

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 868**

51 Int. Cl.:
G01N 25/48 (2006.01)
G01K 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **00942915 .0**
96 Fecha de presentación: **15.06.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1194766**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.04.2002**

54 Título: **Sistema y procedimiento para un calorímetro mejorado para determinar propiedades termodinámicas de reacciones químicas y biológicas**

30 Prioridad:
17.06.1999 US 336668

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.08.2012

73 Titular/es:
**LIEBERMAN, DAVID S.
9192-C REGENTS ROAD
LA JOLLA, CA 92037, US**

72 Inventor/es:
Lieberman, David S.

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 385 868 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

Sistema y procedimiento para un calorímetro mejorado para determinar propiedades termodinámicas de reacciones químicas y biológicas.

5

[0001] Esta invención se ha hecho con el apoyo del gobierno con la subvención de la NSF n° BIR 9513629 concedida por la National Science Foundation. El gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

Antecedentes de la invención

10

Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere en general a un sistema y procedimiento para un calorímetro mejorado, y más específicamente, a un sistema y procedimiento para un calorímetro mejorado para determinar propiedades termodinámicas de reacciones químicas y biológicas.

15

Técnica relacionada

[0003] La absorción de calor y/o liberación de calor es ubicua en las reacciones químicas y biológicas. La información termodinámica que caracteriza estas reacciones se mide directamente mediante calorimetría. La información termodinámica proporciona conocimiento de las fuerzas moleculares que dirigen estas reacciones.

20

[0004] Los calorímetros convencionales usados para medir reacciones químicas y biológicas, en general comprenden una celda de fluido y una jeringa de inyección. La celda de fluido se carga con una muestra de receptor líquida. Un ejemplo de una muestra de receptor es una disolución de proteína. La celda de fluido después se pone entonces en una cámara cilíndrica llena de líquido, en la que posteriormente se hacen las mediciones de temperatura.

25

[0005] La jeringa de inyección se carga con un ligando, tal como un fármaco que se une a la muestra de receptor cuando se inyecta en la celda de fluido. Después se inyecta un volumen conocido de la disolución de ligando en la celda de fluido que contiene la disolución de muestra de receptor. Cuando esto ocurre, las disoluciones de muestra de ligando y receptor se unen, lo cual produce calor que se va a liberar. Mediante las realizaciones de esta invención, los calorímetros usados para estudiar las muestras en estado sólido de película fina como describen, por ejemplo, Denlinger, y col., "Thin film microcalorimeter for heat capacity measurements from 1.5 to 800K," American Institute of Physics, *Rev. Sci. Instrum.* 65 (4):946-959, (April 1994), así como las narices electrónicas como en Koll, A. y col., "Micromachined CMOS Calorimetric Chemical Sensor with On-chip Low Noise Amplifier", IEEE International MicroElectromechanical Systems Conference, New York, NY; IEEE, 1999 pág. 547-551), se usan de una forma que hacen obsoletos los calorímetros convencionales descritos antes. Cuando esto ocurre, las disoluciones de muestra de ligando y receptor se unen, lo cual produce calor que se va a liberar.

30

35

40

[0006] Los termómetros, dentro de la cámara cilíndrica llena de líquido, miden con precisión la cantidad de calor liberado durante este procedimiento. Esta información se registra, y se repiten las etapas de inyección y medición. Este procedimiento continúa hasta que ya no se libera más calor. Esto indica que se han llenado todos los sitios de unión. Una vez completado el procedimiento entero, los científicos pueden determinar las propiedades termodinámicas asociadas con las dos moléculas que interaccionan.

45

[0007] Es decir, debido a que se conocen los volúmenes exactos de las muestras, así como la cantidad precisa de calor liberado, los científicos pueden determinar propiedades tales como la constante de equilibrio de unión, la relación de moléculas que participan en la reacción (estequiometría), y el calor de unión. Típicamente, estas propiedades se determinan construyendo una curva de unión que comprende múltiples puntos de datos que se obtienen de cada una de las reacciones como se ha descrito antes.

50

[0008] El problema con los calorímetros químicos/biológicos convencionales es que el procedimiento anterior es muy meticuloso y requiere mucho tiempo. Además, la sensibilidad de los sistemas actuales es bastante limitada. Por ejemplo, típicamente los sistemas actuales no pueden medir constantes de unión-disociación inferiores a 10^{-8} (o constantes de unión-afinidad superiores a 10^8). Hay que indicar que la expresión "constante de unión" en lo sucesivo se define como la constante de disociación. Sería conveniente aumentar la sensibilidad de los calorímetros químicos/biológicos de modo que se puedan detectar y medir las constantes de unión menores.

60

[0009] Además, el estado actual de la técnica de los calorímetros requiere volúmenes de muestra relativamente grandes, del orden de un mililitro. El uso de estos volúmenes de muestra grandes puede ser muy caro, en especial para operaciones a gran escala, tal como el cribado farmacéutico de fármacos de alta capacidad. Además también, los sistemas actuales requieren que las disoluciones sean más diluidas a medida que aumentan las constantes de unión de los sistemas

65

[0010] Además, los volúmenes grandes de muestra requeridos por los calorímetros actuales impide el estudio de determinados fenómenos. Por ejemplo, muchas proteínas, tales como factores de transcripción, existen en cantidades relativamente pequeñas en la célula. Además, la amplificación no es posible hasta que un gen es clonado y se ha desarrollado un sistema de expresión. Por consiguiente, los científicos no pueden estudiar las propiedades termodinámicas de dichas proteínas usando los sistemas actuales.

[0011] Por consiguiente, lo que se necesita es un sistema y procedimiento para determinar las propiedades termodinámicas de reacciones biológicas y químicas, que se pueda llevar a cabo usando volúmenes inferiores, pueda detectar constantes de unión inferiores, y se pueda llevar a cabo de forma más eficaz y económica que los sistemas de calorímetros químicos/biológicos convencionales.

Resumen de la invención

[0012] De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para determinar las propiedades termodinámicas de una muestra química/biológica usando un sistema que comprende una cámara ambiental y un calorímetro microelectrónico que tiene un soporte de muestra acoplado a un termómetro, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de: introducir la muestra en una cámara ambiental dispensando la muestra sobre el soporte de muestra; estimular la primera muestra; y determinar una o más propiedades termodinámicas de la muestra usando el termómetro para medir la temperatura que resulta de dicha etapa de estimulación;

caracterizado porque

la cámara ambiental se equilibra de forma que la presión de vapor dentro de la cámara está dentro de un umbral predeterminado en relación con la presión de vapor de la muestra.

[0013] De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un sistema para determinar las propiedades termodinámicas de un primer conjunto de muestras que comprende: una cámara ambiental; una primera matriz que comprende una pastilla que comprende una pluralidad de calorímetros para soportar el primer conjunto de muestras, en el que cada calorímetro comprende: una estructura térmicamente aislada dentro de un marco; un termómetro montado en dicha estructura; y una superficie de muestra para recibir dichas muestras; caracterizado porque, la cámara ambiental está dispuesta para mantener una presión de vapor similar a la presión de vapor del primer conjunto de muestras.

[0014] La presente invención posibilita un sistema y procedimiento para determinar las propiedades termodinámicas de reacciones biológicas y químicas que se van a producir, en el que las reacciones se pueden llevar a cabo usando volúmenes mucho menores, y pueden detectar constantes de unión inferiores que los sistemas actuales. Además, el sistema y procedimiento de la presente invención se pueden llevar a cabo de forma más eficaz y económica que los sistemas de calorímetros químicos/biológicos convencionales. Por ejemplo, la determinación de la constante de equilibrio de unión usando técnicas de valoración convencionales que implican múltiples inyecciones, puede tardar en completarse del orden de 1 hora. Usando la técnica del perfil termodinámico como se describe a continuación, las constantes de equilibrio de unión se calculan en segundos o minutos.

[0015] En el funcionamiento, la presente invención aumenta espectacularmente la sensibilidad de los calorímetros usados para estudiar los sistemas químicos y biológicos. Esto incluye el estudio termodinámico de las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN, la termodinámica y cinética de la unión de fármacos tanto para las proteínas como el ADN, los estudios de ocupación de fármacos y los estudios de plegado de proteínas.

[0016] Una ventaja de la presente invención es que puede medir muestras que son al menos 1000 veces más pequeñas que los sistemas convencionales. Además, una ventaja de la presente invención es que puede determinar propiedades termodinámicas de muestras con una precisión relativa y absoluta muy alta a partir de mediciones resueltas en el tiempo.

[0017] Otra característica es que muchos calorímetros se pueden hacer de forma barata debido a la naturaleza intrínsecamente paralela de las técnicas de fabricación de semiconductores. Muchas aplicaciones nuevas se basan en la capacidad de hacer un gran número de dispositivos coincidentes en una sola pastilla con interconexiones construidas en la misma. Por ejemplo, en una realización encajan 24 dispositivos en una pastilla de 10,16 cm. En otra realización, se reduce 10 veces la escala de los dispositivos de forma que 2400 dispositivos individuales encajan en una sola pastilla. La miniaturización de los dispositivos a tamaños incluso menores es fácil y depende solo de las técnicas de fabricación usadas para implementar la presente invención.

[0018] Una ventaja de la presente invención es que puede medir tanto la capacidad calorífica como la entalpía de los sistemas químicos y biológicos en un solo experimento usando un solo dispositivo. De esta forma, se pueden obtener constantes de unión mucho más rápido que en los sistemas convencionales que requieren múltiple experimentación, tales como las técnicas de valoración convencionales usando el análisis de curvas de unión.

