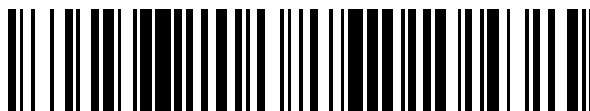


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 878 079**

51 Int. Cl.:

G01N 24/08 (2006.01)

G01R 33/46 (2006.01)

G01R 33/465 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2017** **PCT/EP2017/081314**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2018** **WO18108600**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2017** **E 17816600 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.06.2021** **EP 3555603**

54 Título: **Procedimiento de RMN para la detección y cuantificación de analitos individuales en mezclas de analitos líquidos**

30 Prioridad:

13.12.2016 DE 102016124177

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

18.11.2021

73 Titular/es:

**LEIBNIZ - INSTITUT FÜR ANALYTISCHE
WISSENSCHAFTEN - ISAS - E.V. (100.0%)
Bunsen-Kirchhoff-Strasse 11
44139 Dortmund, DE**

72 Inventor/es:

**TELFAH, AHMAD;
HERGENRÖDER, ROLAND y
LAMBERT, JÖRG**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 878 079 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de RMN para la detección y cuantificación de analitos individuales en mezclas de analitos líquidos

La invención se refiere a un procedimiento para la detección y cuantificación de al menos un analito individual en mezclas de analitos líquidos mediante espectrometría de RMN, en el que una muestra de la mezcla de analitos se somete a un pulso de alta frecuencia en un espectrómetro de RMN y el espectro de RMN resultante se evalúa, en donde la muestra de la mezcla de analitos se coloca en un espectrómetro de RMN de campo bajo.

Un análisis preciso de las mezclas de analitos líquidos es necesario o al menos deseable en muchos casos de aplicaciones. La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución es básicamente adecuada para este fin. Sin embargo, un espectrómetro de RMN de este tipo con una intensidad de campo magnético de más de 20 T (Tesla) es extremadamente caro y, por lo tanto, generalmente no está disponible. En principio, la espectrometría de masas también es adecuada para el análisis. Esos espectrómetros de masas también son complejos y costosos, por lo que los dos instrumentos analíticos mencionados anteriormente no están disponibles para aplicaciones *in situ*, por ejemplo, en consultas médicas o en instalaciones de control de seguridad en aeropuertos o similares.

Sin embargo, especialmente en el área de la predicción, diagnóstico, seguimiento y pronóstico de enfermedades, así como en la optimización de las dosificaciones de medicamentos, sería deseable tener a disposición un procedimiento de análisis *in situ* económico. En este contexto, el análisis de los productos finales metabólicos (metabolitos) de un paciente tiene un papel clave. Las concentraciones de metabolitos clave en los fluidos corporales sangre y orina, permiten básicamente una predicción diferenciada del estado de salud y de los posibles riesgos para la salud.

Sin embargo, la evaluación de una pequeña cantidad de biomarcadores, como los triglicéridos y el colesterol, que se practica en el análisis clínico actual, no es suficiente para predecir de manera fiable en cada caso el riesgo de que aparezcan enfermedades. Esas simples predicciones con biomarcadores subestiman la complejidad inherente de los trastornos metabólicos que incluyen cientos de procesos bioquímicos. Sin embargo, la creación de un perfil metabólico completo a partir de biofluidos hasta ahora ha estado fuera de discusión en el análisis clínico por razones económicas. A diferencia del genoma o el proteoma, que se pueden analizar con la ayuda de tecnologías matriciales de bajo costo, aún no se dispone de herramientas de diagnóstico comparables, eficientes y económicas para el metaboloma. Como se ha mencionado anteriormente, esos análisis son posibles básicamente con la ayuda de espectrómetros de masas o espectrómetros de resonancia magnética nuclear de alta resolución, pero se descarta su uso *in situ*.

Fundamentalmente se conocen también espectrómetros de RMN de campo bajo económicos y portátiles con intensidades de campo magnético de hasta aproximadamente 3 T. Esos espectrómetros de RMN de campo bajo se comercializan cada vez más y se utilizan para medir el contenido en grasa de alimentos así como detectores para la cromatografía líquida. Sin embargo, muchos de los sistemas de RMN portátiles que se utilizan en la actualidad tienen imanes con un bajo nivel de homogeneidad y, por lo tanto, se utilizan para investigaciones relaxométricas para determinar el contenido en agua de los alimentos así como para el control de calidad de los elastómeros. Para las investigaciones espectroscópicas clásicas de RMN, como el control de productos en la síntesis orgánica, existen aparatos comerciales que solo son adecuados para sustancias de muestras puras con señales bien separadas. Esos aparatos se suelen utilizar con fines formativos y pueden alcanzar anchos de línea que permiten la resolución de multipletes. Los espectrómetros de RMN de campo bajo, que son adecuados para la caracterización de mezclas de sustancias y, en particular, para una identificación clara y una cuantificación fiable de los metabolitos en la sangre y la orina, no están disponibles hasta la fecha porque la dispersión espectral es demasiado pequeña con intensidades bajas de campo magnético.

