>2</sup>, las bobinas deben refrigerarse con agua. Por encima de un segundo límite, aproximadamente 200 amps/cm<sup>2</sup>, las bobinas se autodestruyen. No son factibles bobinas de cobre pequeñas de alto campo en estado estacionario.

Asimismo no es factible reducir el tamaño de imanes superconductores arbitrariamente. Las bobinas superconductoras pueden hacerse mucho más pequeñas y más potentes que las bobinas no superconductoras, y pueden llevar altas densidades de corriente. Sin embargo, las bobinas superconductoras deben rodearse de un criostato aislado a vacío, que normalmente tiene múltiples vainas mantenidas a diferentes temperaturas criogénicas. Por tanto, las diversas vainas están mecánicamente y térmicamente interconectadas por puntales de soporte. No es posible hacer el criostato arbitrariamente delgado debido a la conductividad térmica de los miembros de soporte. El criostato limita la miniaturización factible en imanes superconductores.

Los imanes permanentes no tienen ninguno de estos defectos. Un diseño de imán dado que usa imanes permanentes se modificará de escala con precisión, sin cambio en la geometría o campo o calidad del 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 pueden modificarse de escala a un tamaño determinado por el volumen de muestra, las propiedades de la bobina de RF u otros parámetros del sistema, en vez de forzar los otros parámetros a cumplir la escala del imán. Como resultado, es factible miniaturizar el sistema electromagnético entero. Esto conduce a sensibilidad de detección mejorada en volúmenes de muestra más pequeños, coste reducido y peso de la porción de sensor del sistema, y potencia de RF reducida requerida.

Una realización del imán 512 se representa esquemáticamente en sección transversal en la Figura 7. El imán incluye un marco 710, tal como un marco de acero hueco. En una realización, la altura H del marco es inferior a 50 cm y puede ser inferior a 5 cm. La anchura W también puede ser inferior a 50 cm y puede ser inferior a 5 cm. Un imán 714 de disco permanente superior y un imán 716 de disco permanente inferior localizado opuesto al imán permanente superior están unidos a una sección superior del marco y una sección inferior del marco, respectivamente. Por ejemplo, pueden unirse mecánicamente usando tornillos o pernos y/o pueden unirse con un adhesivo. Un polo 718 superior con forma de disco está localizado encima del imán permanente superior y opuesto a un polo 720 inferior con forma de disco localizado encima del polo inferior. Alrededor de la periferia de cada polo están ocho orificios roscados finos con pernos de ajuste, que pueden variarse para mejorar la uniformidad del campo. El imán se ensambla atornillando con pernos junto con el marco, deslizando los discos de imán permanente en posición, deslizando los polos en posición, y luego ajustando la uniformidad. Los discos del imán permanente son muy fuertemente atraídos al marco de acero, y los polos son muy fuertemente atraídos a los discos del imán permanente. Las atracciones, y la fricción resultante entre los diversos miembros puestos en contacto, proporcionan estabilidad mecánica para mantener el ensamblaje junto. Puede obtenerse robustez adicional aplicando pinzas o adhesivos a los discos del imán o polos, preferentemente no interfiriendo con el ajuste de la uniformidad del campo o mediciones de resonancia magnética. Las fuerzas sobre los componentes del imán permanente son fuertes y posiblemente peligrosas. No se muestran plantillas y herramientas usadas para controlar el procedimiento de ensamblaje en vista de las fuertes fuerzas implicadas.

El ajuste de la uniformidad es el procedimiento de ajuste de un imán, tal como el imán 512, para producir la uniformidad necesaria. Tal y como se construyen, la mayoría de los imanes proporcionan uniformidad insuficiente debido a las tolerancias de fabricación. El ajuste de la uniformidad consiste en medir la distribución de campo, ajustar los parámetros incorporados del imán y repetir hasta que se logre la uniformidad deseada. En una realización se utiliza un simple diseño de ajuste de la uniformidad que se basa en los parámetros de campo más importantes, en vez de en proporcionar un conjunto exhaustivo de parámetros de los cuales la mayoría nunca se necesitan.

Primero se iguala la magnetización de los dos discos del imán permanente. Basándose en el gradiente axial observado, una o más hojas ferromagnéticas delgadas se fijan por atracción magnética circunferencialmente alrededor de solo el más fuerte de los dos imanes. El ajuste iterativo del número y espesor de las hojas produce neutralización casi perfecta del gradiente axial. Entonces las hojas pueden asegurarse por pinzas o adhesivos.

Entonces se ajustan uno o más de los pernos en miniatura, por ejemplo, el perno 722, en la periferia de los polos. Estos pernos presionan contra los discos del imán permanente para balancear ligeramente los polos según se

necesite para neutralizar gradientes de campo transversales. Cualquiera o ambos de los polos puede ajustarse, dependiendo de los detalles del campo observado. El ajuste final de los diversos pernos produce neutralización casi perfecta de los gradientes transversales.

5 Normalmente no necesita alterarse la forma de los polos, aunque pueden desmontarse y revisarse su forma si se necesita para lograr el campo deseado. Alternativamente, la separación entre los polos puede reducirse apretando ligeramente todos los pernos alrededor de ambos polos. Un ajuste tal es casi equivalente, magnéticamente, a ajustar la profundidad de la etapa de aflojamiento del polo.

10 Para fabricar las partes del imán, metales en polvo tales como hierro o acero pueden colocarse dentro de un molde de forma deseada. Entonces, en la prensa se aplican presión y calor para generar la parte final. Aunque solo pueden hacerse pequeñas partes por esta técnica, puede lograrse la fabricación en serie. Alternativamente puede usarse mecanizado para hacer las partes individuales.

15 Los polos pueden diseñarse para proporcionar la mayor uniformidad de campo y volumen de campo para probar muestras, con la limitación de que el hueco sea suficiente para insertar y ajustar la bobina de muestra de resonancia magnética. Las limitaciones al diseño incluyen el máximo campo en los polos para limitar la saturación, número mínimo de parámetros de ajuste de la uniformidad para lograr la uniformidad del campo objetivo, y uso de componentes de imanes permanentes comerciales de bajo coste cuando sea posible.

20 El material del imán permanente proporciona densidad de magnetización muy alta, pero es sensible a la temperatura. En aplicaciones en las que la frecuencia pueda ajustarse al campo, la desviación térmica del campo magnético no es un problema. Sin embargo, para mediciones de T2 de precisión es necesario estabilizar el campo magnético. Puede usarse un recinto controlado por temperatura. En una realización, el recinto puede construirse usando aislamiento de espuma y un par de calentadores de parches. Un sensor de termopar y controlador completan la disposición.

25 La determinación precisa de T2 usando el procedimiento de CPMG se potencia con un oscilador local extremadamente estable con ruido de fase mínimo en una escala de tiempo de al menos la separación de ecos de espín. Incluso osciladores de cristal de alto coste normalmente no proporcionan estabilidad suficiente debido a las ruidosas líneas de potencia del ordenador. Puede obtenerse estabilidad suficiente usando osciladores de cristal integrados baratos amortiguando tanto la entrada de corriente CC como la salida de reloj de RF. Una disposición tal se representa esquemáticamente en la Figura 8. En una realización, el oscilador mostrado en la Figura 8 se usa en el generador 518 de pulsos de la Figura 5. En general, la entrada de corriente CC (corriente continua) se amortigua conectando dos o más reguladores del voltaje en serie. El circuito representado en la Figura 8 incluye un primer regulador 802 del voltaje (por ejemplo, un regulador de 8 voltios que recibe una entrada de +12V). Un segundo regulador 804 del voltaje recibe la salida del primer regulador del voltaje y proporciona su salida al oscilador 806 (por ejemplo, un regulador de 5 voltios, que recibe la salida del regulador de 8 voltios). Un tercer regulador 808 del voltaje (por ejemplo, un regulador de 5 voltios) también puede recibir la salida del primer regulador del voltaje y puede proporcionar su salida a una puerta 810 lógica digital con alta velocidad y alto aislamiento de la fuente, tal como el conductor de línea 74F3037 NAND (disponible de Philips Semiconductors y otros). La puerta 810 lógica digital amortigua la salida del oscilador.