[0019] Como se ha expuesto, la presente invención requiere volúmenes de muestra mucho menores para determinar las propiedades termodinámicas de sistemas químicos y biológicos. Específicamente, los volúmenes de

muestra están en el intervalo de nanolitros e inferiores, más que de mililitros como se encuentra en los sistemas convencionales. Por lo tanto, una ventaja de la presente invención es que puede aceptar volúmenes de muestra tres órdenes de magnitud inferiores de lo que es posible usando los sistemas convencionales.

5 **[0020]** Los volúmenes de muestra más pequeños y en consecuencia el equilibrio térmico más rápido permiten el examen en dominios de tiempo más cortos de lo que actualmente es posible. A diferencia de los calorímetros químicos/biológicos actuales, una ventaja de usar la presente invención es que proporciona la capacidad de examinar el dominio de tiempo de la liberación de calor. Esta ventaja posibilita las caracterizaciones termodinámicas resueltas en el tiempo directas. Por lo tanto, por ejemplo, la presente invención se puede usar para determinar las
10 propiedades termodinámicas asociadas con el plegado de proteínas, liberación de calor de una sola célula, las propiedades termodinámicas de motores moleculares, la dinámica molecular de organización de polímeros y la recuperación enzimática de sustrato.

[0021] La presente invención mejora aplicaciones tradicionales tales como la calorimetría diferencial de barrido y la
15 calorimetría de flujo detenido. Además, la presente invención se puede implementar usando matrices calorimétricas para facilitar y hacer posible operaciones a gran escala, tales como el cribado farmacéutico de fármacos de alta capacidad, y similares.

[0022] El microcalorímetro de la presente invención se basa en microcalorímetros existentes usados en la industria
20 electrónica para medir muestras de película fina de materiales magnéticos y superconductores. La presente invención proporciona mejoras y modificaciones importantes a dichos microcalorímetros convencionales, de modo que dichos sistemas se pueden usar eficazmente con sistemas químicos y biológicos.

[0023] Dichas mejoras incluyen un estilo de termómetro mejorado para aumentar la sensibilidad frente a los
25 intervalos de temperatura mucho más estrechos necesarios para los sistemas biológicos. Por ejemplo, los estudios realizados en sistemas biológicos se llevan a cabo predominantemente a temperatura ambiente, mientras que los estudios que usan películas finas están en el intervalo de aproximadamente 4 K a cientos de grados Celsius.

[0024] La presente invención proporciona una cámara ambiental que es vaciada y humidificada para controlar la
30 evaporación y el calor de vaporización asociado. Además, la presente invención proporciona una plataforma de muestra mejorada de modo que los microcalorímetros se pueden apilar (es decir, "intercalar" entre sí) para crear un entorno semiadiabático que es necesario para el trabajo en vapor de agua saturado (a diferencia del sistema convencional que opera a vacío). Otras mejoras del sistema incluyen crear matrices de dispositivos en una sola pastilla de silicio para operaciones a gran escala eficaces.

[0025] El microcalorímetro de la presente invención se fabrica preferiblemente en una instalación de fabricación de
35 microelectrónica. Específicamente, el dispositivo microcalorímetro de la presente invención comprende una membrana fina de nitruro de silicio amorfo (Si_3N_4) anclada a un marco de silicio. Se deposita una capa de conducción térmica en la parte central de la membrana. Los termómetros y calentadores están en un lado de la capa de conducción térmica y las muestras se ponen en el otro. Se usan técnicas de fabricación de microelectrónica
40 estándar para construir el dispositivo calorímetro microelectrónico.

[0026] Una cámara ambiental se configura preferiblemente para minimizar la conducción térmica desde el o los
45 calorímetros a la misma. Esto se lleva a cabo eliminando el aire de la cámara y después humidificando la cámara a una presión de vapor adecuada, de modo que la unión térmica es solo a través del vapor de agua.

[0027] La presión de vapor de agua se controla. Un procedimiento para controlar la presión de vapor de agua es
montar un manómetro de capacitancia en la cámara. Preferiblemente, la dispensación de la muestra se lleva a cabo usando robótica. Se pone una primera muestra sobre la membrana de un primer calorímetro. Se pone una segunda
50 muestra sobre la membrana de un segundo calorímetro. Las muestras se combinan invirtiendo un calorímetro y poniéndolo en la parte superior del segundo calorímetro. La tensión superficial es suficiente para hacer que las muestras de volumen ultrabajo no caigan de las superficies de los calorímetros.

[0028] En una realización, se usa una concha de almeja para combinar la primera y la segunda muestra. Se une
55 un primer calorímetro (o un conjunto de calorímetros) a una superficie interior de la concha de almeja. Se une un segundo calorímetro (o un conjunto de calorímetros) a la otra superficie interior. La concha de almeja se configura de modo que los dos conjuntos de calorímetros están alineados de forma precisa para mezclar las muestras entre sí cuando se cierra la concha de almeja.

[0029] Las constantes de unión para las dos moléculas que interaccionan se determinan calentando primero y
60 determinando las capacidades caloríficas individuales de las muestras antes de mezclar. Después las muestras se mezclan intercalando los dos dispositivos entre sí para hacer que se produzca una reacción de unión. La entalpía de la unión se determina midiendo la cantidad de calor liberado o absorbido debido a la reacción de unión. Después la mezcla se calienta y se determina la capacidad calorífica de la mezcla. A partir de estos datos, se calcula la
65 constante de unión.

[0030] En una realización, se construye una pluralidad de dispositivos calorímetros en dos pastillas de silicio. Las muestras se ponen en cada dispositivo y se mezclan entre sí poniendo la primera pastilla en contacto con la segunda pastilla. Los dispositivos en la primera capa se alinean de forma precisa con los dispositivos en la segunda capa, de modo que cuando las pastillas se combinan los dispositivos individuales están alineados.

Breve descripción de las figuras

[0031] La presente invención se describe con referencia a los dibujos que acompañan, en los que:
10 La Fig. 1 es un diagrama esquemático que representa los componentes de un microcalorímetro de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Fig. 2 representa un entorno de ejemplo de acuerdo con el sistema y el procedimiento de la presente invención.

15 La Fig. 3 es un diagrama esquemático que representa un medio preferido para mezclar muestras entre sí en una realización preferida de la presente invención.

La Fig. 4 es un diagrama esquemático útil para describir un procedimiento preferido para determinar la constante de unión y otras propiedades termodinámicas usando la técnica del perfil termodinámico de acuerdo con una
20 realización de la presente invención.

La Fig. 5 es un diagrama de flujo que representa un procedimiento que se puede usar para determinar la constante de equilibrio de unión de dos moléculas que interactúan usando la técnica del perfil termodinámico de acuerdo con
25 una realización preferida de la presente invención.

La Fig. 6 representa un ejemplo de una matriz de microcalorímetros de acuerdo con una realización de la presente invención.

30 **[0032]** En las figuras, los números de referencia iguales en general indican elementos idénticos, funcionalmente similares y/o estructuralmente similares.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

35 **[0033]** El sistema y el procedimiento de la presente invención usan una versión modificada de un tipo de microcalorímetro usado en la industria de la electrónica para medir películas finas. Un ejemplo de dicho dispositivo se describe en el artículo titulado "Thin film microcalorimeter for heat capacity measurements from 1.5 to 800K" de Denlinger, y col., publicado por el American Institute of Physics en abril de 1994.

40 **[0034]** Estos dispositivos se han usado, por ejemplo, para analizar material de película fina de grabado, tal como óxido de magnesio y similares. También se han usado dispositivos similares en otras aplicaciones, tales como gafas de visión nocturna de infrarrojos y para medir la radiación de fondo en el espacio. Sin embargo, según el conocimiento de los autores de la invención, estos dispositivos no se han usado nunca para determinar las propiedades termodinámicas de reacciones químicas y biológicas, antes de la presente invención.

45 **[0035]** Antes de la presente invención, dichos microcalorímetros necesitaban usar vacío para reducir la conductancia térmica entre la zona de la muestra y el entorno que la rodea. Los sistemas biológicos se basan típicamente en disoluciones acuosas y se evaporarían en el vacío. Por lo tanto, estos microcalorímetros son incompatibles con los sistemas químicos y biológicos.

50 **[0036]** Sin embargo, la presente invención proporciona amplias modificaciones y mejoras frente a los sistemas anteriores. Por ejemplo, la presente invención proporciona una cámara ambiental que comprende un entorno saturado que hace que se pueda usar con sistemas químicos o biológicos. Esta mejora y otras modificaciones y mejoras se describen a continuación en detalle.

55 **[0037]** La figura 1 es un diagrama esquemático que representa los componentes de un microcalorímetro de acuerdo con una realización de la presente invención. Este dispositivo también se denomina en el presente documento "calorímetro microelectrónico". En la parte superior de la figura 1 se muestra una vista superior del microcalorímetro 20. En la parte inferior de la figura 1, se muestra una vista lateral del microcalorímetro 20.

60 **[0038]** El microcalorímetro 20 comprende una membrana fina, de nitruro de silicio (Si_3N_4) amorfo 32 anclada a un marco de silicio 38. En esta realización de ejemplo, las dimensiones del marco de silicio son $1 \times 1 \text{ cm}^2$ y las dimensiones de la membrana 32 son $0,5 \times 0,5 \text{ cm}^2$. La membrana 32 en este ejemplo es de 1800 \AA de grosor. En otra realización, se fabrica una pluralidad de calorímetros 20 en una sola pastilla de silicio, en la que cada calorímetro 20 es del mismo tamaño o menor que las dimensiones descritas en el ejemplo anterior. Esto se
65 denomina una matriz de calorímetros y se describe a continuación con referencia a la figura 6.

