



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 283 436**

51 Int. Cl.:
G01R 33/465 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
G01N 1/42 (2006.01)
G01R 33/30 (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01976420 .8**
86 Fecha de presentación : **12.10.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1410055**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2004**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo de análisis del estado químico intracelular de células vivas por medio de resonancia magnética nuclear.**

30 Prioridad: **13.10.2000 FR 00 13183**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

73 Titular/es: **Metabolic Explorer
Biopole Clermont-Limagne
63360 Beuzire, FR
BRUKER S.A.**

72 Inventor/es: **Gonzalez, Benjamin;
Piotto, Martial y
Huber, Gaspard**

74 Agente: **Izquierdo Faces, José**

ES 2 283 436 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 y dispositivo de análisis del estado químico intracelular de células vivas por medio de resonancia magnética nuclear.

La presente invención se refiere a un procedimiento no-invasivo de análisis *in vivo* del metabolismo intracelular. El procedimiento utiliza la resonancia magnética nuclear (RMN) para medir el estado químico intracelular de las células animales, vegetales o de microorganismos cultivados en unas condiciones definidas y controladas.

La invención se refiere en particular a un procedimiento de análisis del estado químico intracelular de células vivas mediante RMN, que comprende una etapa de preparación de la muestra o prueba de células y una etapa de análisis de la muestra mediante RMN realizadas a muy baja temperatura a fin de fijar el estado bioquímico de las células vivas de manera a tener unas medidas reproducibles, específicas y justas del funcionamiento celular en unas condiciones dadas.

Las concentraciones intracelulares son unos parámetros fundamentales para caracterizar y correlacionar la influencia de las modificaciones genéticas y ambientales sobre el funcionamiento de la célula (Weuster-Botz *et al.*, 1996; Teusink *et al.*, 1998). Por medio de la medición de las concentraciones intracelulares cabe la posibilidad de determinar un perfil metabólico específico del organismo vivo cultivado en unas condiciones estándares y de comparar este perfil con los obtenidos después de modificaciones genéticas o después de diversas condiciones de cultivo.

Las técnicas dedicadas a la determinación *in vivo* de los parámetros intracelulares se dividen en 2 grupos: los métodos invasivos y los métodos no invasivos.

Los métodos invasivos necesitan una destrucción de las células y una extracción de los compuestos químicos intracelulares. Estas dos etapas se desarrollan en unas condiciones físico-químicas extremas. En consecuencia, es frecuente encontrar en la bibliografía datos contradictorios para las concentraciones intracelulares de un mismo organismo cultivado en las mismas condiciones (Gancedo *et al.*, 1973; Weuster-Botz *et al.*, 1996; González *et al.*, 1997).

Los métodos no invasivos como la resonancia magnética nuclear (RMN) presentan la ventaja de caracterizar el estado químico intracelular de células vivas sin perturbación del metabolismo celular (Gadian *et al.*, 1983). Numerosas revistas científicas muestran que esta técnica es la herramienta analítica mejor adaptada para el análisis *in vivo* del metabolismo intracelular (Jeffrey *et al.*, 1991; Cameon *et al.*, 1997).

En este contexto, ya ha sido propuesto realizar la detección del estado químico de sistemas vivos mediante RMN. A este respecto se puede citar la solicitud internacional de patente WO 92/01946, que atañe a un procedimiento de medida mediante resonancia magnética nuclear del estado químico de sistemas vivos animales o humanos, según el preámbulo de la reivindicación 1.

Si con este dispositivo es posible detectar disfuncionamientos celulares en tejidos con respecto a una referencia, definida sobre tejidos sanos, resulta mucho más difícil aplicarlo para correlacionar y caracterizar específicamente una función celular de microorganismos, de células animales y de células vegetales mediante la medida RMN del estado químico intracelular. En efecto, la sensibilidad de los sistemas vivos a las condiciones ambientales hace difícil la aplicación de este dispositivo para medir el estado químico intracelular de las células y, sobre todo, para correlacionar específicamente este estado a las condiciones experimentales. Esto ha sido confirmado por Middleton *et al.*, (1998), que han mostrado la influencia de las condiciones de preparación de tejidos biológicos enfermos sobre los perfiles metabólicos obtenidos por medio de RMN de alta resolución con el ángulo mágico (más conocido bajo el acrónimo RMN HR MAS, que significa High Resolution Magic Angle Spinning en inglés). Mediante estos experimentos, han subrayado la dificultad de correlacionar los factores patológicos experimentados y los perfiles metabólicos medidos con el dispositivo mencionado más arriba.

El origen de las dificultades para asociar específicamente un perfil intracelular medido por medio de los dispositivos RMN a las condiciones experimentales reside en el método y el tiempo transcurrido para la preparación y la medición de las muestras o pruebas. Es importante subrayar que las velocidades de las reacciones metabólicas y particularmente de las implicadas en el metabolismo energético son elevadas; por ejemplo, la velocidad de conversión de la glucosa intracelular es de $1 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y la del ATP (Adenosina-Tri-Fosfato) es de $1.5 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (De Koning y van Dam, 1992; Theobald *et al.*, 1993). Los contenidos intracelulares consignados en la bibliografía para estos dos compuestos son inferiores a 4 mmol.l^{-1} (Ryll *et al.*, 1991; Seiler *et al.*, 1994). Estos datos muestran que un tiempo de toma o recogida y/o un tiempo de medida superior a 6 segundos tiene por consecuencia unas variaciones importantes de las concentraciones intracelulares.

Así pues, es indispensable para obtener unas mediciones por medio de RMN reproducibles y específicas del funcionamiento celular para una condición dada mantener las células en un estado estable no solamente entre el tiempo de toma de las células desde el procedimiento de cultivo de las células y el tiempo t_1 de medida del estado químico mediante resonancia magnética nuclear, pero también durante la medida RMN.

La presente invención se propone, pues, resolver estos problemas proveyendo un procedimiento que permite fijar el estado químico de las células medido por medio de RMN a fin de establecer con precisión el perfil (Código de barra, signature) de los metabolitos intracelulares específicos del tipo celular y de las condiciones experimentales.

ES 2 283 436 T3

La presente invención se refiere a un procedimiento de análisis del estado químico de células vivas utilizando la resonancia magnética nuclear (RMN) mediante comparación de, al menos, un espectro de RMN y/o de, al menos, un valor de medida de RMN obtenido sobre una muestra o prueba de dichas células vivas con, al menos, un espectro de RMN y/o de, al menos, un valor de medida de RMN de referencia obtenido sobre, al menos, una muestra de células vivas de referencia, de manera a identificar, al menos, un pico de dicho espectro de RMN y/o, al menos, un valor de medida de RMN, que constituye un marcador específico del estado metabólico de dichas células vivas caracterizado por el hecho de que comprende una etapa de preparación de dicha muestra o prueba en unas condiciones que permiten fijar el estado químico de dichas células vivas.

