



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 372 832**

② Número de solicitud: 200902287

⑤ Int. Cl.:

G01N 30/02 (2006.01)

B01D 15/08 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **30.11.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **27.01.2012**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
27.01.2012

⑰ Solicitante/s: **Universidad de La Laguna
OTRI. Edificio Central
c/ Delgado Barreto, s/n
38200 La Laguna, Tenerife, ES**

⑱ Inventor/es: **Borges Jurado, Ricardo;
Suárez Montesinos, Mónica;
Beltrán Baute, Beatriz;
Machado Ponce, José David y
Fernández Castro, José Javier**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Sistema de detección de actividad biológica en tiempo real basado en cromatografía líquida.**

㉑ Resumen:

Sistema de detección de actividad biológica en tiempo real basado en cromatografía líquida que se caracteriza por la utilización de: a) un tampón fisiológico como fase móvil, b) una bomba de fluido, c) un inyector, d) una columna compatible con el pH y la composición salina del tampón, e) un transductor, f) una o varias preparaciones de órganos o tejidos (que actuarán como detectores o sensores biológicos) y g) un sistema de medición. El equipo se acompaña de otros elementos como los sistemas de termostatación.

El sistema propuesto permite separar y analizar una muestra hidrosoluble compleja a tiempo real y discriminar si alguno de los productos emanados de la columna posee actividad biológica. Si resultase de interés, el esfuerzo de identificación/purificación se restringiría a esa fracción.

DESCRIPCIÓN

Sistema de detección de actividad biológica en tiempo real basado en cromatografía líquida.

5 Sector de la técnica

Biotechnología, investigación farmacéutica.

10 Introducción

10 La cromatografía líquida es una técnica de separación y cuantificación que utiliza un líquido como vehículo para hacer pasar la muestra a analizar a través de una columna de separación. La columna está rellena de una arena formada por partículas microscópicas que retienen, con diferente afinidad, los componentes de la muestra a analizar. De esta forma las distintas sustancias irán emergiendo de la columna a diferentes tiempos, característicos de cada soluto (tiempo de retención). Generalmente se coloca un detector “en línea” con la columna para ir identificando y cuantificando los distintos componentes. El sistema ideal sería aquel que permitiese separar y detectar todos los componentes en un espacio de tiempo razonable.

20 Dos son las modalidades principales de cromatografía líquida:

20 a) Cromatografía líquida de alta presión HPLC. Donde se utilizan pequeñas columnas de relleno altamente compactado para las que se requiere altas presiones. El volumen de muestra que podemos analizar es bajo, habitualmente menor de 100 μ L.

25 b) Cromatografía de baja o media presión (FPLC ó MPLC). Utiliza columnas de medio o gran tamaño. Generalmente no requieren grandes presiones para hacer pasar flujos moderados de líquido (4-10 mL/min) a su través. Pueden hacerse inyecciones de muestra de varios mL.

30 Al líquido utilizado para acarrear las muestras se le denomina fase móvil. Por el contrario al relleno de la columna se le denomina fase estacionaria. Hasta hace bien poco los rellenos de las columnas de HPLC sólo admitían fases móviles con pH muy ácidos y con altos contenidos en disolventes no-polares (metanol, acetonitrilo). Con la llegada de nuevos rellenos para columnas ya es posible utilizar tampones fisiológicos (de composición similar al medio extracelular normal) como fases móviles, por lo que no es preciso añadir disolventes y se puede trabajar al pH fisiológico.

35 Estado de la técnica

40 Uno de los problemas derivados tanto de la síntesis combinatoria como de la extracción de moléculas desde productos de origen natural reside en la necesidad de aislar y purificar los diferentes compuestos antes de proceder a su análisis farmacológico. Ello supone un descomunal esfuerzo tanto de tiempo como de dinero además de disponer de una cantidad considerable de material inicial, con el fin de obtener suficientes productos de cada una de las sustancias puras. Luego se precisará del cribado farmacológico de cada sustancia una por una.