40 El sistema 500 de resonancia magnética (Figura 5) interactúa con la muestra usando la antena 516 que, en operación, está electromagnéticamente acoplada a los núcleos precesores de la muestra. En una realización, la bobina está montada en una plataforma intercambiable modular para permitir cambiar el tamaño de muestra, sustituir la bobina en caso de contaminación, u otros cambios necesarios.

45 La antena puede encapsularse en un material resistente a la contaminación. La contaminación es una cuestión grave cuando van a probarse múltiples muestras que llevan múltiples enfermedades o toxinas. Las antenas anteriores son difíciles de limpiar debido a que están geométricamente altamente corrugadas e incluyen materiales aislantes y conductores no higiénicos. La encapsulación de la antena puede resolver esta cuestión. Por ejemplo, la antena podría ser una bobina de cobre incorporada en una forma de teflón cilíndrica hueca de manera que cualquier contaminación procedente del recipiente de muestra se encontrara solo con una superficie de teflón, nunca con el conductor real. Como el teflón no es absorbente y es relativamente fácil de limpiar, las cuestiones de contaminación se reducen enormemente. Por tanto, la antena encapsulada sería más estable y mecánicamente resistente que una bobina libremente montada. Las señales de resonancia magnética de un elemento en el encapsulante, tal como deuterio o flúor, pueden usarse para controlar una frecuencia o un campo magnético.

55 La cancelación de ruido, señales de interferencia, compensaciones del nivel inicial y otros efectos del ruido de fondo pueden mejorarse realizando mediciones de resonancia magnética múltiples veces con diversas fases de RF alternas. Esto puede implementarse bajo el control del controlador. Por ejemplo, la excitación puede alternarse entre rotación de fase positiva y negativa de los espines durante pulsos de RF. Durante el procesamiento de señales por el controlador, la fase del oscilador del receptor también puede girarse 90 grados o su múltiplo. El software de análisis en el controlador que controla estas alternancias de fase también realiza la suma o resta correspondiente de los datos digitalizados para acumular la señal deseada mientras que se cancelan los ruidos de fondo.

- Pueden proporcionarse diversas interfaces de usuario con el sistema. Por ejemplo, el sistema 500 representado en la Figura 5 puede llevar a cabo mediciones para detectar un analito o analitos seleccionados e informar de los resultados emitiendo una alarma si se detecta o proporciona una indicación visual o informe mediante la interfaz 524 de usuario. En una versión, el operario inserta una muestra mixta en el sistema y presiona un único botón sobre la interfaz de usuario para iniciar una serie previamente preparada de instrucciones para que el controlador lleve a cabo y analice la muestra. Si va a buscarse más de un analito, las instrucciones ordenan automáticamente la mezcla de nanopartículas sensibilizadas a cada analito y llevan a cabo las mediciones secuencialmente. En otra versión del instrumento, un conmutador mecánico u óptico detecta la inserción de la muestra en el sistema de resonancia magnética, y automáticamente inicia la secuencia de medición.
- En una realización, un cambio de T2 es el indicador primario de que el analito está presente. Para comprobar desviaciones o errores que pudieran afectar la medición de T2, el sistema puede comparar el T2 medido de la muestra con el de una muestra de calibración sellada que tiene un valor de T2 previamente medido. La muestra sellada puede contener sulfato de cobre en agua, aceite mineral, u otro líquido que tenga un T2 estable para comparación. Alternativamente, la muestra de calibración sellada puede medirse periódicamente.
- Puede usarse una amplia diversidad de mecanismos para presentar la muestra al sistema de resonancia magnética. La muestra, que comprende medio líquido, analito y nanopartículas, puede mezclarse en un recipiente tal como un tubo de RMN de vidrio, un tubo de plástico o vial, un recipiente desechable tal como un tubo Eppendorf de plástico o matraz, u otro recipiente adecuado. Un polímero ventajoso es PEEK (poliéter-éter-cetona) debido a su dureza, inactividad y maquinabilidad. El recipiente puede recubrirse con un material para prevenir que las nanopartículas se adhieran a las paredes, aglomeren o precipiten en la mezcla. Por ejemplo, el recubrimiento puede ser una proteína tal como BSA (albúmina de suero bovino). El recipiente que incluye la muestra puede insertarse, manualmente o por un alimentador mecánico, en el sistema de resonancia magnética. Alternativamente, un recipiente fijo en el sistema de resonancia magnética puede usarse para mediciones de múltiples muestras insertando líquidos de muestra en el recipiente, por ejemplo, bombeando la muestra o sus componentes a través de tubos en el recipiente. Después de las mediciones, la muestra se saca entonces del recipiente fijo usando bombas, tubos, válvulas y dispositivos de flujo de fluidos relacionados. Puede llevarse a cabo una etapa de lavado o aclarado entre las muestras. Puede llevarse a cabo tratamiento ultravioleta de depósitos que contienen agua destilada y nanopartículas para prevenir la formación de bacterias. Alternativamente, un fungicida tal como azida de sodio puede mezclarse en el agua destilada en cantidades traza para prevenir el crecimiento de bacterias y algas en el agua.
- En una realización representada esquemáticamente en la Figura 9, múltiples unidades de sensor están conectadas a un único controlador. Por ejemplo, un sistema de sitio fijo automatizado puede consistir en un controlador 902 central con fuentes de alimentación y un generador de pulsos o transmisor, conectado por cables a múltiples cabezas 906 a y b de sensor remotas. Aunque solo se representan dos cabezas de sensor, pueden usarse más. Cada cabeza 906 incluye un aparato de preparación de muestras junto con nanopartículas seleccionadas, un imán de resonancia magnética, un preamplificador y una bobina, por ejemplo, como se describió a propósito de la Figura 5. Los pulsos de potencia de RF se enrutan a las unidades de sensor mediante un multiplexador 908 de salida que está controlado por el controlador 902. Las señales de las unidades de sensor se enrutan al receptor 910 mediante el multiplexador 912 de entrada, también controlado por el controlador. Las interconexiones son preferentemente por cable coaxial. Alternativamente, cada unidad de sensor puede incluir un amplificador de RF. Si el amplificador de RF se localiza en la unidad de sensor, las interconexiones no llevan pulsos de RF de potencia alta y así pueden ser medios de comunicación inalámbricos, de fibra óptica u otros medios de comunicación, además de cable coaxial. Los elementos del sistema representado en la Figura 9 operan de la manera descrita anteriormente.
- En una realización, material en partículas en suspensión en aire puede extraerse del aire libre, conductos de HVAC, espacios interiores tales como centros comerciales, trenes del metro y otras áreas de transporte público, o cualquier otro sistema de aire, para probar enfermedades o ataque terrorista (HVAC representa calefacción, ventilación y aire acondicionado). La recogida incluye preferentemente entrar material en partículas en el sistema o concentrar partículas del aire en el medio líquido. La Figura 10 muestra un esquema de un sistema de monitorización tal. El colector 1002 puede estar situado dentro de un conducto o en cualquier otra área a monitorizar, y puede incluir un protector (no mostrado) para excluir suciedad e insectos. El colector 1002 puede incluir un concentrador electrostático para atraer analito o material de muestra. Un sistema 1004 fluídico transporta el analito del colector 1002 al área de muestra del analizador o sistema 1006 de resonancia magnética. El sistema 1006 de resonancia magnética puede ser el sistema descrito a propósito de la Figura 5. El sistema 1004 fluídico puede incluir una mezcladora microfluídica automatizada para mezclar analito con un líquido, tal como el medio de agua y con nanopartículas configuradas para el uno o más analitos que van a detectarse. Un depósito de las nanopartículas y el agua 1008 también puede ser parte del sistema fluídico. La muestra mezclada se transfiere entonces por el sistema fluídico al área de muestra del sistema de resonancia magnética en la que se hacen las mediciones. En una realización, un sistema de transporte fluídico está en comunicación con la mezcladora y se extiende en el área de muestra. Dependiendo de los resultados de medición, la muestra puede vaciarse en un recipiente de residuos, guardarse como material de archivo o enviarse a sistemas de análisis secundario. El agua residual puede recircularse para ser usada de nuevo pasando a través de un filtro.