A partir del documento WO 2016/189536 A1 se conoce un procedimiento que tiene las características del preámbulo de la reivindicación 1. Ese procedimiento se utiliza en particular para medir el contenido en grasa de los alimentos.

El objeto de la invención es seguir desarrollando un procedimiento del tipo descrito al inicio, de tal manera que permita un análisis exacto de mezclas de analitos líquidos, incluso cuando se utilizan espectrómetros de RMN de campo bajo.

Este objeto se consigue de acuerdo con la invención en el caso de un procedimiento del tipo especificado inicialmente, en el que la muestra se somete a al menos un pulso de alta frecuencia que estimula solo un analito específico, estando configurado el pulso de alta frecuencia de modo que estimula selectivamente el analito en todas las posiciones en las que aparecen señales del espectro de RMN.

Como se ha mencionado anteriormente, la espectrometría de RMN de campo bajo básicamente no es adecuada para el análisis de mezclas de sustancias, por ejemplo, para una cuantificación fiable de los metabolitos en la sangre y la orina, ya que en los espectros de RMN de biofluidos se produce una superposición masiva de señales de metabolitos y matrices que hace imposible un análisis razonable. De acuerdo con la invención, cada muestra respectiva de la mezcla de analitos en un espectrómetro de RMN de campo bajo no se somete por tanto al pulso de alta frecuencia habitual, sino que se determina para cada analito que se está buscando un pulso de alta frecuencia que solo excite ese analito y solo se aplica a la muestra ese pulso de alta frecuencia específico del analito.

De acuerdo con la invención, por pulso de alta frecuencia específico de un analito, se entiende un pulso de alta frecuencia que es capaz de excitar toda una serie de bandas de frecuencias, concretamente en todas las posiciones en las que aparecen señales en el espectro de RMN para un determinado analito. Como resultado, solo se excita el analito correspondiente y, si está presente en la muestra, el analito se puede detectar y cuantificar claramente en el espectro de RMN. Por ejemplo, durante un control de seguridad en un aeropuerto o similar, se puede analizar específicamente de esta manera una muestra líquida en busca de un analito específico, aplicando un pulso de alta frecuencia a la muestra que solo excita ese analito específico. Si se puede reconocer el analito en el espectro de RMN, entonces la muestra contiene ese analito, de lo contrario, el analito no está en la muestra.

En la mayoría de los casos de aplicaciones, se prevé preferiblemente que la muestra de la mezcla de analitos se aplique sucesivamente a una pluralidad de pulsos de alta frecuencia, en donde cada pulso excita solo un analito específico, evaluándose el espectro de RMN resultante después de cada exposición a pulsos de alta frecuencia. A diferencia de la espectrometría de RMN clásica, la muestra no solo se somete a un único pulso de alta frecuencia, sino que sucesivamente a varios pulsos de alta frecuencia que excitan solo un analito específico, es decir, se examina sucesivamente si la muestra contiene o no diferentes analitos o sustancias analíticas. De esta manera es posible un análisis exacto de mezclas de sustancias y, en particular, una identificación clara y una cuantificación fiable de, por ejemplo, los metabolitos en la sangre y la orina, con espectrómetros de RMN de campo bajo sencillos y económicos.

En una realización preferida, se prevé que el campo magnético del espectrómetro de RMN de campo bajo tenga una intensidad magnética entre 0,1 y 3,0 T. Ese tipo de espectrómetros de RMN de campo bajo están disponibles y tienen unos gastos comparativamente bajos, de modo que se pueden utilizar, por ejemplo, en consultas médicas o también en estaciones de control de seguridad.

Para llevar a cabo el procedimiento, se prevé preferiblemente que para una pluralidad de analitos se determine un pulso de alta frecuencia que es específico para cada analito respectivo y que solo estimula ese analito y se archive. Los respectivos pulsos de alta frecuencia se almacenan luego en el respectivo espectrómetro de RMN de campo bajo y se pueden seleccionar dependiendo del analito buscado y luego aplicar a la muestra.

