

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 997 253**

51 Int. Cl.:

**G01N 24/10** (2006.01)

**G01R 33/60** (2006.01)

**G01R 33/30** (2006.01)

**G01R 33/345** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2017 PCT/EP2017/000493**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.10.2018 WO18192635**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2017 E 17722680 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2024 EP 3612822**

54 Título: **Pruebas de resonancia de espín electrónico (REE) de la actividad celular metabólica y dispositivo de REE para su realización**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.02.2025**

73 Titular/es:  
**NOXYGEN SCIENCE TRANSFER&DIAGNOSTICS  
GMBH (100.00%)  
Lindenmatte 42  
79215 Elzach, DE**

72 Inventor/es:

**FINK, BRUNO y  
FINK, ARTHUR**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 997 253 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

Pruebas de resonancia de espín electrónico (REE) de la actividad celular metabólica y dispositivo de REE para su realización

5 La invención se refiere a la utilización de un dispositivo REE para la caracterización diferencial de al menos dos estados diferentes de una muestra biológica, tal como se define en la reivindicación 1 o en una reivindicación dependiente de la misma, y a un dispositivo portátil para la medición de parámetros vitales que comprende un dispositivo REE dotado de un portamuestras para un capilar para la recepción de una muestra biológica, tal como se define en la reivindicación 2 con referencia a la reivindicación 4 o en la reivindicación 3 con referencia a la reivindicación 5, o en una reivindicación dependiente de la misma.

10 La medicina y la fisiología modernas conocen múltiples parámetros adecuados para el diagnóstico y la medición de la vitalidad y la salud de pacientes y personas sanas.

De especial interés son la evaluación del riesgo de las personas con respecto a la susceptibilidad a enfermedades y afecciones, como las que surgen en el sistema cardiovascular y en los procesos inflamatorios, pero también la evaluación del éxito de las terapias utilizando parámetros mensurables.

15 Últimamente, la espectroscopia de resonancia de espín electrónico (REE, también conocida como resonancia paramagnética electrónica = RPE) va ganando importancia entre los métodos de medición.

El documento WO 2012/021453 A2 describe una evaluación de la reacción antiinflamatoria a determinadas sustancias (por ejemplo, terapéuticas) en células vivas in vitro e in vivo mediante la REE.

20 Un procedimiento de la empresa Noxygen Science Transfer & Diagnostics GmbH (Elzach, Alemania) trata de un sistema automatizado de prueba de vitalidad y biodisponibilidad de NO (que correlaciona hasta 25 parámetros funcionales y biológicos de laboratorio y cardiovasculares), que también se basa en la REE. Existe en el mercado un sistema correspondiente diseñado para fines de investigación con el nombre de sistema NOXYSCAN y diseñado como sistema de mesa. El sistema permite la medición de especies reactivas de oxígeno (ERO, por ejemplo, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), estrés oxidativo, concentración y consumo de oxígeno, respiración mitocondrial y disfunción, respuesta inflamatoria y resistencia a la misma, y especies reactivas del nitrógeno (ERN - como ONOO<sup>-</sup>, NO, Hb, NO<sup>o-</sup> biodisponibilidad, concentración de NOHb circulante, disfunción endotelial) in vitro, in vivo y en animales vivos en condiciones fisiológicas y patológicas. De este modo también es posible la medición de sustratos y derivados de los mismos, como grupos SH, vitamina C, vitamina BH3\*, pH intracelular y microviscosidad de membrana.

30 Un estudio ha demostrado que existe una correlación altamente significativa entre ERO/NO y 25 parámetros de laboratorio, metabólicos, inflamatorios y de la función cardíaca cuando se toma un complemento alimenticio multifuncional denominado Peak Performance Pack durante 3 meses (aún sin publicar). La aplicación de estos hallazgos en la práctica médica permite un gran ahorro gracias a la reducción de las pruebas de laboratorio de diagnóstico diferencial necesarias.

35 Los espectrómetros de REE de mesa son bien conocidos y se han utilizado para controlar la retención del sabor en la cerveza (degradación por ERO) (Wayne Openlander, Resonance Instruments News), pero se destacó expresamente que hacía falta cierta práctica y formación para obtener resultados consistentes. La medición se realizó en una célula de medición plana.

40 Nemzer et al, Food Science & Nutrition, 2014, páginas 1 a 12, describe el uso de SPECTRA™, un suplemento dietético basado en una gama de frutas, verduras y extractos y concentrados de hierbas, para la modulación ex vivo de las respuestas inflamatorias tras la estimulación del TNF-α. Las mediciones se realizaron utilizando un espectrómetro REE. Se emplean hidroxilaminas cíclicas (sondas de espín), como la 1-hidroxi-3-carboxi-pirrolidina o la 1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina, como captadores ("Scavenger") de radicales superóxido. Las investigaciones se llevaron a cabo utilizando el sistema de mesa de laboratorio NOXYSCAN mencionado anteriormente. La presión parcial de oxígeno utilizada es de 110 mmHg (14665,42 Pa).

45 Bohne et al, Inflammation Research, vol. 46, n° 10, 1997, páginas 423-424 y Ange Mouithys-Mickalad et al, Redox Report, vol. 7, n° 2, 2002, páginas 85-94, describen métodos basados en REE para la determinación de ERO. Eun-Ryeyong Hahm et al, PLOS One, vol. 6, n° 8, 2011 (página e23354) describe un dispositivo de REE.

50 El documento US 2014/091802 A1 describe espectrómetros de REE en los que los componentes del puente están impresos como placas de circuito impreso.

55 La REE se basa en la medición del desdoblamiento del momento magnético de electrones no apareados, que se alinea en dos direcciones opuestas de diferentes niveles de energía en un campo magnético, siendo posible que, al irradiar microondas, el momento magnético pueda "dar la vuelta" del nivel de energía inferior al nivel de energía superior y, por lo tanto, dar lugar a la absorción con respecto a las microondas irradiadas. En dependencia del microentorno de los electrones (átomos contiguos), se producen diferentes frecuencias de absorción con el mismo campo magnético o, a la inversa, con una frecuencia de microondas constante y variación del campo magnético, se produce una variación correspondiente en la absorción de la radiación de microondas.

Los puntos débiles de la REE siguen siendo el elevado precio del equipo y los requisitos de espacio relativamente altos, así como el elevado peso de los componentes, en particular de la unidad de resonancia y del sistema de imanes.

Sin embargo, el inconveniente más grave es que las mediciones no pueden realizarse normalmente en condiciones fisiológicas reales. No obstante, se sabe que las condiciones desviadas pueden conducir a resultados de medición desviados (por ejemplo, la importancia de la concentración de oxígeno para numerosos experimentos se ha demostrado en múltiples publicaciones), que no se pueden correlacionar de forma significativa con las condiciones reales. En particular, la alta dependencia de la temperatura (mejor intensidad de la señal con bajas cantidades de especies paramagnéticas cuando se utilizan temperaturas muy bajas, por ejemplo, ante mediciones en nitrógeno líquido) conduce a limitaciones adicionales.

El objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un sistema de medición y un método de medición que permita mantener y controlar las condiciones fisiológicas reales y, al mismo tiempo, en proporcionar un sistema que sea fácilmente transportable y permita la determinación y el control de una pluralidad de parámetros fisiológicos o analitos, especialmente en el ámbito médico clínico y ambulatorio.

Objetos de la invención y formas de realización de la invención:

(A1) La tarea se resuelve mediante un dispositivo portátil miniaturizado, en particular de mano, que incluye un dispositivo de REE equipado con un portamuestras para un capilar para la recepción de una muestra biológica, insertándose dicho capilar en el portamuestras durante una aplicación, caracterizado por que el capilar es permeable al gas, en especial permeable al oxígeno, y está diseñado de modo que pueda regular la temperatura, por que los elementos de control de la temperatura y de la presión parcial de oxígeno están integrados en el dispositivo, lo que permite ajustar la temperatura en la muestra biológica en una gama de 36,6 +/-0,5 °C y ajustar la presión parcial de oxígeno en un rango de 3999,66 a 6666,1 Pa (35 a 50 mmHg).

En particular, el dispositivo de REE comprende un puente de microondas, dotado de un resonador, en el que se puede insertar o se inserta el portamuestras durante una aplicación, un oscilador y una línea de reflexión de microondas, configurada preferiblemente a modo de cable coaxial, diseñado o producido respectivamente como una unidad mediante fusión y/o sinterización y/o conversión química, capa por capa y/o punto por punto, y en caso de utilización de dispersiones de partículas de plástico/metal bajo secado, en particular, por impresión 3D.

Una variante de realización especialmente importante de la invención (B1) implica el uso de un dispositivo de REE según la invención u otro dispositivo de REE para la caracterización diferencial de al menos dos estados diferentes de una muestra biológica, en el que

- 30 - midiéndose en un primer paso, mediante REE y una sonda de espín en forma de una hidroxilamina no cargada o cíclica portadora de grupos negativos, las especies reactivas de oxígeno (ERO), las especies reactivas de nitrógeno (ERN) o ambas, y/o mediante compuestos que, debido a la adición de oxígeno, muestran un ensanchamiento del pico con el aumento de la concentración de oxígeno en función de la presión parcial de oxígeno sin reacción química, es decir, mediante interacciones puramente físicas que surgen a causa de la
- 35 proximidad de diferentes cantidades de oxígeno, la concentración de oxígeno de la muestra biológica sin adición de efectores y
- midiéndose en un segundo paso, mediante REE y una sonda de espín en forma de una hidroxilamina cíclica portadora de n grupos negativos o de un grupo negativo, las ERO, las ERN o las ERO y las ERN de la misma muestra biológica, respectivamente con adición de efectores,
- 40 - pudiéndose elegir el orden de los pasos primero y segundo también de forma arbitraria;
- y/o
- obteniéndose diferentes resultados de medición en virtud de al menos dos mediciones de REE de la muestra biológica con diferentes sondas de espín, que pueden alcanzar de distintas maneras el líquido extracelular, el líquido intracelular y el interior de las mitocondrias, con o sin determinación de la concentración de oxígeno
- 45 mediante compuestos que muestran un ensanchamiento de un pico de la absorción de REE con el aumento de la concentración de oxígeno por adición de oxígeno en función de la presión parcial de oxígeno sin reacción química, es decir, por interacciones puramente físicas que surgen debido a la proximidad de diferentes cantidades de oxígeno;
- sacándose respectivamente mediante la diferenciación conclusiones acerca de la vitalidad o salud de los
- 50 pacientes o sujetos sanos de los que procede la muestra biológica a la vista de la diferencia;
- realizándose la medición a una temperatura en la muestra biológica del orden de 36 a 44 °C y la presión parcial de oxígeno del orden de 2666,4 a 7332,71 Pa (20 a 55 mmHg);
- y
- 55 - entendiéndose por «efectores», allí donde se mencionan, inhibidores o activadores u otros moduladores de enzimas, sistemas enzimáticos u orgánulos que influyen en la formación de las ERO y/o ERN.

