



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 304 263**

② Número de solicitud: 200401200

⑤ Int. Cl.:  
**C30B 7/00** (2006.01)  
**C30B 29/58** (2006.01)  
**C30B 30/08** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **19.05.2004**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2008**

Fecha de la concesión: **27.07.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **12.08.2009**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**12.08.2009**

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

⑱ Inventor/es: **García Ruiz, Juan Manuel**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉑ Título: **Dispositivo y procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión.**

㉒ Resumen:

Dispositivo y procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión.

El objeto de la presente invención es un dispositivo que permite la cristalización (por ejemplo de macromoléculas biológicas) por el método de contradifusión. El dispositivo está constituido por un espacio unidimensional, por ejemplo un tubo capilar, que comprende tres partes de distinta geometría.

Constituye igualmente un objeto de la presente invención un bloque que agrupa varios de dichos dispositivos lo cual permite la realización simultánea de experimentos de cristalización en diferentes condiciones.

Es otro objeto de la presente invención un procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión en los dispositivos de geometría unidimensional, bien en condiciones terrestres de gravedad, bien en condiciones de gravedad reducida utilizando en este caso preferentemente el bloque que agrupa varios de dichos dispositivos.

ES 2 304 263 B1

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

## DESCRIPCIÓN

Dispositivo y procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión.

5 **Objeto de la invención**

El objeto de la presente invención es un dispositivo que permite la cristalización (por ejemplo de macromoléculas biológicas) por el método de contradifusión. El dispositivo está constituido por un espacio unidimensional, por ejemplo un tubo capilar, que comprende tres partes de distinta geometría.

10 Constituye igualmente un objeto de la presente invención un bloque que agrupa varios de dichos dispositivos lo cual permite la realización simultánea de experimentos de cristalización en diferentes condiciones.

15 Es otro objeto de la presente invención un procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión en los dispositivos de geometría unidimensional, bien en condiciones terrestres de gravedad, bien en condiciones de gravedad reducida utilizando en este caso preferentemente el bloque que agrupa varios de dichos dispositivos.