Las Figuras 11 a-e representan una realización de un sistema de instalación fijo como se describe a propósito de la Figura 10 y tres tomas de colector. La Figura 11 a es una vista en perspectiva y la Figura 11 b es una vista en planta

del sistema que muestra la toma 1102 y una pantalla 1104. Los otros elementos representados en la Figura 10 están contenidos dentro de la carcasa. Las Figuras 11 c-e representan tres opciones de entrada para el sistema. Una vez iniciado, el controlador hace que el sistema recoja muestras periódicamente para análisis. El sistema también puede operarse manualmente. Puede proporcionarse una interfaz de usuario mediante botones o una pantalla táctil. La pantalla 1104 puede mostrar el estado de operación. El acceso de usuario puede controlarse mediante, por ejemplo, identificación biométrica, tal como identificación por huella dactilar o una contraseña.

La Figura 12 es una vista en perspectiva frontal de un sistema portátil. El sistema puede operar en un modo de operación autónoma de un único botón. Una muestra puede introducirse mediante viales y tubos. Una muestra en un recipiente 1202 puede introducirse en el sistema mediante un receptáculo u orificio 1204 en la parte superior. Dentro del sistema, el sistema fluídico manipulará la muestra mezclándola y moviéndola al sistema de RMN del modo descrito anteriormente a propósito de la Figura 10. La interfaz 1206 de usuario puede incluir áreas iluminadas de "riesgo biológico" y "seguro" sobre una pantalla de visualización. Para empezar la operación se proporciona un botón de inicio en la pantalla táctil. El estado de operación del sistema se indica en la pantalla.

Una realización de un sistema que puede llevar a cabo o implementar las técnicas de medición o detección descritas anteriormente para fines de diagnóstico médico se describirá ahora con referencia a la Figura 13 que es un diagrama de bloques funcional de un sistema de prueba 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 ósea, pelo, muestras de biopsia u otro tejido; o material biológico no celular tal como saliva, moco, esputo, líquido intravenoso, orina, heces, pus, líquido cefalorraquídeo y contenido del estómago o intestinos; o cualquier otro material de muestra obtenido de un cuerpo humano o animal. La recogida de ese material comprende un paciente o sujeto que produce el material, un profesional clínico que extrae el material del cuerpo de un paciente o sujeto, un investigador que recupera el material de muestra de una escena del crimen o accidente, o cualquier otra etapa que produzca la acumulación de material biológico para pruebas.

Primero, el sistema 1302 fluídico entra el espécimen 1304 de un paciente, o una porción del mismo, o una disolución del mismo, en una mezcladora que mezcla el material de muestra con un disolvente, por ejemplo, guardado en un depósito 1306 de disolvente, y uno o más tipos de nanopartículas guardadas en los depósitos 1308a-c. Cada tipo de nanopartícula puede sensibilizarse a una o más sustancias químicas o analitos relacionados con enfermedades o condiciones médicas. La Figura 13 muestra tres tipos de nanopartículas, pero puede usarse cualquier número de tipos de nanopartículas, cada uno sensibilizado a uno o más analitos relacionados con una o más condiciones médicas. Las enfermedades incluyen patógenos contagiosos tales como virus y bacterias, y enfermedades no contagiosas tales como cáncer o hipercolesterolemia. Las sustancias químicas incluyen enzimas u otros marcadores producidos por el cuerpo, toxinas y fármacos. En una realización, el usuario selecciona los tipos de nanopartículas que van a usarse en la prueba de un espécimen del paciente particular. Por ejemplo, un médico puede extraer una muestra de la sangre de un paciente para comprobar la concentración de una medicación de manera que se controle la dosificación, o guardias en un aeropuerto o cruce de frontera pueden tomar muestras de tejido de pollos vivos o muertos para comprobar gripe aviar. Etapas de procesamiento adicionales pueden incluir lisar la muestra para liberar ADN o ARN u otros componentes de la muestra, calentar o refrigerar la muestra, ajustar el pH de la muestra, u otras etapas necesarias para promover la reacción selectiva entre las nanopartículas y el analito. La muestra mixta, o una alícuota de la misma, se transfiere entonces al sistema 1310 de resonancia magnética, tal como el sistema representado en la Figura 5. La muestra puede mezclarse alternativamente con nanopartículas dentro de un recipiente que está dentro del instrumento de resonancia magnética, evitando así la etapa de transferir la muestra mezclada, y pueden realizarse etapas de procesamiento adicionales mientras que la muestra esté dentro del instrumento de resonancia magnética.

El instrumento de resonancia magnética mide entonces señales de la muestra, tales como el T2 de la muestra, y analiza aquellas señales para determinar la presencia o ausencia o concentración de los analitos seleccionados. Entonces, basándose en los resultados de medición, un médico puede entonces diagnosticar la enfermedad del paciente.

En una realización de los sistemas descritos anteriormente, el sistema detecta analito midiendo señales del líquido, estando las señales relacionadas con el campo magnético. Específicamente, las señales son sensibles al campo magnético distinto en la región especial alrededor de las nanopartículas. Cuando el analito se une al anticuerpo correspondiente u otro agente de unión, se provoca que el analito permanezca en la región especial, y así en el campo magnético distinto. El analito desplaza el líquido de esa región, de forma que el líquido ya no emite señales de resonancia magnética características del campo magnético en esa región. Por tanto, es importante observar que el analito no emite señales de resonancia magnética, o al menos no emite señales que sean similares a aquellas del líquido. Esto es debido a que el analito se aferra a la nanopartícula sólida, haciendo que el analito presente el T2 corto característico de sólidos. Así, en una realización, el analito, a la vez que ocupa la región especial, no produce señales que imiten al líquido.

La aglomeración puede producir un cambio en T2, pero no en T1, mientras que tanto T1 como T2 cambian en respuesta a elevada concentración de nanopartículas. Por tanto, puede usarse una medición de T1 como calibración o una medida independiente de la concentración de nanopartículas. En una realización, el sistema mide tanto T1 como T2 de la muestra, aplica análisis referente al valor de T1 para determinar la concentración de nanopartículas, y

el valor de T2 para detectar el analito. Alternativamente, están disponibles otros métodos para medir el contenido de hierro, y por tanto la concentración de nanopartículas, en la muestra.

5 La etapa de procesamiento de datos realizada por el controlador incluye ajustar los datos para parámetros relacionados con la presencia de analito, tal como un cambio de T2 en datos de CPMG. Normalmente, el tren de ecos en CPMG se ajusta a una única fórmula exponencial, un ajuste de tres parámetros para amplitud, constante de tiempo y ruido de fondo. Una forma simple pero eficaz de realizar esto es una búsqueda en cuadrícula en la que los tres parámetros se estiman primero a partir de los datos, y luego se genera una cuadrícula tridimensional de valores variando los tres parámetros por encima y por debajo de los valores estimados. Entonces, los mejores valores se seleccionan como la chi al cuadrado mínima o desviación al cuadrado media de los datos de la fórmula. A partir del mejor valor se calcula de nuevo una nueva cuadrícula de búsqueda, se calculan las desviaciones y los mejores valores se derivan de nuevo. Este procedimiento se repite varias veces (normalmente 9) para obtener el mejor ajuste global. Opcionalmente, la escala de la cuadrícula puede reducirse un factor (normalmente 0,95) cada vez que se usa, de manera que los mismos valores no estén apareciendo repetidamente.