En otras palabras, se trata de un uso diferencial en dos (o más) condiciones en las que las diferencias entre los valores medidos pueden utilizarse para sacar conclusiones acerca de la vitalidad o de los estados de un sujeto del que proceden las muestras biológicas.

5 Sólo con fines de referencia y no como objeto de la invención, el presente texto divulga procesos o métodos en los que se utiliza un dispositivo portátil miniaturizado, en particular manual, según la invención, mencionado anteriormente y/o a continuación, en el que, en presencia de al menos una hidroxilamina cíclica como muestra de espín, oxígeno, especies reactivas de oxígeno y/o especies reactivas de nitrógeno, se determinan mediante mediciones de absorción de REE y se almacenan y/o visualizan las señales de medición y se determinan y se determinan preferiblemente de forma cualitativa o cuantitativa las especies reactivas de oxígeno, oxígeno y/o las especies reactivas de nitrógeno.

10 En la variante de realización B1, en particular (pero también en general) cuando se miden muestras biológicas por lo demás idénticas, también se pueden utilizar dispositivos de este tipo según la invención cuyo portamuestras permite la medición simultánea de dos o más muestras biológicas (por ejemplo, mediante un número correspondiente de compartimentos de muestras o el alojamiento de dos o más capilares en un único compartimento de muestras), en especial las que corresponden a diferentes estados de las respectivas muestras. Los dispositivos con portamuestras para la medición simultánea de dos o más capilares para muestras biológicas en diferentes estados constituyen, por 15 lo tanto, una forma de realización especial de la invención. Varios portamuestras en el mismo resonador también permiten la medición de varias muestras del mismo contenido, por lo que el uso de los capilares permite un mejor equilibrio con respecto a la temperatura y el oxígeno en las muestras, e incluso así, se pueden medir mayores volúmenes de muestras.

20 Las diferentes condiciones son, como se menciona en la reivindicación 1, las que permiten comparar una muestra biológica con o sin efectores y/o con sondas de espín que pueden alcanzar de diferentes maneras el líquido extracelular, el líquido intracelular y el interior de las mitocondrias.

25 Las muestras biológicas son, en particular, sangre, o además plasma sanguíneo o suero sanguíneo, o además líquido linfático, saliva, orina, mucosidad de las vías respiratorias, jugos digestivos, leche, bilis, esperma, cerumen, células corporales o sanguíneas, tejidos o partes de órganos, así como fluidos derivados de los mismos como sangre, sustituto sanguíneo o linfa, respectivamente de animales, en particular, de mamíferos, especialmente humanos.

Las condiciones fisiológicas son, en particular, las que prevalecen en la circulación sanguínea de animales, en particular de humanos, o en su fluido entre células de tejidos y similares.

30 Mientras que en las mediciones anteriores se utilizaba, como se ha mencionado, una presión parcial de oxígeno del orden de 14665,42 Pa (110 mmHg), en los usos según la invención se utiliza una presión parcial de oxígeno en el rango de 2666,44 - 7332,71 Pa (20 a 55 mmHg), preferiblemente de 4666,26 - 6666,10 (35 a 50 mmHg), en particular de aproximadamente 5332,88 Pa (40 mmHg). Esto corresponde al valor encontrado en los capilares sanguíneos del cuerpo de los animales, en particular de los seres humanos. Por lo tanto, este es un aspecto especialmente importante de la presente invención.

35 Se prefieren especialmente una presión parcial de oxígeno en el rango de 5332,88 a 6666,1 Pa (40-50 mmHg) (1 mmHg corresponde a 133,322 Pa o 1,33322 bar) y una temperatura en la célula de medición de 36 a 44° C (que en los seres humanos también implica fiebre), especialmente de 36,4 a 36,8°, por ejemplo, de 36,5 a 36,7 °C, preferiblemente de 36,6 +/- 0,1 °C.

40 Además, el pH, el contenido de dióxido de carbono o la velocidad de flujo, así como otros parámetros inicialmente mencionados, también se pueden adaptar a las condiciones fisiológicas de los animales de los que proceden las muestras biológicas.

45 En lo que sigue, se mencionan características que, por sí solas, en grupos o en su totalidad se pueden usar en lugar de o además de las características o designaciones mencionadas anteriormente y a continuación y que pueden describir así las formas de realización preferidas del dispositivo, de los métodos y usos según la invención y usar, por ejemplo, en las reivindicaciones siguientes.

Cuando se habla de vitalidad, se debe entender en particular que se refiere a la actividad metabólica celular, de modo que el término de "vitalidad" se puede sustituir adecuadamente por a definición en las formas de realización preferidas de la invención.

50 Los efectores empleados en las formas de realización de la invención (B1) son, por ejemplo, inhibidores o activadores, o además otros moduladores, de enzimas, sistemas enzimáticos u orgánulos como las mitocondrias, que influyen en la formación de ERO y/o ERN. Ejemplos de ellos son los principios activos de los medicamentos de la Lista Roja 2016 de medicamentos; Editio Cantor Verlag, Aulendorf 2016 (incorporados aquí por referencia), en particular antibióticos, especialmente antibióticos macrólidos, como claritromicina, eritromicina, azitromicina, roxitromicina, espiramicina o josamicina, además cetólidos, como telitromicina, y también

- 55
- terapéuticos antivirales poco solubles en agua, por ejemplo, inhibidores de la proteasa antirretroviral como indinavir, saquinavir, ritonavir o nelfinavir;
  - analgésicos, como el paracetamol;

- medicamentos cardiovasculares, por ejemplo, antagonistas del Ca, como nifedipino, o inhibidores de la ECA, como captopril o enalapril;
- medicamentos antiinflamatorios, como glucocorticoides, por ejemplo, cortisona, prednisolona o acetato de prednisolona,
- 5 - terapéuticos contra el cáncer, como inhibidores de la mitosis, por ejemplo, inhibidores de la desagregación de microtúbulos, como taxanos, por ejemplo paclitaxel o docetaxel,
- AINE, como el ácido acetilsalicílico u L antiinflamatorios no esteroideos (AINE o en inglés NSAIDs), como otros derivados del ácido acetilsalicílico, derivados del ácido acetilpropiónico, como flurbiprofeno, naproxeno (especialmente el enantiómero S), ketoprofeno o, en particular, ibuprofeno o ácido tiaprofénico, los derivados del ácido arilacético, como el diclofenaco, los derivados del ácido indolacético, como indometacina, los derivados del ácido antranílico, como flufenamina o ácido mefámico, o los oxicamínicos, como piroxicam, tenoxicam o meloxicam,
- 10 - inhibidores de la COX, como los inhibidores más bien específicos de la COX-2 ("Coxibe"), como refexocib, lumiracoxib, valdecoxib o, en particular, celocoxib, etoricoxib o parecoxib u otros agentes, seleccionados, por ejemplo, de entre los siguientes:
- 15 - antihipertensivos, analgésicos, antiflogísticos, antiarrítmicos, antihipertensivos, vasodilatadores, anticolinérgicos, antiarterioscleróticos, enzimas, anticuerpos, secretolíticos, aprodicos contra las úlceras gástricas, antiproliferativos, vasoconstrictores, expectorantes, antitusígenos, mucolíticos, secretomotores, Simpaticomiméticos (como fenilefrina, efedrina, tetrazolina, nafazolina, oximetazolina, xilometazolina o tramazolina), antihistamínicos, principios activos antiinflamatorios no esteroideos o esteroideos (como acetónido de triamcinolona, glucocorticoides como prednisolona, clometasona acetónido de triamcinolona, dexametasona o fluticasona), simpaticomiméticos; estabilizadores de mastocitos, inhibidores de la aromatasas; antiestrógenos; inhibidores de la topoisomerasa I, inhibidores de la topoisomerasa II; compuestos microtubuliactivos; alquilantes; inhibidores de la histona deacetilasa; compuestos que inician procesos de diferenciación celular; inhibidores de la ciclooxigenasa; inhibidores de la MMP; inhibidores de la mTOR; antimetabolitos antineoplásicos; compuestos de platino; compuestos dirigidos contra la actividad de las proteínas o lipidoquinasas o contra la actividad de las proteínas o lípidofosfatasas, o que las reducen; agonistas de la gonadorelina; antiandrógenos; inhibidores de la metionina aminopeptidasa; bifosfonatos; modificadores de la respuesta biológica; anticuerpos antiproliferativos; inhibidores de la heparanasa; inhibidores de la isoforma del oncogén Ras; inhibidores de la telomerasa; inhibidores del proteasoma; compuestos activos en el tratamiento de neoplasias hematológicas; compuestos que se dirigen, inhiben o activan la actividad de Flt-3; inhibidores de Hsp90 como 17-AAG (17-ailaminogeldanamicina), 17-DMAG (17-dimetilaminoetilamino-17-demetoxigeldanamicina, IPI-504, CNF1010, CNF2024, CNF1010 de Conform Therapeutics; temozolomida; inhibidores de la proteína del huso kinesina, como SB715992 o SB743921 de GlaxoSmithKline, o pentamidina/clorpromazina de CombinatoRx; Inhibidores de MEK, como ARRY142886 de Array PtoPharma, AZD6244 de AstraZeneca, PD181461 de Pfizer, leucovorina, aglutinante EDG, compuestos antileucémicos, inhibidores de la ribonucleótido reductasa, inhibidores de la S-adenosilmetionina descarboxilasa, anticuerpos antiproliferativos u otros compuestos quimioterapéuticos; tricíclicos, por ejemplo, benzodiazepinas, incluidos ligandos de benzodiazepinas mitocondriales, inhibidores de la MAO, ISRS, IRSN, antagonistas de los receptores NK, antagonistas de los receptores CRF, antagonistas de los receptores 5HT7, agonistas/antagonistas/moduladores de los receptores mGlu, agonistas/antagonistas o moduladores de los receptores GABA-A o GABA-A/B, Antagonistas de los receptores de la vasopresina, medicamentos a base de plantas como la hierba de San Juan, agonistas de los receptores 5-HT1A, antagonistas de los receptores de la vasopresina, inhibidores de la acetilcolinesterasa como rivastigmina o donepezilo, inhibidores mixtos de la acetilcolina/butirilcolinesterasa, agonistas del receptor nicotínico alfa7, antipsicóticos como clozapina o haloperidol, agentes antimaníacos (por ejemplo, litio, carbamazepina, valproato) u otros antipsicóticos atípicos o típicos; suplementos dietéticos; o similares.