**Estado de la técnica**

20 La cristalización de macromoléculas biológicas en condiciones de baja gravedad o “microgravedad” en el espacio se lleva a cabo por diferentes métodos que pueden dividirse en dos grandes grupos. El primero de ellos agrupa a las técnicas en las que la cristalización tiene lugar en un pequeño volumen quasi-esférico y por tanto podemos llamarlas de geometría esférica. Entre ellas están las técnicas clásicas de difusión en fase vapor que son las técnicas más usadas hasta el año 2000 en los experimentos espaciales (US-5641681). Desde entonces se viene imponiendo la técnica de  
25 contra difusión en condiciones lejos del equilibrio que se llevan a cabo en reactores alargados y por tanto pertenece al grupo que denominamos técnicas de geometría longitudinal (véase patentes ES 2164032 y ES 2172363). En estas técnicas de geometría longitudinal se pretende conseguir un cambio continuo en el espacio y en el tiempo de las condiciones de sobresaturación a lo largo del eje del reactor donde se lleva cabo el crecimiento de los cristales. En la técnica de contradifusión las disoluciones que van a reaccionar se colocan una frente a la otra bien en contacto directo o separadas mediante una membrana o por una cámara intermedia que actúa como buffer físico, es decir como una  
30 cámara que hace más lenta la cinética del proceso de transporte. Esta cámara puede llenarse con un buffer químico o con un líquido cualquiera, por ejemplo agua. Por definición, las técnicas de contradifusión requieren que se evite la convección en la zona de cristalización. Hay dos formas de reducir la convección: desarrollar los experimentos en condiciones de microgravedad en el espacio o bien llevarlos a cabo medios gelificados. Ambos medios, microgravedad en el espacio y geles, comparten la reducción de la convección provocada por flotación, la reducción de la concentración de impurezas en la superficie cristalina y la eliminación de la sedimentación de cristales y la nucleación secundaria de agregados de proteínas. Además, la microgravedad elimina la posible interacción química del gel con los reactivos incluyendo las propias proteínas. La técnica de contradifusión se ha utilizado en el espacio en reactores de volumen de varios microlitros que necesitan ser puestos en funcionamiento por la tripulación de la nave y se ha comprobado  
40 mediante video-interferometría que la técnica funciona adecuadamente en condiciones de gravedad reducida (J.M. García-Ruiz, F. Otálora, M.L. Novella, J.A. Gavira, C. Sauter and O. Vidal. A supersaturation wave in protein crystallization. *Journal of Crystal Growth* 232, 2001, 149-155). Para obtener cristales de macromoléculas de forma simple y rápida en laboratorios terrestres se desarrolló el método de acupuntura en gel, que se basa en las propiedades de los geles que se usan para sujetar los capilares que contienen la solución de proteína sin gelificar, así como por ser un medio para la transferencia de materia del agente precipitante. El agente precipitante y la proteína se desplazan en contradifusión a través del gel poroso que sujeta los capilares. La solución de proteína se desplaza a menor velocidad debido a que la constante de difusión de las grandes macromoléculas es uno o dos órdenes de magnitud inferior a las pequeñas moléculas que se utilizan como agente precipitante. Cuando entran en contacto va aumentando la concentración de proteína hasta que se alcanza el grado de sobresaturación que da lugar a la formación de cristales (J.M. García-Ruiz *et al.*, “Teaching protein crystallization by the gel acupuncture method”; *Journal of Chem. Education* 75, 1998, 442-446; F. Otálora y J.M. García-Ruiz, “Computer model of the diffusion/reaction interplay in the Gel Acupuncture Method”, *Journal of Crystal Growth* 169, 1996, 361-367; J. M. García-Ruiz, Counterdiffusion methods for protein crystallisation. *Methods in Enzymology* 368 (2003) 130-154). La técnica de contradifusión desarrollada por J.M. García-Ruiz y colaboradores se basa en comenzar los experimentos de cristalización en condiciones lejanas al equilibrio buscando eventos múltiples de nucleación bajo condiciones que se acercan progresivamente al equilibrio. Con este procedimiento, el sistema experimenta fenómenos de precipitación que tienen lugar a diferentes valores de sobresaturación. Los primeros eventos de nucleación tienen lugar en condiciones muy lejanas al equilibrio dando lugar a precipitación amorfa. Los siguientes eventos ocurrirán en condiciones más cercanas al equilibrio con precipitación policristalina. De esta forma y conforme avanza el proceso, el sistema se acerca lentamente al equilibrio dando lugar a cristales más escasos y de mayor calidad. Cada una de estas precipitaciones ocurre en diferentes localizaciones del capilar. Estos experimentos se han realizado tanto por el método de acupuntura en gel como por el método de las tres capas (H.K. Henisch, *Crystal growth in gels and Liesegang rings*, Cambridge University Press, 1988) en capilares de rayos X (Joseph D. Ng, José A. Gavira and Juan M. García-Ruiz, Protein crystallization by capillary counterdiffusion for applied crystallographic structure determination, *Journal of Structural Biology* 142, 2003, 218-231). Para facilitar la experimentación se desarrolló un dispositivo denominado Granada Crystallisation Box (GCB) que permite implementar fácilmente el método de acupuntura en geles (J.M. García-Ruiz, L. A. González-Ramírez, J.A. Gavira and F. Otálora. Granada Crystallisation Box: a new device for protein crystallisation by counter-diffusion techniques. *Acta Crystallographica D* 58, 2002, 1638-1642). Este dispositivo (GCB) puede funcionar correctamente en el espacio sin  
65

necesidad de ser manipulado por la tripulación de la nave. Para este fin se realizaron unos contenedores especiales, denominados "Granada Crystallisation Facility" que cumplen los requerimientos de seguridad de la experimentación en vehículos orbitales tripulados y que pueden contener hasta 23 GCBs en un litro de volumen y un kilogramo de peso.

5

### Explicación de la invención

Constituye un primer objeto de la presente invención un dispositivo para el crecimiento de cristales por contradifusión constituido por un espacio de geometría unidimensional, preferentemente un tubo capilar, que comprende tres partes de distinta geometría:

10

- 15 a) un cilindro capilar con (un diámetro) una longitud comprendida entre 50 micras y 2 milímetros y longitud superior a 10 mm de tal forma que pueda desarrollarse apropiadamente la técnica de contradifusión como está definida J. M. García-Ruiz, Counterdiffusion methods for protein crystallisation. Methods in Enzimology 368 (2003) 130-154).
- b) el vaso del capilar cuya geometría puede ser cilíndrica, prismática, cónica o de cualquier otra forma pero cuyo volumen ha de ser mayor de cinco veces el volumen del cilindro capilar.
- 20 c) opcionalmente entre el cilindro capilar y el vaso del capilar puede existir un cuello o interfase (cuello del capilar) que tiene forma cilíndrica, prismática, cónica o de cualquier otra forma y cuyo es menor que el volumen del vaso del capilar.