[0039] Se deposita una capa fina de conducción térmica 30 sobre la parte central de la membrana 32 usando técnicas estándar de fabricación de microelectrónica. La superficie superior de la capa de conducción es donde se ponen las muestras. En este ejemplo, la capa de conducción térmica 30 es de 0,25 x 0,25 cm². En esta realización de ejemplo, la capa de conducción 30 está hecha de oro. En otras realizaciones, se pueden usar diferentes metales, pero idealmente, se prefieren materiales con difusión térmica menor. Además, se prefiere el oro debido a sus propiedades de compatibilidad biológica.

[0040] Hay que indicar que estos materiales usados para describir una realización preferida de la presente invención se usan solo con propósitos de ilustrar. En otras realizaciones se usan diferentes materiales. Por ejemplo, se puede usar carburo de silicio para implementar la membrana fina 32. Se puede usar vidrio o cuarzo para implementar el marco 38. En otra realización, se puede usar Mylar y metal para implementar la membrana 32 y el marco 38, respectivamente. Por lo tanto, el uso de los materiales usados para describir la realización de ejemplo presentada en el presente documento no debe considerarse que limita el alcance y la amplitud de la presente invención.

[0041] Hay que indicar que en la realización de ejemplo se usa una membrana 32 para aislar térmicamente la capa de conducción 30 (es decir, soporte de muestra). Sin embargo, se puede usar cualquier medio para aislar térmicamente el soporte de muestra en realizaciones alternativas de la presente invención. Por consiguiente, el uso de la membrana 32 en las realizaciones preferidas descritas en el presente documento no debe considerarse que limita el alcance y la amplitud de la presente invención.

[0042] Hay que indicar que en la realización de ejemplo se usa un calentador 34 como un dispositivo de entrada de energía para estimular la o las muestras. En otras realizaciones se pueden usar otros tipos de dispositivos de entrada de energía. Por ejemplo, se puede usar cualquier tipo de radiación electromagnética para estimular la o las muestras. Por consiguiente, el uso del calentador 34 como dispositivo de entrada de energía en los ejemplos del presente documento, no debe considerarse que limita el alcance y la amplitud de la presente invención.

[0043] Se ponen un calentador 34 y un termómetro 36 en la parte inferior de la capa de conducción 30, usando técnicas estándar de fabricación de microelectrónica. Por ejemplo, en una realización, se une un termómetro de cuarzo a la parte inferior de la capa de conducción 30 usando técnicas estándar de fabricación de microelectrónica. Igualmente, se configura un calentador metálico, tal como un calentador 34 de tipo resistencia de níquel cercano al termómetro 36. Como se describe a continuación, el calentador 34 se usa para calentar las muestras, y el termómetro 36 se usa para medir con precisión la diferencia de calor (es decir, la liberación o absorción de calor) de la muestra. Se une un par de conductores 40 y 41 al termómetro 36 y al calentador 34, respectivamente.

[0044] Para detectar y medir con precisión los cambios de temperatura en muestras de volumen pequeño, se prefiere usar masas térmicas pequeñas para implementar el soporte de muestra 30, el termómetro 34 y el calentador 36. Esto se lleva a cabo usando micromecanizado de silicio para hacer una membrana 32 de película extremadamente fina que pueda soportar el termómetro en una cara 26 y la muestra en la otra 30.

[0045] La alta relación de dimensiones de la membrana 32 proporciona un rápido equilibrio térmico con el termómetro 34 y un lento equilibrio térmico con el marco de silicio 38 que lo rodea. Esto aísla térmicamente la muestra. Sin embargo, el aislamiento térmico solo no es suficiente para hacer un dispositivo calorímetro de precisión. Es igualmente importante la termometría usada que determina cómo de sensible es el calorímetro frente a los efectos de calor. Para satisfacer tanto la alta sensibilidad como los requisitos de resolución de tiempo, una realización preferida de la presente invención usa un oscilador-termómetro más que dispositivos de termómetro estándar.

[0046] Los termómetros estándar se basan en la medición de un cambio de voltaje debido a alguna propiedad del material en el termómetro, tal como un cambio de resistencia o similar. Sin embargo, esta técnica no es el procedimiento preferido de acuerdo con la presente invención. Un oscilador que se basa en la medición de la frecuencia de resonancia de una onda acústica generada en el termómetro 36 del calorímetro 20, es la base para la técnica usada en una realización preferida de la presente invención. Usando esta técnica, la frecuencia de la onda acústica depende de la velocidad de la onda acústica, que depende de la temperatura.

[0047] Una realización de la presente invención usa preferiblemente un analizador de dominio de la modulación para el recuento de frecuencia. Un analizador de dominio de la modulación es una clase de instrumento que cuenta frecuencias, por ejemplo, de hasta 12 dígitos por segundo. Esto proporciona tanto sensibilidad como resolución en el tiempo mucho más allá de las capacidades de los termómetros resistivos convencionales.

[0048] La idea detrás del esquema de medición es maximizar la sensibilidad usando analizadores de dominio de la modulación, como se ha expuesto antes. Estos instrumentos se pueden pensar como osciloscopios de frecuencia que miden la frecuencia frente al tiempo. Los analizadores de dominio de la modulación usan uno de los dos procedimientos para el recuento de frecuencia sin tiempo muerto entre mediciones.

[0049] El procedimiento de interpolación lineal usa la carga de condensadores para hacer el seguimiento del tiempo acumulado entre las señales de inicio y de parada. El procedimiento de interpolación de Vernier es un procedimiento digital que usa varios relojes, una pareja de los cuales se ajusta en frecuencia en $1+1/n$ respecto a un reloj de referencia.

5

[0050] El procedimiento de interpolación de Vernier se está convirtiendo en el procedimiento dominante usado en los analizadores de dominio de la modulación comerciales actualmente disponibles. Algunos tienen una resolución de disparo único de 12 dígitos/s (es decir, $1:10^{12}$ en 1 s sin determinación de promedio). Para aprovechar más esta técnica, la sensibilidad se puede mejorar reduciendo la frecuencia de los osciladores para así reducir el número de

10

dígitos del recuento, y por lo tanto mantener una alta sensibilidad incluso en ventanas de tiempo cortas (biológicamente importantes).

[0051] La técnica anterior se denomina heterodinaje. Implica mezclar el oscilador con otro oscilador y filtrar los componentes de alta frecuencia. Esto da como resultado una frecuencia de salida definida por la diferencia entre la

15

frecuencia de los dos osciladores. De esta forma, cuando ambos osciladores están en contacto con la misma muestra, esta técnica tiene el efecto de duplicar la resolución de temperatura. El siguiente ejemplo ilustra esta técnica.

[0052] Supóngase que un oscilador con una frecuencia de resonancia (f) de 10 MHz, tienen una sensibilidad de

20

temperatura de 100 ppm/K. Por lo tanto, un ΔT de 1 K = Δf de 1000 Hz. Supóngase además que un dispositivo puede leer 10 dígitos/s (disparo único). Esto corresponde a una resolución de frecuencia de $1 \text{ mhz/s} = 1 \mu\text{K/s}$.

[0053] Usando la técnica descrita antes, los osciladores se reducen de 10 Mhz a 100 kHz. En este ejemplo, para

25

lograr la misma resolución de 1 mhz tómense ahora solo 10 ms. Por lo tanto, ir a mayores frecuencias aumenta la sensibilidad de la temperatura. En una realización preferida de la presente invención, se usan dos o más osciladores que están en contacto con la misma disolución para producir un aumento de la sensibilidad.

[0054] La figura 2 representa un ejemplo de entorno de acuerdo con el sistema y el procedimiento de la presente invención. Como se muestra en esta realización de ejemplo, se unen dos microcalorímetros 20 a un dispositivo de

30

concha de almeja 52. Se pone una muestra 54 en cada uno de los microcalorímetros 20. En general, esto se logra por medios robóticos usando cualquier tipo de dispositivo de dispensación de volumen ultrabajo de control remoto. El propósito del dispositivo de concha de almeja 52 es mezclar las muestras 43 cuando se cierra la concha de almeja 52 en la dirección de la flecha mostrada en la figura 2.

[0055] El dispositivo de concha de almeja 52 en este ejemplo se pone en una plataforma 55. Se une un dispositivo

35

de calentamiento a la plataforma 55 para controlar la temperatura del entorno del experimento. Típicamente, se usan dispositivos controlados electrónicamente (no se muestra) para controlar el cierre de la concha de almeja 52 para mezclar las muestras 54 de los dos calorímetros 20.

[0056] La plataforma 55 se pone en una cámara ambiental 50. La cámara 50 se configura para minimizar la

40

conducción térmica de los calorímetros 20. Esto se logra en esta realización de ejemplo, usando un humidificador 58 y una bomba de vacío 60 unida a la cámara 50. La bomba 60 se usa para extraer aire de la cámara. El humidificador 58 se usa para humidificar el ambiente dentro de la cámara 50.

[0057] Por consiguiente, la reducción de la conducción térmica de los calorímetros 20 se logra eliminando aire de la cámara usando la bomba de vacío 60 y después humidificando la cámara usando el humidificador 58. La cámara se humidifica hasta una presión de vapor adecuada de modo que la conexión térmica desde el calorímetro 20 es solo por el vapor de agua. Alternativamente, la operación se puede producir en aire o gas con la presión de vapor de agua adecuada. Usando este procedimiento alternativo, la conexión térmica se determina experimentalmente de

45

50

modo que puede ser compensada cuando se determinan las propiedades termodinámicas de la o las muestras.