45 Por probabilidad, la mayoría o todos los productos aislados resultan poco o nada activos. El sistema propuesto permite separar y analizar una muestra hidrosoluble compleja y discriminar, en tiempo real, si alguno de los productos emanados de la columna posee actividad biológica. Si resultase de interés, el esfuerzo de identificación/purificación se restringiría a esa fracción.

50 Descripción de la invención

55 Se trata de utilizar preparaciones biológicas como detectores de actividad farmacológica, en tiempo real, de las sustancias que vayan emergiendo de la columna de separación cromatográfica. Dado que la fase móvil a emplear es un tampón fisiológico, similar al utilizado en las preparaciones clásicas en farmacología podemos mantener saludablemente, durante varias horas, una o más preparaciones biológicas cuya actividad (contráctil, secretora, eléctrica) podemos medir.

60 El sistema se caracteriza por la utilización de (véase Figura 1): a) un tampón fisiológico como fase móvil, b) una bomba de fluido, c) un inyector, d) una columna compatible con el pH y la composición salina del tampón, e) un transductor, f) una o varias preparaciones de órganos o tejidos (que actuarán como detectores o sensores biológicos) y g) un sistema de medición. El equipo se acompaña de otros elementos como los sistemas de termostatación.

La invención se puede aplicar con dos técnicas de cromatografía:

65 - HPLC de utilidad para muestras muy concentradas o de uso con preparaciones biológicas de poco volumen (células en cultivo, órganos pequeños). Requiere de algunas modificaciones en el sistema de bombeo a fin de oxigenar el tejido.

- MPLC al admitir grandes volúmenes de inyección resulta de utilidad para muestras menos concentradas y permite el uso en preparaciones de cierto tamaño. La figura 3 muestra un registro obtenido con este sistema.

5 Como preparación de los detectores o sensores biológicos (f) puede utilizarse, en principio, cualquier órgano, tejido o célula aislada (o su combinación) cuya acción pueda ser medida, tales como: el conducto deferente, útero, intestino, arteria aorta, vena porta, aurícula aislada, corazón o riñón aislados de diversos animales, etc., que pueden colocarse individualmente o en serie a fin de explorar la acción de las sustancias emergentes sobre diferentes receptores farmacológicos, canales, enzimas, etc ...

10

Descripción de las figuras

Figura 1: Descripción general del sistema siendo: a) un tampón fisiológico como fase móvil, b) una bomba de fluido, c) un inyector, d) una columna compatible con el pH y la composición salina del tampón, e) un transductor, f) una o varias preparaciones de órganos o tejidos (que actuarán como detectores) y g) un sistema de medición. El equipo se acompaña de otros elementos como los sistemas de termostatación.

15

Figura 2: Sistema para HPLC adaptado a riñón perfundido de rata.

20 Figura 3: Registros obtenidos en el sistema HPLC adaptado a riñón perfundido de rata. El trazo del primer pico (≈ 18 minutos) es una solución estándar de fenilefrina $1 \mu\text{M}$. El trazo que se corresponde con la elución a los 23 minutos se obtuvo tras inyectar 1 mL de un extracto hidrosoluble de origen vegetal. La escala en ordenadas muestra los incrementos sobre la basal (80 mmHg) de la presión de perfusión de un riñón de rata. En abscisas se muestran los tiempos de retención en una columna XK16 (Pharmacia) rellena con Sephadex 100.

25

Figura 4: Diseño del sistema para HPLC adaptado a varias preparaciones.

Figura 5: Registro en cascada de dos preparaciones. Se colocaron en serie un conducto deferente y un anillo de aorta de rata. Las contracciones isométricas son mostradas. La de mayor pico corresponde a la respuesta del conducto deferente y a la de menor pico a la arteria aorta. La escala en ordenadas indica la contracción ($1 \text{ V} = 500 \text{ mg}$). En abscisas se muestra el tiempo de retención.

