



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 315 054**

② Número de solicitud: 200501777

⑤ Int. Cl.:
G01N 21/03 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **20.07.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2009**

Fecha de la concesión: **21.12.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **08.01.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
08.01.2010

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad Complutense de Madrid**

⑱ Inventor/es: **Carmona Hernández, Pedro;
Rodríguez Casado, María Aránzazu y
Molina Santos, Marina**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

② TÍTULO: **Celda porta-muestras para análisis de intercambio isotópico H/D e interacciones moleculares para espectroscopía infrarroja de transmisión y sus aplicaciones.**

③ Resumen:

Celda porta-muestras para análisis de intercambio isotópico H/D e interacciones moleculares para espectroscopía infrarroja de transmisión y sus aplicaciones.

La invención presentada se refiere al diseño, fabricación y uso de una nueva celda porta-muestras para compuestos líquidos utilizable en espectroscopía infrarroja de transmisión. Su ventaja principal es que permite medir, caracterizar y observar, *in situ* y en tiempo real, el intercambio isotópico de hidrógeno por deuterio desde el instante inicial de este proceso hasta su final. Los sectores de aplicación son varios: industria farmacéutica, química y biotecnológica, así como también es de uso en el campo de la investigación científica de la estructura electrónica, conformacional y evolución dinámica de compuestos químicos y biológicos como, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Esta celda porta-muestras se ha diseñado teniendo en cuenta futuros cambios de las técnicas de medida y en los procedimientos empleo de la espectroscopía infrarroja por transmisión.

ES 2 315 054 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Celda porta-muestras para análisis de intercambio isotópico H/D e interacciones moleculares para espectroscopía infrarroja de transmisión y sus aplicaciones.

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un nuevo celda o dispositivo porta-muestras para líquidos utilizable en los equipos de espectroscopia infrarroja de transmisión, y, en términos generales, los sectores de aplicación son: industria farmacéutica, biotecnológica y química (alimenticia, cosmética, etc.). También es de aplicación en la investigación científica de la estructura electrónica y conformacional de sustancias químicas y biológicas tales como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, y en la investigación de la evolución dinámica de las interacciones entre estos compuestos. Asimismo, la fabricación de este accesorio porta-muestras concierne a la industria de instrumentación científica que manufactura equipos para espectroscopia infrarroja.

Estado de la técnica anterior

La espectroscopia infrarroja de transmisión es una técnica analítica y estructural conocida de antiguo y muy extendida en los ámbitos industriales y de la investigación científica. Sus ventajas frente a otras técnicas usuales son:

a) Se pueden analizar muestras en cualquier estado físico de la materia con una preparación sencilla y rápida, a diferencia de otras técnicas.

b) Se precisan cantidades de muestra relativamente pequeñas.

Más específicamente, se sabe dentro del campo de la proteómica que el análisis infrarrojo de diversas regiones espectrales puede proporcionar información sobre estructura y dinámica de proteínas. Con esta finalidad se ha utilizado el intercambio isotópico de hidrógeno por deuterio (H/D) (Barth y Zscherp, *Quart. Rev. Biophys.*, 35, 369-430 (2002)). La cinética de intercambio isotópico en grupos amida polipeptídicos y cadenas laterales depende de la estructura proteica y del entorno del medio que rodea a la proteína a estudiar. Así, los grupos que están expuestos al disolvente intercambian hidrógeno por deuterio con mayor rapidez. En cambio, los hidrógenos de un fragmento proteico ordenado estructuralmente intercambian más lentamente en comparación con los hidrógenos de otros segmentos carentes de orden estructural polipeptídico. Esto es debido, entre otras causas, a la presencia de enlaces de hidrógeno, a la baja accesibilidad del disolvente o a impedimentos estéricos. Por ello, en el caso frecuente de un hidrógeno amídico protegido se puede considerar como "cerrado", o lento, al intercambio isotópico. Ahora bien, existen dos posibilidades sobre cómo realizar el proceso de intercambio. Una es disolver previamente la proteína liofilizada en óxido de deuterio (agua pesada, D₂O) y tomar después una parte alícuota de esta disolución e introducirla en los porta-muestras convencionales para su posterior análisis por espectroscopia infrarroja de transmisión (Wu y cols., *J. Phys. Chem. B*, 105, 6251-6259 (2001)). Pero el uso de los porta-muestras convencionales comporta una etapa inicial de intercambio isotópico que no se puede medir durante el tiempo que media entre el momento de disolver la sustancia liofilizada y su posterior introducción en la celda porta-muestras disponibles hasta ahora. Además, la liofilización previa de una sustancia biológica puede comportar agregación de la misma, lo cual invalida su posterior análisis espectroscópico por tratarse ya de un producto biológico desnaturalizado. Para obviar esta dificultad se estableció, desde los inicios de la práctica técnica, el método de "stopped flow" consistente en mezclar instantáneamente en una celda porta-muestras convencional la disolución de la sustancia a estudiar y agua pesada. Pero este procedimiento tiene el inconveniente de diluir dicha sustancia, lo que implica la consiguiente disminución de señal espectral. Otro método alternativo que se ha utilizado es el de realizar el intercambio isotópico en una bolsa de diálisis frente a un tampón de D₂O e ir tomando sucesivas partes alícuotas de la disolución para su posterior análisis. Sin embargo este método exige la disponibilidad de cantidades relativamente grandes de sustancia biológica, lo que con frecuencia es un problema insuperable. Por otra parte, si se utiliza otra técnica alternativa como la de reflectancia total atenuada (ATR) (De Jongh y cols., *Biochemistry*, 36, 13593-13602 (1997); Goormaghtigh y cols., *Appl. Spectrosc.* 50, 1519-1527 (1996)), también se necesitan cantidades relativamente grandes de muestra, y además, esta técnica comporta una pérdida (alrededor del 50%) de la energía del haz infrarrojo por reflexión múltiple (Miller y Stace, (Eds.), *Laboratory Methods in Infrared Spectroscopy*, Heyden & Son Ltd., London, 1972, cap. 14, pp. 210). Por ello esta técnica de ATR resulta menos sensible que la espectroscopia infrarroja de transmisión, sobre todo en el caso de disoluciones que se deban preparar muy diluidas (como es frecuente en las disoluciones biológicas) para evitar agregaciones moleculares no deseadas.