El tubo capilar puede construirse en vidrio o material polimérico transparente o no transparente a los RX. Opcionalmente, el vaso del capilar está provisto de una tapa que permite el cierre hermético del vaso por presión sobre el contorno exterior de dicho vaso.

25

El dispositivo de la invención puede utilizarse individualmente o integrado en un bloque que agrupe varios de dichos dispositivos lo cual permita la realización simultánea de experimentos de cristalización en diferentes condiciones.

30

Dicho bloque para la realización simultánea de procesos de crecimiento de cristales por contradifusión en espacios de geometría unidimensional, preferentemente capilares, consta de los siguientes elementos:

- 35 a) caja externa constituida por una carcasa de geometría prismática, cilíndrica o esférica que se cierra con dos tapas provistas de juntas de estanqueidad, ajustándose la más externa de dichas tapas a la carcasa mediante un conjunto de tornillos a presión.
- b) una caja interna que se coloca centrada en el interior de la caja externa y que es un bloque macizo de geometría prismática, cilíndrica o esférica compatible con la correspondiente geometría de la caja externa que comprende vaciados periódicamente distribuidos que tienen la forma necesaria para encajar los dispositivos de geometría unidimensional y que se cierra con una tapa provista de una junta de estanqueidad.
- 40 c) un volumen libre entre la caja interna y la caja externa dividido en compartimentos que se rellenan con bolsas de material de cambio de fase que se utiliza para mantener la temperatura estable dentro de la caja.
- 45 d) dispositivos de geometría unidimensional, preferentemente capilares, dispuestos en los vaciados previstos a tal efecto en la caja interna.

La caja externa y la caja interna están fabricadas en cualquier material que no interaccione con los agentes químicos que se utilizan en los procesos de crecimiento de cristales, preferentemente en material polimérico, cerámico, metálico o vidrio.

50

Constituye igualmente un objeto de la presente invención un procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión en dichos dispositivos de geometría unidimensional, preferentemente capilares, y que comprende las siguientes etapas:

55

- a) introducción de la solución con el producto a cristalizar en los capilares hasta enrasar con la parte inferior del cuello del capilar o del vaso del capilar.
- 60 b) sellado de la parte inferior de los capilares mediante cera, grasa de vacío, lacre o cualquier otro producto que asegura la estanqueidad del cierre.
- c) opcionalmente relleno del cuello de los capilares con un gel químicamente inerte.
- 65 d) colocación sobre el gel inerte que rellena el cuello de los capilares o directamente sobre el vaso del capilar de la disolución de agente precipitante que ocupará total o parcialmente el vaso de los capilares.
- e) cierre hermético del vaso de los capilares.

## ES 2 304 263 B1

- f) comienzo del transporte de masa difusivo del agente precipitante hacia la disolución que contiene el compuesto que se quiere cristalizar.
- g) cristalización en el interior de los capilares de forma que a medida que avanza el proceso se obtienen cristales de mayor calidad por acercamiento a las condiciones de equilibrio.

El compuesto a cristalizar es, preferentemente, una macromolécula biológica.

La solución que contiene el compuesto que se quiere cristalizar está formada por un disolvente orgánico o inorgánico, preferentemente agua, agua con un tampón de pH ó agua con un producto tensioactivo.

El gel inerte es un agente químicamente inerte tal como agarosa y materiales derivados, gel de sílice o poliacrilamida, o cualquier medio poroso que sirva para evitar la convección.

El agente precipitante es en general cualquier compuesto que reduzca la solubilidad del compuesto que se quiere cristalizar tal como una sal inorgánica, por ejemplo cloruro sódico o sulfato amónico o bien un polímero ó un alcohol, por ejemplo polietilenglicol.

El proceso puede llevarse a cabo en condiciones terrestres de gravedad, o bien en condiciones de gravedad reducida. En este último caso, el procedimiento se lleva cabo preferentemente en el bloque referido anteriormente y que agrupa a varios de los dispositivos de geometría unidimensional.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1: Dispositivo de contradifusión con vaso cilíndrico y con cuello cilíndrico.