30

Modos de realización de la invención

35 Ejemplo 1

Sistema para HPLC adaptado a riñón perfundido de rata. (Figura 2)

Mediante el burbujeo continuo con helio (1) el tampón fisiológico (Solución de Krebs-HEPES) es desgasificado. (2) Una bomba de HPLC (3) envía la solución con un flujo constante de 1-2 mL/min hacia un inyector de asa manual o automático (4) y de ahí a una columna de fase reversa con relleno compatible con pH 7,4 (C18, $5 \mu\text{m}$ partícula), (5). Desde un reservorio con una solución de Krebs-HEPES burbujeado con oxígeno (6) y la ayuda de una bomba de fluidos (8) el efluente de la columna (que llega desgasificado) se mezcla al 50% (9). Un inyector manual situado en línea (10) permite el calibrado de la preparación con concentraciones conocidas de fármacos (por ejemplo noradrenalina). La mezcla se atempera a 37°C (11) y se dirige a un riñón de rata perfundido a través de su arteria renal (13). La presión de infusión se monitoriza continuamente mediante un transductor (12). El sistema tiene incorporado un sistema de derivación a fin de evitar el paso por la preparación de aquellas partes del efluente que pudiesen dañar a la preparación (7).

45

En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos en la experiencia. La imagen muestra dos registros superpuestos. El trazo del primer pico (≈ 18 minutos) es una solución estándar de fenilefrina $1 \mu\text{M}$. La fenilefrina es un estimulante de los receptores alfa-1 adrenérgicos. El trazo que se corresponde con la elución a los 23 minutos se obtuvo tras inyectar 1 mL de un extracto hidrosoluble de origen vegetal. La escala en ordenadas muestra los incrementos sobre la basal (80 mmHg) de la presión de perfusión de un riñón de rata. En abscisas se muestran los tiempos de retención en una columna XK16 (Pharmacia) rellena con Sephadex 100.

55

Ejemplo 2

Diseño del sistema para HPLC adaptado a varias preparaciones

60

Se trata de un sistema similar al utilizado en la figura 1 sólo que en lugar de utilizar un riñón perfundido se utilizan varias preparaciones de músculo liso en cascada (13) en la figura 4. El efluente es derivado hacia el hilo de la primera preparación que a su vez es conducido hacia las restantes (en este caso dos). Las contracciones son registradas de forma independiente por dos transductores (12), figura 4. Las respuestas contráctiles dependerán de la riqueza relativa en receptores para fármacos y en su acoplamiento al proceso contráctil.

65

En la figura 5 se tiene el correspondiente registro en cascada de dos preparaciones. Se colocaron en serie un conducto deferente y un anillo de aorta de rata. Las contracciones isométricas son mostradas. La de mayor pico

ES 2 372 832 A1

corresponde a la respuesta del conducto deferente y a la de menor pico a la arteria aorta. La escala en ordenadas indica la contracción (1 V= 500 mg). En abscisas se muestra el tiempo de retención. La muestra contenía acetilcolina 100 μ M (50 μ L de muestra total, 1 mL/min de flujo) y evidencia la distinta sensibilidad a altas concentraciones del fármaco de las dos preparaciones.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Sistema de detección de actividad biológica en tiempo real basado en cromatografía líquida que comprende: a) un tampón fisiológico como fase móvil, b) una bomba de fluido, c) un inyector, d) una columna compatible con el pH y la composición salina del tampón, e) un transductor, f) una o varias preparaciones de órganos o tejidos (que actuarán como detectores) g) un sistema de medición y h) sistemas de termostatación.

10 2. Sistema de detección de actividad biológica en tiempo real basado en cromatografía líquida según reivindicación 1, **caracterizado** por la utilización de sistemas de termostatación.

3. Procedimiento de detección de actividad biológica en tiempo real basado en cromatografía líquida **caracterizado** por las siguientes etapas:

15 Etapa 1: Mediante el uso de un sistema de degasificación (1) en la fase móvil (2), una bomba (3) envía una solución con un flujo constante hacia un inyector (4) y de ahí a una columna (5).

20 Etapa 2: Desde un reservorio con una solución (6) y la ayuda de una bomba de fluidos (8) el efluente de la columna se mezcla en la proporción adecuada (9).