De lo anteriormente expuesto surge la necesidad de un nuevo accesorio porta-muestras para espectroscopia infrarroja de transmisión, donde realizar, "in situ", el intercambio isotópico y que además nos permita observar y medir el proceso de intercambio isotópico desde el momento inicial. Este nuevo accesorio, que se describe en esta memoria, resulta de la inclusión de dos membranas de diálisis en una celda de muestras líquidas que posee los elementos de diseño que se indican más adelante. El mismo accesorio es utilizable no solamente para el estudio analítico, estructural y dinámico de proteínas y otras biomoléculas, sino también en investigaciones relativas a interacciones proteína-ligando, proteína-ácido nucleico y proteína-lípido e interacciones fármaco-células biológicas en tiempo real. En el continuo desarrollo de las técnicas de espectroscopia infrarroja se prevén avances en la denominada espectroscopia de correlación bidimensional, que exige la medida en función del tiempo de numerosos espectros a diferentes porcentajes de deuteración. Por ello, este invento tendría aquí su aplicación práctica porque con él se acorta el tiempo de proceso y, también, hace posible su observación íntegra.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

5 Esta invención se refiere al diseño y uso de una celda porta-muestras de líquidos utilizable en espectroscopia infrarroja de transmisión para el estudio de intercambio isotópico H/D. Esta celda porta-muestras lleva incorporados dos cilindros en donde se introduce el agua pesada y en cuyos extremos, en contacto con la muestra, se sitúan dos membranas de diálisis (Fig. 1 y 2) entre las cuales se realiza la reacción de intercambio.

10 La ventaja de este accesorio sobre la celda porta-muestras convencional es que el intercambio isotópico se puede realizar, *in situ*, en el mismo porta-muestras desde el inicio del proceso. Como el volumen de D₂O que se puede introducir en los cilindros es aproximadamente 4 ml y el volumen necesario para rellenar el espacio, entre los cristales de la celda y las membranas, es aproximadamente 40 μ l, se pueden conseguir deuteraciones de hasta el 99%, sin necesidad de renovar el agua pesada de los cilindros. Resultado de ello es que el proceso completo se puede medir
15 en una sola etapa, acortando notablemente el tiempo de operación. Un conocimiento más detallado de la invención se adquiere a continuación, en donde se describen las características de este accesorio y unos ejemplos de intercambio isotópico realizado para la enzima tripsina y tampón acuoso.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención se basa en que los autores de la misma han puesto a punto una celda porta-muestras para medida espectral de líquidos, por espectroscopia infrarroja de transmisión, en el curso del intercambio isotópico H/D. Como ya se ha mencionado, la ventaja de este accesorio porta-muestras sobre los convencionales es que el intercambio isotópico H/D se puede realizar *in situ*, y observar en la misma celda porta-muestras, el proceso completo. La celda
25 utilizada posee las características geométricas indicadas en las Figuras 1 y 2. El esquema de la Figura 1 (y, en detalle en la figura 2, sección lateral de los conductos de relleno y secciones del soporte metálico frontal) muestra el ensamblaje de todos los componentes de la celda. Además, en los orificios de entrada de los líquidos (en nuestro prototipo, con un de un diámetro de 2,5 milímetros), se colocan dos membranas de diálisis para permitir la difusión del agua pesada hacia la muestra en estudio. Se puede aumentar el diámetro de los orificios de entrada (Figura 2.) de las muestras
30 líquidas, o el camino óptico en la celda, para el caso necesario de querer acelerar la difusión del agua pesada hacia el interior de la lámina líquida comprendida entre los dos cristales del accesorio. Las dimensiones de dichos orificios de entrada de líquido, no obstante, podrán tener un diámetro máximo de 4 milímetros. dependiendo del volumen de muestra líquida disponible. Por otra parte, existe una diferencia adicional en comparación a las celdas porta-muestras actuales, en cuanto al espesor de la placa soporte frontal de la celda, que es de suficiente grosor (6 milímetros.) como
35 para poder insertar los dos cilindros que contienen el agua pesada en los orificios de entrada de la disolución problema. Los cilindros de relleno atraviesan soporte metálico frontal junta metálica y primer cristal hasta conducir el líquido-muestra hasta las membranas de diálisis. Como el volumen de D₂O contenido en los cilindros (aproximadamente, 4 mililitros) es muy superior al espacio entre los cristales y las membranas de diálisis (aproximadamente 40 microlitros para espaciadores de 12 micrometros), se puede medir espectros hasta niveles de deuteración del 99% sin necesidad
40 de renovar el agua pesada de los cilindros. Los soportes metálicos y cilindros de la celda están fabricados de latón y las juntas situadas entre estos soportes y los cristales son de estaño o teflón. Los dos cristal son de un material transparente e insoluble en el líquido, tal como, fluoruro cálcico, sulfuro de zinc, seleniuro de zinc, bromuro de plata, etc. De igual modo, los otros componentes de la celda porta-muestras en contacto con la muestra líquida pueden ser de distinta composición (metálica o plástica) pero necesariamente insolubles en ella. Los discos que constituyen las membranas
45 de diálisis son de un material polimérico apropiado tal como celulosa y derivados. Cuatro tornillos de rosca insertados entre el soporte metálico posterior y el frontal aseguran el cierre y estanqueidad del conjunto.