También es un objetivo de la invención proveer un procedimiento de preparación de la muestra o prueba, que asegura la estabilidad del estado químico intracelular desde la toma hasta la medición mediante RMN. Así, el procedimiento según la invención se caracteriza por el hecho de que para preparar dicha muestra o prueba se la somete a una temperatura muy baja durante un tiempo suficiente para detener las reacciones intracelulares entre el momento de toma de dicha muestra y el momento de medida del estado químico de las células, y eventualmente también durante toda la duración del análisis.

La invención se refiere igualmente a un procedimiento caracterizado por el hecho de que la preparación de dicha muestra comprende las etapas siguientes:

a) la inmersión directa e inmediata de dicha muestra en el nitrógeno líquido;

b) la liofilización de dicha muestra;

c) eventualmente el almacenamiento de dicha muestra a muy baja temperatura;

d) en el momento deseado para el análisis, la mezcla y la puesta de nuevo en solución a muy baja temperatura de dicha muestra liofilizada con un disolvente, que tiene un punto de fusión muy bajo.

Según un modo particular de realización de la invención, el procedimiento según la invención se caracteriza por el hecho de que en lugar del nitrógeno líquido se utiliza una mezcla agua/metanol tamponado a muy baja temperatura. Según un modo preferido de realización de la invención, la mezcla agua/metanol se tampona con pH 7,5 y contiene 50% de metanol. Es igualmente dentro del alcance de la invención utilizar otros compuestos orgánicos en mezcla con el agua, que varían por la naturaleza del compuesto orgánico empleado, por el pH de la mezcla. La presente invención se refiere a todas las mezclas compuestas orgánicas/agua y más particularmente alcohol/agua, para las cuales el punto de fusión (Pf) es inferior a 0°C. Entre los compuestos orgánicos, que no sean alcohol en mezcla con el agua, se puede citar la acetona (Pf = -95°C) o el cloroformo (Pf = -64°C).

Según un modo de realización de la invención, el procedimiento se caracteriza por el hecho de que dicho disolvente es una mezcla agua deuterizada/metanol deuterizado y contiene 50% de metanol. Asimismo forma parte del ámbito de la invención utilizar otros tipos de disolvente compuesto de mezclas agua deuterizada/compuesto orgánico deuterizado y más particularmente agua deuterizada/alcohol deuterizado. Los otros tipos de disolvente se refieren a todas las mezclas agua deuterizada/compuesto orgánico deuterizado. Estas mezclas pueden variar por la naturaleza del compuesto orgánico deuterizado empleado, por la proporción del compuesto orgánico deuterizado en la mezcla o por el pH de la mezcla, por ejemplo. Los puntos de fusión de los disolventes deuterizados difieren poco de los disolventes equivalentes protonados. El disolvente más sensible a la deuterización; es probablemente H₂O ya que el punto de fusión del D₂O es de 3,8°C.

Según un modo de realización de la invención, el procedimiento se caracteriza por el hecho de que dicha muy baja temperatura, a la cual se somete la muestra durante su preparación, su almacenamiento y durante la duración del análisis de RMN es inferior a 0°C. De manera preferida, dicha muy baja temperatura para la preparación y el almacenamiento de la muestra queda comprendida entre -10 y -80°C, y de manera más preferida, dicha muy baja temperatura es inferior o igual a -80°C. De manera muy preferida, la muestra se almacena dentro del nitrógeno líquido para una mayor estabilidad. De manera preferida, dicha muy baja temperatura durante la duración del análisis de la muestra queda comprendida entre -20°C y +5°C de tal suerte que dicha temperatura sea compatible con la utilización del rotor y de la sonda.

El procedimiento de análisis del estado químico de dicha célula según la invención utiliza la RMN provista de una sonda líquida, la RMN provista de una sonda HRMAS alta resolución, de preferencia por medio de RMN HRMAS con dos dimensiones.

Según un modo preferido de realización de la invención, el procedimiento según la invención se caracteriza por el hecho de que dichas células vivas se cultivan o incuban en un medio de cultivo celular o histológico, que contiene unas moléculas enriquecidas con isótopos estables. De manera más preferida, dichas moléculas comprenden una fuente de carbono 13 y/o una fuente de nitrógeno 15.

Las células vivas según la invención son unas células procarióticas o eucarióticas, animales o vegetales. Sin establecer una lista exhaustiva, se dan a continuación unos ejemplos de células vivas según la invención. Entre las células procarióticas conviene citar las algas azul-verde, las mixobacterias, las espiroquetas, las eubacterias, las rickettoias,

las clamidias, los micoplasmas, las arqueobacterias. Entre las eubacterias conviene citar las enterobacterias tales como *Escherichia coli*, los bacilos tales como *Bacillus subtilis*, los pseudomonas, los Campilobacter, los Rhizobium, los Agrobacterium, los Azotobacter, los Micrococcos, los Estafilococos, los Estreptococos, los Lactobacilos. Entre las células de microorganismos eucarióticos conviene citar las algas verdes, pardas o rojas, los champiñones tales como los ficomicetos, los ascomicetos, los basidiomicetos, las levaduras. Entre las levaduras conviene citar *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, *candida albicans*. Entre las células animales conviene citar de preferencia las células humanas y las células de mamíferos tales como los bovinos, los ovinos, los caprinos, el cerdo, los équidos, los roedores tales como el ratón y la rata, por ejemplo.