[0058] En una realización preferida, la misma disolución acuosa usada para contener las muestras 54 se usa como el agente de humidificación en el humidificador 56. De esta forma, las presiones de vapor de la cámara 50 se acercan mucho a la presión de vapor de la muestra 54, para evitar la evaporación. En general, la presión de vapor de las muestras debe estar dentro de un umbral predeterminado de la presión de vapor de la cámara para evitar la evaporación.

55

[0059] En una realización preferida de la presente invención, se monta un manómetro de capacitancia (no se muestra) en la cámara 50 y se usa para controlar la presión de vapor de agua en la misma. Como se ha expuesto, la dispensación de muestra se hace mediante robótica usando etapas de vacío compatibles (no se muestra). En una realización, el dispositivo de concha de almeja se cierra manualmente usando una varilla oscilante o similar. En otra realización, se usan dispositivos robóticos para cerrar el dispositivo de concha de almeja 52. Se usa un accionador piezoeléctrico o similar (no se muestra) para cerrar el hueco entre el conjunto superior e inferior de calorímetros 20 cuando la concha de almeja 53 está en la posición cerrada.

60

65

[0060] La velocidad de accionamiento del accionador piezoeléctrico puede variar. En un ejemplo, la velocidad de accionamiento es de $\approx 100 \mu\text{s} - 800 \mu\text{s}$. En otra realización, el hueco se puede cerrar más despacio o más rápido. Por ejemplo, en una realización, el hueco se cierra más despacio mediante el ajuste de una velocidad de rampa de la fuente de tensión, que preferiblemente es controlada por ordenador.

5

[0061] El desplazamiento del accionamiento se puede controlar, por ejemplo, usando un transformador diferencial variable lineal con una resolución de aproximadamente 250 \AA montado en el extremo del accionador piezoeléctrico. En una realización preferida, se monta un diodo de silicio (no se muestra) en la plataforma de muestra 55 para controlar la temperatura. El controlador de temperatura puede usar la entrada de este termómetro para controlar la energía a un calentador 56 montado también en la plataforma 55.

10

[0062] La figura 3 es un diagrama esquemático que representa un medio preferido para mezclar muestras en una realización preferida de la presente invención. Como se muestra en el bloque 64, las muestras 54a y 54b se ponen cada una en un dispositivo microcalorímetro 20. Como se muestra, uno de los microcalorímetros 20 está puesto de modo que los dos microcalorímetros 20 están enfrentados entre sí. Debido a los volúmenes ultrapequeños usados, la tensión superficial entre la muestra 54 y la capa de conducción 30 es suficiente para mantener las muestras en cualquier posición invertida. La orientación de la pareja de microcalorímetros 20 es irrelevante. Los ejemplos descritos en el presente documento que representan una orientación horizontal para una realización preferida de la presente invención tienen solo el propósito de ilustrar. En otras realizaciones, los microcalorímetros 20 están orientados en una configuración vertical. En otras realizaciones más, los microcalorímetros 20 están orientados en configuraciones entre las configuraciones vertical y horizontal descritas antes. El punto importante es que los microcalorímetros 20 están colocados de modo que están enfrentados entre sí, como se muestra en la figura 3.

15

20

[0063] El bloque 65 representa un procedimiento preferido para mezclar las muestras 54a y 54b entre sí. Con el fin de mezclar las muestras 54a y 54b, los microcalorímetros 20 se mueven cerca uno a otro, de modo que las muestras se combinan como se muestra en 54a+54b. Este procedimiento de mezcla como se muestra en la figura 3, tiene varias ventajas frente a un procedimiento en el que la segunda muestra se inyecta o se añade gota a gota en la parte superior de la primera muestra. Sin embargo, la selección de qué procedimiento de mezcla usar, depende del experimento que se lleve a cabo. Por ejemplo, cuando se lleva a cabo el perfil termodinámico, como se describe a continuación, el procedimiento de mezcla mostrado en la figura 3 es preferido con el fin de evitar los cálculos erróneos.

25

30

[0064] Por ejemplo, mediante la adición gota a gota de una segunda muestra en la parte superior de una primera muestra, los errores en el volumen de dispensación introducirán resultados erróneos cuando se lleve a cabo una segunda medición de capacidad calorífica (en la mezcla). En su lugar, usando el procedimiento de mezcla representado en la figura 3, no se introducen errores porque la capacidad calorífica se determina antes y después de la mezcla de muestras y la capacidad calorífica depende de la masa. Por consiguiente, usando el procedimiento de mezcla preferido mostrado en la figura 3, no hay cambio de volumen antes y después del procedimiento de mezcla. Por lo tanto, no hay errores en la capacidad calorífica asociados con la incertidumbre en el volumen de la disolución añadido.

35

40

[0065] Sin embargo, para algunas aplicaciones, se puede usar la primera técnica de mezcla de disoluciones mediante la adición gota a gota de una segunda disolución en la parte superior de una primera disolución. Por ejemplo, cuando se determina la inhibición de enzima/sustrato, se puede usar la técnica de mezclado más sencilla para evitar un experimento innecesariamente complicado.

45

[0066] Como se describe a continuación, una ventaja de usar microcalorímetros 20 separados para cada una de las muestras 54a y 54b, y el uso de la técnica de mezclado mostrada en la figura 3, es que proporciona la capacidad de determinar la constante de unión en un solo experimento, como se describe a continuación. Esta técnica se denomina en el presente documento la técnica, método o procedimiento del "perfil termodinámico", de acuerdo con una realización preferida de la presente invención.

50

[0067] Un procedimiento para determinar la constante de unión y otras propiedades termodinámicas usando la técnica del perfil termodinámico de acuerdo con la presente invención preferida, se describirá ahora con referencia a la figura 4.

55

[0068] Habitualmente, la calorimetría de valoración es el procedimiento usado para determinar la constante de equilibrio de unión (K_d) de las 2 moléculas que interactúan. El procedimiento determina la constante de equilibrio de unión mediante la relación:

60

$$K_d = [L][P]/[LP]$$

Ecuación (1)

en la que:

K_d = constante de equilibrio de unión - disociación

65 L = concentración de la primera muestra (es decir, fármaco o proteína o ADN, etc.)

P = concentración de la segunda muestra (receptor) (es decir, proteína, ADN, etc.)
 LP = concentración del complejo unido

- [0069]** Este procedimiento tiene el problema de que el intervalo de valores de K_d que se pueden determinar con precisión está limitado por la necesidad de tener disoluciones cada vez más diluidas de las muestras a medida que la K_d se hace menor. Esto establece el límite inferior de la K_d al que los calorímetros de valoración pueden acceder. Además, otra limitación de usar este procedimiento es que requiere que se lleven a cabo múltiples inyecciones a tiempo con el fin de construir la curva de unión para determinar la constante de equilibrio de unión.
- 10 **[0070]** A diferencia de los sistemas y procedimientos convencionales, la presente invención usa una relación diferente para determinar la constante de equilibrio de unión. En concreto, la relación:

$$K_d = e^{-\Delta G/RT} \quad \text{Ecuación (2)}$$

- 15 **[0071]** La ecuación (2) se puede volver a escribir en la forma:

$$\ln[K_d] = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad \text{Ecuación (2a)}$$

en la que:

- 20 K_d = constante de equilibrio de unión
 ΔH = entalpía de unión
 ΔS = entropía de unión
 T = temperatura
 R = constante de los gases

- 25 **[0072]** La ecuación (2) no se ha usado de forma convencional para determinar constantes de equilibrio de unión porque la determinación de los parámetros en la ΔH y ΔS previamente no era posible usando un solo experimento. Sin embargo, como apreciarán los expertos en la materia pertinente, la presente invención proporciona la capacidad para determinar la entalpía de unión (ΔH) y la entropía de unión (ΔS), y por lo tanto la K_d , usando un solo dispositivo en un solo experimento.

- [0073]** Debe indicarse que los procedimientos tradicionales que usan técnicas de calorimetría de valoración, determinan primero K_d y ΔH . A partir de esta información, después se calcula la ΔS . Usando estos procedimientos convencionales para determinar la capacidad calorífica (ΔC_p) mediante la calorimetría de valoración, es necesario llevar a cabo los experimentos a varias temperaturas. Sin embargo, como se describe a continuación, el procedimiento y el sistema de la presente invención proporcionan la capacidad de determinar la capacidad calorífica usando una sola temperatura, y por lo tanto un solo experimento. Este procedimiento, denominado la técnica del perfil termodinámico, se describe a continuación con detalle.

- 40 **[0074]** Hay que indicar que no hay dependencias de concentraciones en la ecuación (2). Por lo tanto, una ventaja de usar esta ecuación es que las concentraciones se pueden aumentar de forma óptima para aumentar la relación de señal a ruido. Esto permite usar termómetros más baratos y menos complejos con una realización de la presente invención.