Etapa 3: Se calibra la preparación con concentraciones de fármacos conocidas o sustancias a identificar en un inyector situado en línea (10).

25 Etapa 4: La mezcla se atempera a una temperatura adecuada a la preparación farmacológica utilizada (11) y se dirige al detector/sensor biológico (13).

30 Etapa 5: La presión de infusión se monitoriza continuamente mediante un transductor (12). Se evita el paso por la preparación de aquellas partes del efluente que pudiesen dañar a la preparación (7), mediante un sistema de derivación incorporado.

Figura 1

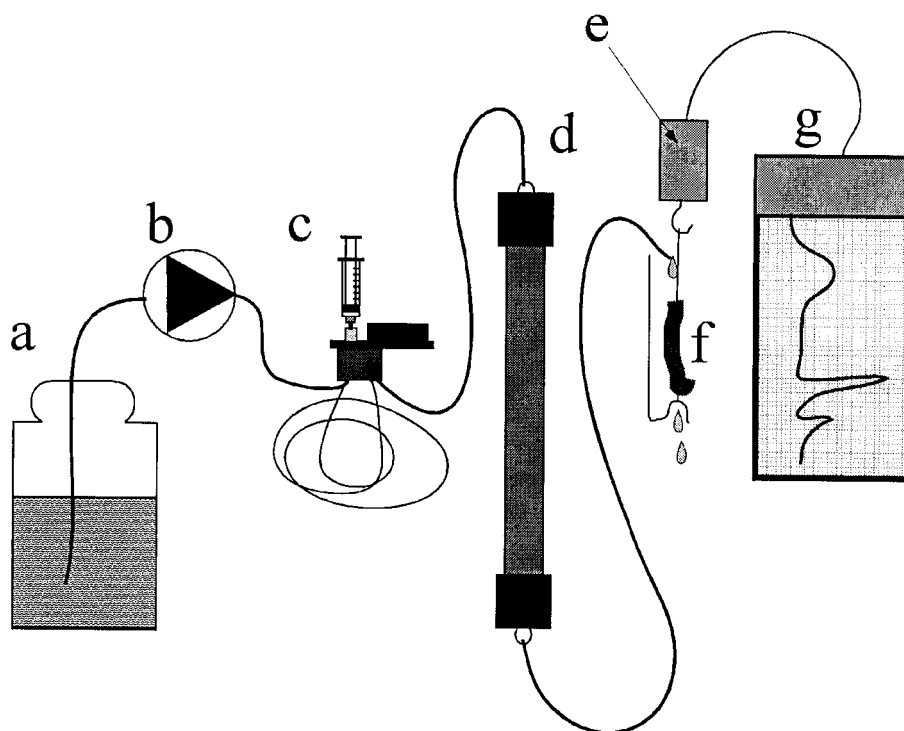


Figura 2

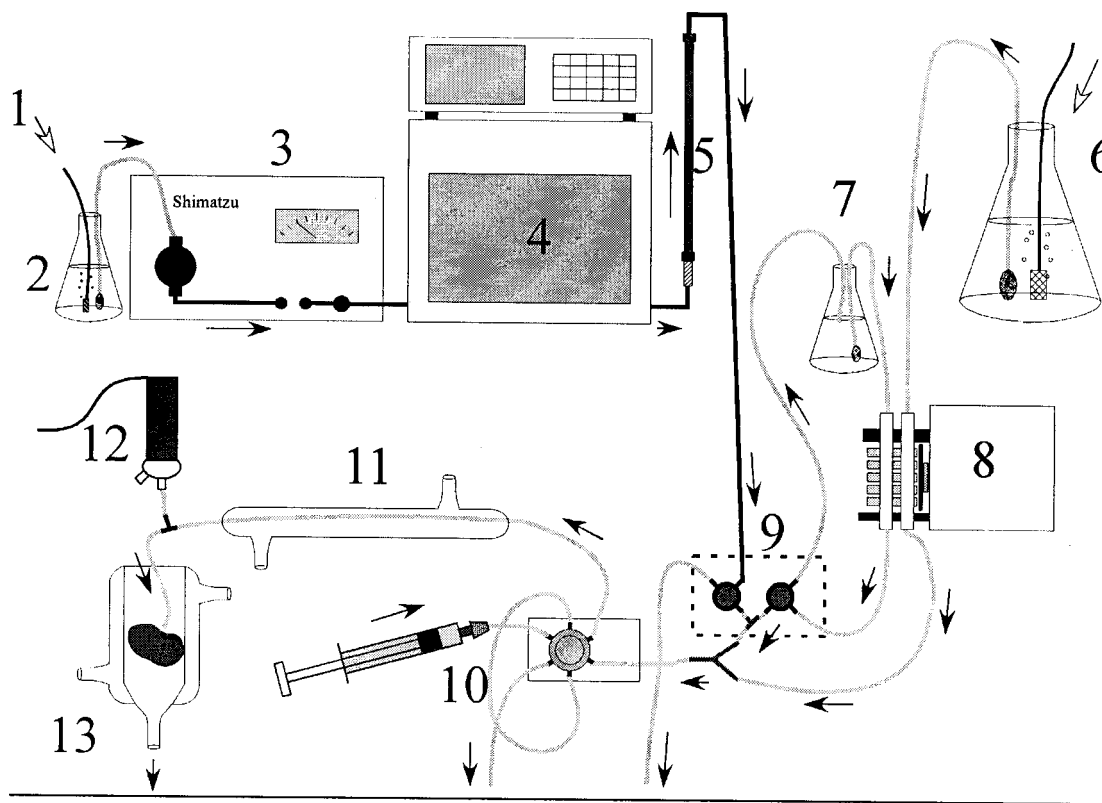


Figura 3

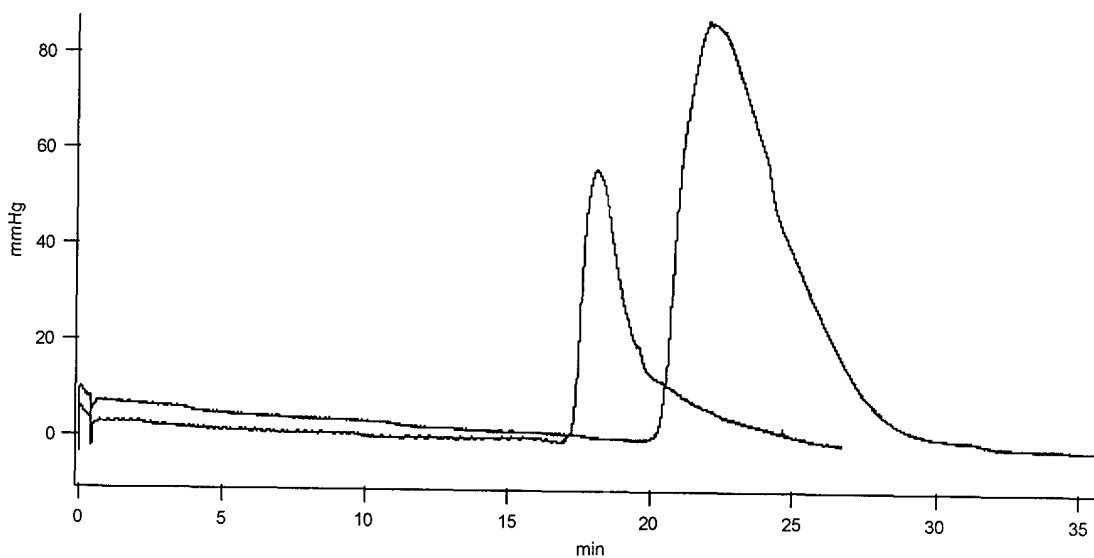


Figura 4

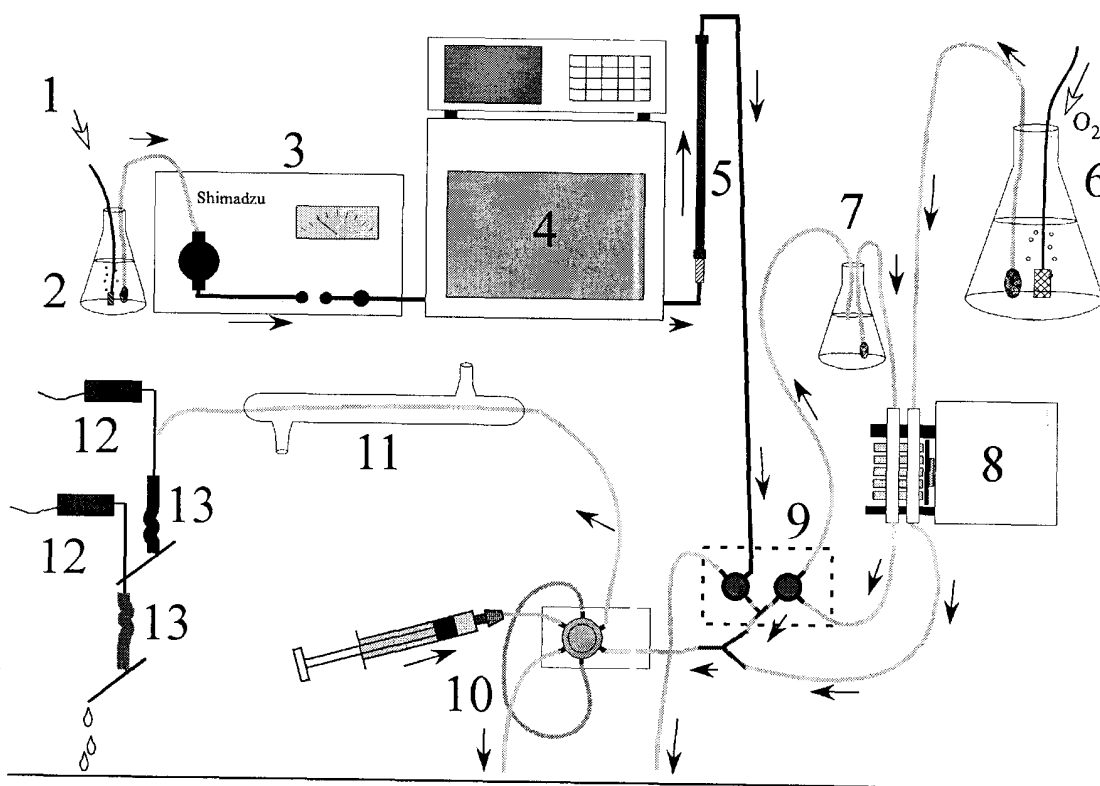
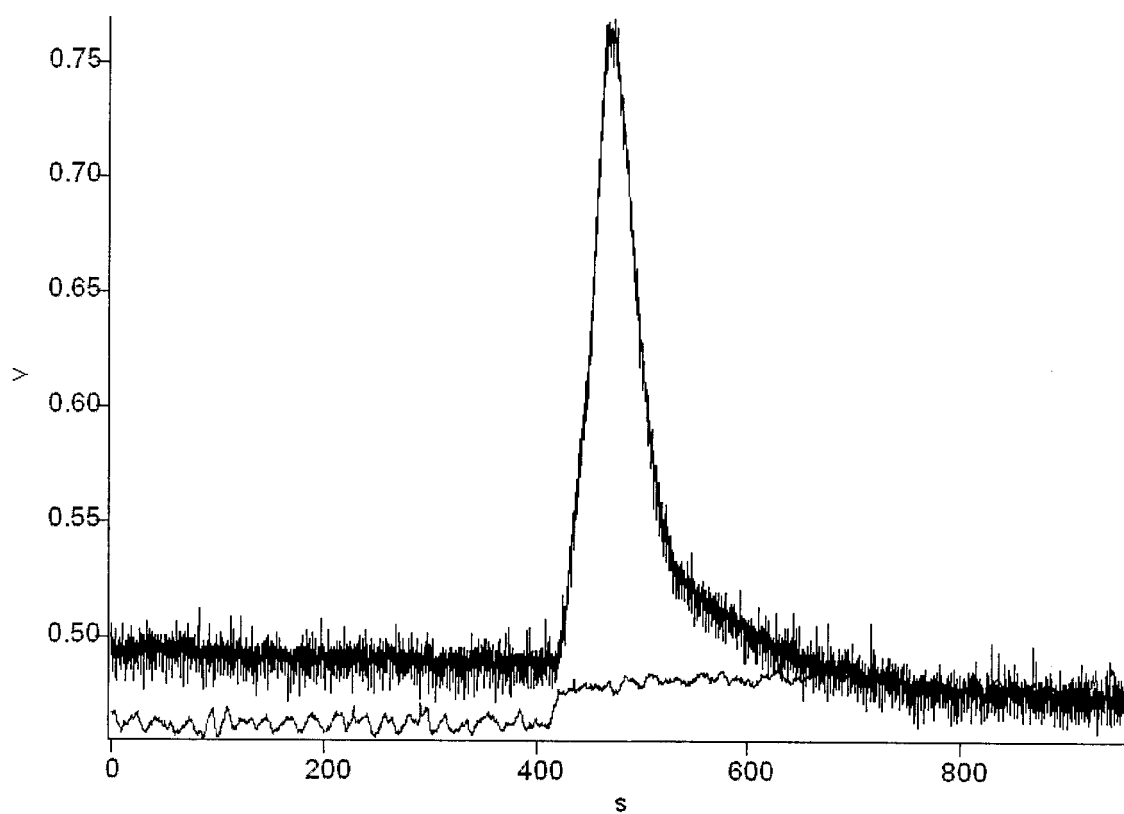