Figura 2: Dispositivo de contradifusión con vaso paralelepípedo y sin cuello.

Figura 3: Sección del bloque para la realización simultánea de procesos de crecimiento de cristales por contradifusión.

Figura 4: Sección de la caja interna donde se observa la disposición de los vaciados para colocar los dispositivos de geometría unidimensional, preferentemente capilares.

### Descripción detallada de la invención

El dispositivo objeto de la presente invención se caracteriza por tener 3 partes de distinta geometría.

La primera es el cilindro capilar en sí que tiene una longitud mayor de 10 milímetros y un diámetro entre 50 micras y 2 milímetros. La segunda, que es opcional, es el cuello del capilar que tiene una forma en U y que tiene entre 0.1 y 2 milímetros de longitud. Por su forma el diámetro del cuello varía de forma continua o discontinua entre el diámetro del cilindro capilar y el diámetro del vaso. La tercera es el vaso del capilar que puede tener una longitud entre 10 y 30 milímetros y una anchura hasta 30 veces el diámetro del cilindro capilar. El capilar objeto de la presente invención se caracteriza por tener un aspecto geométrico de forma que el vaso tenga un volumen mayor de 5 veces el volumen del cilindro capilar. Esta geometría es fundamental para la cristalización por contradifusión porque asegura que -una vez alcanzado el equilibrio- la concentración de agente precipitante en el cilindro capilar sea parecida a la concentración inicial en el vaso. De esa forma se puede asegurar que la onda de sobresaturación recorrerá toda la longitud del capilar. Los capilares disponibles actualmente tienen una relación de volumen del vaso a volumen del cilindro capilar demasiado pequeña para que el procedimiento de contradifusión se produzca a todo lo largo del capilar.

El procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión en los dispositivos de la presente invención consta de las siguientes etapas:

- a) La solución con el producto que se quiere cristalizar se introduce en los dispositivos de vidrio hasta enrasar con la parte inferior del cuello del capilar. El disolvente utilizado para la solución que contiene el producto que se quiere cristalizar es agua, agua con un tampón de pH ó agua con un producto tensioactivo. El compuesto que se quiere cristalizar es en general una macromolécula biológica.
- b) Se sella la parte inferior del capilar mediante el uso de cera, grasa de vacío o lacre o cualquier otro producto que asegure la estanqueidad del cierre.
- c) El cuello del capilar se rellena con un gel. El gel es un agente químicamente inerte tal como agarosa y materiales derivados, gel de sílice o poliacrilamida, o cualquier medio poroso que sirva para evitar la convección.
- d) Se coloca sobre el gel el agente precipitante y se cierra el capilar con un septo. El agente precipitante es en general cualquier compuesto que reduzca la solubilidad del producto que se quiere cristalizar, por ejemplo

## ES 2 304 263 B1

una sal inorgánica tal como cloruro sódico o sulfato amónico o bien un polímero o un alcohol, por ejemplo polietilenglicol. También puede usarse como agente precipitante un cambio de pH del medio.

e) cierre hermético del vaso de los capilares.

A partir de ese momento comienza el transporte de masa difusivo del agente precipitante hacia la disolución que contiene el compuesto que se quiere cristalizar, produciéndose la cristalización en el interior de los capilares de forma que a medida que avanza el proceso se obtiene cristales de mayor calidad por acercamiento a las condiciones de equilibrio.

Otro objeto de la presente invención es un bloque (ver Figura 3) que agrupa varios de los dispositivos para el crecimiento de cristales por contradifusión descritos anteriormente y que permite la realización simultánea de experimentos de cristalización en diferentes condiciones y especialmente en el espacio, en condiciones de gravedad reducida. Este bloque optimiza el número de experimentos por unidad de peso y de volumen y facilita y reduce el tiempo necesario para implementar los experimentos antes de su integración en la nave espacial. El bloque objeto de la presente invención se compone de una caja externa (1) que consta de un cuerpo de caja y una tapa ajustables mediante juntas de estanqueidad (2) ("O-rings") y un conjunto de tornillos a presión que asegura un cierre hermético de la misma.