- 45 **[0075]** Hay que indicar que las capacidades caloríficas, entropías y entalpías son funciones de estado termodinámicas y son aditivas. Por consiguiente, las entalpías, entropías y capacidades caloríficas de la reacción de unión son igual a la diferencia entre los estados iniciales y los estados finales de las respectivas funciones para una sustancia particular. Presentado de forma matemática:

50 $\Delta C_p = C_{p(\text{final})} - C_{p(\text{inicial})} \quad \text{Ecuación (3)}$

$\Delta S = S_{(\text{final})} - S_{(\text{inicial})} \quad \text{Ecuación (4)}$

$\Delta H = H_{(\text{final})} - H_{(\text{inicial})} \quad \text{Ecuación (5)}$

- [0076]** Por consiguiente, para determinar la constante de equilibrio de unión usando el procedimiento del perfil termodinámico, se usa la siguiente relación:

$$S = C_p (\ln T_2/T_1) \quad \text{Ecuación (6)}$$

- [0077]** Por consiguiente, la ecuación (6) se usa para determinar ΔS para la reacción en la que la C_p se determina directamente calentando las muestras (como se describe a continuación). Además, en una realización preferida, el experimento se controla de modo que las temperaturas T_2 son iguales entre sí y todas las T_1 son iguales entre sí. Además, en una realización preferida, es conveniente ajustar la T_1 tan próxima a T_2 como sea posible. En general, T_1 es controlada por el calentador de la plataforma 55 y T_2 es controlada por el calentador 36 en el calorímetro 20. Por lo tanto, ΔH se determina directamente a partir del calor liberado o absorbido del mezclamiento de los

reaccionantes. Este procedimiento se describe a continuación con referencia a las figuras 4 y 5.

[0078] La figura 4 representa un ejemplo que muestra las diferentes etapas de un experimento de ejemplo usando dos pares de microcalorímetros. El par de microcalorímetros de la derecha (67 y 69) se usa para soportar las muestras de referencia 74 y 76. El par de microcalorímetros de la izquierda (66 y 68) se usa para soportar las muestras de interés 70 y 72.

[0079] Los pares de microcalorímetros se muestran en dos puntos de tiempo. Específicamente, el bloque 66 representa un punto en el tiempo antes de que se mezclen las muestras 70, 72, y el bloque 68 representa un punto en el tiempo después de que se mezclen las muestras para producir la mezcla 78. Igualmente, el bloque 67 representa un punto en el tiempo antes de que se mezclen las muestras de referencia 74 y 76, y el bloque 69 representa un punto en el tiempo después de que se mezclen las muestras para producir la mezcla 79.

[0080] El primer conjunto de microcalorímetros 66 se carga con dos muestras de interés 70 y 72, tal como un ligando y una disolución de proteína. El segundo conjunto de microcalorímetros 67 se carga con un par de muestras de referencia 74 y 76.

[0081] Por consiguiente, la mitad superior de la figura 4 (66 y 67) representa los pares de muestras antes de que los microcalorímetros se pongan juntos con el propósito de la mezcla, y la mitad inferior (68 y 69) representa los pares de muestras después de la mezcla. En las siguientes ecuaciones, los subíndices indican la muestra asociada o mezcla. Por ejemplo S_{70} se refiere a la entropía asociada con la muestra 70. Igualmente, S_{78} se refiere a la entropía asociada con la mezcla 78. Este ejemplo se usa para describir el procedimiento del perfil termodinámico de acuerdo con una realización preferida de la presente invención.

[0082] Primero, hay que indicar que la entropía de cada muestra antes de ser mezcladas se expresa como:

$$S_{70} = C_{p70} \ln \frac{T_2}{T_1}, \quad S_{72} = C_{p72} \ln \frac{T_2}{T_1}, \quad S_{74} = C_{p74} \ln \frac{T_2}{T_1} \text{ y } S_{76} = C_{p76} \ln \frac{T_2}{T_1}$$

donde T_1 y T_2 son las temperaturas de las muestras asociadas cuando se mide el calor específico. Por ejemplo, usando el procedimiento de relajación, se calienta una muestra a T_2 y se deja enfriar a T_1 . Hay que indicar que en este ejemplo, el procedimiento de relajación para determinar el calor específico se usa para simplificar la descripción del presente documento. Sin embargo, en una realización preferida de la presente invención, el procedimiento A/C bien conocido, es el procedimiento preferido para determinar el o los calores específicos de la o las muestras.

[0083] Por lo tanto, puesto que los calores específicos son aditivos:

$$[(S)_{70,74} = C_{1p70} \ln T_2/T_1 - C_{1p74} \ln T_2/T_1]$$

y

$$[(S)_{72,76} = C_{1p72} \ln T_2/T_1 - C_{1p76} \ln T_2/T_1]$$

[0084] Puesto que se sabe que la muestra de referencia no tiene reacción de unión, la ecuación se convierte en:

$$(C_{p78} \ln \frac{T_2}{T_1} - C_{p79} \ln \frac{T_2}{T_1}) - (C_{p70} \ln \frac{T_2}{T_1} - C_{p74} \ln \frac{T_2}{T_1} + C_{p72} \ln \frac{T_2}{T_1} - C_{p76} \ln \frac{T_2}{T_1}) =$$

$\Delta S_{\text{reacción}}$

[0085] Debido a que todas las T_1 son iguales y todas las T_2 son iguales, esto se simplifica para convertirse en:

$$\ln T_2/T_1 (C_{1p78} - C_{1p79} - C_{1p70} + C_{1p74} - C_{1p72} + C_{1p76}) = (S)_{\text{reacción}} \quad \text{Ecuación (7)}$$

[0086] La figura 5 es un diagrama de flujo que representa un procedimiento que se puede usar para determinar la constante de equilibrio de unión de dos moléculas que interaccionan, usando la técnica del perfil termodinámico de acuerdo con una realización preferida de la presente invención.

[0087] El procedimiento empieza con la etapa 80, en la que las muestras se depositan en cada uno de los dispositivos microcalorímetros 20. Después, en la etapa 84, se añade calor a cada dispositivo en un procedimiento para medir la capacidad calorífica de cada muestra antes de mezclarlas. Por ejemplo, usando el experimento de ejemplo anterior, se determina la capacidad calorífica de las muestras 70, 72, 74 y 76. En una realización preferida, las temperaturas se seleccionan de modo que todas las T_1 son iguales y todas las T_2 son iguales.

[0088] Después, en la etapa 86, las muestras se mezclan entre sí. Otra vez, usando el experimento de ejemplo

anterior, esto forma las mezclas 78 y 79. Debe indicarse que el uso de un par de muestras de interés y un par de muestras de referencia se usa solo con el propósito de ilustrar, para destacar en particular las características y funcionalidad de la presente invención. En otras realizaciones, se pueden usar diferentes configuraciones. Por ejemplo, en una realización se usa más de un par de muestras de referencia para obtener resultados más precisos.

5 En cualquier caso, el uso de las muestras de referencia en experimentos para determinar las propiedades termodinámicas es bien conocido, y dicho uso será evidente para el experto en la materia pertinente. Como tal, el uso de un par de muestras y un par de referencia en los ejemplos del presente documento, no debe considerarse que limite el alcance y amplitud de la presente invención.

10 **[0089]** Después, como se indica en la etapa 88, se determina la entalpía de unión (ΔH) para las mezclas 78 y 79. Esto se lleva a cabo midiendo el calor real absorbido o liberado como consecuencia de la reacción de unión.

[0090] Después, como se indica en la etapa 92, se determinan las capacidades caloríficas tanto de la mezcla 78 como de la 79 usando las mismas temperaturas que en la etapa 84. Finalmente, como se indica en la etapa 94, se

15 usa la ecuación $K_d = e^{-\Delta G/RT}$ para calcular la constante de equilibrio de unión. El procedimiento termina como se indica en la etapa 95.

[0091] Como se ha expuesto antes, se pueden llevar a cabo muchas aplicaciones nuevas, distintas de las descritas antes, usando la presente invención. Por ejemplo, se puede configurar un número grande de dispositivos

20 emparejados en una sola pastilla de silicio con las interconexiones construidas. Usando la presente invención se puede realizar un verdadero "laboratorio en un chip".

[0092] Se representa un ejemplo de una matriz de microcalorímetros en la figura 6. La parte superior de la figura 6

25 representa el lado operativo de una sola pastilla 120. La pastilla 120 comprende una pluralidad de dispositivos microcalorímetros 20. La parte inferior de la figura 6 representa una vista lateral que muestra dos pastillas 120 y 121. Como se muestra, las dos pastillas están orientadas de modo que el lado operativo de una pastilla 120 está enfrentado con el lado operativo de la otra pastilla 121. Cada pastilla 120 y 121 se acopla a un brazo robótico 122 que funciona para acoplar las dos pastillas juntas.

30 **[0093]** Por consiguiente, durante la operación, cada pastilla 120 y 121 está orientada de modo que los lados operativos de las pastillas 120 y 121 están enfrentados entre sí. Los brazos robóticos 122 se usan para acoplar las pastillas entre sí para la mezcla. Típicamente, los brazos robóticos se usan para alinear las pastillas 120 y 121 también con otros dispositivos, tal como un dispositivo para dispensar las disoluciones (no se muestra) y similares. Las pastillas 120 y 121 están alineadas de modo que cada dispositivo microcalorímetro 20 en la pastilla superior 120

35 está alineada exactamente con un dispositivo microcalorímetro 20 asociado en la pastilla inferior 121.

[0094] Por lo tanto, en este ejemplo, la configuración y disposición de los microcalorímetros 20 es exactamente la misma en las pastillas superior e inferior 120 y 121. Hay que indicar que en otras realizaciones, este no es

40 necesariamente el caso. Sin embargo, cuando se desea mezclar las muestras de la forma descrita en el presente documento, es esencial que se alineen con precisión un par de microcalorímetros 20 emparejados tanto en la pastilla superior como en la inferior 120 y 121.

[0095] De esta forma, las operaciones a gran escala, tales como el cribado farmacéutico de fármacos de alta capacidad se puede llevar a cabo de forma más eficaz. Como se ha expuesto, se puede configurar cualquier número

45 de microcalorímetros 20 en cada dispositivo y solo está limitado por la tecnología de fabricación y el tamaño de las pastillas usadas para implementar una realización de la presente invención.