Este accesorio celda porta-muestras objeto de esta patente de invención (descrito con detalle, en las figuras 1 y 2), se puede utilizar, sin cambio alguno, para medidas espectrales que no sean de intercambio isotópico, como por ejemplo,
50 para el estudio de mecanismos de reacción entre iones o ligandos de bajo peso molecular y macromoléculas biológicas, o interacciones lípido-proteína y fármaco-célula biológica, siempre que las membranas de diálisis a usar posean un corte molecular apropiado a cada caso, dependiendo de la magnitud de los pesos moleculares de las sustancias a analizar.

55 Preparación de muestras y medida del intercambio isotópico

Antes de insertar los cilindros que contienen el agua pesada en la celda porta-muestras, se rellena ésta mediante una micro-pipeta evitando la formación de burbujas de aire que disminuirían la velocidad de intercambio. Posteriormente se insertan las dos membranas de diálisis, una en cada orificio de entrada de la celda, preparadas previamente con un
60 diámetro apropiado para evitar fuga de disolución desde la cavidad de los cristales hasta los cilindros. Se acoplan éstos a presión en los orificios de la placa frontal de la celda (Fig. 2) donde se han colocado previamente las membranas de diálisis. A continuación se tapan los cilindros y se mide entonces el espectro de la disolución problema, que corresponde al tiempo inicial de la cinética de intercambio. Se llenan, después, los cilindros de la celda con agua pesada y se procede inmediatamente a realizar medidas de espectros en función del tiempo. Para evitar una disminución de
65 la cinética de deuteración es esencial que siempre haya contacto entre la disolución problema contenida entre las ventanas de la celda y el agua pesada contenida en los cilindros. Una ventaja que posee este accesorio es que las membranas de diálisis pueden aplicarse mediante un único uso, evitando así la posible adherencia de macromoléculas a las mismas tras su uso reiterado. Otra posibilidad que ofrece este accesorio es la opción de, una vez completada la

deuteración de la disolución sujeto de estudio, poder realizar una cinética de intercambio isotópico inverso al anterior utilizando la misma disolución. Esta es una ventaja muy apreciada por los espectroscopistas cuando se dispone de cantidades muy pequeñas de sustancia biológica o volúmenes muy pequeños de disolución problema.

5 Las medidas espectrales las hemos realizado en un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier de la firma Perkin-Elmer, modelo 1725X, dotado de un detector de sulfato de glicina. Cada espectro considerado en la cinética de intercambio resultó de promediar 16 barridos durante 1,5 minutos con una resolución de 2 cm^{-1} y un camino óptico de $12\ \mu\text{m}$ en la celda utilizada. Las bandas residuales generadas por el vapor del agua de la cámara porta-muestras se eliminaron mediante diferencia espectral, y posteriormente se realizaron alisamientos según el procedi-
10 miento de Savitzky-Golay, considerando grupos de 11 puntos. En el caso de determinar cinéticas de intercambio para macromoléculas biológicas es necesario restar el espectro del disolvente o tampón puro con el mismo porcentaje de deuteración que el disolvente de la muestra. Las sustracciones espectrales que se realicen sin cumplir con este requisito pueden conducir a resultados equívocos, sobre todo si se trata de medir perfiles espectrales que se solapen con bandas del disolvente.

15 Explicación detallada de las figuras

Figura 1. Esquema del ensamblaje de los componentes de la celda porta-muestras. Los cristales deben ser insolubles en los líquidos a analizar, y los soportes y cilindros que contienen el líquido del isótopo a intercambiar pueden ser
20 de naturaleza metálica o de materiales plásticos como teflon.

Figura 2. Secciones recta y transversal de, cilindros de relleno y soporte metálico frontal (véase la figura 1). Dimensiones en milímetros.

25 Figura 3. Curva del porcentaje de intercambio isotópico H/D determinada mediante las medidas de la intensidad de la banda de deformación angular $\delta\text{H}_2\text{O}$ situada hacia 1643 cm^{-1} .

Figura 4. Secuencia espectral de deuteración de una disolución acuosa de la enzima tripsina (30 mg/ml).

30 Figura 5. Espectros síncronos de una disolución de tripsina (30 mg/ml) sometida a intercambio H/D.

Figura 6. Espectros asíncronos de una disolución de tripsina (30 mg/ml) sometida a intercambio H/D.