El procedimiento según la invención se caracteriza por el hecho de que se utiliza para identificar unas células vivas, cuyo estado fisiológico se desvía de la norma. Un tal procedimiento permite identificar células vivientes que pertenecen al grupo compuesto, por ejemplo, de células que presentan un defecto genético constitucional o adquirido, y células sometidas a un estrés ambiental. Por estrés medioambiental se quiere designar un agente físico, químico o biológico, que provoca una reacción de la célula. Entre los agentes físicos conviene citar, entre otros, los rayos beta, los rayos gamma, los rayos X, los ultravioletas, los infrarrojos, la luz visible. Igualmente, unas condiciones de cultivo, aerobio o anaerobio, el pH del medio de cultivo, ácido, básico o neutro, la concentración de gas carbónico o de otro elemento en el medio de cultivo, la temperatura constituyen unos agentes físicos según la invención. Mediante agente químico se entiende o quiere designar todo compuesto químico susceptible de interactuar con la célula o uno de los componentes celulares de la membrana o intercelulares; por ejemplo, los agentes intercalantes, tales como el bromuro de etidio, el yoduro de propidio, constituyen unos compuestos químicos según la invención. Los compuestos biológicos de la invención corresponden a todos los compuestos susceptibles de provocar una reacción biológica celular. Se pueden citar de manera no exhaustiva todas las moléculas que interactúan con un receptor de membrana, tales como, por ejemplo, las moléculas de la comunicación intercelular, las hormonas, las citoquinas, las linfoquinas, las interleuquinas, los anticuerpos. Los virus constituyen igualmente unos agentes biológicos según la invención. Los agentes biológicos según la invención incluyen igualmente los factores genéticos. Estos factores genéticos afectan al metabolismo celular; estos factores pueden ser constitucionales, como, por ejemplo, en el caso de enfermedades genéticas tales como, por ejemplo, la miopatía de Duchenne, la distrofia miotónica de Steinert, la mucoviscidosis, la amiotropía espinal, la esclerosis lateral amiotrófica. Estos factores pueden ser adquiridos como en el caso de mutaciones o de modificaciones cromosómicas, tales como una delección, una inserción, una translocación, una integración vírica o viral. Según la invención, dichas células que presentan un defecto genético constitucional o adquirido, pertenecen preferentemente al grupo de las células cancerosas, o de las células humanas de paciente afectado de un defecto genético constitucional, o de las células infectadas por un virus.

El procedimiento según la invención se caracteriza por el hecho de que dicho marcador específico se utiliza para el cribado de moléculas químicas o biológicas.

Según otro modo de realización de la invención, el procedimiento según la invención se caracteriza por el hecho de que se utiliza para identificar un metabolito intracelular específico de un tipo celular y/o de un estado metabólico celular y/o de condiciones medioambientales celulares.

El procedimiento según la invención puede utilizarse igualmente para determinar la repartición de metabolitos intracelulares que han incorporado dicho isótopo estable, por ejemplo, carbono 13 o nitrógeno 15. El procedimiento según la invención se puede utilizar asimismo para determinar cualitativamente las vías metabólicas en el origen de la formación de dichos metabolitos y/o para determinar cuantitativamente los flujos intracelulares generados por la catálisis enzimática.

La presente invención comprende igualmente la provisión de un marcador específico susceptible de ser obtenido mediante el procedimiento según la invención. Un ejemplo de marcador específico se presenta en la figura 2. El experimento ha consistido en observar el espectro RMN¹³C, con desacoplamiento de los protones, 10 minutos antes y 25 minutos después del paso de un cultivo de células de levadura en unas condiciones de aerobio estricto con un cultivo en unas condiciones anaerobias. Se observan unas variaciones muy importantes de intensidad, incluso unas apariciones de picos y constituyen unos marcadores específicos. Así las señales C1 (55.9 ppm) y C2 (18.0 ppm) del etanol aparecen en condiciones anaerobias, mientras que estas señales no son significativas en el espectro de levaduras en condiciones aerobias. Al contrario, la señal con 91.3 ppm, que corresponde a la C1 de la Trehalosa, desaparece casi enteramente. Otro ejemplo de marcadores específicos es observable en la figura 5.

En fin, la invención también comprende la utilización del pico de espectro de RMN o del valor de medida de RMN tal como queda identificada por la puesta en acción del procedimiento según la invención como marcador de un estado metabólico dado para el cribado de células vivas. Por consiguiente la invención se refiere igualmente a un procedimiento de cribado de células vivas para la identificación de células, que presentan un estado metabólico dado caracterizado por el hecho de que se utiliza el marcador según la invención. La invención trata igualmente sobre la utilización del marcador según la invención para el cribado de moléculas químicas o biológicas.

La invención se sirve de un dispositivo que comprende un imán supraconductor, una consola electrónica, una sonda de medida RMN y una unidad de refrigeración.

El papel del imán supraconductor es generar un campo magnético intenso (hasta 18,8 T), homogéneo sobre un volumen suficientemente importante y cuya intensidad es estable en el tiempo. La consola electrónica permite generar

ES 2 283 436 T3

unos impulsos de alta frecuencia (hasta 800 MHz) y de fuertes potencias (50 W) y recoger las señales emitidas por la muestra. La cabeza o cabezal de medida (patente europea EP0856741), comercializada por BRUKER (código artículo B 1867), recoge la muestra y le transmite los impulsos de alta frecuencia, Asegura igualmente la detección de la señal emitida. El compuesto sometido a la medida está contenido dentro de un rotor con óxido de zirconio de 4 mm de diámetro. Se introduce en la sonda mediante la parte alta del imán con la ayuda de una caña de transferencia (código artículo BRUKER K0219) y se viene a colocar en el centro de una bobina de radiofrecuencia en forma de solenoide. La parte que contiene la bobina y la muestra, se llama estator y posee la característica notable o remarcable de ser móvil y, gracias a un mando neumático, de poder bascular de suerte que el eje de la bobina, y consecuentemente, de la muestra, haga un ángulo de $54,7^\circ$ con respecto al campo magnético principal generado por el imán (figura 1). Una vez en esta posición, se levanta la turbina y se pone en levitación por un flujo neumático axial (bearing) de unos 1500 mbares que llega por la parte baja del rotor. Este está herméticamente cerrado gracias a una caperuza de K₂IF, que posee unas aletas, las cuales permiten la puesta en rotación. Esta se realiza con la ayuda de un segundo flujo neumático (drive), de dirección tangencial con respecto a la turbina. La presión del drive es de unos 500 mbares y el flujo de aire, que llega sobre las aletas de la caperuza o casquete permite alcanzar unas velocidades de rotación del orden de 15000 r.p.s. Las presiones de bearing y drive, el basculado del estator así como la eyección de la plantilla se controlan por una unidad neumática BRUKER (código artículo H2620).

El ángulo de $54,7^\circ$ que hace la muestra con el campo magnético principal se llama corrientemente ángulo mágico. Permite, en efecto, procurar las importantes diferencias de susceptibilidad magnética presentes en unas muestras de células vivas. Esta propiedad permite obtener unas señales RMN netamente más finas que las obtenidas utilizando unas técnicas de RMN clásica con alta resolución líquida, que no utilizan el concepto de la rotación con el ángulo mágico. En este caso la técnica utilizada se conoce bajo el nombre de RMN alta resolución con el ángulo mágico (RMN HRMAS).