El cuerpo de la caja contiene en su interior y centrado en él una segunda caja (caja interna) (3) que es un bloque macizo en el que se han realizado una serie de vaciados (4) periódicamente distribuidos que tienen la forma necesaria para encajar los dispositivos de geometría unidimensional. En esos huecos se encajan los dispositivos, generalmente capilares, una vez realizado el protocolo de preparación del experimento anteriormente descrito. También puede incluir opcionalmente un vaciado (5) para acoplar un sensor para el registro de temperaturas.

La caja interna (ver Figura 4) puede estar hecha en material polimérico, cerámico, metálico, vidrio y en general de cualquier material que no interaccione con los agentes químicos que se utilizan en los experimentos de cristalización. El volumen libre entre la caja interna y la caja externa está dividido en compartimentos (6) que se rellenan con bolsas de material de cambio de fase que se utiliza para mantener la temperatura estable dentro de la caja. Los capilares, sean de vidrio o de plástico (transparente o no transparente a los rayos X) pueden tener un diámetro capilar comprendido entre 50 micras y 2 milímetros de diámetro.

Este bloque, además de tener las ventajas de la Granada Crystallisation Facility tiene las siguientes ventajas en relación a ella:

- a) se ajusta mejor a las ventajas de la técnica de contradifusión.
- b) aumenta el número de capilares por unidad de volumen.
- c) mejora la respuesta mecánica a la vibración
- d) facilita la implementación rápida y segura en tiempos reducidos.

### Modo de realización de la invención

*Ejemplo de dispositivo de contradifusión con vaso cilíndrico y con cuello cilíndrico (ver Figura 1)*

- 1) Un volumen capilar de vidrio (1) cilíndrico de 0.7 milímetros de diámetro y 50 milímetros de longitud. El volumen de este cilindro a rellenar de disolución de proteína es de 19,23 microlitros.
- 2) El vaso del capilar (3) está realizado en poliestireno y consta de dos cilindros contiguos. El cilindro inferior o cuello del capilar tiene dimensiones internas de 1,5 mm de diámetro y 20 milímetros largo con un volumen total de 35,33 microlitros. El cilindro superior o vaso del capilar propiamente dicho tiene unas dimensiones internas de 2 milímetros de diámetro, y 30 milímetros de altura, con un volumen total de 376,8 microlitros. El vaso del capilar tiene una tapa que cierra el mismo herméticamente por la parte exterior, de tal forma que el cierre no introduce presión en el interior del dispositivo. La tapa del vaso capilar esta unida al vaso capilar mediante una cinta elástica de poliestireno.
- 3) El cuello del capilar (2) tiene un orificio centrado en su parte inferior por donde entra el capilar a ras de la parte inferior quedando sellado el capilar al cuerpo del vaso capilar sin que se obstruya el capilar.

*Procedimiento de utilización del dispositivo de contradifusión con vaso cilíndrico y con cuello cilíndrico en condiciones de gravedad terrestre*

- 1) Se mezcla la cantidad apropiada de agarosa de bajo punto de gelificación al 0.12% en una disolución de acetato sódico tamponada a pH 4.5. Se calienta hasta ebullición y se deja enfriar hasta cinco grados por encima de la temperatura de gelificación.

## ES 2 304 263 B1

- 2) Se mezcla entonces 25 microlitros de la solución de agarosa con 7.5 miligramos de lisozima para preparar una disolución de lisozima al 30%.
- 3) Cuando aun esta la disolución por encima del punto de gelificación se rellena el volumen capilar por capilaridad sumergiendo el extremo inferior del mismo en la disolución con azarosa. La disolución de proteína asciende hasta la parte superior del capilar a ras con la parte inferior del vaso del capilar.
- 4) Se cierra el extremo por el que se ha llenado el capilar mediante cera y se deja enfriar durante 5 minutos a temperatura ambiente para que la azarosa tenga consistencia.
- 5) Se vierte en el vaso-cuello del capilar 200 microlitros de una disolución 3 molar de cloruro sódico tamponada con acetato sódico a pH 4.5.
- 6) Se cierra la tapa del vaso capilar.