[0096] Como se ha expuesto, se pueden llevar a cabo muchas aplicaciones nuevas usando la presente invención.

50 A continuación se listan varios ejemplos de dichas nuevas aplicaciones. No se pretende que esta lista sea exhaustiva o limitante de ninguna forma, sino que se presenta para señalar algunas ventajas particulares de la presente invención.

Ejemplo 1: cribado calorimétrico:

55 **[0097]** La presente invención es adecuada para este trabajo debido a la capacidad de realizar muchas reacciones simultáneamente, y porque se pueden fabricar fácilmente una cantidad de dispositivos. Un ejemplo de su uso es descubrir que rutas de señalización afectan a un elemento transcripcional putativo. Por ejemplo, los científicos pueden ensayar que rutas están implicadas usando las matrices 120 de microcalorímetros de tipo flujo detenido.

60 **[0098]** Esto se puede llevar a cabo como sigue. Primero, se pone una gota de extracto de proteína nuclear que contiene factores constitutivamente activados que corresponden a las diferentes rutas en un lado de un sándwich de diferentes calorímetros 20 en una matriz 120. El ADN de interés se pone en el otro lado de la matriz en sándwich 120. Se pone ADN de control de longitud similar, que se sabe que no está implicado en la ruta que se está ensayando, en las celdas 20 en la matriz 120, alineado con el extracto en la otra mitad del sándwich 121.

65

[0099] Se llevan a cabo reacciones por duplicado tanto en los controles como en las muestras, para mejorar la relación señal a ruido. Puesto que el único desencadenante es la adición del ADN de interés, la suma de las curvas de las reacciones por duplicado mostrará una señal por encima del ruido correspondiente al cambio de entalpía de la unión. De esta forma, no solo se encuentra la ruta que afecta a la muestra de ADN, sino que también se aprende información termodinámica. El cribado de fármacos automático es otro ejemplo del uso de las matrices de calorímetros, en el que la información de la unión adquirida durante el procedimiento de cribado puede ayudar en la selección de los fármacos candidatos.

Ejemplo de calorimetría de valoración:

10 **[0100]** Se puede llevar a cabo la calorimetría de valoración usando las matrices 120 del dispositivo de microcalorímetros 20 de acuerdo con una realización de la presente invención. Se pone una muestra en cada uno de los calorímetros de la matriz 120. En la otra mitad 121 del sándwich, se ponen gotas de diferentes concentraciones conocidas. Cuando el sándwich de 120 y 121 se cierra, se comparan las curvas de entalpía correspondientes a las
15 diferentes concentraciones. La concentración de la gota en la que ya no hay más evolución de calor es análoga al punto en el que no se libera calor adicional con más valoración. Esto se puede ajustar, puesto que se conocen las masas tanto del tamaño de la gota como de la muestra. Otra vez, esto se equilibra frente a las entalpías de mezcla de disolvente-muestra y se resta de la entalpía de mezcla de muestra₁-muestra₂.

20 **Ejemplo de calorimetría de multicomponentes**

[0101] La presente invención también se puede usar para el control de la entalpía de las interacciones proteína-proteína/proteína-ADN usando procedimientos calorimétricos tanto de flujo detenido como de valoración. Una propiedad de la presente invención es que la constante de tiempo interna (τ_{int}) es rápida con respecto a los
25 calorímetros de flujo detenido y de valoración convencionales, como se ha descrito antes. Una aplicación interesante de la presente invención es la capacidad para examinar el dominio de tiempo de interacciones de unión macromoleculares de multicomponentes con más detalle de lo que es posible usando dispositivos convencionales. La capacidad para discernir las interacciones de multicomponentes por estos procedimientos se aprecia mejor mediante un ejemplo.

30 **[0102]** Supónganse que se purifican 5 proteínas por HPLC, y se propone que forman un complejo de transcripción en un segmento de ADN que se ha aislado. La presente invención se puede usar para determinar el orden en el que se unen.

35 **[0103]** Con el propósito de ilustrar se puede examinar un escenario sencillo. Por ejemplo, supóngase que estas proteínas se unen en orden, es decir, la proteína 1 se une al primer ADN, la proteína 2 se une al siguiente, etc., hasta que se forma el complejo D12345. Cada uno de estos sucesos de unión se produce con algún cambio de entalpía.

40 **[0104]** El orden de la unión se puede determinar combinando las proteínas y el ADN en grupos de 3 de diferentes formas. Dados estos parámetros que tienen 6 componentes, cada sándwich con 3, hay entonces 10 formas de combinar los componentes suponiendo que las mitades de los sándwiches son equivalentes. Cuando se combinan, habrá un termograma que tenga el menor número de curvas de unión correspondiente a la agrupación D12345. Para
45 determinar cuál de estas se une primero, se usan las agrupaciones D1-2, D2-1, la primera dará una curva y la otra dará dos como sigue:

Mitad inferior	Mitad superior	Curvas de unión
D12	345	3
D13	245	4
D14	235	4
D15	234	4
D23	145	5
D24	135	5
D25	134	5
D34	125	5
D35	124	5
D45	123	5

[0105] Para limitar:

Mitad inferior	Mitad superior	Curvas de unión
D1	2	1
D2	1	2
D12	3	1
D12	4	0
D12	5	0
D123	4	1
D123	5	0

[0106] Todas estas reacciones están equilibradas frente a controles y deben realizarse reacciones repetidas, sumar las curvas y mejorar la relación señal:ruido (como \sqrt{R} donde R = número de experimentos repetidos). Esta capacidad se debe a las constantes de tiempo cortas de estos dispositivos. Además, al hacerse más rápidos, es posible una mejor resolución en el tiempo, permitiendo usar los dispositivos para investigar sucesos más rápidos. Además, estos procedimientos se pueden hacer automáticos mediante estaciones de pipetas con una pequeña cantidad de muestra en cada una, y programando una etapa XYZ de modo que las gotas designadas se pongan en los dispositivos adecuados.

10 **Ejemplo de sensor portátil:**

[0107] El tamaño del microcalorímetro 20 lo hace adecuado para usar como un sensor portátil, que se podría usar para el cribado de enfermedades, fármacos, compuestos químicos o cualquier otra muestra en la que existan agentes de unión y un cambio de calor asociado con la unión. La detección de una muestra se lleva a cabo por agentes de unión conocidos que están conjugados con la capa de conducción o están libres en disolución antes de aplicar la muestra.

[0108] Aunque se han descrito antes varias realizaciones de la presente invención, debe entenderse que se han presentado solo a modo de ejemplo y no de limitación. Por lo tanto, la amplitud y el alcance de la presente invención no deben estar limitados por ninguna de las realizaciones de ejemplo descritas antes, sino que se definen solo de acuerdo con las siguientes reivindicaciones.

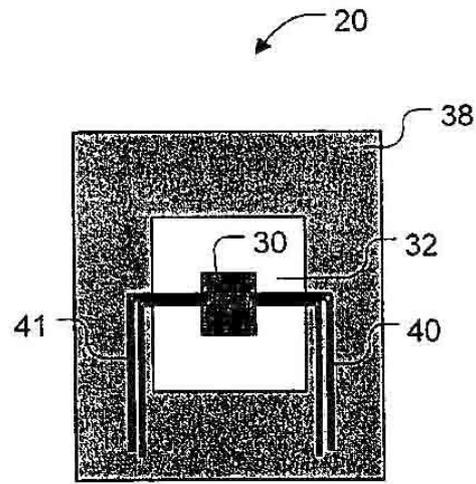
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar las propiedades termodinámicas de una muestra química/biológica usando un sistema que comprende una cámara ambiental y un calorímetro microelectrónico que tiene un soporte de muestra acoplado a un termómetro, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 5 introducir la muestra en una cámara ambiental dispensando la muestra sobre el soporte de muestra; estimular la primera muestra; y determinar una o más propiedades termodinámicas de la muestra usando el termómetro para medir la
- 10 temperatura que resulta de dicha etapa de estimulación;
caracterizado porque
 la cámara ambiental se equilibra de modo que la presión de vapor dentro de la cámara está dentro de un umbral predeterminado respecto a la presión de vapor de la muestra.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha etapa de estimulación se lleva a cabo añadiendo una segunda muestra a la muestra química/biológica.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho calorímetro microelectrónico comprende además un dispositivo de entrada de energía y dicha etapa de estimulación se lleva a cabo introduciendo energía en
- 20 la muestra usando el dispositivo de entrada de energía.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho sistema comprende además un segundo calorímetro microelectrónico que tiene un segundo soporte de muestra, comprendiendo dicho procedimiento además las etapas de:
- 25 introducir una segunda muestra en la cámara, dispensando la segunda muestra sobre un soporte de segunda muestra;
 mezclar las muestras entre sí; y
 usar el termómetro para determinar una o más propiedades termodinámicas adicionales relacionadas
- 30 con la mezcla.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicha etapa de mezcla se realiza intercalando el primer y el segundo microcalorímetros entre sí.
- 35 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho calorímetro microelectrónico comprende:
 una membrana fina amorfa anclada en un marco que la rodea; y
 dicho soporte de muestra comprende una capa fina de conducción térmica, térmicamente aislada, depositada sobre una parte central de la membrana para soportar las muestras en un lado y acoplada al termómetro
- 40 en el otro lado.
7. Un sistema para determinar propiedades termodinámicas de un primer conjunto de muestras que comprende:
- 45 una cámara ambiental;
 una primera matriz que comprende una pastilla que comprende una pluralidad de calorímetros para soportar el primer conjunto de muestras;
- en el que cada calorímetro comprende:
- 50 una estructura térmicamente aislada dentro de un marco;
 un termómetro montado en dicha estructura; y
 una superficie de muestra para recibir dichas muestras;
caracterizado porque
- 55 la cámara ambiental está dispuesta para mantener una presión de vapor similar a la presión de vapor del primer conjunto de muestras.
8. El sistema de la reivindicación 7, que además comprende:
- 60 una segunda matriz que comprende una pastilla que comprende una pluralidad de calorímetros para soportar un segundo conjunto de muestras; y
 medios para mezclar el primer y el segundo conjunto de muestras intercalando entre sí dichas primera y segunda matrices.
- 65 9. El sistema de la reivindicación 8, en el que cada uno de dichos calorímetros comprende además: un