La unidad de refrigeración, comercializada por BRUKER bajo el nombre BCU05 (código artículo W1210342), es esencial, puesto que permite retardar o enfriar considerablemente, hasta congelar, los procesos metabólicos de manera a poder estudiar mediante RMN los diferentes componentes químicos, que se hallan en el interior de la célula sin que sus propiedades sean alteradas en el curso de la medición RMN. Esta unidad enfría el flujo de aire seco, que sirve para la puesta en levitación de la muestra (bearing) a unas temperaturas que pueden alcanzar -20°C , que aseguran así unas temperaturas similares al nivel de la muestra. Esta unidad funciona por medio de aire seco y permite generar un caudal de aire, que puede llegar a 2500 l/h. Este flujo de gas debe permitir a la muestra alcanzar las velocidades de rotación elevadas requeridas para este tipo de experiencias. El caudal y la temperatura del aire deben ser suficientemente estables para garantizar una buena estabilidad de la velocidad de rotación y de la temperatura a fin de impedir la aparición de artefactos parásitos en los espectros RMN. El racor de la unidad de refrigeración debe poder soportar presiones importantes aunque siendo suficientemente flexible para poderse conectar fácilmente a la sonda y absorber eventuales vibraciones que podrían dañar a la medida RMN.

Este dispositivo se caracteriza por el hecho de que permite realizar la medida RMN a una temperatura regulada inferior a 0°C , de preferencia entre 0 y -20°C .

Otras características y ventajas de la presente invención serán mejor puestas en evidencia con la lectura de los ejemplos siguientes:

Figuras

Figura 1

Esquema general del dispositivo

1. Ángulo mágico: $54,735^\circ$
2. Caña de inyección y de eyección
3. Gas de rotación (drive)
4. Gas portador (bearing)
5. Blindaje
6. Cerámicas de soporte
7. Bobina RF
8. Estator en posición vertical para expulsar o eyectar la muestra
9. Hacia los circuitos de modulación

ES 2 283 436 T3

10. Contacto movable
11. Cable de medida de la velocidad de rotación
- 5 12. Aire para la expulsión o eyección de la muestra
13. Tubo soporte
14. Pivotes herméticos
- 10 15. Tubos que sirven para la eyección de la muestra
16. Llegada de aire para la puesta en posición vertical
- 15 17. Llegada de aire para la puesta en posición en ángulo mágico
18. Pistón neumático
19. Tornillo micrométrico para regulación del ángulo mágico
- 20 20. Recipiente de Dewar
21. Termopar
- 25 22. Llegada de gas portador
23. Resistencia calefactora.

Figura 2

30 *Espectro RMN¹³C con desacoplamiento de los protones*

- en condiciones de aerobio estricto (en parte baja)

35 Condiciones experimentales: tiempo de adquisición 1 s, tiempo de espera 5 s, 350 adquisiciones duración de registro 30 mn, velocidad de rotación de la muestra 1 kHz.

- 25 minutos después del paso de condiciones de aerobio estricto a unas condiciones de anaerobio (en parte alta).

40 Condiciones experimentales: tiempo de adquisición 1 s, tiempo de espera 5 s, 639 adquisiciones, duración de registro 53 mn, velocidad de rotación de la muestra 1 kHz. Las señales características del etanol se indican por medio de un asterisco.

Figura 3

45 *Influencia de la temperatura sobre la resolución de los espectros protones efectuados mediante RMN HR MAS sobre unas levaduras*

50 El espectro protón obtenido a -10°C (espectro de la parte alta) muestra una resolución ligeramente inferior a la observada en el espectro obtenido a una temperatura ambiente (+25°C) (espectro de la parte baja).

55 Condiciones experimentales: 7 mg de células liofilizadas, disolvente 50 µl metanol-d₄:D₂O en la relación volúmica 1:1, tiempo de adquisición 1,4 s, tiempo de presaturación 0,9 s, 256 adquisiciones, duración de registro 10 mn, velocidad de rotación de la muestra 4 kHz. El D₂O contiene 0,75% de TSP (ácido tri-sililo-d₄-propionato como referencia en desplazamiento químico).

Figura 4

60 *Influencia de la temperatura sobre la estabilidad de los espectros protones efectuados por medio de RMN HR MAS sobre o en unas levaduras*

65 Las condiciones de preparación de las muestras y de registro de los espectros son idénticas a las de la figura 3. El experimento ha sido realizado a +25°C (espectros A1 y A2) y a -10°C (espectros B1 y B2). Los espectros han sido registrados inmediatamente después de la preparación de la muestra y de las regulaciones del espectrómetro (espectros A1 y B1), luego después de 1 h 50 mn en las condiciones de adquisición de datos RMN manteniendo constante la temperatura (A2 y B2). Se observa una mucho mayor estabilidad de la muestra netamente superior a -10°C que a +25°C. Por ejemplo, a +25°C, en la zona del espectro descrito por la figura, las señales a 8.93, 8.92 y 8,56 ppm

ES 2 283 436 T3

desaparecen casi enteramente mientras que las señales a 8.61, 8.10 y 8.08 ppm aumentan netamente de intensidad. Al contrario, a -10°C , las variaciones de intensidad permanecen muy débiles sobre todo el espectro.

Figura 5

5

Caracterización de levaduras por medio de RMN¹H

Las condiciones de preparación de las muestras son idénticas a las de la figura 3. Espectros protón de dos cultivos de ultralevadura (UL y UL') y de un cultivo de levadura de panificación (PS) parados en el momento del consumo total de la glucosa (10 g de glucosa por litro de cultivo): Este instante se define por una dosificación enzimática de la glucosa. Los espectros de UL y UL' muestran una muy buena reproductibilidad de todas las etapas experimentales, que llevan al registro de los espectros. Las diferencias espectrales entre UL y PS permiten fácilmente distinguir las dos levaduras. Condiciones experimentales RMN idénticas a las de la figura 3, salvo $T = +2^{\circ}\text{C}$ y disolvente $50\ \mu\text{l D}_2\text{O}$.

15 Ejemplos

1. Material y métodos

Las células se toman o recogen directamente a partir del cultivo celular y se sumergen directamente en el nitrógeno líquido o en una mezcla agua/metano) (50% en volumen) a -40°C . Esta etapa tiene por objeto detener mediante el frío las reacciones intracelulares. El gradiente de temperatura impuesto a las células optimiza la velocidad de la transferencia de calor y tiene por consecuencia una parada instantánea del metabolismo intracelular.

A continuación se centrifugan las células. Se aclara dos veces en el PBS (Phosphate Buffer Saline, tampón salino fosfato) el residuo celular y después se centrifuga una última vez. A continuación se liofilizan y se almacenan a -80°C las células.