Para determinar el respectivo pulso de alta frecuencia, se prevé preferiblemente que el respectivo pulso de alta frecuencia, que excita solo un analito específico, se determine numéricamente de forma iterativa. El pulso de alta frecuencia se puede calcular, por ejemplo, según el principio del llamado control óptimo. Por ejemplo, se puede utilizar un procedimiento de Krotov, que ha mostrado ser el algoritmo más adecuado para sistemas complejos con muchos núcleos de hidrógeno diferentes. El algoritmo de Krotov tiene un comportamiento de convergencia estrictamente monótono y para optimizar los pulsos de alta frecuencia no requiere ninguna técnica de gradiente, que podría conducir a soluciones subóptimas.

La invención se explica a continuación a modo de ejemplo con más detalle haciendo referencia al dibujo. Este muestra en

la Figura 1 un espectro de RMN total no analizable de un biofluido,

la Figura 2 un espectro de RMN total de una mezcla de analitos que consiste solo en dos analitos (alanina y lactato),

la Figura 3 la progresión de la amplitud dependiente del tiempo del pulso de alta frecuencia para el espectro de RMN total según la Figura 2,

la Figura 4 la progresión de la fase dependiente del tiempo del pulso de alta frecuencia para el espectro de RMN total según la Figura 2,

la Figura 5 el espectro de RMN del analito puro alanina,

la Figura 6 la progresión de la amplitud dependiente del tiempo de un pulso de alta frecuencia para alanina al comienzo de la iteración,

la Figura 7 la progresión de la fase asociada del pulso de alta frecuencia según la Figura 6,

la Figura 8 el espectro de RMN total según la Figura 2 a menor escala,

la Figura 9 el espectro de RMN específico de alanina debido a la excitación con un pulso de alta frecuencia según las Figuras 6 y 7,

la Figura 10 la progresión de la amplitud dependiente del tiempo de un pulso de alta frecuencia para alanina en el medio de la iteración,

la Figura 11 la progresión de la fase asociada del pulso de alta frecuencia según la Figura 10,

la Figura 12 el espectro de RMN total según la Figura 2 a menor escala,

la Figura 13 el espectro de RMN específico de alanina debido a la excitación con un pulso de alta frecuencia según las Figuras 10 y 11,

la Figura 14 la progresión de la amplitud dependiente del tiempo de un pulso de alta frecuencia para alanina al final de la iteración,

5 la Figura 15 la progresión de la fase asociada del pulso de alta frecuencia según la Figura 14,

la Figura 16 el espectro de RMN total según la Figura 2 a menor escala, así como en

la Figura 17 el espectro de RMN específico de alanina debido a la excitación con un pulso de alta frecuencia según las Figuras 14 y 15.

10 En la Figura 1 se muestra a modo de ejemplo un espectro de RMN total de un biofluido que se ha obtenido en un espectrómetro de RMN de campo bajo. Es fácil observar que un espectro de RMN de ese tipo no se puede analizar.

No obstante, para poder utilizar espectrómetros de RMN de campo bajo para el análisis de mezclas de analitos líquidos, se utiliza el procedimiento descrito anteriormente de acuerdo con la invención.

15 La Figura 2 muestra un espectro de RMN total de una mezcla de analitos que, para simplificar la explicación, consiste solo en dos analitos, a saber, lactato y alanina. Por lo tanto, ese espectro mostrado en la Figura 2 ya se podría evaluar fundamentalmente de forma útil. Sin embargo a continuación, para explicar el procedimiento de acuerdo con la invención, se supone que el espectro mostrado en la Figura 2 no se puede analizar.

20 El espectro mostrado en la Figura 2 surge del hecho de que una muestra líquida, que está dispuesta en un espectrómetro de RMN de campo bajo y que consiste solo en lactato y alanina, se somete a un pulso de alta frecuencia, el cual se muestra en las Figuras 3 y 4. Se selecciona una "unidad arbitraria" para la intensidad en la Figura 2, lo que es habitual ya que la intensidad exacta (un voltaje) depende mucho del equipo (intensidad de campo del imán, preamplificador) que se utiliza para la detección. Por tanto, cada espectroscopista de RMN medirá un voltaje diferente para un mismo pulso, dependiendo del aparato que esté usando.