15 Los subsistemas primarios del sistema de resonancia magnética son el generador de pulsos, el receptor de señales y el controlador. Estos subsistemas pueden residir en tarjetas separadas, interconectadas por cables. Alternativamente, los subsistemas pueden estar integrados como un circuito único en una única tarjeta del ordenador. La ventaja de esto último es que no se necesitan interconexiones por cable, y por tanto que puede usarse una única base de tiempo para todas.

20 El sistema puede estar alimentado por baterías. El sistema usa muy poca energía durante la adquisición de datos, y puede programarse para usar esencialmente cero energía en un modo de suspensión.

25 En una realización, el sistema también incluye un detector de radiación interconectado al controlador. El fin del detector de radiación es detectar materiales radiactivos en la muestra. El detector de radiación puede ser cualquier sensor de radiación, preferentemente sensible a rayos gamma, tal como semiconductor, contador de centelleo y contadores llenos de gas. El detector puede estar posicionado próximo al medio de recogida de muestras, el sistema de mezcla de muestras, o una cámara de retención dispuesta aguas abajo del sistema de resonancia magnética.

Insectos tales como arañas pueden tapar las entradas y colectores de aire. La primera barrera a la entrada para estos bichos son filtros. Para instalaciones de exteriores puede incorporarse un insecticida de liberación lenta, preferentemente inocuo para los seres humanos y mascotas. Tales insecticidas pueden implementarse a lo largo del pozo de la entrada o próximos a la boca de la entrada.

30 En una realización, los sistemas y métodos detectan explosivos y materiales de armas químicas. Los sistemas y métodos pueden realizar la detección usando nanopartículas como se ha desvelado anteriormente, en los que los sitios de unión específica sobre las nanopartículas se unen a las moléculas de armas explosivas o químicas. Alternativamente, los sistemas y métodos pueden detectar explosivos o materiales de armas químicas midiendo señales de resonancia magnética del propio material de muestra, sin uso de nanopartículas. El sistema puede emplear el efecto Overhauser nuclear de espín para detectar armas químicas y explosivos. En este caso no se requieren nanoconmutadores. Otra configuración podría ser un sistema híbrido que incorpora cromatografía de gases, espectroscopía de masas, espectroscopía de movilidad iónica, otras técnicas analíticas y RMN con o sin nanopartículas

40 Una ventaja de los sistemas y métodos inventivos es que las pruebas de confirmación pueden llevarse a cabo para ciertos analitos usando el mismo aparato. Por ejemplo, una prueba de confirmación para explosivos comprende medir el parámetro T1 usando un sistema de resonancia magnética, ya 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 nerviosos es un barrido de resonancia magnética para flúor o fósforo basado en las frecuencias de Larmor características de aquellos elementos.

45 En una realización, el sistema detecta toxinas y armas biológicas en sobres de correo, probando material en partículas recogido del correo. En la presente solicitud, el sistema incluiría preferentemente medios para extraer material en partículas de sobres, tales como agitando, vibrando, soplando aire a través del correo o comprimiendo los sobres. El sistema puede incluir medios para cortar sobres para recuperar polvo, preferentemente solo después de que otros sensores hayan dirigido la sospecha a un correo particular.

50 Una realización preferida para aplicaciones de muestreo de 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 muestra del aire. Las entradas pueden usar "impactador" o "pre-separador", o "fraccionador" y sirve para prevenir que grandes partículas (por ejemplo, partículas con tamaños superiores a aproximadamente 10 micrómetros de diámetro aerodinámico) entren en el detector o identificador. El fraccionador de partículas grandes es un componente esencial 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 medioambiental ocupado, podría ser un cartucho pre-separador opcional que se coloca aguas abajo de la entrada. Además, para el muestreador ambiental, podría ser un tamiz de bichos que se coloca precisamente aguas arriba del puerto de salida.

El colector incluye medios concentradores que incluyen un impactador virtual para insertar las partículas de muestra en un medio líquido. Entonces, el sistema fluido mezcla la muestra con nanopartículas.

En una realización, los sistemas y métodos están adaptados para inspeccionar contenedores de transporte, por ejemplo, para detectar materiales o fármacos o microbios peligrosos entre artículos en un contenedor de transporte. La realización incluye medios para extraer aire del espacio interior del contenedor de transporte, medios para recoger o concentrar cualquier material en suspensión u ocluido en ese aire, medios para mezclar el material con nanopartículas y medios para presentar esa mezcla al sistema de resonancia magnética para pruebas. La inspección puede llevarse a cabo abriendo una puerta del contenedor de transporte. Alternativamente, el aire interior puede sacarse mediante un puerto o abertura que puede volver a cerrarse en el contenedor de transporte. Más detalles se proporcionan en la solicitud provisional número de serie 60/669.019 presentada el 07/04/2005 titulada SHIPPING CONTAINER INSPECTION DEVICE.

Aquellos expertos apreciarán adicionalmente que los diversos bloques lógicos, módulos, circuitos y etapas de algoritmos ilustrativos descritos a propósito de las realizaciones desveladas en el presente documento pueden implementarse frecuentemente como hardware electrónico, software informático, o combinaciones de ambos. Para ilustrar claramente esta intercambiabilidad de hardware y software, diversos componentes, bloques, módulos, circuitos y etapas ilustrativos se han descrito anteriormente generalmente en términos de su funcionalidad. Si tal funcionalidad se implementa como hardware o software depende de la aplicación particular y limitaciones al diseño impuestas en el sistema global. Los expertos pueden implementar la funcionalidad descrita de formas variables para cada aplicación particular, pero tales decisiones de implementación no deben interpretarse como que provoquen una divergencia del alcance de la invención. Además, la agrupación de funciones dentro de un módulo, bloque, circuito o etapa es para facilidad de descripción. Funciones o etapas específicas pueden moverse a un módulo, bloque o circuito sin apartarse de la invención.

Los diversos bloques lógicos, módulos y circuitos ilustrativos descritos a propósito de las realizaciones desveladas en el presente documento pueden implementarse o realizarse con un procesador de uso general, un procesador de señales digitales (DSP), un circuito integrado para aplicaciones específicas (ASIC), una matriz de puertas programable por campo (FPGA) u otro dispositivo de lógica programable, puerta discreta o lógica de transistores, componentes de hardware discreto, o cualquier combinación de los mismos diseñados para realizar las funciones descritas en el presente documento. Un procesador de propósito general puede ser un microprocesador, pero por el contrario, el procesador puede ser cualquier procesador, controlador, microcontrolador o máquina de estados. Un procesador también puede implementarse 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 conjuntamente con un núcleo de DSP, o cualquier otra configuración tal.

Las etapas de un método o algoritmo descrito a propósito de las realizaciones desveladas en el presente documento pueden incorporarse directamente en el hardware, en un módulo de software ejecutado por un procesador, o en una combinación de los dos. Un módulo de software puede residir en memoria RAM, memoria rápida, memoria ROM, memoria EPROM, memoria EEPROM, registradores, disco duro, un disco extraíble, un CD-ROM, o cualquier otra forma de medio de almacenamiento. Un medio de almacenamiento a modo de ejemplo puede acoplarse al procesador de tal manera que el procesador pueda leer información de, y escribir información a, el medio de almacenamiento. Provisionalmente, el medio de almacenamiento puede ser parte integrante del procesador. El procesador y el medio de almacenamiento pueden residir en un ASIC.