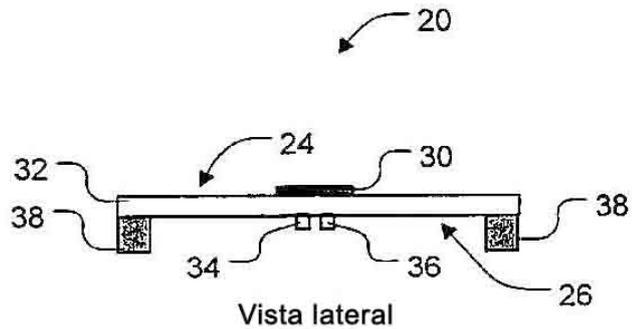
dispositivo de entrada de energía acoplado a dicha estructura térmicamente aislada.

10. El sistema de la reivindicación 9, en el que dicho dispositivo de entrada de energía es un calentador.

5 11. El sistema de la reivindicación 9, en el que dicho dispositivo de entrada de energía y dicho termómetro están acoplados en un lado de dicha estructura térmicamente aislada y dichas muestras se ponen en el otro lado.



Vista superior



Vista lateral

Fig. 1

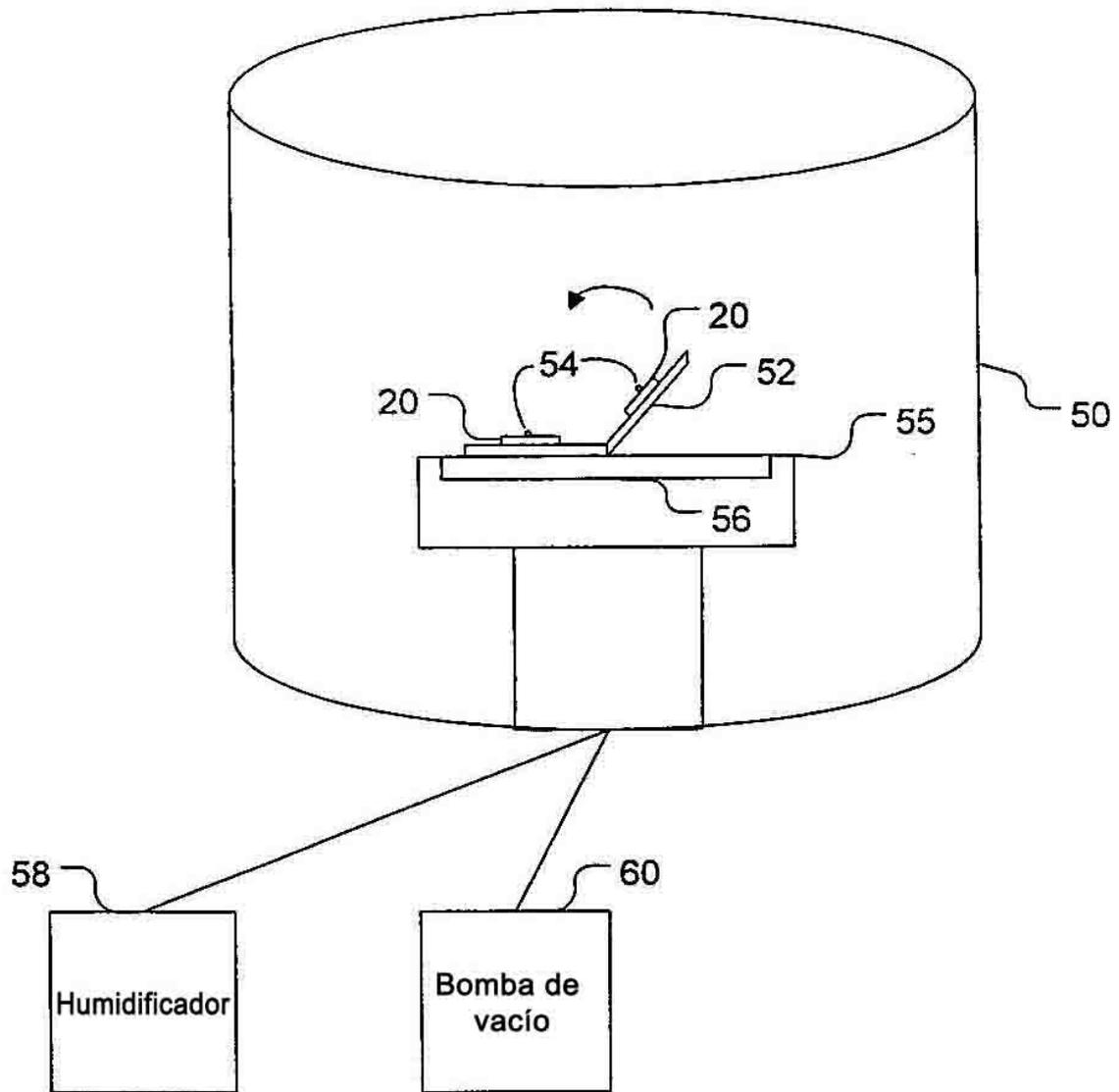


Fig. 2

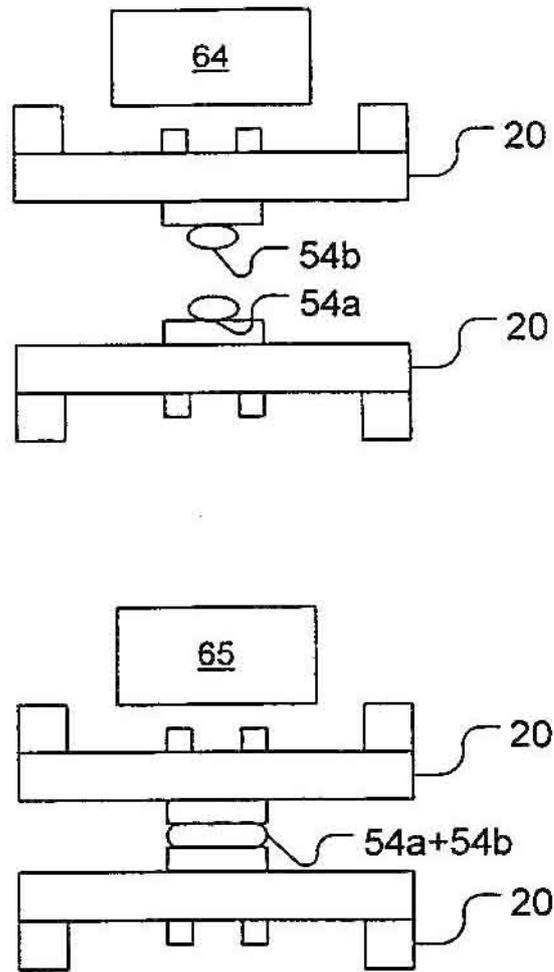


Fig. 3

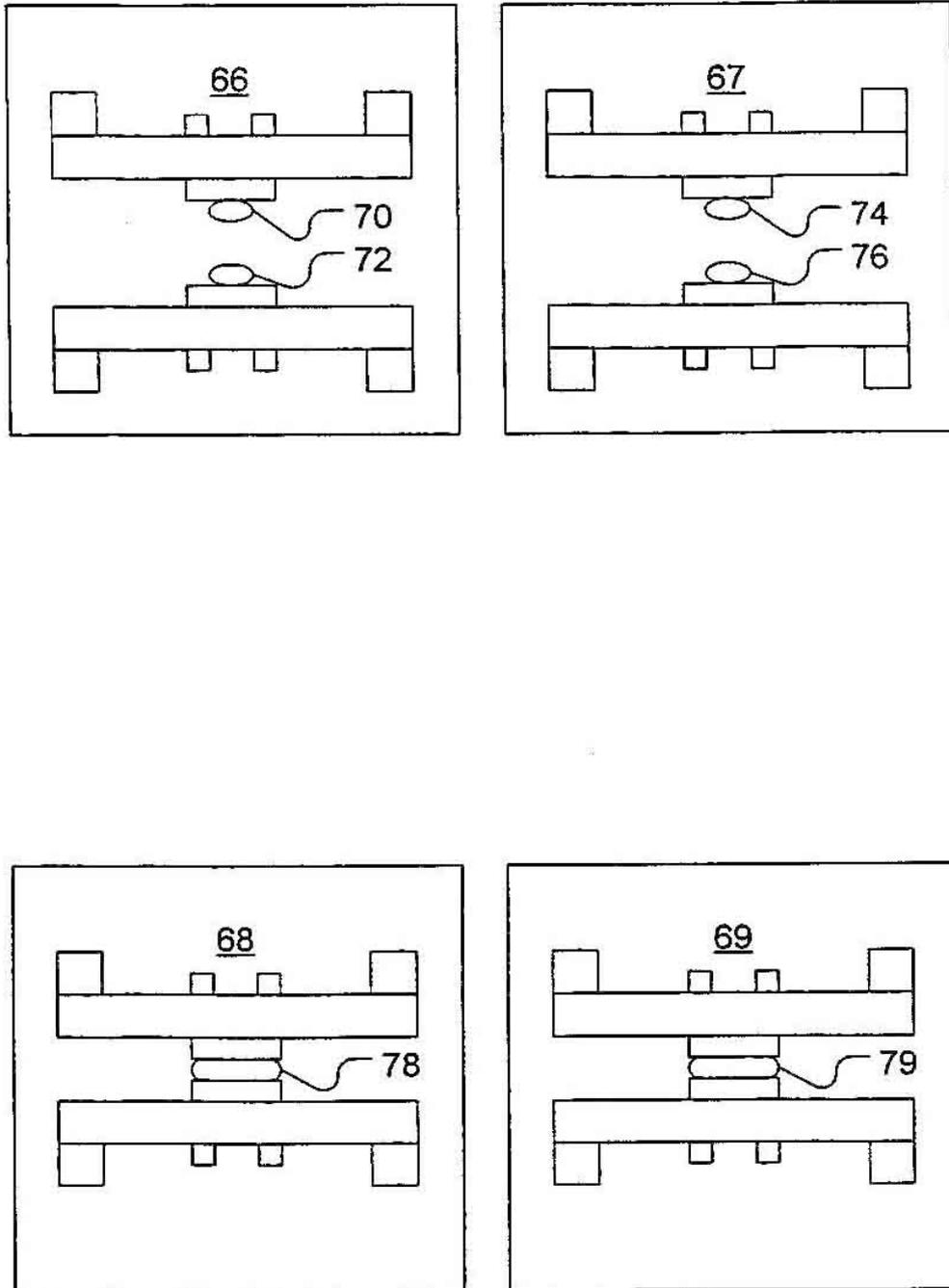


Fig. 4

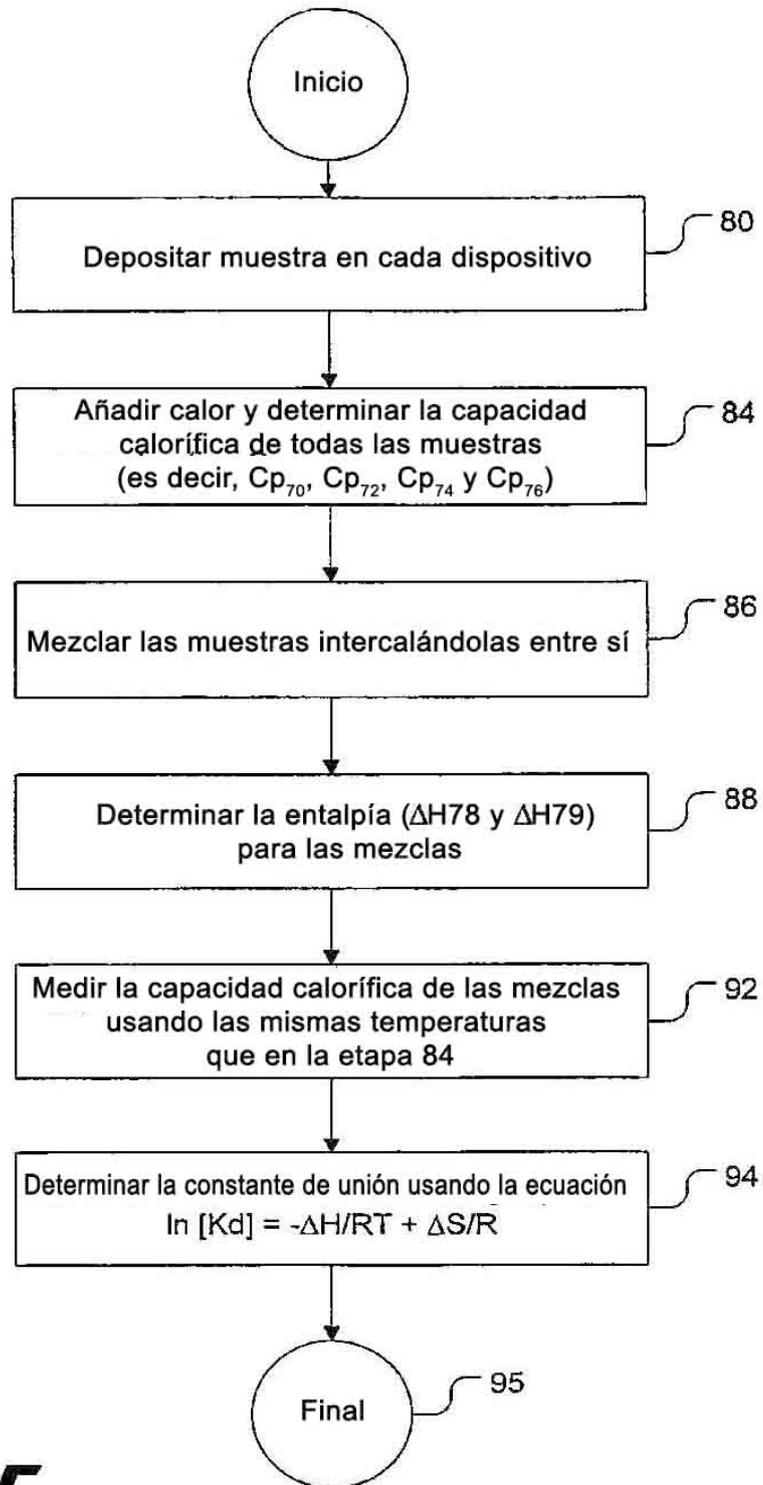


Fig. 5

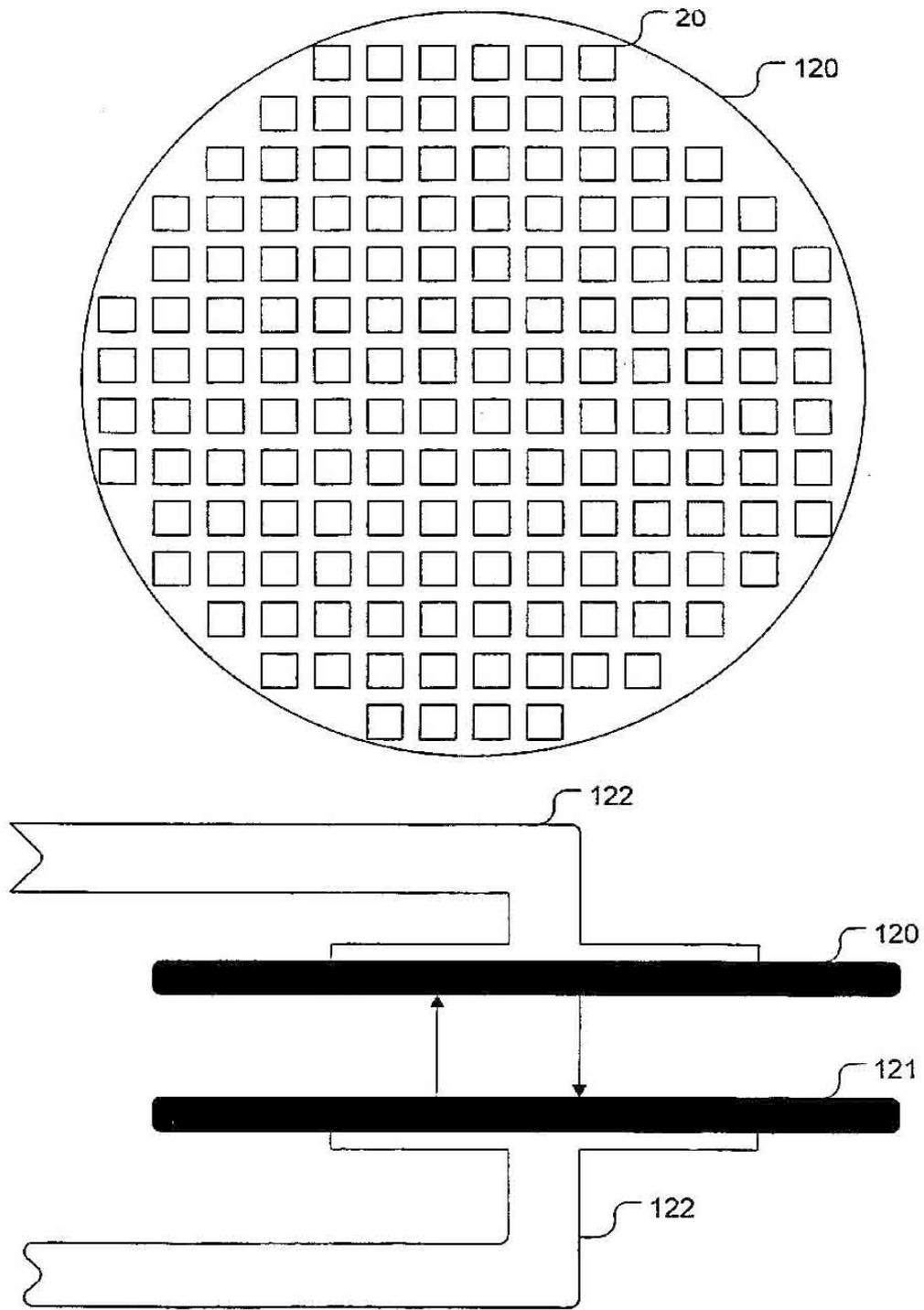


Fig. 6