En particular, se pueden examinar y comparar muestras biológicas (en particular de sangre) de sujetos de ensayo (animales, especialmente humanos) con y sin los efectores correspondientes (los mismos sujetos de ensayo en diferentes momentos o diferentes sujetos de ensayo) a partir de las diferencias con y sin la adición del efector (al paciente o a la respectiva muestra biológica).

Una variante particular se refiere a los efectores que inhiben la actividad mitocondrial, por lo que la contribución de las mitocondrias a la formación de ERO y/o ERN puede deducirse de la diferencia entre la intensidad de la señal de ERO y/o ERN con y sin efector. Ejemplos de tales efectores son inhibidores de los complejos I, II, III, IV y/o ATP sintasa, como para el complejo I MPP<sup>+</sup>, aminobarbital rotenona o biguanidas (como metformina), para el complejo II ácido 3-nitropropiónico, malonato o un inhibidor fungicida de la succinato deshidrogenasa, para el complejo III antimicina A o estrobilurinas, para el complejo IV una sal de cianuro o una sal de azida o el ácido respectivamente correspondiente, para la ATP sintasa oligomicina, o también un desacoplador de la cadena respiratoria, como termogenina, 2,4-dinitrofenol, cianuro de carbonilo-m-clorofenilhidrazona, cianuro de carbonilo-p-trifluorometoxifenilhidrazona o pentaclorofenol; también son posibles mezclas de dos o más de estos efectores.

La intensidad de la señal ERO y/o ERN se refiere a la intensidad de la señal REE determinada (normalmente mediante una sonda de espín), como la causada por la transferencia de la propiedad radical de ERO y/o ERN a una o más sondas de espín.

5 Otra variante especial se refiere, por ejemplo, a los inhibidores de la NO sintasa endotelial: mientras que en los sujetos de ensayo sanos con NO sintasa endotelial intacta sólo se miden pequeñas cantidades de radicales (radicales NO y radicales O, es decir, ERO y ERN), al medir la sangre de sujetos de ensayo con NO sintasa endotelial disfuncional se produce un aumento de la formación de ERO y/o ERN. Esto aumenta las intensidades de señalización de ERO (determinadas mediante sondas de espín). Si se añaden inhibidores de la NO sintasa endotelial, estas señales se vuelven menos intensas (debido a la menor producción de radicales). Por tanto, es posible distinguir si la formación de radicales se debe o no a la NO sintasa endotelial midiendo la diferencia en la intensidad de la señal en presencia y ausencia del inhibidor de la NO sintasa. De este modo, se pueden distinguir las muestras sanas (diferencia pequeña) y las muestras con funcionalidad de NO sintasa endotelial alterada (diferencia mayor).

10 Ejemplos de inhibidores de NO sintasa, sin que su indicación sea limitativa, son N-metilarginina, L-nitroarginina, L-NAME (Nω-nitro-L-arginina metil éster), L-NIO (L-N<sup>5</sup>-(1-iminoethyl)ornithine), 1400W (N-(3-aminomethyl)benzylacetamidine), o N-AANG ((4S)-N-(4-amino-5[aminoethyl]aminopentyl)-N'-nitroguanidine).

15 Todos los efectores pueden estar presentes como compuesto libre y/o como sal.

También mediante la medición con sondas de espín, que pueden acceder de diferentes maneras al espacio extracelular, al espacio intracelular o al interior mitocondrial, los espacios correspondientes pueden analizarse diferencialmente por separado para la aparición de ERO y/o ERN cuando las mediciones se realizan utilizando diferentes sondas de espín (variante de realización de la invención (B1)). De este modo, se puede determinar si las ERO y/o ERN surgen a nivel del espacio extracelular, intracelular o intramitocondrial, con lo que se pueden sacar conclusiones acerca de la funcionalidad de los espacios correspondientes.

20 Las diferentes sondas de espín correspondientes, que pueden alcanzar de diferentes maneras el líquido extracelular, el líquido intracelular y el interior de las mitocondrias, son, por ejemplo, las que llevan grupos cargados (en particular negativamente) como grupos fosfona o grupos sulfona con grupos OH libres unidos a grupos P o S unidos a grupos OH, que son adecuados para medir el espacio extracelular (no penetran en la membrana celular); y los que penetran en todos los espacios mencionados (por ejemplo, las sondas de espín sin carga negativa), de modo que la contribución del espacio intracelular y del espacio extracelular puede deducirse de la medición de la diferencia en las intensidades de absorción de la REE entre las sondas de espín que sólo alcanzan el espacio extracelular y las que alcanzan todos los espacios.

25 Las sondas de espín son generalmente compuestos que forman radicales de vida muy larga (vidas medias de varias horas) mediante la transferencia de la propiedad radical de especies atómicas o moleculares con una vida media muy corta (como ERO, ERN) y que, por lo tanto, se pueden medir durante mucho tiempo utilizando la REE.

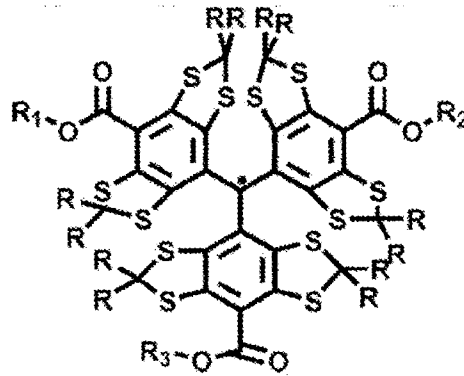
30 Ejemplos de hidroxilaminas cíclicas no cargadas son la 1-hidroxi-3-metoxi-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina (CMH) o el cloruro de 1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il-trimetilamonio (CAT-1H).

Ejemplos de hidroxilaminas cíclicas con grupos cargados negativamente son PPH = 1-hidroxi-4-fosfona-oxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidina, que en caso de células intactas (vitales) no se absorben en el interior celular (por transporte activo o difusión).

35 El término de "hidroxilaminas cíclicas" también incluye nitroxidos cíclicos como TEMPO o 4-amino-TEMPO o 4-[(5-aminopentil)carbonilamino]-TEMPO)) como muestra de espín. Sin embargo, preferiblemente, se trata en realidad de hidroxilaminas.

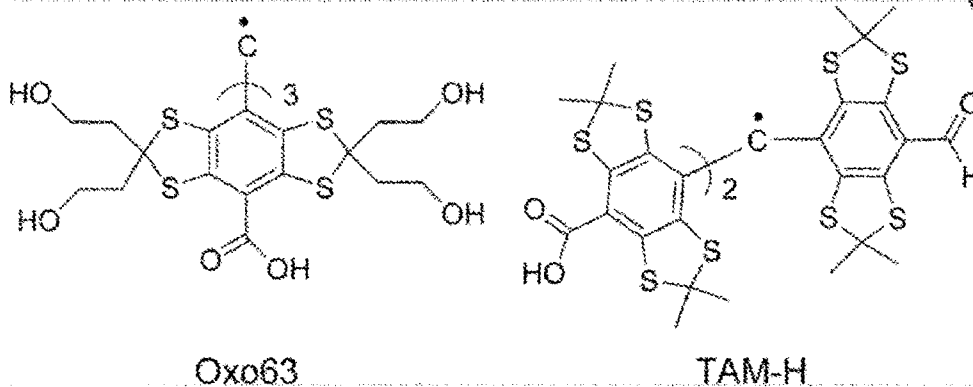
40 Las mediciones (y por lo tanto también, si se desea, el control y la regulación) del contenido de oxígeno en cada uno o cualquiera de los usos, procesos o métodos mencionados anteriormente según la invención se pueden llevar a cabo, por ejemplo y como se ha visto, mediante compuestos que muestran diferentes anchuras de los picos de la absorción REE (ensanchamiento del pico con el aumento de la concentración de oxígeno) debido a la adición de oxígeno en función de la presión parcial de oxígeno sin reacción química (por ejemplo, transferencia de radicales), es decir, por interacciones puramente físicas que surgen debido a la proximidad de diferentes cantidades de oxígeno. Tales compuestos son, por ejemplo, los compuestos de radicales trítilo descritos por A. Bobko et al. en Free Radical Biological Medicine 47, 654-658, 2009, o Y. Liu et al, Free Radic Biol Med. 2009 abr 1;46(7):876-83,

50



<b>CT-03</b>	<b>R = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = Na</b>
<b>Ox063</b>	<b>R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = Na</b>
<b>MT-03</b>	<b>R = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = CH<sub>3</sub></b>
<b>BT-03</b>	<b>R = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = <i>tert</i>-Butyl</b>
<b>AMT-03</b>	<b>R = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = CH<sub>2</sub>OC(O)CH<sub>3</sub></b>
<b>AMT-02</b>	<b>R = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>OC(O)CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = H</b>

(Liu et al., op. cit.) o, sobre todo, uno seleccionado de entre los de las fórmulas



5 (Bobko et al., loc. cit.), en particular la sal de sodio tris(8-carboxil-2,2,6,6-tetrametilbenzo-[1,2-d;4,5-d]bis[1,3]ditiol-4-il)metil comercializada como NOX-15.1.