La descripción anterior de las realizaciones desveladas se proporciona para permitir que cualquier experto en la materia haga o use la invención. Diversas modificaciones a estas realizaciones serán rápidamente evidentes para aquellos expertos en la materia, y los principios genéricos definidos en el presente documento pueden aplicarse a otras realizaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para detectar si un analito está presente o no en una muestra usando resonancia magnética, comprendiendo el método:  
aplicar un primer campo magnético a una muestra que comprende un líquido y material que se va a analizar;
- 5 aplicar un segundo campo magnético dentro de al menos una región de la muestra de forma que las señales de resonancia magnética del líquido en la al menos una región sean diferentes de las señales de resonancia magnética del líquido exterior a la al menos una región, en donde el segundo campo magnético es creado por una nanopartícula asociada a un material de afinidad en presencia del primer campo magnético, en donde la nanopartícula es una partícula paramagnética;
- 10 retener el analito con el material de afinidad en la al menos una región de manera que desplace líquido de la al menos una región;  
excitar las señales de resonancia magnética del líquido mientras el analito está en la al menos una región para determinar el T2 de la muestra; y  
determinar la presencia del analito determinando si el T2 determinado es mayor que el T2 de la combinación del líquido con las partículas paramagnéticas,
- 15 en donde la determinación de T2 de la muestra usada para determinar la presencia del analito se realiza antes de la aglomeración sustancial, y  
en donde la estequiometría de las partículas paramagnéticas inhibe la aglomeración.
2. El método de la reivindicación 1 que comprende además medir el T2 del líquido con las nanopartículas.
- 20 3. El método de la reivindicación 2 que comprende además medir el T1 de la muestra para determinar la concentración de nanopartículas en la muestra y usar esa determinación para determinar un nivel inicial para determinar si se ha producido un aumento en el T2.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el segundo campo magnético es tal que las señales de resonancia magnética del líquido en el segundo campo magnético puedan distinguirse de las señales de resonancia magnética del líquido exterior al segundo campo magnético.
- 25 5. El método de la reivindicación 1 que comprende además determinar la cantidad del analito en la muestra a partir del T2 determinado.
6. El método de la reivindicación 1 que comprende además medir el T2 del líquido con partículas paramagnéticas y sin el material que va a analizarse para determinar una medición del T2 del nivel inicial.
- 30 7. El método de la reivindicación 1, en donde el analito se une a la partícula formando un binario de nanopartícula-analito, y el analito ocupa la segunda región de campo magnético, excluyendo así líquido de la región, dando como resultado una reducción en el desfase del líquido, dando como resultado un aumento en el T2 de la muestra entera de líquido.