### *Ejemplo de dispositivo de contradifusión con vaso paralepipédico y sin cuello (ver Figura 2)*

- 1) Un volumen capilar de vidrio (1) cilíndrico de 0.1 milímetro de diámetro y 40 milímetros de longitud. El volumen de este cilindro a rellenar de disolución de proteína es de 0,314 microlitros.
- 2) El vaso del capilar (2) está realizado en poliestireno y tiene unas dimensiones internas de 5 milímetros de ancho, 2.5 milímetros de profundidad y 20 milímetros de altura, con un volumen total de 250 microlitros. El vaso del capilar tiene una tapa (3) que cierra el mismo herméticamente por la parte exterior, de tal forma que el cierre no introduce presión en el interior del dispositivo. La tapa del vaso capilar esta unida al vaso capilar mediante una cinta elástica de poliestireno. El vaso del capilar tiene un orificio centrado en su parte inferior por donde entra el capilar a ras de la parte inferior quedando sellado el capilar al cuerpo del vaso capilar sin que se obstruya el capilar.

### *Procedimiento de utilización del dispositivo de contradifusión con vaso paralepipédico y sin cuello*

- 1) Se rellena el volumen capilar por capilaridad sumergiendo un extremo inferior del mismo en la disolución de lisozima de 30 mg/ml de concentración tamponada con acetato a pH 4,5. La disolución de proteína asciende hasta la parte superior del capilar a ras con la parte inferior del vaso del capilar.
- 2) Se cierra el extremo por el que se ha llenado el capilar mediante cera.
- 3) Se vierte en el vaso del capilar 10 microlitros de una disolución 3 Molar de cloruro sódico tamponada con acetato sódico a pH 4.5. Se cierra la tapa del vaso capilar.

### *Procedimiento de utilización del dispositivo de contradifusión con vaso cilíndrico y con cuello cilíndrico en condiciones de gravedad reducida en el espacio*

- 1) Se prepara una disolución de lisozima al 30% con 7.5 miligramos de lisozima y 25 microlitros de una disolución con acetato sódico a pH 4,5.
- 2) Se rellena el volumen capilar por capilaridad sumergiendo el extremo inferior del mismo en la disolución de lisozima tamponada con acetato a pH 4,5. La disolución de proteína asciende hasta la parte superior del capilar a ras con la parte inferior del vaso del capilar.
- 3) Se cierra el extremo por el que se ha llenado el capilar mediante cera y se deja enfriar durante 5 minutos a temperatura ambiente para que la azarosa tenga consistencia.
- 4) Se preparan 1 mililitro de una disolución de agarosa de bajo punto de gelificación al 0.12%. Se calienta hasta ebullición y se deja enfriar hasta cinco grados por encima de la temperatura de gelificación.
- 5) Cuando aún esta la disolución de agarosa fluida y por encima del punto de gelificación se rellena el cuello del capilar mediante una pipeta con 35 microlitros de la disolución de agarosa y se deja enfriar durante unos minutos a temperatura ambiente.
- 6) Se vierte en el vaso-cuello del capilar 200 microlitros de una disolución 3 Molar de cloruro sódico tamponada con acetato sódico a pH 4.5.
- 7) Se cierra la tapa del vaso capilar.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dispositivo para el crecimiento de cristales por contradifusión constituido por un espacio de geometría unidimensional, preferentemente un tubo capilar, **caracterizado** porque comprende tres partes de distinta geometría:
- 10 a) cilindro capilar con un diámetro comprendido entre 50 micras y 2 milímetros y longitud superior a 10 mm.
  - b) vaso del capilar cuya geometría puede ser cilíndrica, prismática, cónica o de cualquier otra forma pero cuyo volumen ha de ser mayor de cinco veces el volumen del cilindro capilar.
  - 15 c) opcionalmente entre el cilindro capilar y el vaso del capilar puede existir un cuello o interfase (cuello del capilar) que tiene forma cilíndrica, prismática, cónica o de cualquier otra forma y cuyo volumen es menor que el volumen del vaso del capilar.
2. Dispositivo para el crecimiento de cristales por contradifusión según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el tubo capilar se construye en vidrio o material polimérico transparente o no transparente a los RX.
3. Dispositivo para el crecimiento de cristales por contradifusión según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque el vaso del capilar está provisto de una tapa que permite el cierre hermético del vaso por presión sobre el contorno exterior de dicho vaso.
- 20 4. Bloque para la realización simultánea de procesos de crecimiento de cristales por contradifusión en espacios de geometría unidimensional, preferentemente capilares, que consta de los siguientes elementos:
- 25 a) caja externa constituida por una carcasa de geometría prismática, cilíndrica o esférica que se cierra con dos tapas provistas de juntas de estanqueidad, ajustándose la más externa de dichas tapas a la carcasa mediante un conjunto de tornillos a presión.
  - 30 b) una caja interna que se coloca centrada en el interior de la caja externa y que es un bloque macizo de geometría prismática, cilíndrica o esférica compatible con la correspondiente geometría de la caja externa que comprende vaciados periódicamente distribuidos que tienen la forma necesaria para encajar los dispositivos de geometría unidimensional y que se cierra con una tapa provista de una junta de estanqueidad.
  - 35 c) un volumen libre entre la caja interna y la caja externa dividido en compartimentos que se rellenan con bolsas de material de cambio de fase que se utiliza para mantener la temperatura estable dentro de la caja.
  - 40 d) dispositivos de geometría unidimensional, preferentemente capilares, según las reivindicaciones 1 a 3, dispuestos en los vaciados previstos a tal efecto en la caja interna.
5. Bloque para la realización simultánea en el espacio de procesos de crecimiento de cristales por contradifusión según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la caja externa y la caja interna están fabricadas en cualquier material que no interaccione con los agentes químicos que se utilizan en los procesos de crecimiento de cristales, preferentemente en material polimérico, cerámico, metálico o vidrio.
- 45 6. Procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión en dispositivos de geometría unidimensional, preferentemente capilares, según las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
- 50 a) introducción de la solución con el producto a cristalizar en los capilares de hasta enrasar con la parte inferior del cuello del capilar o del vaso del capilar.
  - b) sellado de la parte inferior de los capilares mediante cera, grasa de vacío, lacre o cualquier otro producto que asegura la estanqueidad del cierre.
  - 55 c) opcional relleno del cuello de los capilares con un gel químicamente inerte.
  - d) colocación sobre el gel inerte que rellena el cuello de los capilares o directamente sobre el vaso del capilar de la disolución de agente precipitante que ocupará total o parcialmente el vaso de los capilares.
  - 60 e) cierre hermético del vaso de los capilares.
  - f) comienzo del transporte de masa difusivo del agente precipitante hacia la disolución que contiene el compuesto que se quiere cristalizar.
  - 65 g) cristalización en el interior de los capilares de forma que a medida que avanza el proceso se obtienen cristales de mayor calidad por acercamiento a las condiciones de equilibrio.