Cuando en el contexto de la presente revelación se habla de "aproximadamente", esto significa respectivamente que el valor numérico en cuestión puede desviarse en +/- un 2%, preferiblemente en +/- un 1%, muy preferiblemente en un 0,1% del valor numérico mencionado, o que, en particular, no se desvía en absoluto de este valor numérico.

10 Cuando se habla de "además", esto significa que otras de las características sin esta adición son más preferidas que las etiquetadas con "además".

Un dispositivo según la reivindicación 4 o la reivindicación 5 según la invención se caracteriza preferiblemente como sigue por una, varias o todas las características indicadas a continuación:

- 15
- rango de medición de 100 a 500 nmol/seg, en particular de 150 a 360 nmol/seg, preferiblemente de 240 a 300 nmol/seg;
  - precisión (relación señal/ruido) preferiblemente del 5 % o mejor, especialmente del 3 % o mejor (es decir, 5% de ruido con una señal igual o inferior al 95 %, 3 % de ruido con una señal igual o inferior al 97 %);
  - resolución igual o superior a  $3 \times 10^{-4}$  T;
  - estabilidad de campo durante 1 hora  $> 3 \times 10^{-5}$  T;

20

  - sensibilidad de  $< 5$  nM/min (es decir, se puede medir un cambio de 5 nmol por minuto o menos de la concentración de radicales en la muestra biológica);

## ES 2 997 253 T3

- copia de seguridad automática de los datos (por ejemplo, en disco duro u otra memoria de sólo lectura) para guardar los datos; interfaz USB u otra interfaz común (por ejemplo, RS 232);
- software de adquisición de datos que controla el dispositivo, registra los resultados de las mediciones y que, en caso de desearlo, también los puede analizar;

- 5 - aislamiento galvánico entre la interfaz de datos y la fuente de alimentación (por ejemplo, mediante un condensador electrolítico o un elemento de acumulador/batería, estando la fuente de alimentación preferiblemente separada de la carcasa del dispositivo);

Con preferencia, se trata de un dispositivo portátil de mesa, con un peso del orden de entre 5 y 20 kg, por ejemplo, de 7 y 10 kg, por ejemplo, de 8,5 kg.

- 10 El tamaño es preferiblemente de (200-500 mm) x (100 a 350 mm) x (100 a 350 mm), por ejemplo, de 350 x 280 x 265 mm.

El consumo de energía es especialmente < 100, preferiblemente < 50 vatios, por ejemplo, de 20 a 50 vatios.

- 15 El conjunto de microondas ("puente de microondas" de un dispositivo según la invención que constituye en sí mismo una forma de realización reivindicable de la invención) presenta preferiblemente una, varias o todas las características indicadas a continuación:

- grupo de construcción integrado de microondas y resonador como una unidad preformada, que se puede obtener o se ha obtenido preferiblemente mediante impresión 3D o procesos analógicos como los que se describen más adelante;

- 20 - gama de frecuencias preferiblemente en el rango de 8 a 12, especialmente de 9 a 10, por ejemplo, de 9,2 a 9,5 GHz;

- resonador de microondas en impresión 3D (sintonización de resonancia);

- abertura del portamuestras para contenidos de muestras de aprox. 3 a 7 mm, preferiblemente de 5 mm de diámetro; esto garantiza espacio suficiente para el suministro de gas para el control de la temperatura y para el ajuste de la presión parcial de oxígeno deseada;

- 25 - posición del portamuestras en el centro del resonador, donde prevalece la mayor intensidad de campo magnético de la onda estacionaria formada en el resonador;

- resonador rectangular;

- calidad del resonador vacío  $Q \geq 4000$  (medida de la sensibilidad);

- ancho de banda dinámico del amplificador preferiblemente de 8 a 15, en particular de 10 a 12 MHz;

- 30 - potencia del generador de microondas preferiblemente de 5 a 20 mW, en particular de 10 mW;

- amplificación preferiblemente digital hasta 3000 veces;

- estabilización de frecuencia de  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$  (estabilización automática de frecuencia).

El grupo de construcción de campo magnético presenta preferiblemente una o varias o todas las características indicadas a continuación:

- 35 - Imán permanente con un diámetro de los polos magnéticos de 40 a 70, preferiblemente de, por ejemplo, 60 mm;

- bobinas para cambiar la densidad de flujo magnético, preferiblemente en el rango de +/-0,1 G (+/- 0,01 mT) a +/- 0,5 G (+/- 0,05 mT), por ejemplo, de +/- 0,2 G (+/- 0,02 mT);

- diámetro del campo magnético (zona de medición) de aproximadamente 10 a 30, en particular de 15 mm;

- distancia entre los polos magnéticos de 10 a 30, en particular de 12 a 15 mm;

- 40 - precisión dimensional reproducible 10  $\mu$ m, redondez 3  $\mu$ m;

- peso del imán preferiblemente de 1 a 5 kg, en particular de 1,5 a 2,5 kg, por ejemplo, de 2 kg.

El resonador tiene preferentemente un tamaño de 8 a 10 mm (medido en la dirección entre los polos magnéticos), la abertura (redonda o angular, preferiblemente redonda) para el portamuestras en su interior tiene preferentemente un diámetro (se entiende siempre el diámetro exterior) de 3 a 5 mm, el portamuestras tiene un diámetro exterior de 2 a 4 mm, el capilar tiene preferiblemente un diámetro (se entiende siempre el diámetro exterior, salvo que se indique lo contrario) de 0,5 a 2 mm, por ejemplo, de 1,2 a 1,5 mm (de manera que haya un pequeño espacio entre la pared exterior del capilar y la pared interior del portamuestras, que permita el paso del gas para ajustar la presión parcial de oxígeno).

- 50 Durante el proceso de medición ("en uso"), el capilar se puede llenar estáticamente con el fluido de la muestra biológica o el fluido puede fluir a través de él (por ejemplo, mediante una bomba peristáltica). De este modo, también se pueden medir los efectos de la presión sanguínea (hipertensión, hipotensión) o del flujo (efecto de las fuerzas de cizallamiento).

Para la preparación de la muestra (en particular en el marco del uso o según la invención o del procedimiento según la invención), se considera especialmente lo siguiente:

- cantidad de muestra preferiblemente de 5 a 30  $\mu\text{l}$ , en particular de 8 a 15  $\mu\text{l}$ , por ejemplo, 10  $\mu\text{l}$  (cantidad en el rango de medición del portamuestras/resonador);
- 5 - suministro de oxígeno  $\text{pO}_2$  preferiblemente 5332,88  $\pm$  266,64 Pa (40 mmHg  $\pm$  2 mmHg); esto se consigue mediante una mezcla gaseosa que contenga oxígeno (preferiblemente un 4 % de oxígeno);
- control de temperatura preferiblemente 36,6  $^{\circ}\text{C}$   $\pm$  0,1  $^{\circ}\text{C}$
- capilar desechable (preferiblemente con revestimiento de sonda de espín. El recubrimiento se puede aplicar, por ejemplo, a través de macromoléculas como proteínas o polisacáridos, a las que se unen las sondas de espín (por ejemplo, a través de grupos carbonilo por reacción con grupos amino o grupos hidroxilo de las macromoléculas) y mediante las cuales se recubre la pared interior del capilar);
- 10 - diámetro externo del capilar de 0,5 a 2 mm, en particular de 1,0 a 1,2 mm;
- duración del análisis de 5 a 6 minutos.

15 Posibles campos de aplicación preferidos para el dispositivo según la invención o los usos según la invención se pueden encontrar respectivamente en los diagnósticos y/o las terapias de cardiología y angiología, anestesiología, hematología, medicina deportiva, medicina de rehabilitación, medicina medioambiental, traumatología y/o cirugía, o en la monitorización diagnóstica y/o terapéutica de efectos toxicológicos y/o farmacológicos, fenómenos de envejecimiento, vitalidad celular o la actividad metabólica de la célula.

20 La medición de la presencia y cantidad de radicales libres, su formación y degradación, los efectos de la nutrición sobre el estrés oxidativo y nitrosativo en humanos y animales constituyen igualmente campos de aplicación preferidos.

Se pueden examinar muestras biológicas (preferiblemente sangre) de sujetos sanos o enfermos, de sujetos tratados con efectores o de sujetos no tratados, en particular seres humanos, de modo que especialmente en el primero de los casos se puedan detectar riesgos potenciales y posibles enfermedades futuras y tratar a continuación preferiblemente de forma profiláctica.

25 Se pueden utilizar diversos materiales para el capilar. En general, se pueden señalar especialmente los materiales a base de organosilicio, como la silicona o la polisilicona. Otros materiales preferidos son plásticos (polímeros) como polimetacrilato de metilo (PMMA), policarbonato, poliéster, poliamidas, politetrafluoroetileno (TEFLON<sup>®</sup>), cloruro de polivinilo (PVC), polidimetilsiloxano (PDMS), polisulfona, poliestireno, poliolefinas como polimetilpenteno, polipropileno o polietileno, fluoruro de polivinilidina, copolímero de acrilonitrilo-butadieno (ABS), copolímeros en bloque o mezclas de dos o más de estos materiales. Los capilares pueden fabricarse mediante procesos de moldeo conocidos, como moldeo por inyección, extrusión, estirado, polimerización del material precursor monomérico dentro del molde (molde maestro). Se prefieren estos materiales poliméricos porque son fáciles de producir, baratos y desechables. Sin embargo, se prefieren especialmente los capilares poliméricos o de vidrio. Todos los materiales anteriores pueden contener superficies o secciones de superficie tratadas o recubiertas específicamente (por ejemplo, dentro de los microcanales), por ejemplo, mediante silanización (recubrimiento con un silano al que se acopla una molécula compuesta portadora de un grupo hidroxilo), grabado del vidrio de modo que la superficie tenga muchos grupos hidroxilo, por ejemplo, con ácido de Caro, o introduciendo de otro modo grupos reactivos (por ejemplo, grupos epóxido, grupos éster activados, grupos dieno o dienófilos o similares).