Ejemplos de realización de la invención

35 Ejemplo 1

Deuteración de disolvente acuoso

40 Hemos encontrado que la deuteración del agua ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$) mediante este accesorio porta-muestras sigue una ecuación exponencial de pseudo-primer orden (Li y cols. *Biophys. J.*, 65, 1963-1972 (1993)), y por tanto, el porcentaje de intercambio (P) realizado al cabo de un tiempo, t, viene dado por la expresión $P = 100[1 - \exp(-kt)]$. El ajuste de la curva obtenida para el disolvente acuoso (Fig. 3) conduce a un valor de $k = 0.13 \pm 0.006\text{ min}^{-1}$, lo que corresponde a una constante de tiempo de deuteración de $7,7 \pm 0,3$ minutos para este accesorio porta-muestras. Según es bien sabido por
45 cinética química, esto significa que los procesos de intercambio isotópico que transcurran con un tiempo inferior a éste no se resolverán en el tiempo mediante esta celda, como por ejemplo los procesos de apertura o disociación de pares de bases Watson-Crick en dobles hélices oligonucleotídicas, para los que $k \approx 0,06\text{ s}^{-1}$ que corresponde a un tiempo de apertura de bases de alrededor de 17 segundos. La cinética de intercambio obviamente la podemos acelerar utilizando una celda con orificios de entrada de diámetro superior al utilizado aquí. El accesorio de esta invención permite resolver otras fluctuaciones estructurales que ocurren en macromoléculas biológicas tales como proteínas. Así, muchas proteínas sufren fluctuaciones estructurales muy lentas como, por ejemplo, las que pueden ocurrir en proteínas auto-
50 o heteroasociadas en cápsidas de virus, proteínas de membrana, etc., de tal manera que la deuteración subsiguiente a esas fluctuaciones puede ocurrir al cabo de horas e incluso días (Barth y Zscherp, *Quart. Rev. Biophys.*, 35, 369-430 (2002)).

55 Un ejemplo típico se describe a continuación para la cinética de intercambio H/D de la enzima tripsina que hemos medido con el accesorio de esta invención.

60 Ejemplo 2

Intercambio isotópico H/D de tripsina en disolución acuosa

65 En este ejemplo se comprueba que nuestro accesorio porta-muestras es adecuado para medidas experimentales de intercambio H/D en sustancias biológicas tales como proteínas.

La Figura 4 ilustra la secuencia espectral de deuteración de tripsina en disolución acuosa (30 mg/ml) a lo largo de 2 horas, tras las cuales ha intercambiado más del 98% del disolvente mediante el uso de la celda porta-muestras de

líquidos de esta invención. Observamos que al cabo de ese tiempo permanecen aún sin deuterar algunos segmentos polipeptídicos, como muestra la banda residual de deformación angular δNH (banda Amida II) de los grupos amida de la cadena principal proteica. Generalmente los segmentos que intercambian lentamente suelen corresponder a estructuras polipeptídicas ordenadas, como ocurre en este caso con la tripsina que es rica en estructura β (De Jongh y cols., *Biochemistry*, 36, 13593-13602 (1997)), o a grupos que están enterrados dentro de la macromolécula. La deuteración sucesiva de los grupos NH del esqueleto polipeptídico genera la denominada banda amida II', que suele aparecer hacia 1450 cm^{-1} solapada con las bandas de deformación angular δCH de las cadenas hidrocarbonadas de las proteínas. En la Figura 4 se puede apreciar asimismo que la deuteración origina una disminución de intensidad de las bandas situadas en la región de $1700\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$. Pero los cambios espectrales que puedan sufrir varias bandas comparadas entre sí, que ocurren sincronizados o no, se advierten con más claridad y precisión mediante la moderna técnica de la espectroscopia infrarroja bidimensional. Esta técnica consiste en que los cambios espectrales generados en una muestra por una perturbación, ya sea un cambio de temperatura, presión, intercambio isotópico, etc., se pueden representar en mapas de contorno bidimensionales. Por ejemplo, en la Figura 5 el centro de unas líneas de contorno de coordenadas ν_1 y ν_2 correlaciona a dos bandas, de frecuencias ν_1 y ν_2 . En el mapa de contorno de espectros síncronos las bandas de estas frecuencias varían en fase, es decir, o las intensidades de las dos bandas aumentan, o las dos disminuyen, o una aumenta y otra disminuye en fase (al mismo tiempo). En cambio, en los espectros asíncronos el centro de unas líneas de contorno de coordenadas ν_1 y ν_2 correlaciona a dos bandas de frecuencias ν_1 y ν_2 cuyas intensidades varían sin sincronización alguna, es decir, fuera de fase. El porta-muestras motivo de esta patente facilita extraordinariamente la asignación de bandas y su uso permite asimismo obtener información estructural más detallada. También, una ventaja adicional es poder obtener información estructural con más resolución que con los porta-muestras convencionales, al poder medir espectros desde el mismo instante del inicio del intercambio isotópico.

Los espectros síncronos de la disolución de tripsina (Fig. 5) contienen autópicos situados a lo largo de la diagonal hacia 1676 , 1547 y 1453 cm^{-1} , que se pueden atribuir al modo vibracional amida I de acodamientos, amida II y amida II'. En apoyo de esta asignación se presentan los picos cruzados de coordenadas $(1547, 1676)$ y $(1453, 1676)$, cuyos caracteres positivo (fondo blanco) y negativo (fondo oscuro) respectivamente son indicativos de que en el primer pico cruzado las dos bandas cambian su intensidad en el mismo sentido (disminución simultánea) y en sentido opuesto (disminución y aumento simultáneos).