25 Normalmente, las frecuencias absolutas en la RMN están en el intervalo de 5 MHz a aproximadamente 1 GHz (rango de las ondas de radio hasta el rango más bajo de las microondas). Las diferencias de frecuencias entre diferentes señales de RMN, por otro lado, están en el rango de los kHz. Por lo tanto, las escalas de frecuencia contendrían valores muy elevados que difieren solo ligeramente y serían difíciles de leer. Por ello, una frecuencia portadora en el intervalo de los MHz se resta de todas las frecuencias y solo se muestran los cambios en relación con esta frecuencia portadora. La frecuencia portadora se coloca en el centro del espectro para que dé lugar a frecuencias positivas y negativas para los cambios "pequeños" entre las señales. Contrariamente a la convención, la escala de frecuencias 30 va de derecha a izquierda, es decir, las frecuencias positivas están en el lado izquierdo del eje x. Esto tiene razones históricas y se utiliza de esta manera hasta el día de hoy.

35 La Figura 5 muestra el espectro de RMN deseado para la alanina. Si, de acuerdo con la invención, se aplica sobre la muestra líquida compuesta únicamente por lactato y alanina en un espectrómetro de RMN de campo bajo con un pulso de alta frecuencia específico para alanina, es decir, un pulso de alta frecuencia que solo excita la alanina, el espectro RMN mostrado en la Figura 5 se formará si en la muestra está contenida alanina en la cantidad apropiada. De acuerdo con la invención, en este caso se entiende por pulso de alta frecuencia específico para alanina, un pulso de alta frecuencia que es capaz de excitar toda una serie de bandas de frecuencias, concretamente en todas las posiciones en las que aparecen señales para alanina en el espectro de RMN.

40 Para determinar un pulso de alta frecuencia de RMN específico de un analito, en este caso también un pulso específico de alanina, se procede de la siguiente manera:

45 Fundamentalmente, un experimento de RMN se lleva a cabo de la siguiente manera: se aplica un pulso de alta frecuencia, típicamente de 10 μ s de duración, sobre una bobina que se enrolla alrededor de un tubo de vidrio con la mezcla de analitos (también llamada "muestra") utilizando un generador de HF. Como resultado de la acción del pulso, se genera un momento magnético variable en el tiempo en la mezcla de analitos. A través de un dispositivo técnico adecuado, se cambia la bobina del "modo transmisión" al "modo recepción". El momento magnético de la muestra que cambia a lo largo del tiempo, induce entonces una tensión en la bobina, que se mide durante aproximadamente 500 ms, como una función del tiempo y se digitaliza con un convertidor analógico-digital. Después de la transformación de Fourier de la señal de tiempo digitalizada, se produce una representación de la amplitud de la forma como una función de la frecuencia, que se denomina espectro de RMN.

50 Sin preparativos adicionales, el espectro de RMN contiene las señales de RMN de todos los analitos o sustancias de la mezcla de analitos, es decir, lactato y alanina según la Figura 2.

Lo que se busca es un pulso de alta frecuencia que, en un experimento de RMN realizado con una mezcla de varias sustancias, solo entregue el espectro de RMN de una sustancia (de libre elección) de la mezcla. Para ello se utiliza el método de "control óptimo". Este procedimiento numérico iterativo optimiza una funcional. Se entiende que es una

expresión en la que se entrega una función matemática y se recibe un número. El objetivo del algoritmo es maximizar iterativamente la funcional. La función transferida a la funcional es una función de calidad que compara el estado real del pulso proporcionado en el momento (es decir, el espectro que proporciona el pulso realmente en el momento del cálculo) con el estado esperado (es decir, el espectro que el pulso debería proporcionar idealmente). La funcional proporciona valores particularmente grandes cuando los estados real y esperado coinciden. Ese sería entonces el estado deseado, en el que el pulso genera exactamente el espectro de RMN que se quiere tener.

El estado esperado se determina de tal manera que solo las señales de la sustancia deseada aparecen en el espectro de RMN resultante. Esto siempre es fácil porque se conocen los espectros de RMN de todas las sustancias de la mezcla. Para calcular el estado real, el pulso se reemplaza por un histograma de aproximadamente 200 pulsos rectangulares que son muy cortos (aproximadamente 50 μ s). En ese caso, el espectro de RMN generado por un pulso rectangular tan corto, se puede calcular con relativa facilidad. Un cálculo de ese tipo se conoce, por ejemplo, a partir de la revista *Progress in NMR Spectroscopy*, vol. 16, págs. 163-192, 1983.

Para el cálculo del espectro de RMN que genera el pulso total de alta frecuencia, se deben considerar sucesivamente todos los pulsos rectangulares del histograma. El cálculo de la función de calidad muestra entonces a qué distancia está el estado real del estado esperado. Si la función de calidad aún no es satisfactoria, se cambian las amplitudes de los pulsos rectangulares individuales del histograma y comienza una nueva iteración. La forma en que deben cambiarse las amplitudes de los 200 pulsos rectangulares, se determina mediante una regla de actualización analítica dada en el marco del algoritmo. Esta regla de actualización asegura que la función de calidad, y por lo tanto la funcional, crece estrictamente de forma monotonía con cada iteración. El cálculo se detiene después de una serie de iteraciones que se van a determinar de antemano mediante pruebas empíricas, ya que no existe ningún criterio que permita determinar un número máximo de iteraciones.