40 Los capilares se pueden obtener estirando tubos hechos de un material (como un termoplástico) que pueda estirarse (al menos bajo calor). Ejemplos de capilares apropiados incluyen capilares de PTFE disponibles comercialmente en Zeuss Corp, Raritan, USA.

El puente de microondas definido en la reivindicación 5 se fabrica preferiblemente mediante fusión o sinterización capa a capa y/o punto por punto (una variante de la fabricación aditiva) (que incluye los procesos mencionados anteriormente como análogos a la impresión 3D y los procesos de impresión 3D propiamente dichos).

45 Esto se refiere a un proceso en el que un material en polvo o de grano fino, o una mezcla de tales materiales, o un líquido que comprende este material o esta mezcla de materiales, se coloca en primer lugar en forma de capa fina sobre uno o varios elementos de soporte (por ejemplo, una placa resistente al calor), se funde después (por ejemplo, mediante fusión selectiva por láser) o se sinteriza (por ejemplo, por sinterización láser) con el fin de obtener una capa parcial o totalmente endurecida, cuya parte endurecida corresponde en su forma esencial o preferiblemente en su totalidad a una sección transversal del producto final, siendo posible eliminar en el caso del endurecimiento parcial (sinterización láser selectiva = SLS) un exceso de material no endurecido (que corresponde, por ejemplo, a cavidades o aberturas del producto final), respectivamente tras la fusión o sinterización de una capa o en una fase posterior (entonces el material no fundido sirve, por ejemplo, como base a la hora de aplicar nuevos materiales en polvo o de grano fino o líquidos con dichos materiales, a lo que sigue la aplicación de una nueva capa y su fusión o sinterización parcial o completa y, en su caso, la eliminación del exceso de material no fundido tal como se ha descrito anteriormente, repitiéndose estos procesos hasta completar un puente de microondas completo).

Alternativamente, en lugar del tratamiento capa a capa, se puede utilizar un proceso de impresión 3D, en el que el material se deposita y se funde/sinteriza punto por punto hasta completar el puente de microondas. Se pueden elegir,

5 por ejemplo, los siguientes procesos: chorro de aglutinante, deposición de energía dirigida, extrusión de material (especialmente según el proceso FDM de estratificación), chorro de material (que también permite la aplicación de capas laterales y, por tanto, puede ser una variante preferida, métodos híbridos (por ejemplo, proyección térmica de metal, CNC de 5 ejes, fusión intermedia, "aleaciones al vuelo"), fusión de lecho de polvo (fusión por láser o fusión por haz de electrones), laminación de hojas, fotopolimerización VAT, o (como variante líquida) producción de interfaz líquida continua, o sinterizado de alta velocidad.

10 También se consideran procesos químicos o puramente físicos, especialmente en el marco de la impresión 3D. En este caso, se pueden aplicar punto por punto o capa a capa, resinas sintéticas que pueden curarse mediante luz UV (en particular, las que pueden polimerizarse mediante radicales libres, como oligómeros o prepolímeros que contienen grupos vinilo), resinas sintéticas que pueden curarse mediante calor (por ejemplo, resinas epoxídicas con poliaminas como agentes endurecedores o isocianatos con poliaminas como agentes endurecedores), resinas epoxídicas con poliaminas como endurecedores o isocianatos con poliaminas como endurecedores) a las que se añaden metales en forma de polvo o en otra forma finamente dividida, o dispersiones de partículas de plástico/metal que pueden endurecerse por secado (unión física de las partículas).

15 Si es necesario, se puede llevar a cabo un procesamiento de acabado del puente de microondas así obtenido, por ejemplo, mediante mecanizado sustractivo, como esmerilado o fresado (por ejemplo, utilizando equipos CAD/CAM de 5 ejes) u otros procesos de mecanizado o pulido o una combinación de dos o más procesos de este tipo.

20 Unidad significa especialmente que el puente de microondas se fabrica sin piezas de conexión mediante procesos «macroscópicos» de unión y conexión, como pegado, soldadura, bloqueo positivo, como encaje, o bloqueo forzado, como sujeción, y, por lo tanto, no está compuesto de piezas, sino que puede más bien consistir en diferentes componentes y áreas de material (por ejemplo, en el caso de la línea de reflexión de microondas en forma de cable coaxial, metal conductor en el interior, material aislante en el exterior). Esto puede dar lugar a cambios en la composición de las distintas secciones. Las secciones de resonador, el oscilador y la línea de reflexión de microondas forman una pieza coherente, no una pieza fabricada a partir de piezas macroscópicas (como un resonador, una línea de reflexión de microondas y un oscilador) mediante ensamblaje.

25 El procedimiento se ejecuta preferiblemente bajo control y guiado por datos CAD/CAM, en particular mediante un procesamiento de datos adecuado, con el fin de permitir la compensación de tolerancias tras el proceso de fabricación aditiva, una buena calidad superficial y un exceso de material suficiente para su eliminación durante el acabado.

30 Los materiales para los procedimientos son metales como el oro o la plata, aleaciones (en particular CuZn37), plásticos que contienen metales y materiales de revestimiento, como puede verse en los ejemplos y en otros apartados de la descripción.

35 Preferiblemente, la permeabilidad relativa máxima de la sección del cuerpo resonante es de 1,0001 o inferior (verificado con una sonda de Förster). Con preferencia, las tolerancias del mecanizado del puente de microondas (especialmente en el cuerpo de resonancia) son del orden de la clase de tolerancia IT6, es decir, la rugosidad de la superficie corresponde a un máximo de Rz 6 (profundidad de rugosidad media en  $\mu\text{m}$ ), Ra 0,3 (valor de rugosidad central en  $\mu\text{m}$ ) sin daños visibles. La inspección visual se realiza a una distancia de 1000 mm de la lámpara bajo una lámpara de prueba con 1500 lux, distancia de visión 800 mm. Es posible un recubrimiento interno con oro de 10  $\mu\text{m}$ , oro duro de 10  $\mu\text{m}$  no magnético o Helodor 635 (una aleación de oro), que puede aplicarse como parte del proceso de fabricación 3D o de otro tipo, tal como se ha descrito anteriormente o se describirá más adelante, mediante metalización por evaporación.

40 El portamuestras, que en el caso de aplicación se utiliza dentro de la cámara de muestras (resonador), también se puede fabricar preferiblemente mediante uno de los procedimientos mencionados para el puente de microondas, en particular la impresión 3D.

45 Materiales adecuados para el portamuestras son plásticos como PTFE o vidrio de cuarzo sintético. Las impurezas con metales como Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> dan lugar a una señal de fondo, por lo que deben evitarse en la medida de lo posible.

Preferiblemente, la carcasa de un dispositivo según la invención, o partes de la carcasa, incluidos los elementos para apantallar la radiación de microondas hacia el exterior, también se pueden fabricar de forma análoga a uno de los procedimientos mencionados para la fabricación del puente de microondas o de acuerdo con los mismos.

50 Los procedimientos de fabricación mencionados también constituyen posibles objetos inventivos que pueden ser reivindicados.

Las reivindicaciones definen formas de realización de la invención según la invención, por lo que se incorporan aquí por referencia.

Ilustraciones (Figuras):

La Fig. 1 muestra a modo de ejemplo una vista esquemática sobre un dispositivo según la invención.  
 55 La Fig. 2 muestra esquemáticamente la estructura de un puente de microondas de un espectrómetro REE de un dispositivo según la invención. También se representan esquemáticamente un receptor, un generador de modulación y bobinas magnéticas.

La Fig. 3 muestra un diagrama de bloques de un dispositivo según la invención en forma de un espectrómetro REE.

Fig. 4: Representación gráfica de la 1ª derivada de las señales de RPE para la sonda de espín y el compuesto de tritilo para medir los radicales O<sub>2</sub> y la concentración de oxígeno.

5 La Fig. 5 muestra la diferencia en la generación de ERO entre la medición con y sin inhibición en el marco de una muestra de sangre.

Los siguientes ejemplos sirven como forma de realización especial para ilustrar la invención sin limitar su alcance.

Ejemplo 1:

Un dispositivo según la invención para medir parámetros vitales 1 se muestra a modo de ejemplo en la figura 1.

10 En su interior se encuentra un puente de microondas 2 como se muestra en la figura 2. Éste comprende el resonador 2a, el oscilador 3 (como generador de microondas) y una línea de reflexión de microondas 4 y, según la invención, está fabricado en una sola pieza mediante impresión 3D.

15 En caso de aplicación, el oscilador 3 como fuente de radiación genera microondas en el rango de 9-10 GHz (banda X). La frecuencia de las microondas se mantiene constante durante una medición y se guía a través de la línea de reflexión de microondas 4, diseñada como guía de ondas o, en el ejemplo, como cable coaxial, hasta la cámara de muestras 5, que contiene el portamuestras (no mostrado), con una anchura de separación magnética entre las superficies enfrentadas de los imanes 6 de 10 a 14 mm, por ejemplo, de 12 mm. La cámara de muestras 5 contiene un resonador hueco (resonador 2a) (con el espacio real para la muestra) de forma rectangular (o alternativamente cilíndrica) y forma la así llamada cavidad. Se encuentra entre los dos polos magnéticos 6 de imanes permanentes de 2 kg de peso con un diámetro de polo de 60 mm y una intensidad de campo, en el ejemplo, de 0,3476 T (3476 G), a los que están conectadas dos bobinas magnéticas 6a para modular el campo (también se podrían utilizar electroimanes en lugar de los imanes permanentes). Mediante un acoplamiento adecuado (sintonización) se crea durante el proceso de medición una onda estacionaria. Dado que el cambio de amplitud de dicha onda sería demasiado pequeño para lograr una relación señal-ruido adecuada con una sola exploración lineal del campo magnético, el campo magnético se modula adicionalmente durante el proceso de medición de un campo inferior a uno superior (exploración), por ejemplo, a 100 kHz. La amplitud de la oscilación (la intensidad del campo magnético por barrido puede variar en el rango de 0 a 0,005 T (50 Gauss)) mediante un generador de modulación 7.