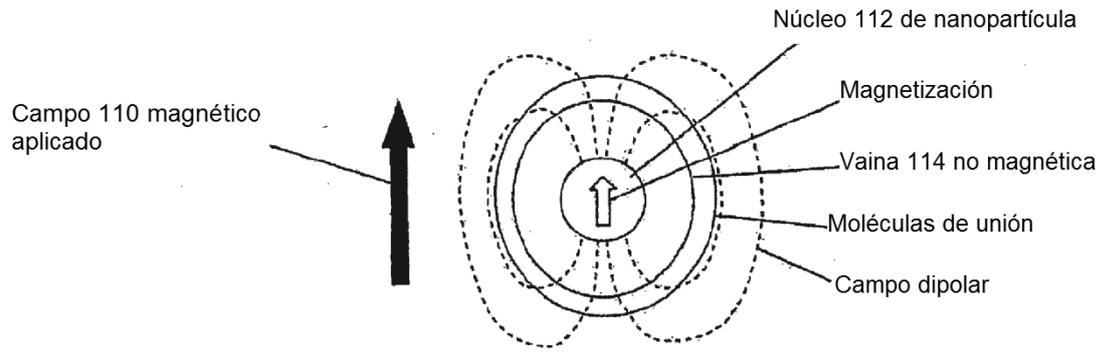


FIGURA 1

CAMPO MAGNÉTICO DE NANOPARTÍCULAS

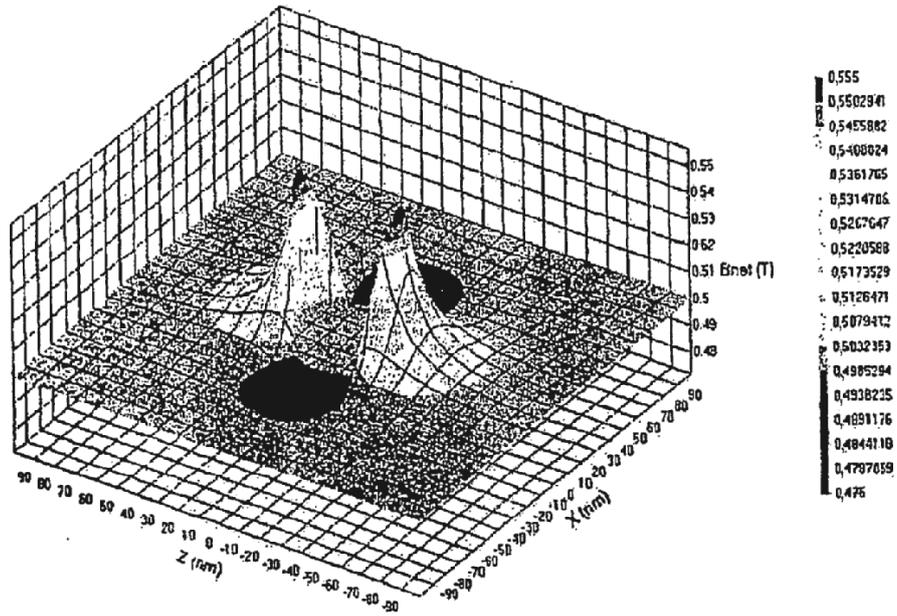


FIGURA 2

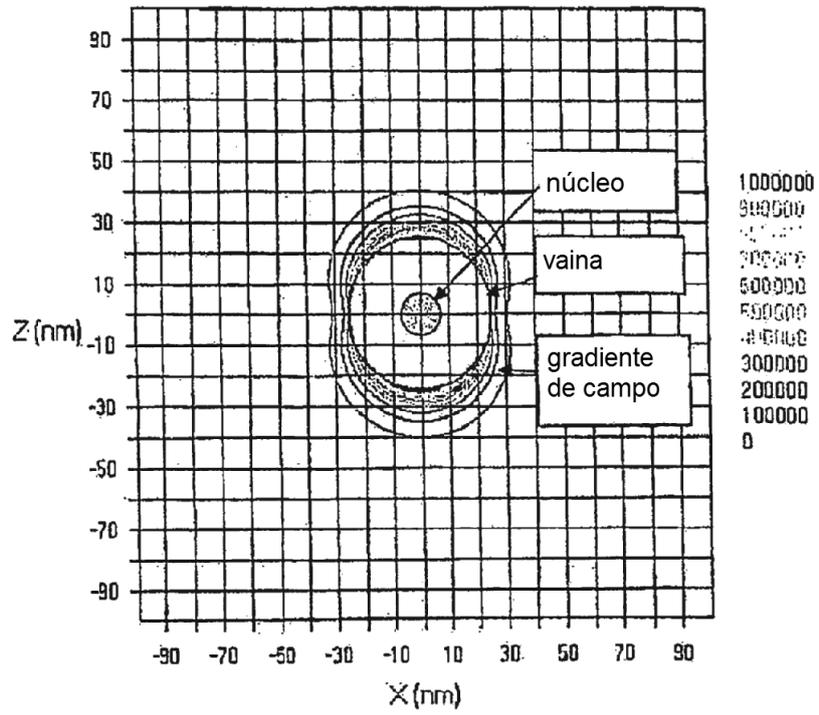


FIGURA 3

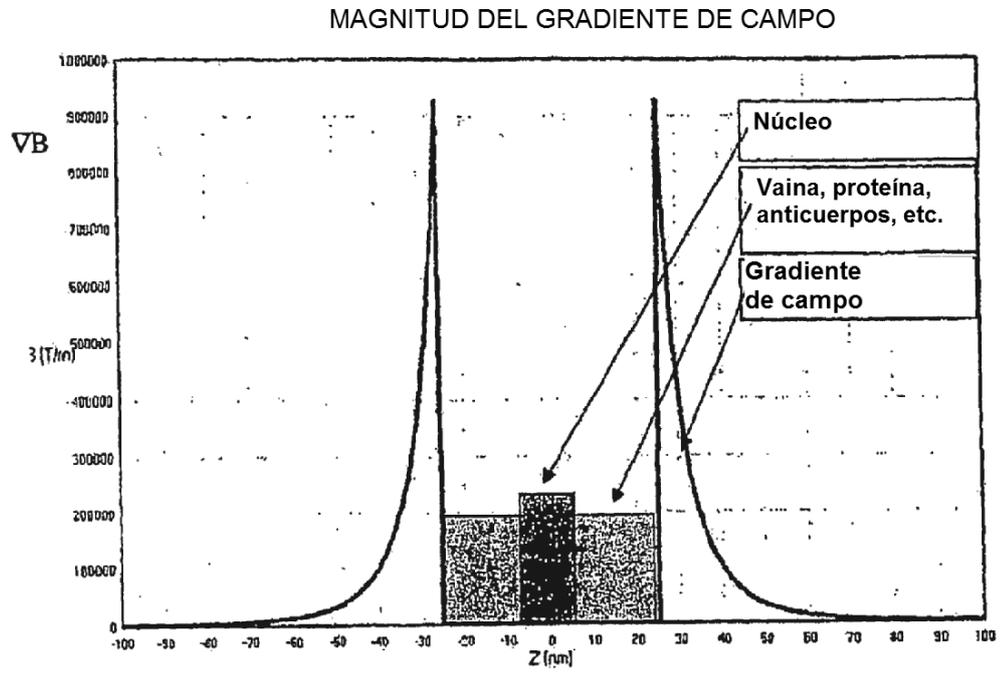


FIGURA 4