En las Figuras 5 a 17 se muestra a modo de ejemplo la determinación de un pulso de alta frecuencia que excita únicamente la alanina, es decir, específico de alanina.

Al comienzo de la iteración, por ejemplo, según las Figuras 6 y 7, se utiliza un pulso de alta frecuencia específico de alanina que todavía está relativamente cerca del pulso de alta frecuencia para todo el espectro según las Figuras 3 y 4. Esto da como resultado un espectro de RMN específico de alanina todavía muy pobre según la Figura 9, que, sin embargo, ya difiere del espectro de RMN total según la Figura 8 (o la Figura 2).

El pulso de alta frecuencia específico de alanina se modifica posteriormente de forma continua, en las Figuras 10 y 11 se muestra un pulso de alta frecuencia específico de alanina como ejemplo en el medio de la iteración. Esto da como resultado un espectro de RMN específico de alanina según la Figura 13, que ya difiere significativamente del espectro de RMN total según la Figura 12 (o la Figura 2) y, por así decirlo, ya se desarrolla en la dirección del espectro de RMN de alanina deseado según la Figura 5.

Al final de la iteración se produce un pulso de alta frecuencia específico de alanina según las Figuras 14 y 15. Esto da como resultado un espectro de RMN específico de alanina según la Figura 17, que difiere significativamente del espectro de RMN total según la Figura 16 (o la Figura 2) y se corresponde en gran medida con el espectro de RMN específico de alanina deseado según la Figura 5. Por tanto, se ha encontrado un pulso de alta frecuencia específico para la alanina (Figuras 14 y 15) que se archiva o se almacena en un espectrómetro de RMN de campo bajo. Este pulso de alta frecuencia, que es específico para la alanina, es por tanto un pulso de alta frecuencia que es capaz de excitar toda una serie de bandas de frecuencias, es decir, exactamente en todas las posiciones en las que aparecen señales en el espectro de RMN para la alanina.

Si ahora se emplea una muestra líquida en un espectrómetro de RMN de campo bajo y esa muestra se debe examinar para detectar la presencia y la cantidad de alanina, entonces se usa el pulso de alta frecuencia específico de alanina almacenado y se aplica a la muestra. Si la alanina está presente en la muestra, se produce un espectro de RMN típico de alanina. Si, por el contrario, la muestra no contiene alanina, solo se pueden reconocer señales de ruido en el espectro de RMN, es decir, no se puede detectar la alanina.

De la misma manera, se determinan pulsos de alta frecuencia que sean específicos de forma correspondiente para otros analitos o sustancias. Cuando se examina una muestra, es decir, una mezcla de analitos, en busca de diferentes analitos, la muestra se somete a continuación a diferentes pulsos de alta frecuencia específicos de analitos, y mientras tanto se lleva a cabo una evaluación, es decir, se evalúa cada espectro de RMN respectivo y se determina si un analito respectivo está presente y en qué concentración.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para detectar y cuantificar al menos un analito individual en mezclas de analitos líquidos mediante espectrometría de RMN, en el que se aplica un pulso de alta frecuencia a una muestra de la mezcla de analitos en un espectrómetro de RMN y se evalúa el espectro de RMN resultante, en donde la muestra de la mezcla de analitos se coloca en un espectrómetro de RMN de campo bajo,
- caracterizado por
- que se aplica a la muestra al menos un pulso de alta frecuencia que excita solo un analito específico, en donde el pulso de alta frecuencia está configurado de tal manera que excita selectivamente el analito en todas las posiciones en las que aparecen señales en el espectro de RMN.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1,
- caracterizado por
- que se aplican múltiples pulsos de alta frecuencia, cada uno de los cuales excita solo un analito específico, uno después de otro a la muestra de la mezcla de analitos, en donde después de cada aplicación de un pulso de alta frecuencia se evalúa el espectro de RMN resultante.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2,
- caracterizado por
- que el campo magnético del espectrómetro de RMN de campo bajo tiene una intensidad magnética entre 0,1 y 3,0 T.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, 2 o 3,
- caracterizado por
- 20 que un pulso de alta frecuencia que es específico del analito respectivo y que excita solo ese analito, se determina y se archiva para una pluralidad de analitos.
5. Procedimiento según la reivindicación 4,
- caracterizado por
- 25 que el pulso de alta frecuencia respectivo que excita solo un analito específico se determina numéricamente de manera iterativa.