25 Si se cumple la condición de resonancia para electrones no apareados, el sistema absorbe la radiación de microondas, que puede medirse mediante un receptor 8.

30 Durante una medición según la invención, la muestra biológica se introduce en la cámara de muestras 5 por medio de un capilar 9 en el portamuestras (no destacado) que lo rodea, que según la invención está hecho de plástico permeable a los gases (en particular al oxígeno), en este caso teflón, o se aporta a la cámara de muestras 5 con el portamuestras dispuesto en ella (no mostrado) o se conduce a través de la misma (por ejemplo, mediante una bomba peristáltica). Se puede medir en el flujo (por ejemplo, 10 µL/seg) o sin flujo. El capilar 9 presenta un volumen de medición y de muestra en el área de la cámara de muestras 5 y en la zona de medición existente en la misma de 30 µl, en el ejemplo, de 10-12 µL. El capilar 9, diseñado, por ejemplo, como capilar desechable, tiene un diámetro exterior de, por ejemplo, 1,20 mm,

40 El portamuestras (no representado), aquí en forma de un tubito de cuarzo con un capilar interno 9, se inserta en el portamuestras del resonador 2a de manera que llegue a situarse en la zona del campo magnético máximo de la onda estacionaria. La temperatura de la muestra se controla mediante termoestabilización en la superficie exterior del portamuestras bombeando a través de él aire calentado a 36,6 +/- 0,1 °C. La termoestabilización de la muestra se produce tras sólo 20-30 segundos debido a la diferencia de volumen de material que es de aproximadamente 3 veces. La introducción de una mezcla gaseosa con una concentración correspondiente de O<sub>2</sub> (4,0%), N (95,5%)<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (0,5%) en el soporte del capilar a un caudal de 0,6 mL/min permite alcanzar la concentración fisiológica de pO<sub>2</sub> de 5332,88 +/- 133,322 Pa (40 +/- 1 mmHg) de la muestra biológica, que se encuentra en el capilar permeable al gas, en 20-30 segundos.

La figura 3 muestra un diagrama de bloques de las partes esenciales de un dispositivo según la invención para medir la actividad metabólica/intensidad respiratoria "Prueba de Vitalidad", medida en base a la formación de ERO.

50 El puente de microondas 2 conduce las oscilaciones electromagnéticas generadas durante una medición a la cámara de muestras 5 con el resonador 2a entre los polos magnéticos 6a. Una unidad de control de campo magnético 11 controla el campo magnético aplicado al campo de los imanes permanentes 6 por las bobinas magnéticas 6a, con el apoyo de un sensor Hall (no mostrado), que mide el campo magnético. Mediante una unidad de control de gas 12, se ajusta y controla la presión parcial de oxígeno a través del conducto de gas 13, y mediante una unidad de control de temperatura 14, se ajusta y controla la temperatura aportando aire templado a través del conducto de aire 15.

55 Una muestra biológica (por ejemplo, sangre humana entera) se introduce en el capilar 9 (aquí permeable al gas) (ambos no mostrados en la figura 3) por medio de una pipeta. La muestra biológica se disuelve en un tampón adecuado que contiene una sustancia de zona de espín de la clase de las hidroxilaminas cíclicas (p. ej. 1-hidroxi-4-fosfono-oxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidina = PPH o 1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina = CMH; ambos Noxygen GmbH, Elzach, Alemania) en la concentración final de 200µM); se mezcla y se coloca en la cámara de muestras 5 en

el portamuestras contenido en la misma (no mostrado). Para el análisis simultáneo de la concentración de oxígeno o del consumo de oxígeno, además de la formación de ERO, se puede añadir una etiqueta sensible al oxígeno (spin) (NOX.15.1 (igual a tris(8-carboxil-2,2,6,6-tetrametilbenzo-[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]ditiol-4-il)sal sódica de metilo, conocida comúnmente como «trityl-radical»; Noxygen GmbH, Elzach, Alemania). Alternativa y preferiblemente, al menos la muestra de espín o la etiqueta (de espín) sensible al oxígeno, o ambas, están unidas a la pared del capilar.

La preparación de la muestra para una medición se realiza de la siguiente manera: de prepara el tampón Krebs-HEPES (KHB). Para ello, el polvo de KHB (concentración final 20mM) se disuelve en 0,5 l de agua EPR (Noxygen). El pH se ajusta a 7,4 antes de cada uso para que el polvo se disuelva (36% HCl, aproximadamente 600 µl por 0,5 l KHB). El tampón se filtra con un filtro de 0,22 µm y se puede almacenar de forma alícuota en el congelador a +4 °C durante un máximo de 4 semanas.

Se preparan soluciones madre de CMH en KHB (pH 7,4) con 25 µM de deferoxamina y 5 µM de dietiltiocarbamato (DETC) (ambos se unen a los iones metálicos y evitan así una reacción de Fenton). Por cada 100 ml de deferoxamina/DETX-KHB se disuelven:

$$1. \text{ DETC (MG} = 225,31 \text{ g/mol): } 5\mu\text{M} = 5 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \times 225,31 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,00112 \frac{\text{g}}{\text{l}} = 0,112 \frac{\text{mg}}{100\text{ml}}$$

1.12 mg de DETC se disuelven en 100 ml de KHB.

Se extraen 10 ml de esta solución y se añaden 90 ml de KHB.

$$25 \mu\text{M} = 25 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \times 656,79 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,0164 \frac{\text{g}}{\text{l}} = 1,64 \frac{\text{mg}}{100\text{ml}}$$

2. Deferoxamina (MG = 656,79 g/mol):

Se añaden 1,64 mg de deferoxamina a la solución DETC/KHB.

Las puntas de pipeta a utilizar se recubren con heparina antes de su uso. Se recogen 20 µl de sangre capilar con la pipeta heparinizada. Con un agitador de muestras se mezcla brevemente (2 a 3 segundos) en un vaso Eppendorf.

A continuación, se mide con el espectrómetro REE la producción de ERO y O<sub>2</sub>, tal como se ha descrito.

Para la detección de REE se seleccionan los siguientes ajustes del espectrómetro de REE: campo central 2,0 g, energía de microondas 20 mW, amplitud de modulación 2,0 G, tiempo de barrido 5,4 segundos (10 exploraciones), barrido de campo 60 G.

Alternativamente, la sustancia de la sonda de espín puede unirse covalentemente al interior del capilar 9.

Una unidad de canal de señales 16 recibe la señal de medición de un receptor 8 (véase la figura 2) y la convierte (de forma reproducible una pantalla o un trazador de gráficos, ambos no mostrados) en un espectro 17, en cuyo eje x se representa la intensidad de campo magnético B<sub>0</sub> y en cuyo eje y se representa la intensidad de absorción (aquí como primera derivada). La correspondiente representación gráfica del espectro se muestra de nuevo ampliada en la figura 4. En ella se pueden apreciar las señales ERO (tres flechas que parten de la molécula de sonda de espín izquierda) y la señal para el contenido de oxígeno (flecha que parte del compuesto trítulo mostrado a la derecha). La línea continua corresponde a la señal obtenida para la medición de las ERO (sonda de espín), la línea discontinua a la señal para el oxígeno (basada en el radical trítulo). La información obtenida sobre los picos determinados de este modo (en particular la intensidad de la señal) permite generalmente una determinación relativa (o, si se utilizan curvas de calibración, también cuantitativa) de las ERO y del O<sub>2</sub> de las muestras biológicas

Por ejemplo, en una variante del ejemplo, las señales de medición se convierten automáticamente en información sobre las concentraciones de radicales por medio de un ordenador programado (en su caso, por medio de una o varias curvas de calibración).

La unidad de control de gas 12 y la unidad de control de temperatura 14 sirven para ajustar la temperatura y la presión parcial de oxígeno, que también contienen sensores correspondientes (no mostrados), están integradas en el dispositivo según la invención y mantienen la temperatura en el portamuestras y, por consiguiente, en el capilar 9 en el rango de 36,6 °C +/- 0,1 °C y la presión parcial de oxígeno en el rango de 5332,88 +/- 266,644 Pa (40 mmHg +/- 2 mmHg) durante un proceso de medición. Por lo tanto, las condiciones fisiológicas durante la medición son las que se registran en un vaso capilar del cuerpo del sujeto.

La descripción anterior del ejemplo mezcla elementos de uso (del procedimiento) y del dispositivo, pero cuando se utilizan características orientadas al uso/procedimiento, siempre debe asumirse que, con respecto al dispositivo, se quiere decir que el dispositivo está configurado de forma correspondiente o que presenta los componentes mencionados.

Ejemplo 2: Medición diferencial con y sin efector.

5 Cuando se utiliza la sonda de espín CMH, que representa la formación total de especies reactivas de oxígeno (intracelular y extracelular), se obtienen para los radicales valores de entre 240 nM/seg y 300 nM/seg. A este tipo de análisis lo llamamos prueba de "vitalidad". La medición repetida de otra parte de la muestra de sangre con la adición previa de antimicina A (10µM de concentración final), que provoca el bloqueo del complejo III y, por tanto, de la transferencia de electrones dentro de la cadena respiratoria mitocondrial y bloquea así la formación mitocondrial de especies reactivas de oxígeno, da lugar a una reducción del 10 al 20% en la formación de ERO. (Ajustes REE como en el ejemplo 1).