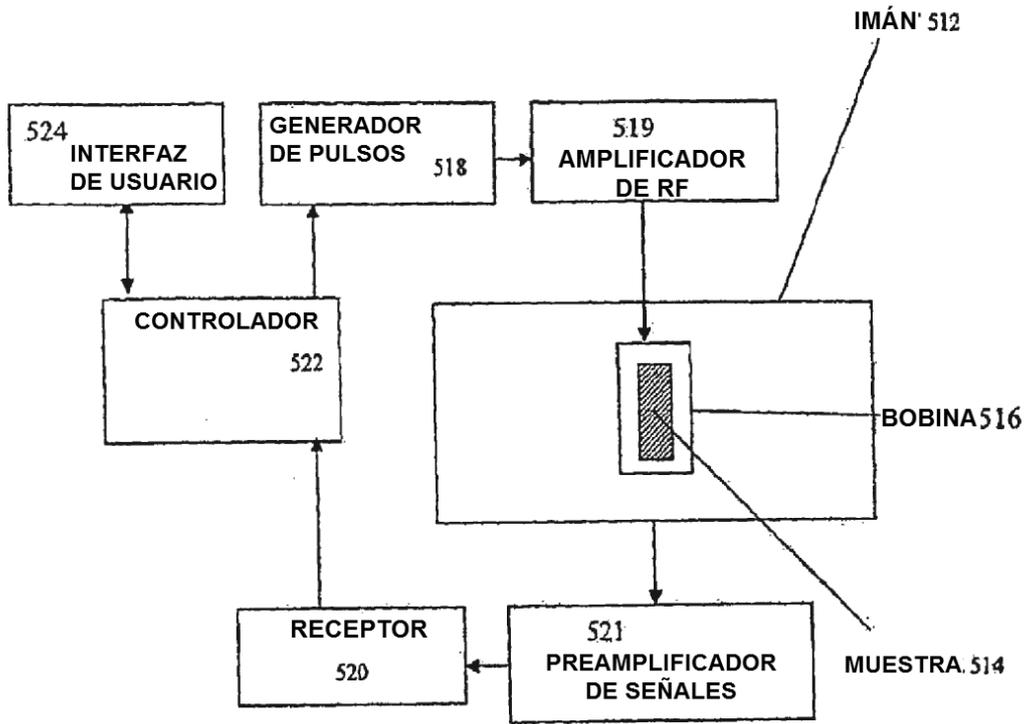


FIGURA 5

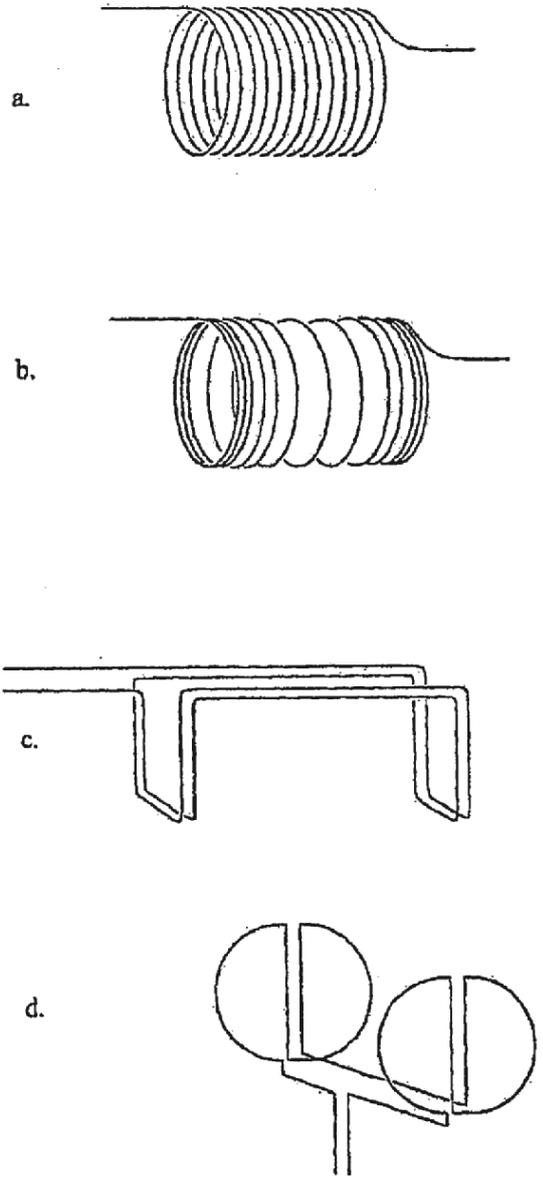


FIGURA 6a-d

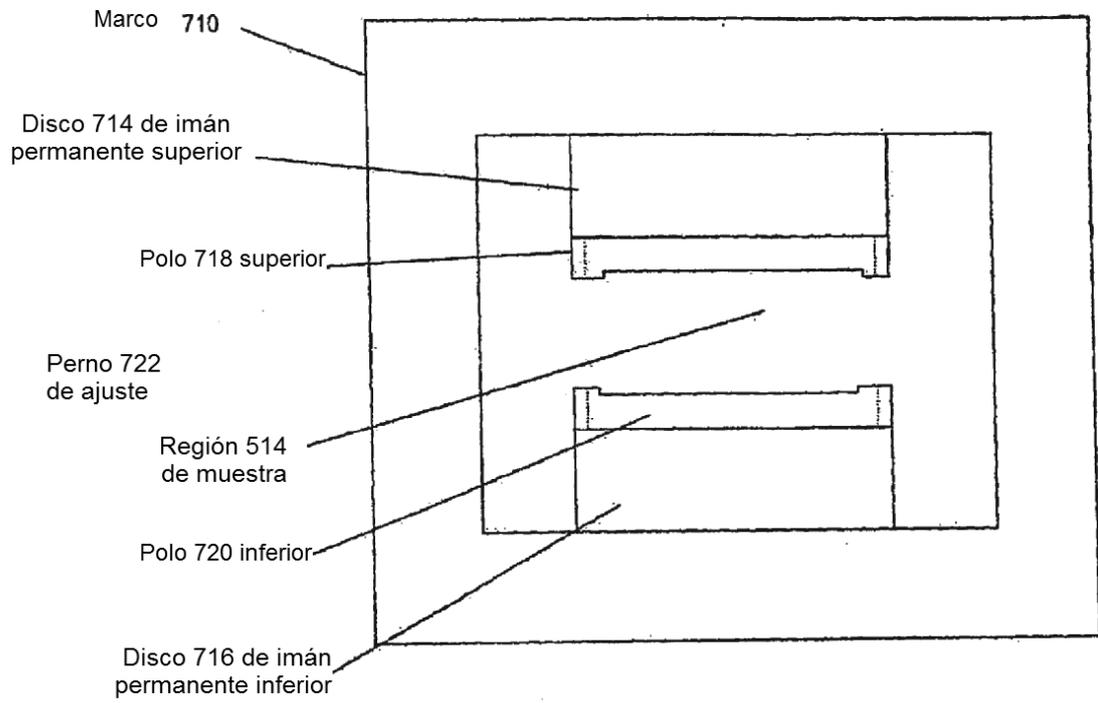


FIGURA 7

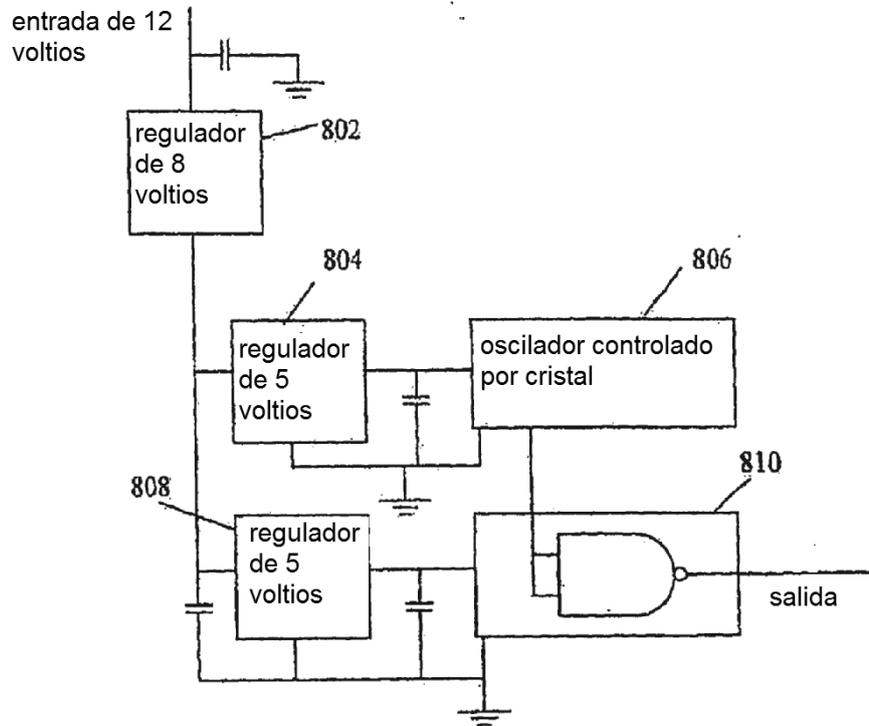


FIGURA 8

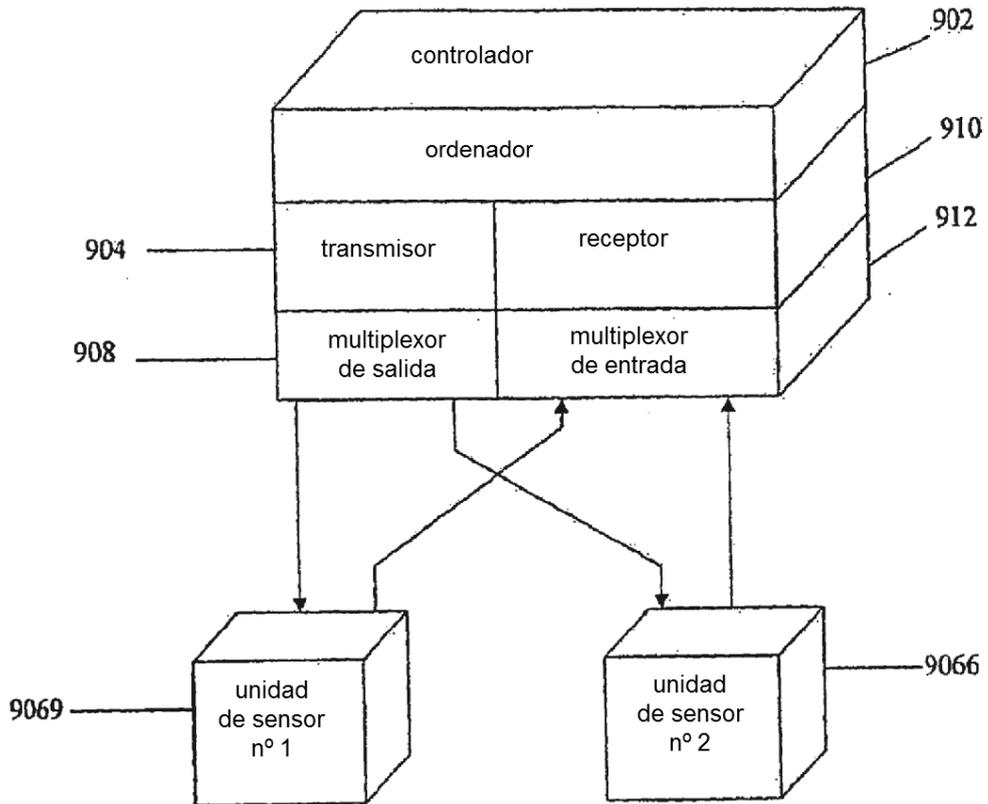