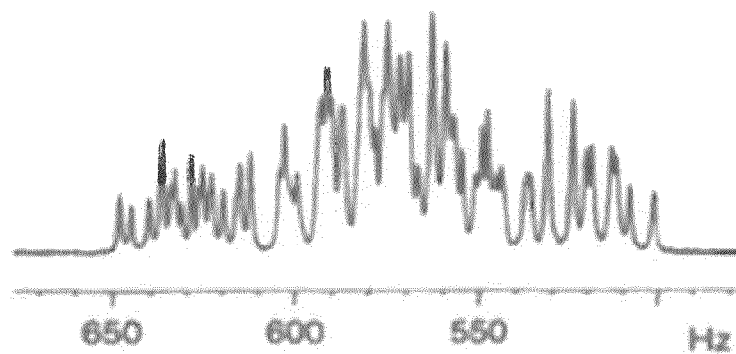


Fig. 1

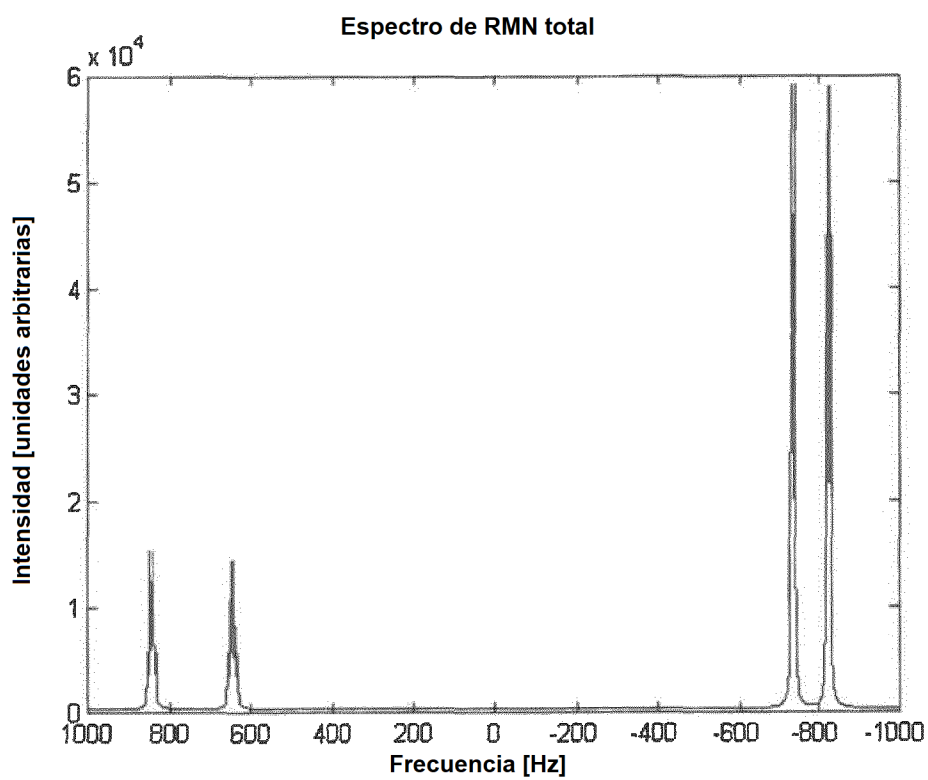