10 La figura 5 muestra esquemáticamente y a modo de ejemplo una diferencia de la generación de ERO entre la medición con (línea discontinua) y sin inhibición (tres flechas, línea continua) en el marco de la medición de una muestra de sangre ("Prueba de Vitalidad Extendida") como la que se acaba de describir.

## REIVINDICACIONES

1. Utilización de un dispositivo de REE para la caracterización diferencial de al menos dos estados diferentes de una muestra biológica, en la que
- 5 - midiéndose en un primer paso especies reactivas de oxígeno (ERO), especies reactivas de nitrógeno (ERN) o ambas y/o mediante compuestos por medio de REE y una sonda de espín en forma de una hidroxilamina no cargada o cíclica portadora de grupos negativos, que, debido a la adición de oxígeno, muestran diferentes anchuras del pico o de los picos de absorción REE con ensanchamiento al aumentar la concentración de oxígeno en función de la presión parcial de oxígeno sin reacción química, es decir, por interacciones puramente físicas que surgen debido a la proximidad de diferentes cantidades de oxígeno, la concentración de oxígeno de la muestra biológica sin adición de efectores y
- 10 - midiéndose en un segundo paso, las ERO, las ERN o las ERO y las ERN de la misma muestra biológica por medio de REE utilizando una sonda de espín en forma de una hidroxilamina no cargada o cíclica portadora de grupos negativos, respectivamente con la adición de efectores,
- 15 - siendo posible que la secuencia de los pasos primero y segundo también pueda ser arbitraria;
- y/o
- obteniéndose como consecuencia de al menos dos mediciones de REE de la muestra biológica con diferentes sondas de espín, que pueden alcanzar de distintas maneras el líquido extracelular, el líquido intracelular y el interior de las mitocondrias, con o sin determinación de la concentración de oxígeno mediante compuestos que muestran ensanchamiento de un pico de la absorción de REE con el aumento de la concentración de oxígeno debido a la adición de oxígeno en función de la presión parcial de oxígeno, sin reacción química, es decir, por interacciones puramente físicas que surgen debido a la proximidad de diferentes cantidades de oxígeno, diferentes resultados de medición;
- 20 y sacándose respectivamente conclusiones mediante la comparación de los distintos resultados de la medición acerca de la diferencia en cuanto a la vitalidad o salud de un paciente o sujeto sano del que procede la muestra biológica;
- 25 ajustándose para la medición una temperatura en la muestra biológica del orden de 36 a 44 °C y una presión parcial de oxígeno del orden de 2666,44 - 7332,71 Pa;
- y
- 30 entendiéndose por "efectores", allí donde se mencionan, inhibidores o activadores u otros moduladores de enzimas, sistemas enzimáticos u orgánulos que influyen en la formación de ERO y/o ERN.
2. Utilización según la reivindicación 1, realizándose la medición mediante un dispositivo portátil según la reivindicación 4.
- 35 3. Utilización según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada por que se utiliza un dispositivo portátil según la reivindicación 5.
4. Dispositivo portátil (1) para la medición de parámetros vitales, que comprende un dispositivo REE con un resonador (2a) con un portamuestras insertado con un capilar (9) para la recepción de una muestra biológica, caracterizado por que el capilar (9) del portamuestras es permeable al gas, al menos para el oxígeno, y por que en el dispositivo están integrados elementos de control de la temperatura y de la presión parcial de oxígeno y elementos para la regulación de la temperatura y de la presión parcial de oxígeno, que están configurados para ajustar la temperatura en la muestra biológica en un rango de 36,6 +/-0,5 °C y la presión parcial de oxígeno en un rango de 4666,27-6666,10 Pa en el intervalo de medida.
- 40 45 5. Dispositivo portátil (1) según la reivindicación 4, caracterizado por que el dispositivo REE comprende un puente de microondas (2), que comprende el portamuestras insertado, el resonador (2a), un oscilador (3) y una línea de reflexión de microondas (4), que puede diseñarse como un cable coaxial, producido respectivamente capa a capa y/o punto por punto como una unidad por fusión y/o sinterización y/o conversión química y, en el caso de la utilización de dispersiones de partículas de plástico/metál, en un proceso de secado.
- 50 6. Dispositivo según una de las reivindicaciones 4 o 5, caracterizado por presentar 4 o más de las siguientes características:
- 55 - rango de medición de 100 a 500 nmol/seg, en particular de 150 a 360 nmol/seg, preferiblemente de 240 a 300 nmol/seg;
- precisión (relación señal/ruido) preferiblemente del 5 % o mejor;
- resolución igual o superior a  $3 \times 10^{-4}$  T;
- estabilidad de campo durante 1 hora  $> 3 \times 10^{-5}$  T;
- 60 - sensibilidad de  $< 5$  nM/min;
- copia de seguridad automática de datos para asegurar los datos;
- interfaz USB u otra interfaz común;
- software de adquisición de datos que controla el dispositivo, registra los resultados de las mediciones y que, en caso de desearlo, también los puede analizar;
- 65 - separación galvánica entre la interfaz de datos y la fuente de alimentación.

7. Dispositivo según una de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado por tener un peso en el rango de 5 a 20 kg, preferiblemente de 7 a 10 kg, y por que el tamaño es de (200-500) x (100 a 350) x (100 a 350 mm).
- 5 8. Dispositivo según una de las reivindicaciones 4 a 7, caracterizado por tener un consumo de energía de menos de 100 W, por ejemplo, de 20 a 50 W.
9. Dispositivo según una de las reivindicaciones 4 a 8, caracterizado por presentar un grupo de construcción de campo magnético que presenta al menos 2 de las siguientes características:
- 10 - imán permanente (6) con un diámetro del polo magnético de 40 a 70 mm;  
- bobinas (6a) para modificar la densidad de flujo magnético en un rango de +/- 0,1 G (+/-0,01 mT) a +/- 0,5 G (+/- 0,05 mT);  
- diámetro del campo magnético que define la zona de medición de 10 a 30 mm;  
- distancia entre los polos magnéticos (6, 6a) de 10 a 30 mm;  
- precisión dimensional reproducible 10  $\mu$ m, redondez 3  $\mu$ m;
- 15 - peso del imán de 1 a 5 kg.
10. Dispositivo según una de las reivindicaciones 4 a 9 con polos magnéticos (6, 6a), caracterizado por que el resonador, medido en la dirección entre sus polos magnéticos, tiene un tamaño de 8 a 10 mm, presenta una abertura para un portamuestras de 3 a 5 mm de diámetro, y por que el capilar (9) tiene un diámetro de 0,5 a 2, en particular de 1,2 a 1,5 mm.
- 20 11. Dispositivo según una de las reivindicaciones 4 a 10, caracterizado por estar previsto para una cantidad de muestra en el rango de medidas de 5 a 30  $\mu$ l, especialmente de 8 a 15  $\mu$ l, por ejemplo, de 10  $\mu$ l.
- 25 12. Dispositivo según una de las reivindicaciones 4 a 11, caracterizado por presentar un capilar (9) recubierto con al menos una sonda de espín para la medición de ERO y/o ERN y/o al menos una etiqueta de espín sensible al oxígeno para la medición del contenido de oxígeno en el interior.
- 30 13. Dispositivo según una de las reivindicaciones 4 a 12, caracterizado por que su portamuestras está configurado para la medición simultánea de dos o más muestras biológicas idénticas o diferentes mediante un número correspondiente de cámaras de muestras (5) o la recepción de dos o más capilares en una única cámara de muestras (5).
- 35 14. Utilización según la reivindicación 2 de un dispositivo portátil conforme a su definición en una de las reivindicaciones 4 a 13 para la determinación de especies reactivas de oxígeno (ERO), oxígeno y/o especies reactivas de óxido de nitrógeno (ERN) en una muestra biológica, empleándose al menos una hidroxilamina cíclica como sonda de espín, realizándose las mediciones mediante mediciones de absorción REE, almacenándose y/o visualizándose las señales de medición y evaluándose las mismas preferiblemente de forma automática.