FIGURA 9

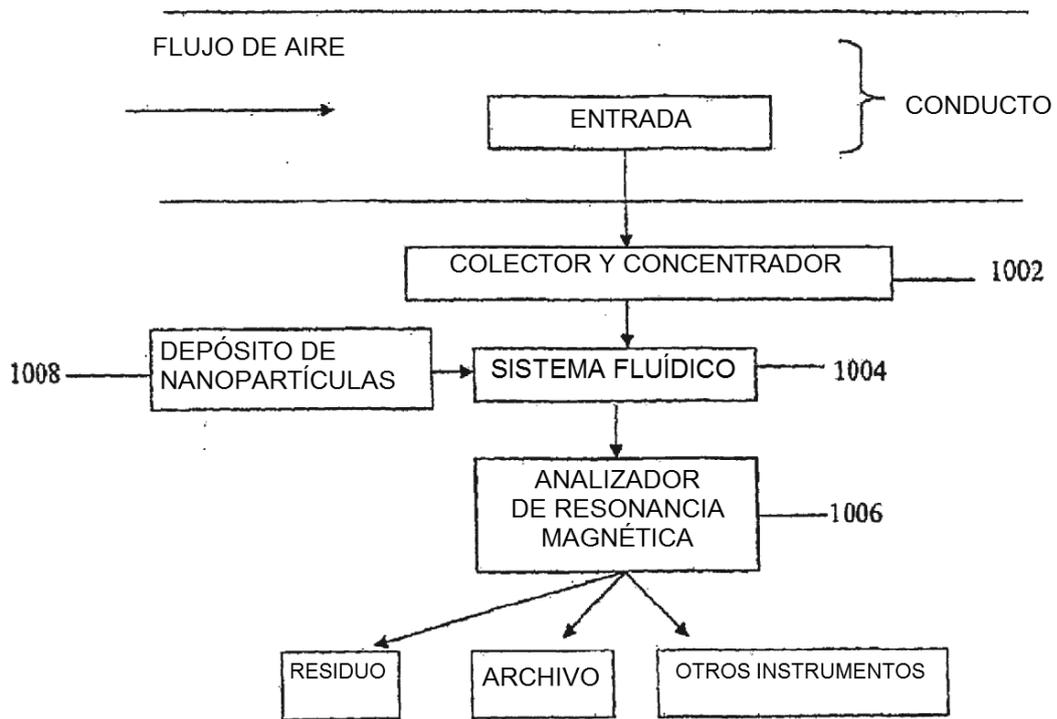


FIGURA 10

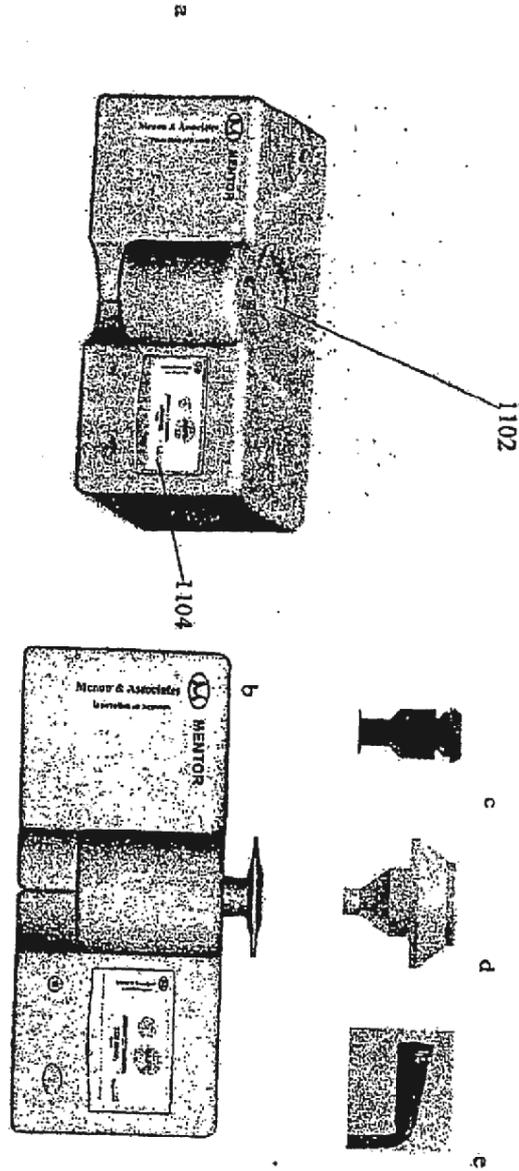


FIGURA 11

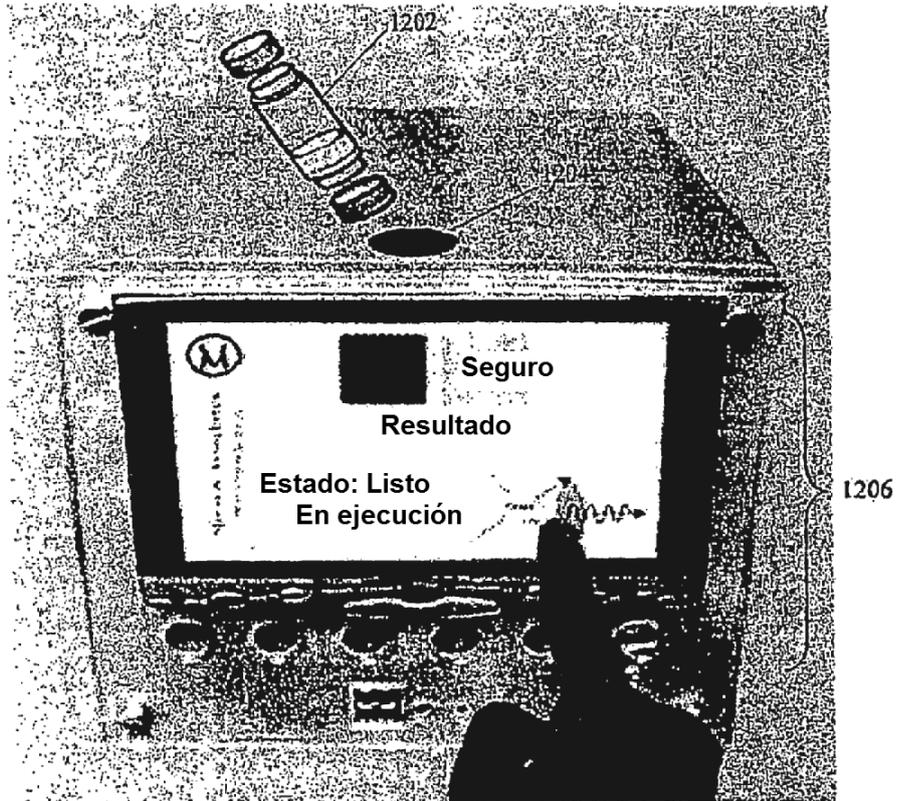


FIGURA 12

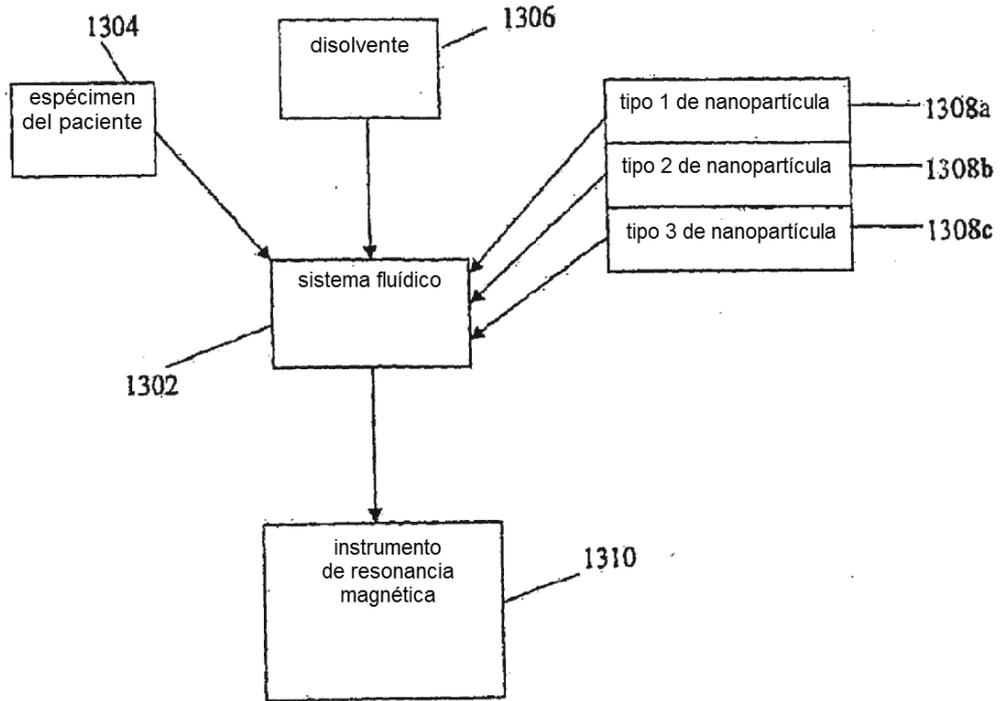


FIGURA 13