Los espectros asíncronos (Fig. 6) son de especial interés para dar una idea de qué fragmentos de la macromolécula están desacoplados cinéticamente en cuanto a la deuteración y para saber por tanto cuáles son los grupos más estructurados o menos expuestos al disolvente, es decir, situados en el interior del espacio ocupado por la macromolécula. Además, la aparición de espectros asíncronos es indicativa de que la cinética de deuteración de la sustancia biológica es distinguible de la del disolvente utilizando la celda porta-muestras de esta invención. En la citada Figura 6 aparecen dos picos cruzados de coordenadas $(1676, 1695)$ y $(1695, 1676)$, siendo de carácter positivo el situado por encima de la diagonal y por tanto indica que la deuteración de la banda situada hacia 1695 cm^{-1} es más lenta que la de la banda a 1676 cm^{-1} . Este resultado es consistente con la asignación de la banda de frecuencia 1695 cm^{-1} a estructuras β , porque es de sobra conocido que las estructuras polipeptídicas ordenadas intercambian más lentamente que las desordenadas o acodamientos (Earnest y cols., *Biophys. J.*, 58, 1539-1546, (1990)). El carácter asíncrono de las variaciones de intensidad de las bandas hacia 1676 y 1695 cm^{-1} y sus consecuentes cambios en las intensidades de las bandas hacia 1547 y 1453 cm^{-1} implica la asincronicidad de parte de las intensidades a estas dos últimas frecuencias (Fig. 6). Por estas mismas consideraciones es de esperar que el pico cruzado de coordenadas $(1618, 1674)$ se sitúe por debajo de la diagonal con carácter positivo debido al intercambio lento (comparado con los acodamientos) de las estructuras de cadenas que originan bandas amida I situadas alrededor de 1620 cm^{-1} (*Quart. Rev. Biophys.*, 35, 369-430, (2002)).

Estos dos ejemplos descritos ilustran aplicaciones operativas del nuevo accesorio descrito para el estudio de estructura y dinámica de proteínas utilizando intercambio isotópico H/D. La cinética de este intercambio se puede acelerar aumentando el diámetro de los orificios de entrada del agua pesada y/o aumentando el camino óptico de la celda. Si se utilizan membranas de diálisis de corte molecular apropiado, mediante la espectroscopia vibracional bidimensional se pueden seguir los cambios espectrales originados por interacciones entre iones, ligandos o lípidos y macromoléculas biológicas.

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Celda porta-muestras de líquidos, para medir cinéticas de intercambio isotópico H/D en su integridad, mediante la espectroscopia infrarroja de transmisión, **caracterizada** porque comprende las siguientes partes o componentes:

- a) Dos soportes metálicos, frontal y posterior, en el primero de los cuales se insertan,
- 10 b) Dos cilindros de relleno y conductos de entrada de la muestra líquida en estudio, a medir o en experimentación, con dos membranas de diálisis de corte molecular apropiado.
- c) Un espaciador en donde se realiza la reacción de intercambio isotópico,
- d) Dos láminas de cristal transparente a la radiación que sirven como separador de la muestra,
- 15 e) Dos juntas intermedias.
- f) Cuatro tomillos metálicos de paso, con su correspondiente rosca, para lograr el debido cierre y estanqueidad de todos los elementos de la celda.

20 2. Celda porta-muestras de líquidos, para medir cinéticas de intercambio isotópico H/D en su integridad, mediante la espectroscopia infrarroja de transmisión, según reivindicación 1, **caracterizada** porque está especialmente diseñada y realizada para permitir medidas “*in situ*” y en “tiempo real” de reacciones u operaciones experimentales.

25 3. Celda porta-muestras de líquidos, para medir cinéticas de intercambio isotópico H/D en su integridad, mediante la espectroscopia infrarroja de transmisión, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizada** porque, además, los elementos metálicos, como soportes y cilindros, de la celda porta-muestras, descritos en la reivindicación 1 a) y b), están fabricados en latón. Igualmente, las dos láminas cristalinas, reivindicación 1 d), se fabrican con un material transparente a la radiación empleada, como pueden ser, fluoruro cálcico, sulfuro de zinc, bromuro de plata, etc. Las juntas intermedias, reivindicación 1 e), son de latón o teflón.

30 4. Celda porta-muestras de líquidos, para medir cinéticas de intercambio isotópico H/D en su integridad, mediante la espectroscopia infrarroja de transmisión, según las reivindicaciones 1, 2 y 3, **caracterizada** porque, las dimensiones de los cilindros y el volumen del recinto de reacción (reivindicación 1, b) y c)), vienen determinados por las aplicaciones, medidas o experimentos a llevar a cabo.

35 5. Celda porta-muestras de líquidos, para medir cinéticas de intercambio isotópico H/D en su integridad, mediante la espectroscopia infrarroja de transmisión, según las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4, **caracterizada** porque, los cilindros de relleno de la celda porta-muestras, descritos en las reivindicaciones 1, 2 y 3, deben ser de un material insoluble en agua o en el líquido a medir o caracterizar.

40 6. Celda porta-muestras de líquidos, para medir cinéticas de intercambio isotópico H/D en su integridad, mediante la espectroscopia infrarroja de transmisión, según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4 y 5, **caracterizada** porque permite el análisis químico y estructural de compuestos biológicos, orgánicos e inorgánicos, mediante medidas de cinéticas de intercambio isotópico usando membranas de diálisis de corte molecular adecuado.

45 7. Celda porta-muestras de líquidos, para medir cinéticas de intercambio isotópico H/D en su integridad, mediante la espectroscopia infrarroja de transmisión, según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6, **caracterizada** porque permite realizar análisis de interacciones biomolécula-ligando, biomolécula-ión, lípido-proteína y fármaco-célula biológica.

50 8. Celda porta-muestras de líquidos, para medir cinéticas de intercambio isotópico H/D en su integridad, mediante la espectroscopia infrarroja de transmisión, según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, y en donde el porta-muestras utilizado pueda diferir del descrito en las figuras 1 y 2 de esta Memoria, en cuanto al número de cilindros portadores del disolvente con el isótopo intercambiable, diámetro de los mismos, separación entre ellos, diámetro de los orificios de entrada de disolvente y espesor de las placas soportes del accesorio.