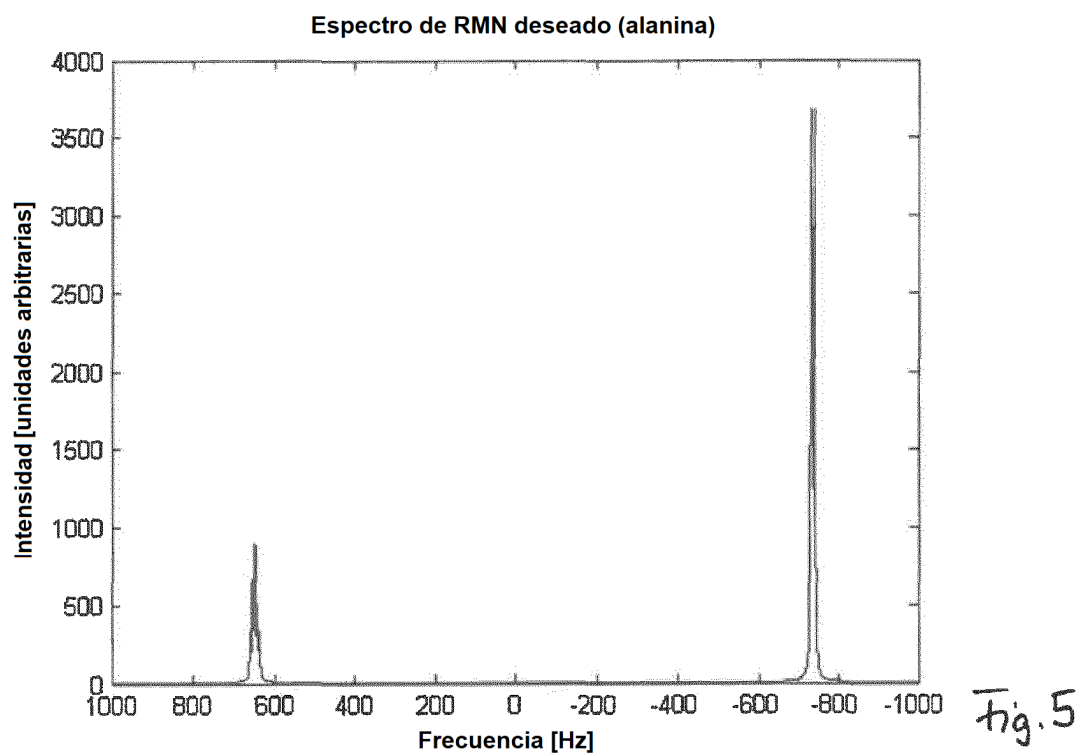
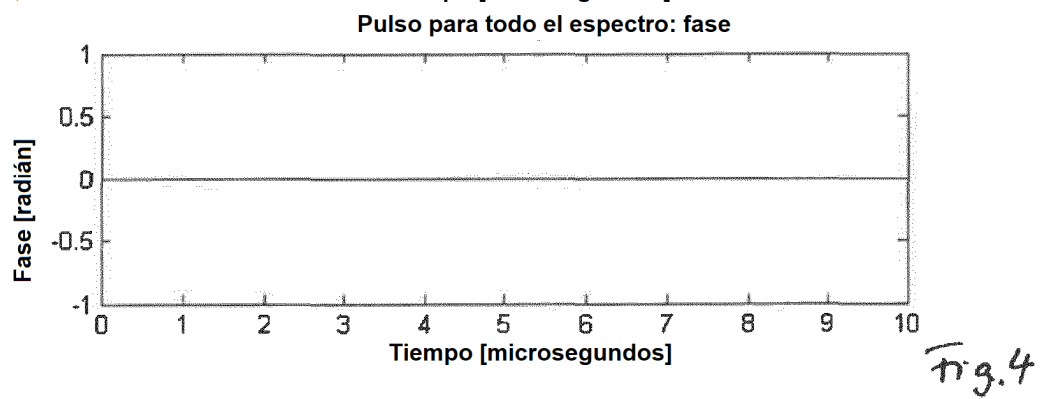
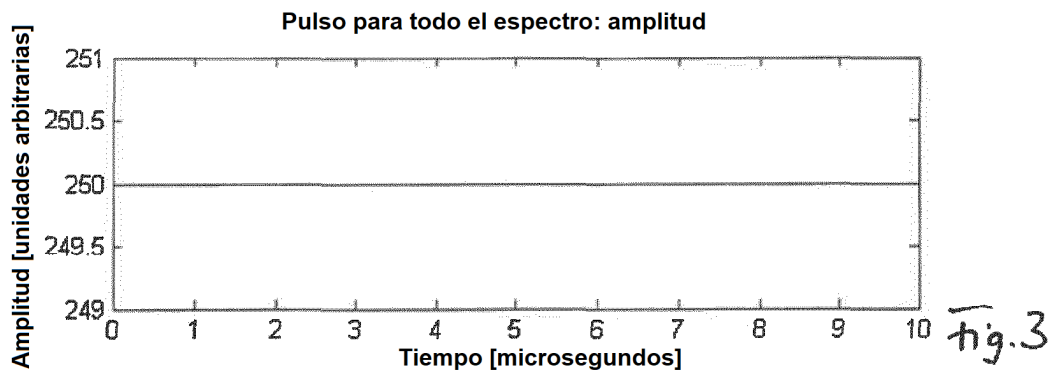