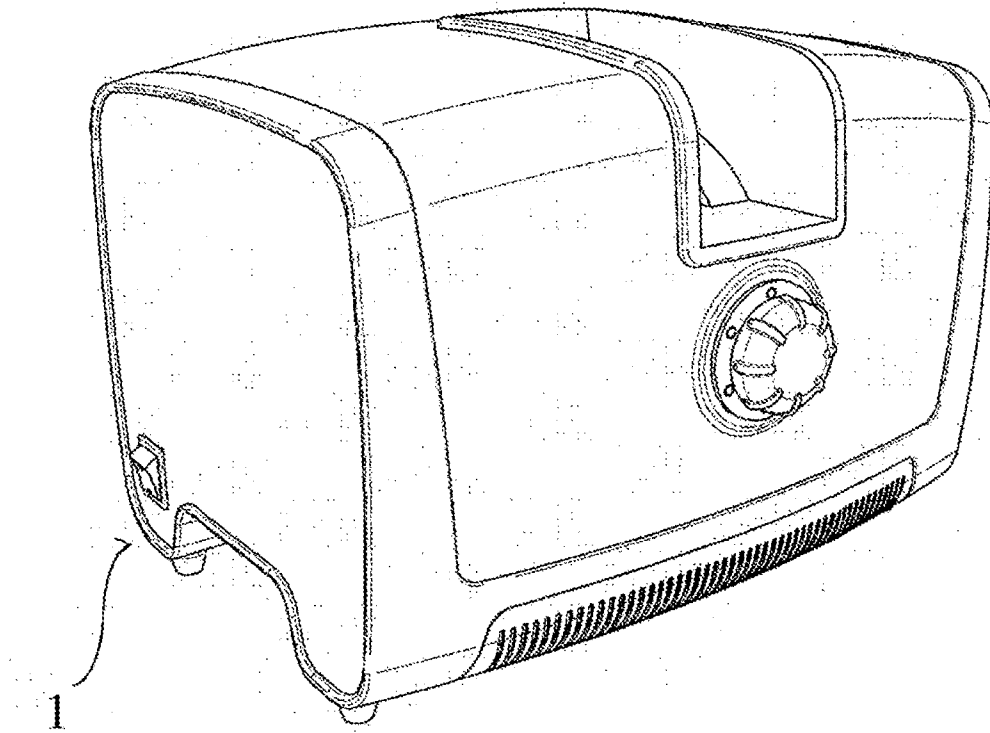


Fig. 1

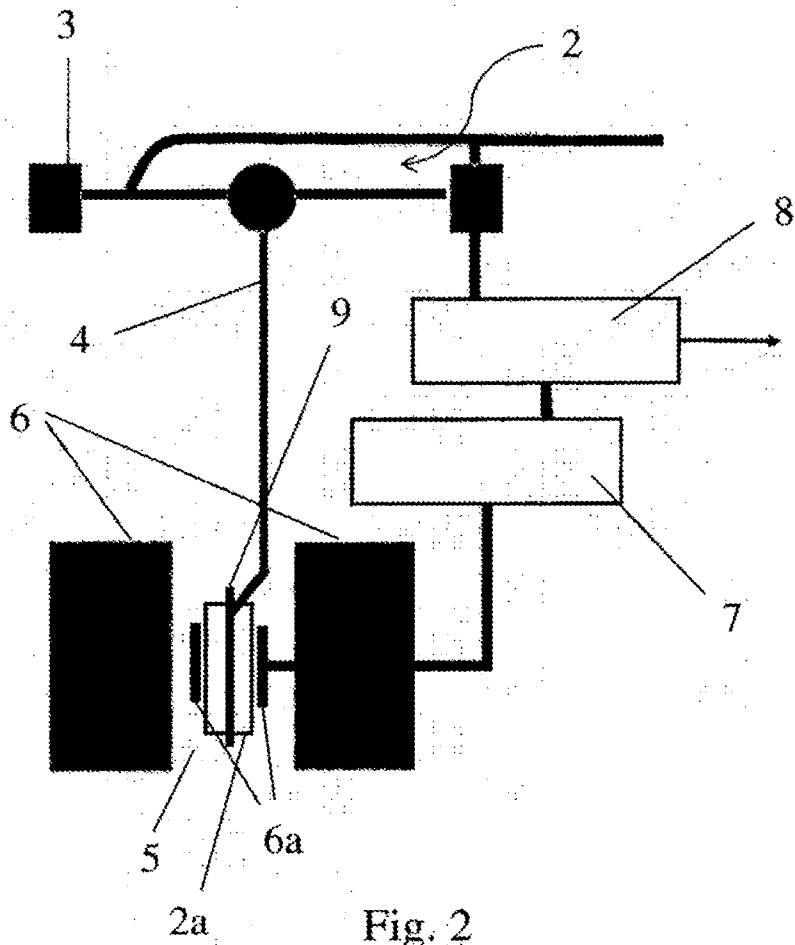


Fig. 2

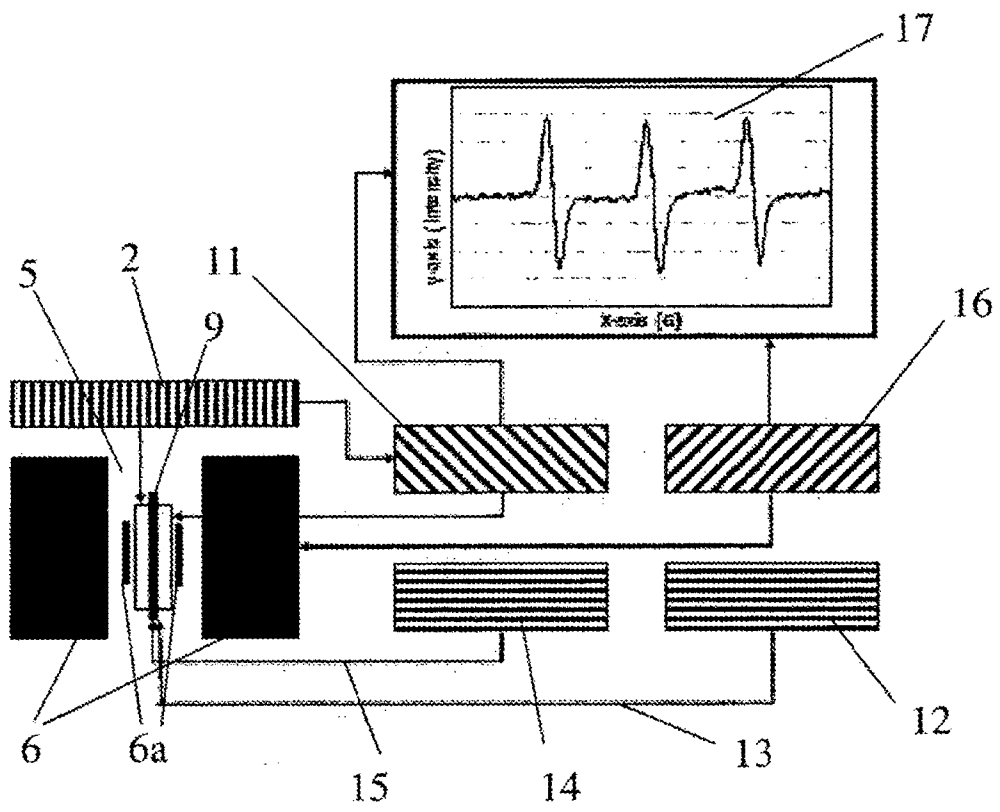


Fig. 3

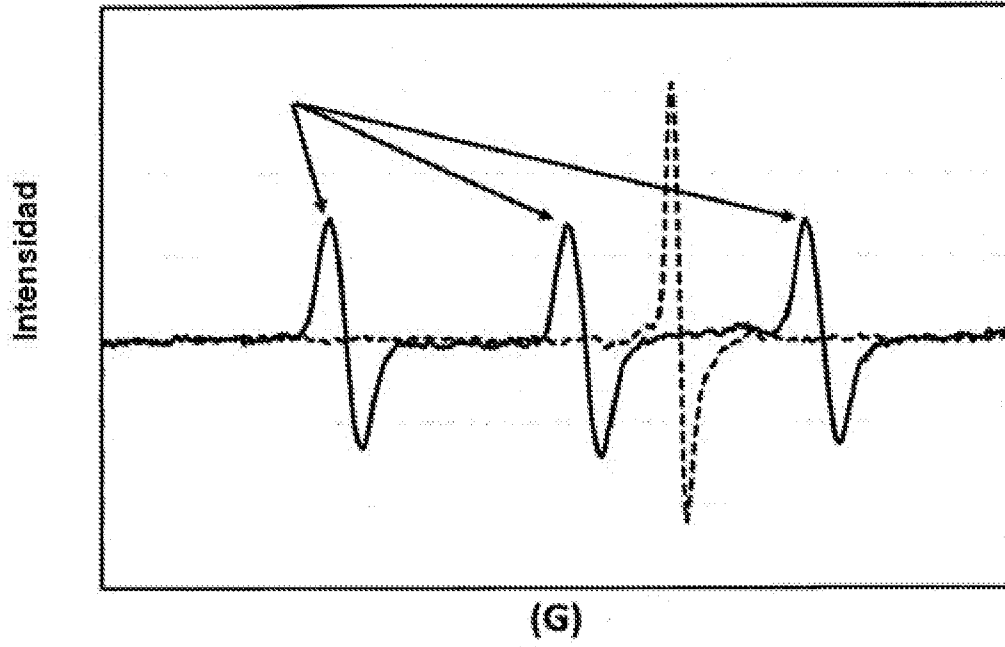


Fig. 4

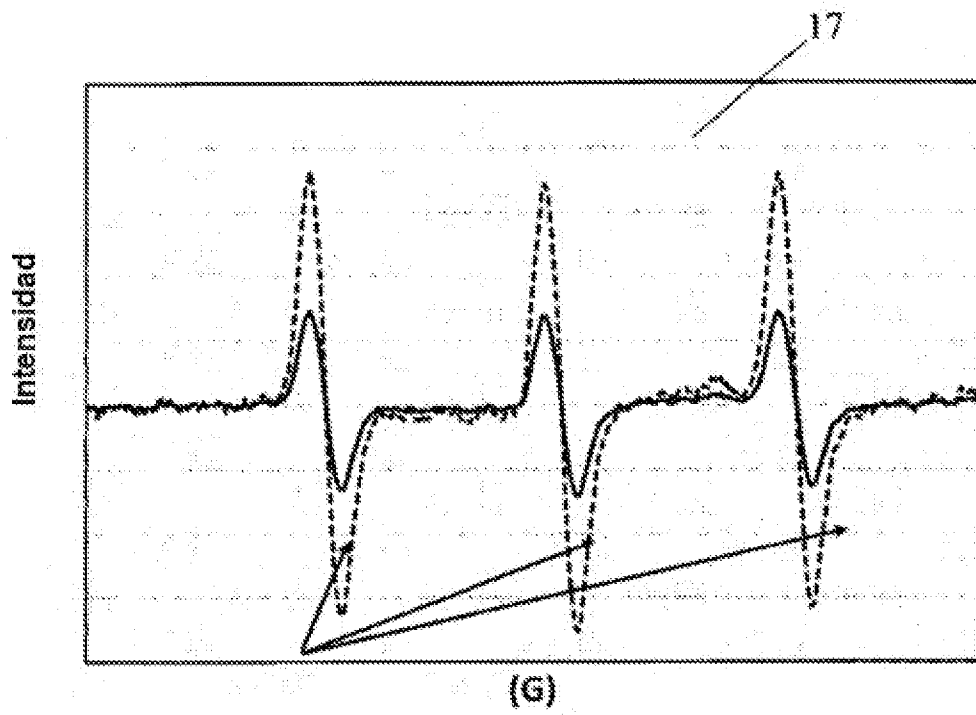


Fig. 5