55 9. Celda porta-muestras de líquidos, para medir cinéticas de intercambio isotópico H/D en su integridad, mediante la espectroscopia infrarroja de transmisión, según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, **caracterizada** porque con el diseño descrito en la Memoria, se acorta el tiempo de medida de espectros en espectroscopia infrarroja de transmisión y, también, en la observación directa de los procesos.

60 10. Celda porta-muestras de líquidos, para medir cinéticas de intercambio isotópico H/D en su integridad, mediante la espectroscopia infrarroja de transmisión, según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, así como el empleo o uso de otro cualquier porta-muestras con características similares a las descritas en esta Memoria y en las reivindicaciones anteriores, que pueda surgir de una futura evolución de la tecnología en espectroscopia infrarroja de transmisión y en especial en la llamada espectroscopia de correlación bidimensional en análisis conformacional.

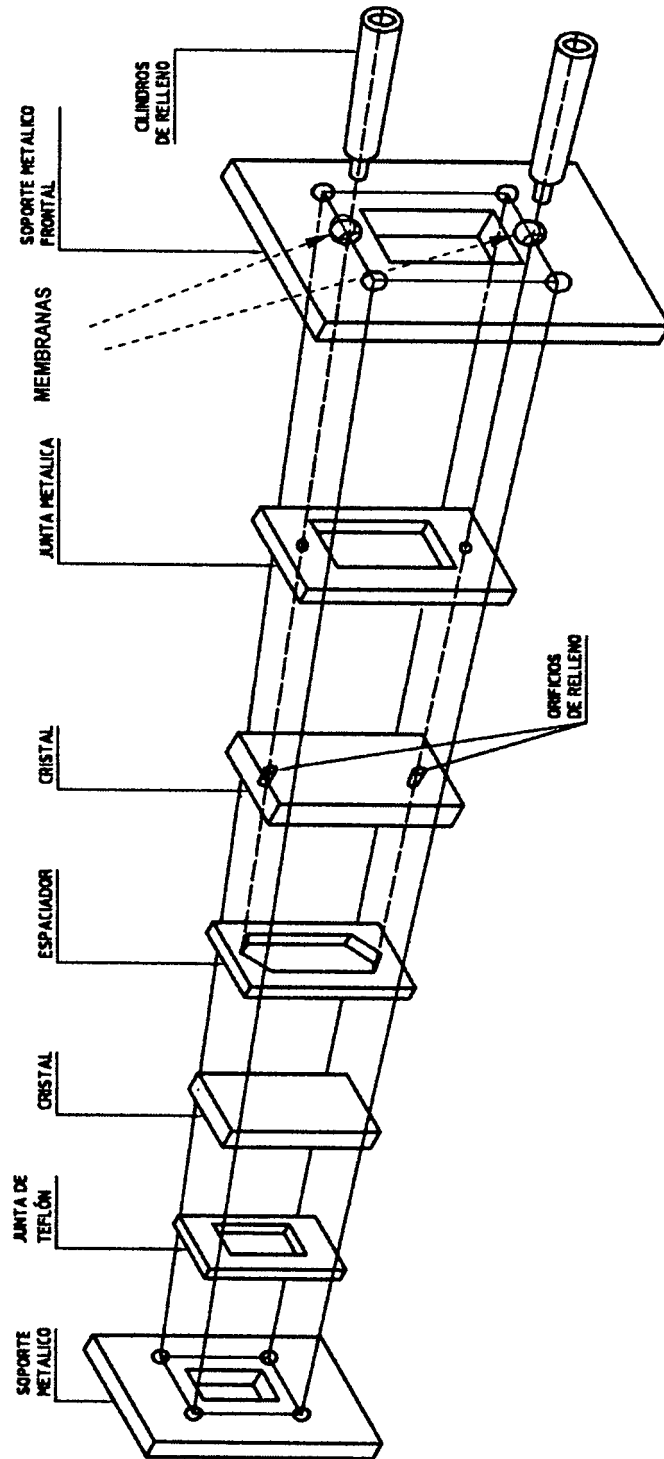


FIGURA 1.