La muestra a medir se prepara mezclando, directamente a 0°C , en el rotor portamuestra, 7 mg de células liofilizadas en una solución de $50\ \mu\text{l}$ de mezcla metanol deuterizado y agua deuterizada en una relación volúmica de 1:1 y que contiene 0,375% de TSP como referencia de desplazamiento químico. Después de 10 segundos de agitación en el vórtice para homogeneizar la muestra, el rotor se transporta dentro de un baño de hielo troceado y está listo para análisis por medio de RMN. Se registra el espectro después de la puesta en rotación del rotor, estabilización de la temperatura de la muestra, sintonización de la cabeza o cabezal de medida y optimización de la homogeneidad del campo magnético B_0 . El conjunto de estas operaciones de regulación no debe sobrepasar 5 mn.

35

2. Resultados

La figura 3 muestra que la resolución de los espectros es ligeramente inferior a baja temperatura. Sin embargo, ésta sigue siendo muy aceptable para el análisis y la interpretación de espectros RMN HRMAS obtenidos de este modo.

40

La figura 4 muestra una estabilidad bien superior de la muestra a baja temperatura. Este resultado muestra que los espectros registrados a -10°C dan una imagen mucho más exacta del estado celular a examinar que los espectros obtenidos a temperatura ambiente. Por consiguiente, el método, que bloquea el estado celular gracias al descenso de la temperatura, permite mejorar notablemente la sensibilidad de la medida haciendo posible el aumento de la duración de adquisición de los espectros RMN. En este caso, el hecho de congelar el estado de los sistemas biológicos a estudiar da la posibilidad de registrar unos experimentos de RMN con dos dimensiones (RMN 2D). Estos, de tipos homonucleares (ex: COSY, TOCSY, NOESY) o hetero-nucleares (ex: correlación inversa $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ o $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ de tipo HSQC, HMQC y/o HMBC) permiten aportar informaciones estructurales y dinámicas sobre los metabolitos estudiados. De otra parte, la RMN 2D permite aumentar muy netamente la resolución gracias, especialmente, a la dispersión espectral sobre la segunda dimensión.

50

Las figuras 2 y 5 muestran la posibilidad de caracterizar en algunos minutos un cultivo celular. Mediante comparación con un banco de datos, unas muestras celulares se pueden caracterizar por su tipo (figura 5) o sus condiciones de cultivo (figura 2). Estos ejemplos se pueden extender fácilmente a otras variaciones de cultivo de células (medio de cultivo, pH, temperatura, instante o momento de toma o recogida) y a unas diferencias genéticas, que repercuten sobre la red metabólica (mutaciones).

55

Referencias

60 **Cameron et al. (1997)** *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 175-80.

De Koning et al. (1992) *Anal Biochem.* 204: 118-123.

Gadian et al. (1983) *Oxford University Press* (Eds), Oxford, UK.

65

Gancedo et al. (1973) *Biochimie* 55: 205-211

Gonzalez et al. (1997) *Yeast* 13: 1347-1356

ES 2 283 436 T3

Jeffrey et al. (1991) *Trends Biochem. Sci.* 16: 5-10

Middleton et al. (1998) *Magn Reson Med.* 40: 166-169

5 **Ryll et al.** (1991) *J Chromatogr.* 570: 77-88

Seiler et al. (1994) *Institute of Biotechnology, ETH, Zurich*

Teusink et al. (1998) *J. Bacteriol* 180: 556-562

10

Theobald et al. (1996) *Biotechnology Techniques.* 10: 197-302

Weuster-Botz et al. (1996) *Adv. Biochem. Eng. Biotech.* 34: 75-108.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de análisis del estado químico de células vivas utilizando la resonancia magnética nuclear (RMN) mediante comparación de, al menos, un espectro de RMN y/o de, al menos, un valor de medida de RMN obtenido en una muestra de dichas células vivas con, al menos, un espectro de RMN y/o de, al menos, un valor de medida de RMN de referencia obtenido en, al menos, una muestra de células vivas de referencia, de manera a identificar, al menos, un pico de dicho espectro de RMN y/o, al menos, un valor de medida de RMN que constituye un marcador específico del estado metabólico de dichas células vivas, **caracterizado** por el hecho de que comprende una etapa de preparación de dicha muestra en unas condiciones, que permiten fijar o conservar el estado químico de dichas células vivas, siendo sometida dicha muestra a una muy baja temperatura durante un tiempo suficiente para detener las reacciones intracelulares entre el momento de toma de dicha muestra y el momento de medida del estado químico de las células, e igualmente durante toda la duración del análisis, comprendiendo dicha preparación de dicha muestra las etapas siguientes:
- a) la inmersión directa e inmediata de dicha muestra en el nitrógeno líquido o una mezcla agua/metano) tamponado a muy baja temperatura;
 - b) la liofilización de dicha muestra;
 - c) eventualmente el almacenamiento de dicha muestra a muy baja temperatura;
 - d) en el momento deseado para el análisis, la mezcla y la puesta de nuevo en solución a muy baja temperatura de dicha muestra liofilizada con un disolvente, que tiene un punto de fusión muy bajo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la mezcla agua/metanol se tampona con pH 7,5 y contiene 50% de metanol.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** por el hecho de que dicho disolvente es una mezcla agua deuterizada/metanol deuterizado tamponado con pH 7,5 y contiene 50% de metanol.
4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por el hecho de que dicha muy baja temperatura es inferior a 0°C.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** por el hecho de que dicha muy baja temperatura queda comprendida entre -10°C y -80°C.
6. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** por el hecho de que dicha muy baja temperatura es inferior o igual a -80°C.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** por el hecho de que la temperatura durante la duración del análisis de RMN es inferior a 0°C.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** por el hecho de que dicha temperatura queda comprendida entre -5°C y -20°C.
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** por el hecho de que el análisis del estado químico de dicha célula se efectúa por medio de RMN HRMAS, preferentemente mediante RMN HRMAS con 2 dimensiones.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** por el hecho de que dicha muestra se toma en un medio de cultivo celular o histológico, que contiene unas moléculas enriquecidas con isótopos estables, en el cual dichas células vivas se cultivan o incuban.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** por el hecho de que dichas moléculas comprenden una fuente de carbono 13 y/o una fuente de nitrógeno 15.
12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** por el hecho de que dichas células vivas son unas células procariotas o eucariotas, animales o vegetales.
13. Utilización de un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para identificar unas células vivas, cuyo estado fisiológico se desvía de la norma.
14. Utilización según la reivindicación 13, **caracterizado** por el hecho de que dichas células vivas pertenecen al grupo compuesto de células, que presentan un defecto genético constitucional o adquirido, y de las células sometidas a un estrés ambiental.

ES 2 283 436 T3

15. Utilización según la reivindicación 14, **caracterizado** por el hecho de que dichas células, que presentan un defecto genético, son unas células cancerosas o unas células infectadas por un virus.

5 16. Utilización de un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para identificar un metabolito intracelular específico de un tipo celular y/o de un estado metabólico celular y/o de condiciones ambientales celulares.