Fig. 2



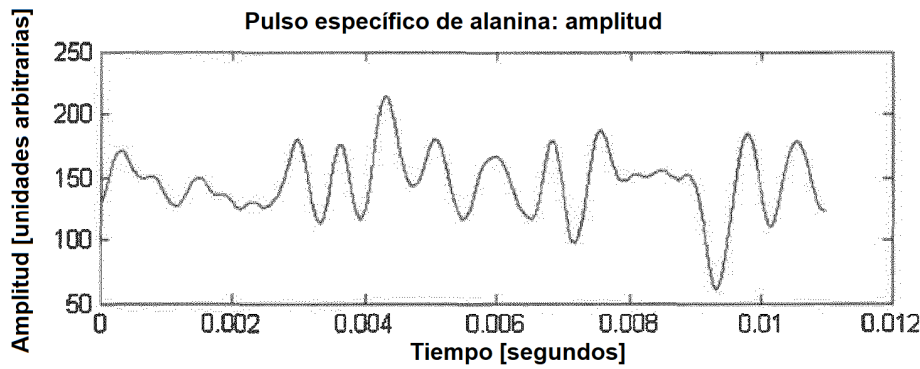


Fig. 6

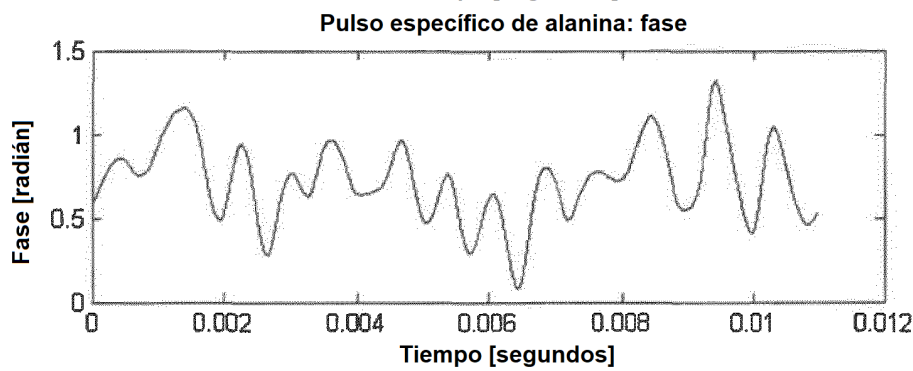


Fig. 7

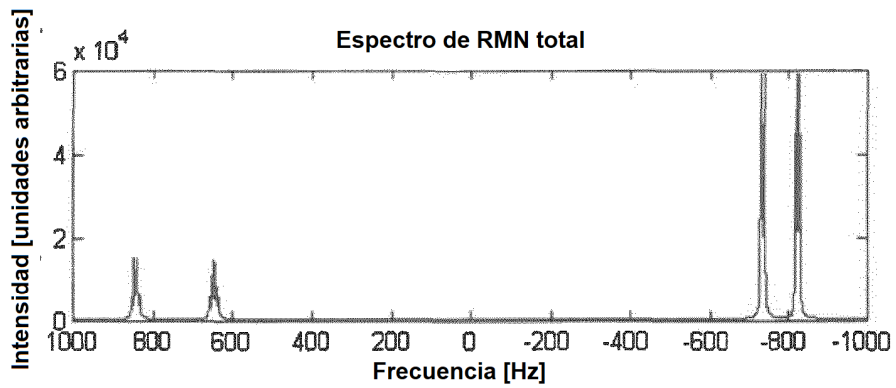


Fig. 8

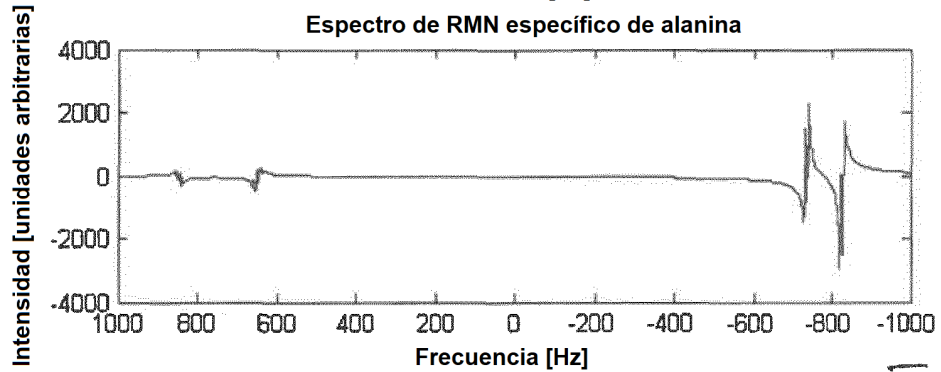


Fig. 9