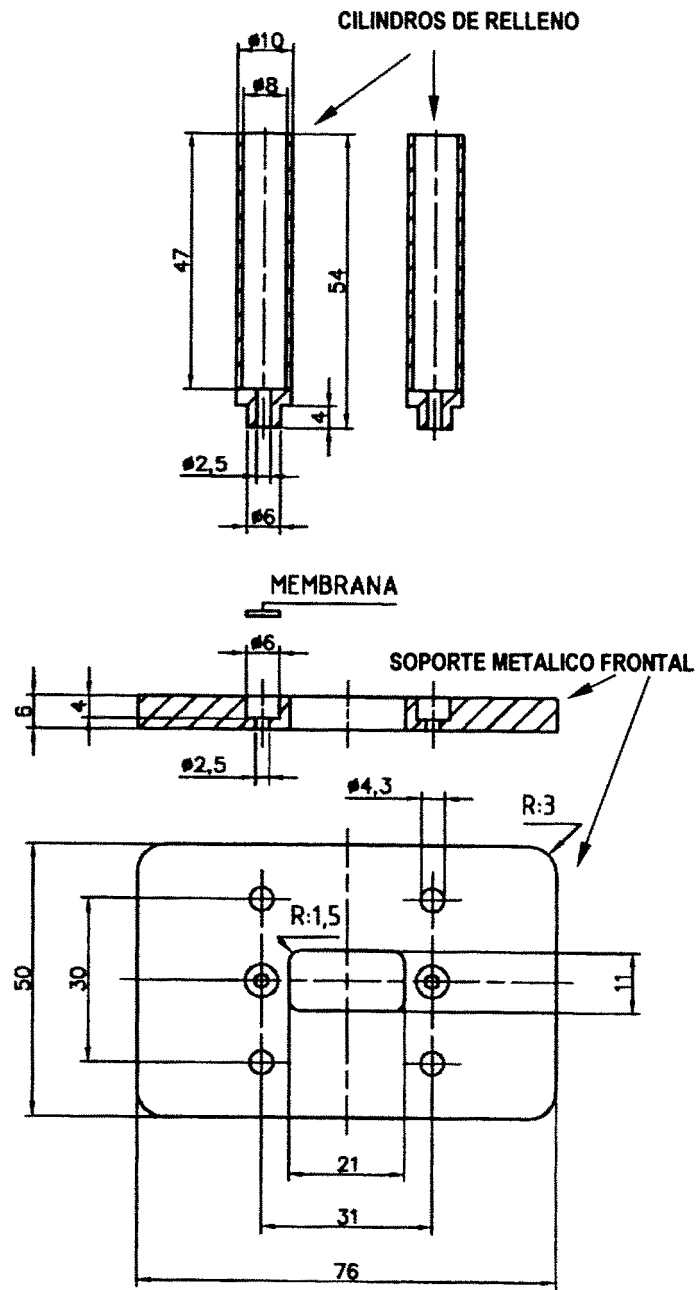
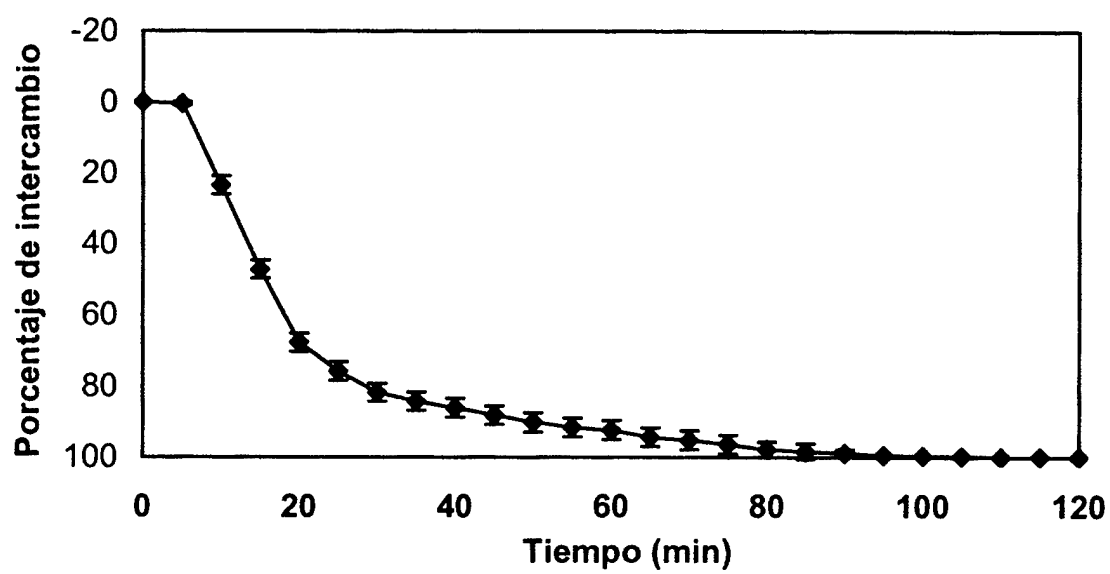