Figura 5





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200902287

②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.11.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N30/02** (2006.01)
B01D15/08 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2006113527 A2 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 26.10.2006, todo el documento.	1-3
A	US 20070000838 A1 (CHI-YUAN SHIH) 04.01.2007, todo el documento.	1-3
A	BUCHHOLZ J. N. y DUCKLES PIPER S. "In vitro measurement of endogenous norepinephrine release from small blood vessels with short stimulation trains." Journal of Pharmacological and Toxicological Methods (1992) Vol. 28, páginas 137-141. Todo el documento.	1-3

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
30.12.2011

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/4

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

G01N, B01D

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, TXTE, TXTF, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.12.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-3	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-3	SI
	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 se publica.

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	WO 2006113527 A2 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY)	26.10.2006
D02	US 20070000838 A1 (CHI-YUAN SHIH)	04.01.2007
D03	BUCHHOLZ J. N. and DUCKLES PIPER S. "In vitro measurement of endogenous norepinephrine release from small blood vessels with short stimulation trains." Journal of Pharmacological and Toxicological Methods (1992) Vol. 28, páginas 137-141. Todo el documento.	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

La presente solicitud de invención consiste en un sistema de detección de actividad biológica en tiempo real basado en una cromatografía líquida (reivindicaciones 1 y 2) y el procedimiento de dicha detección (reivindicación 3).

El documento D01 consiste en un sistema para la detección de analitos en tiempo real utilizando cromatografías, como HPLC.

El documento D02 consiste en un sistema y un método para monitorizar analitos en tiempo real utilizando una cromatografía líquida.

El documento D03 consiste en la cuantificación mediante HPLC de norepinefrina en tejidos y su detección electroquímica.

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).

1.1.-Reivindicaciones 1-3.

Ninguno de los documentos citados en el Informe del Estado de la Técnica, o cualquier combinación relevante de ellos revela el uso de órganos o tejidos como detectores en la cromatografía líquida de alta resolución.

Por lo tanto, los documentos D01-D03 son solo documentos que reflejan el estado de la técnica. En consecuencia la invención es nueva y se considera que implica actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1986.