## ES 2 304 263 B1

7. Procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión según la reivindicación 6 **caracterizado** porque el compuesto a cristalizar es una macromolécula biológica.

5 8. Procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión según las reivindicaciones 6 y 7, **caracterizado** porque la solución que contiene el compuesto que se quiere cristalizar está formada por un disolvente orgánico ó inorgánico.

10 9. Procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión según la reivindicación 8 **caracterizado** porque el disolvente utilizado para la solución que contiene el compuesto que se quiere cristalizar es agua, agua con un tampón de pH ó agua con un producto tensioactivo.

15 10. Procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión según las reivindicaciones 6-9 **caracterizado** porque el gel inerte es un agente químicamente inerte tal como agarosa y materiales derivados, gel de sílice ó poliacrilamida, o cualquier medio poroso que sirva para evitar la convección.

20 11. Procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión según las reivindicaciones 6-10 **caracterizado** porque el agente precipitante es en general cualquier compuesto que reduzca la solubilidad del compuesto que se quiere cristalizar.

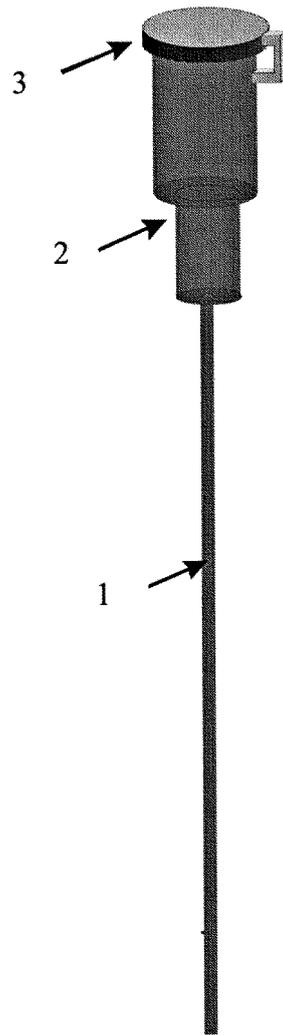
25 12. Procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión según las reivindicación 11, **caracterizado** porque el agente precipitante es una sal inorgánica, por ejemplo cloruro sódico o sulfato amónico.