FIGURA 2

FIGURA 3



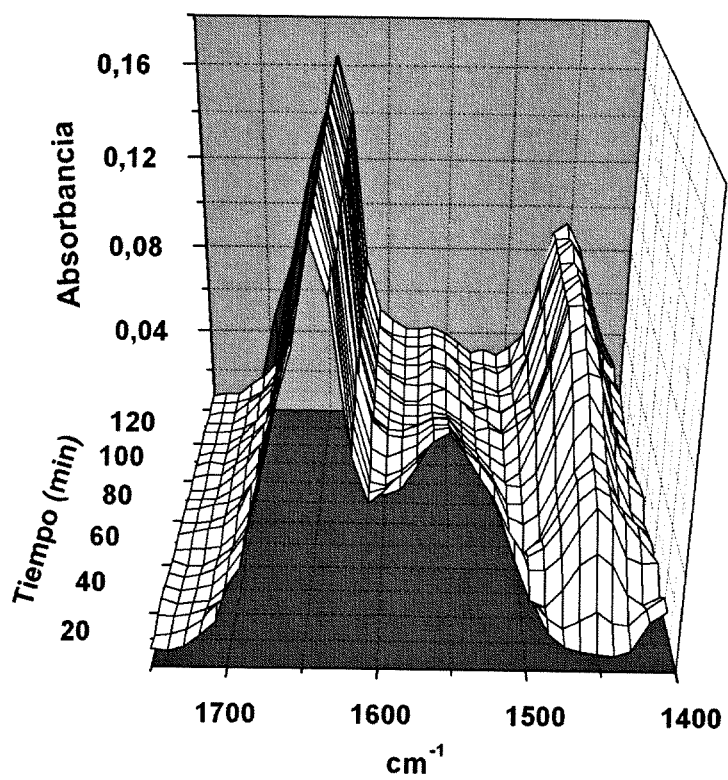


FIGURA 4

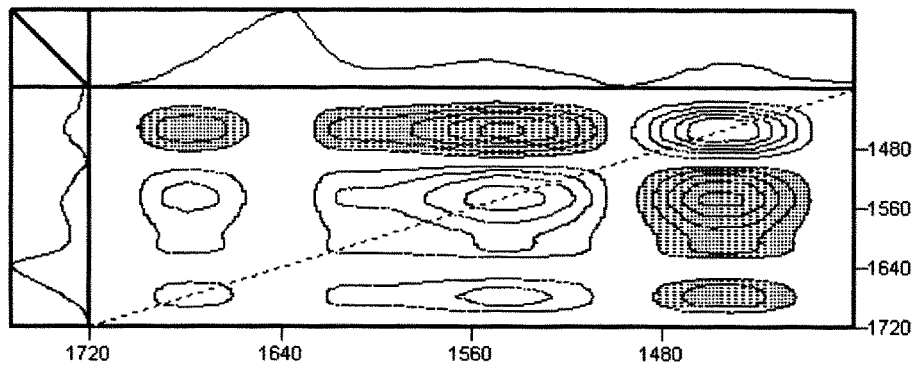


FIGURA 5

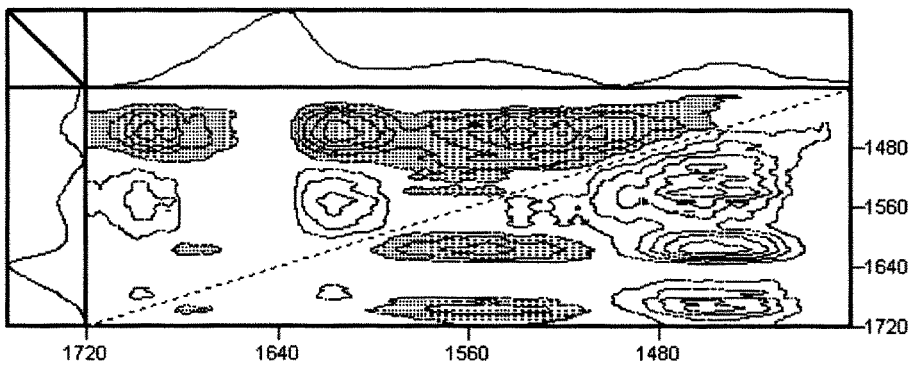


FIGURA 6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 315 054

② N° de solicitud: 200501777

③ Fecha de presentación de la solicitud: **20.07.2005**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N 21/03** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GOORMAGHTIGH, E. et al. "Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. Biochimica and Biophysica Acta.(BBA) - Reviews on Biomembranes, 06.07.1999, Vol. 1422, N° 2, páginas 105-185, ISSN 0304-4157. Ver apartado "8. Amide hydrogen/deuterium exchange kinetics", apartado "8.1. General principles" y apartado "8.2. Experiment procedure and data recording", páginas 163-165.	1 al
A	US 5116759 A (KLAINER et al.) 26.05.1992, Ver resumen; columna 9, línea 64 - columna 10, línea 56; figuras 1-2.	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

20.02.2009

Examinador

A. Figuera González

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTEN, XPESP, XPOAC, BIOSIS, COMPDX, internet

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.02.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SÍ
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Goormaghtigh, E. et al. "Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. Biochimica and Biophysica Acta.(BBA) - Reviews on Biomembranes, 06.07.1999, Vol. 1422, N° 2, páginas 105 a 185, ISSN 0304-4157.	06.07.1999
D02	US 5116759 A (KLAINER et al.)	26.05.1992

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

En el documento D01 se describe un procedimiento experimental para medir cinéticas de intercambio isotópico H/D. Un cristal de germanio recubierto con la muestra que se desea estudiar se introduce en una celda portamuestras de líquidos que tiene una entrada y una salida. El intercambio hidrogeno/deuterio se obtiene haciendo pasar una corriente de gas nitrógeno saturado con D₂O por la celda sellada. Ver documento D01, página 164, columna 1.

Las principales diferencias entre el documento D01 y la invención objeto de la reivindicación 1 son las relacionadas con la estructura de la celda cuyo efecto técnico es hacer llegar el deuterio hasta la muestra de una manera diferente. También es diferente el tipo de espectroscopía de infrarrojo utilizado.

En el documento D02 se describe un sensor químico en el que una fuente de iluminación 6 y un detector 9 están unidos a una cámara de reacción 3 en la que se encuentra un reactivo líquido 4 y a la que acceden las especies que se van a analizar por una apertura 5. Ver documento D02, columna 9, línea 64 a columna 10, línea 25.

En un modo de realización, de la invención del documento D02 la apertura 5 está recubierta de una membrana semipermeable 11 retenida por unos medios de tipo bandas clip o similares 12 que forman un sello estanco. Se consigue así evitar pérdidas de reactivo 4 y una mayor selectividad de las especies de interés que acceden a la cámara de reacción. Ver documento D02, columna 10, líneas 41 a 56 y figura 2.

Así pues aunque en el documento D02 se utiliza una membrana semipermeable que se correspondería a las membranas de diálisis del apartado b) de la reivindicación 1, su objeto no es exactamente el mismo puesto que lo que penetra en la celda a través de la membrana del documento D02 es la muestra y en la invención objeto de la reivindicación 1 es el reactivo. Pero sobre todo la estructura del sistema de introducción de la sustancia en la celda es diferente y parece responder al problema técnico de conseguir una introducción controlada en el tiempo para poder medir en tiempo real la cinética del intercambio H/D.

En definitiva, la reivindicación 1 tiene novedad y actividad inventiva de acuerdo con lo establecido en los artículos 6 y 8 de la ley de Patentes.

El resto de las reivindicaciones dependen de la reivindicación 1 y por lo tanto tienen también novedad y actividad inventiva.