10 17. Utilización de un procedimiento según las reivindicaciones 10, 11 ó 12 siempre que ésta última sea dependiente de la reivindicación 10 u 11, para:

- 10 a) determinar la repartición de metabolitos intracelulares, que han incorporado dicho isótopo estable; y/o
- b) determinar cualitativamente las vías metabólicas en el origen de la formación de dichos metabolitos; y/o
- 15 c) determinar cuantitativamente los flujos intracelulares generados por la catálisis enzimática.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

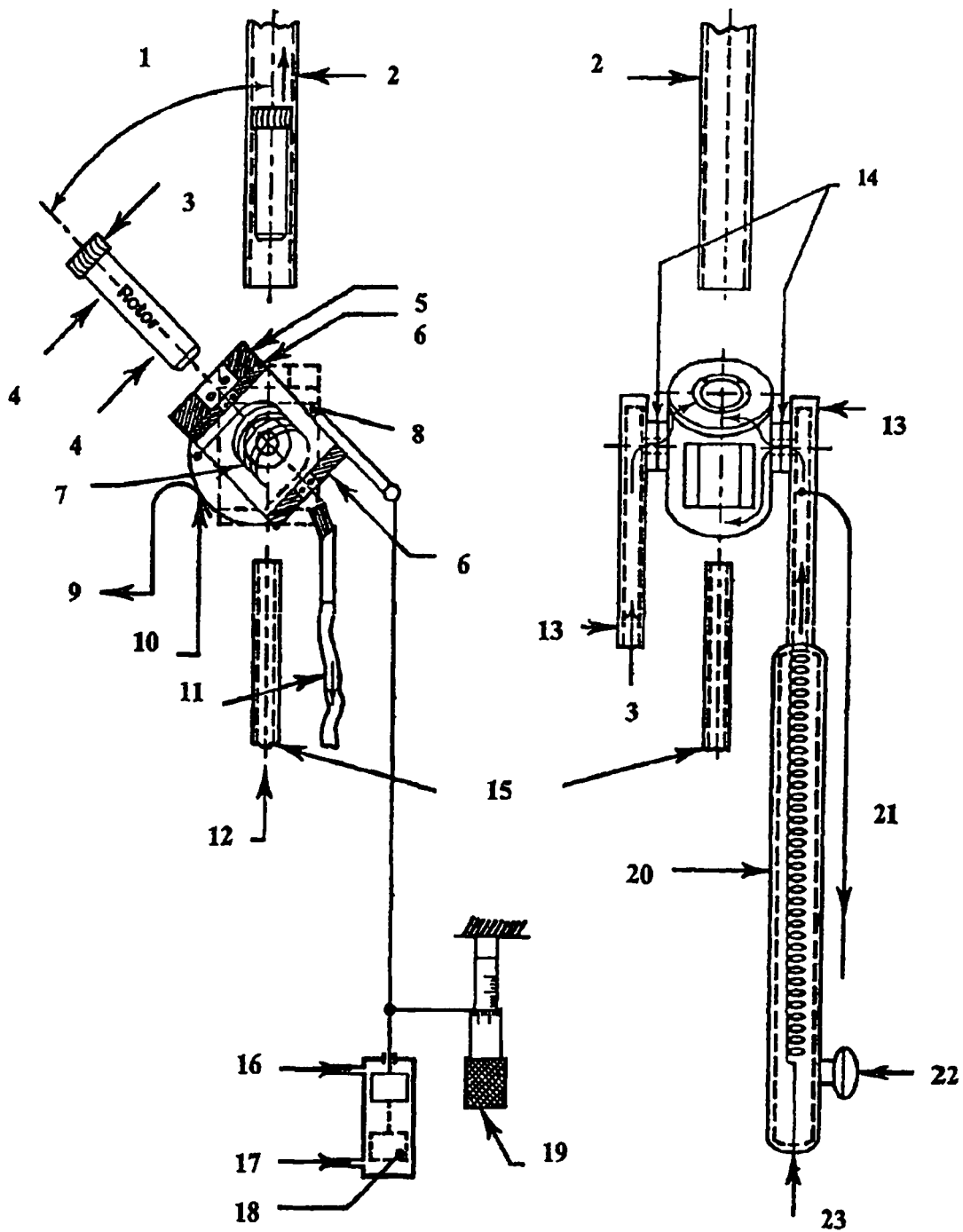


Figura 1

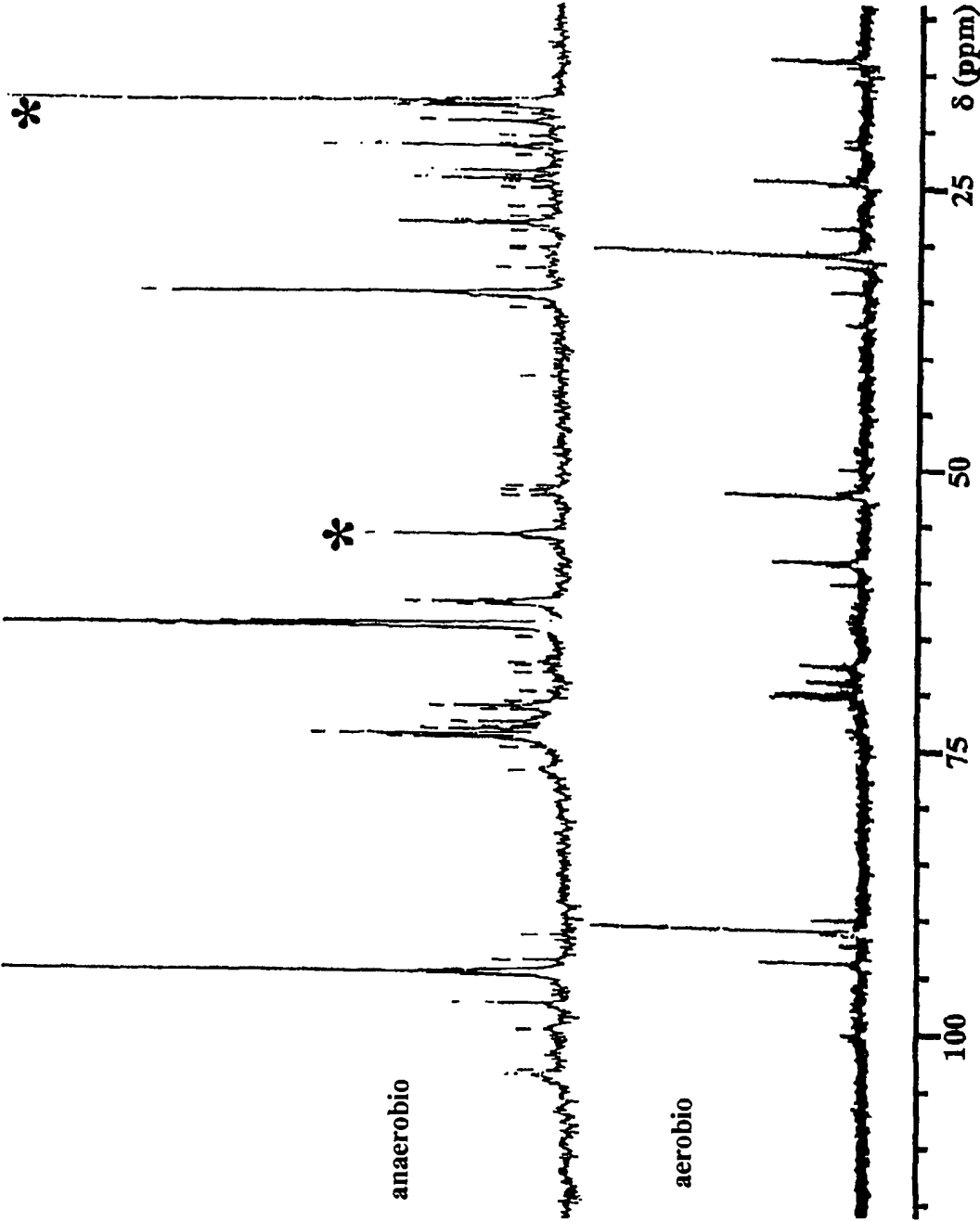


Figura 2

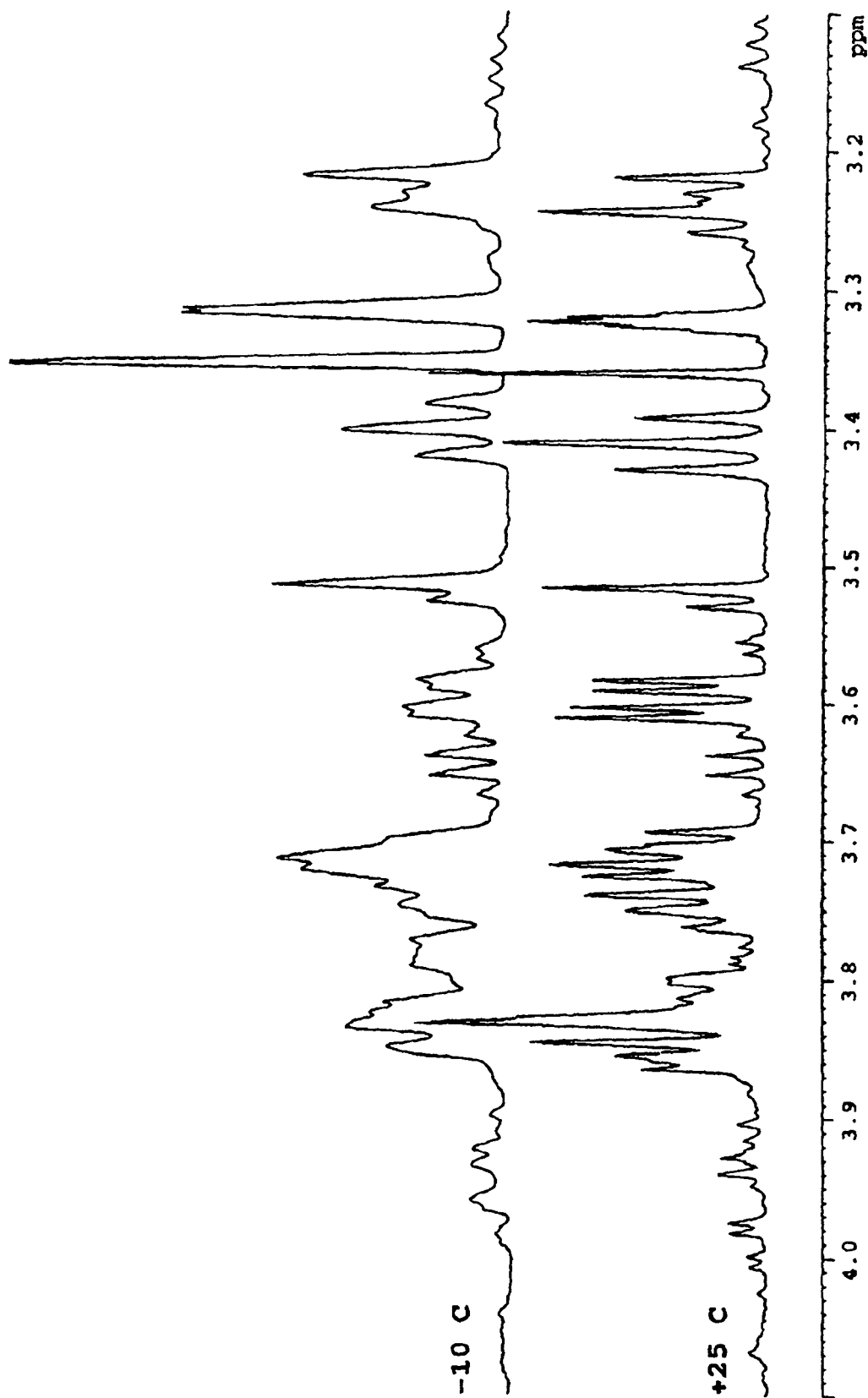


Figura 3

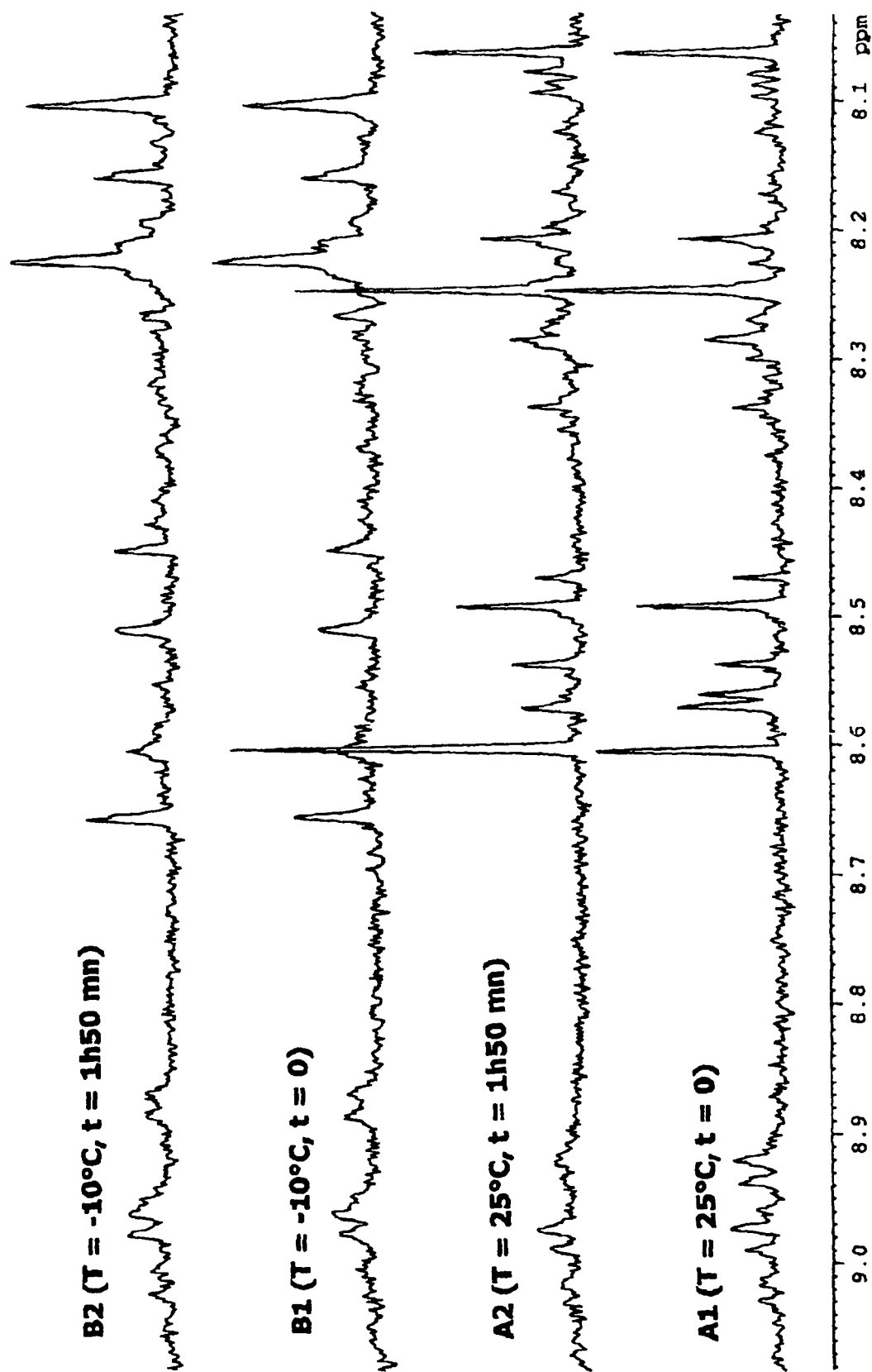


Figura 4

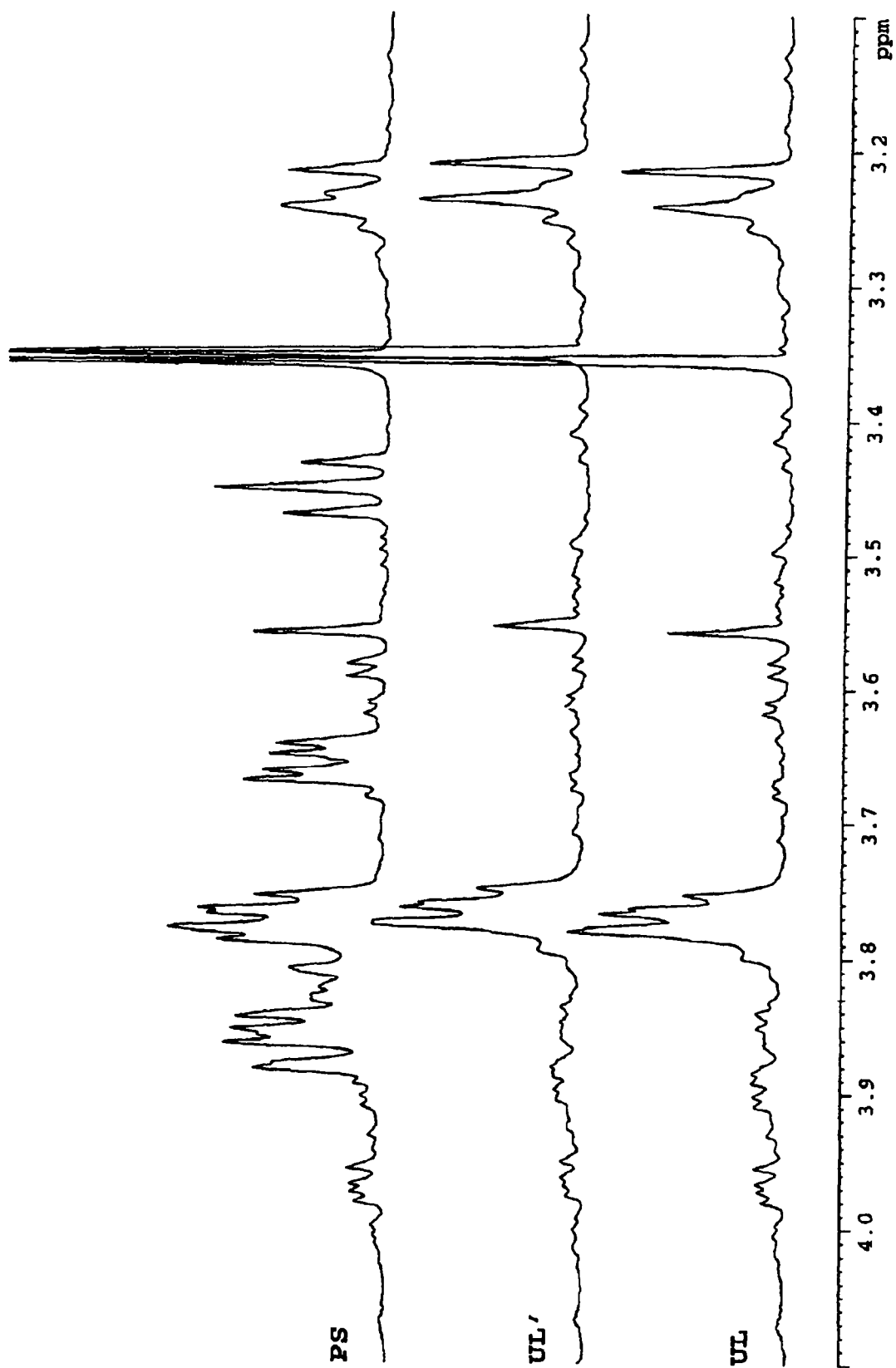


Figura 5