30 13. Procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión según las reivindicación 11 **caracterizado** porque el agente precipitante es un polímero ó un alcohol, por ejemplo polietilenglicol.

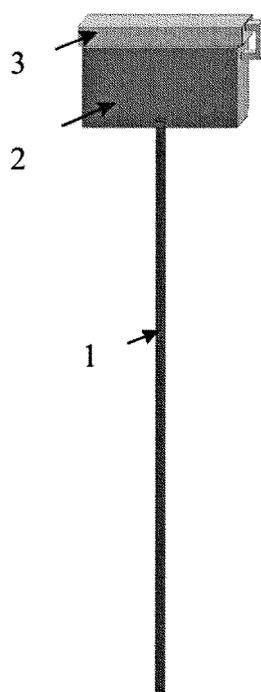
35 14. Procedimiento para el crecimiento de cristales en contradifusión según las reivindicaciones 6-13, **caracterizado** porque todo el proceso se lleva a cabo en condiciones terrestres de gravedad.

40 15. Procedimiento para el crecimiento de cristales en contradifusión según las reivindicaciones 6-13, **caracterizado** porque el contacto entre el agente precipitante y la solución con el producto que se quiere cristalizar y la consiguiente cristalización en el interior de los capilares se lleva a cabo en condiciones de gravedad reducida.

45 50 55 60 65 16. Procedimiento para el crecimiento de cristales en contradifusión según la reivindicación 15, **caracterizado** porque el procesos e lleva a cabo preferentemente en los dispositivos de geometría unidimensional integrados en un bloque según las reivindicaciones 4 y 5.

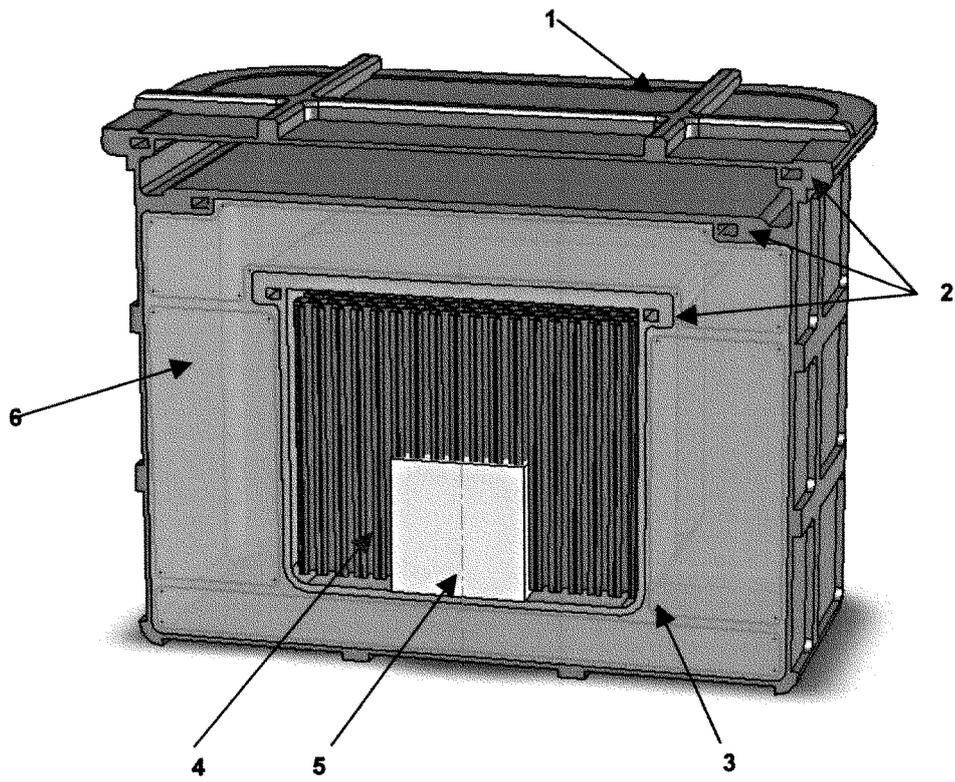


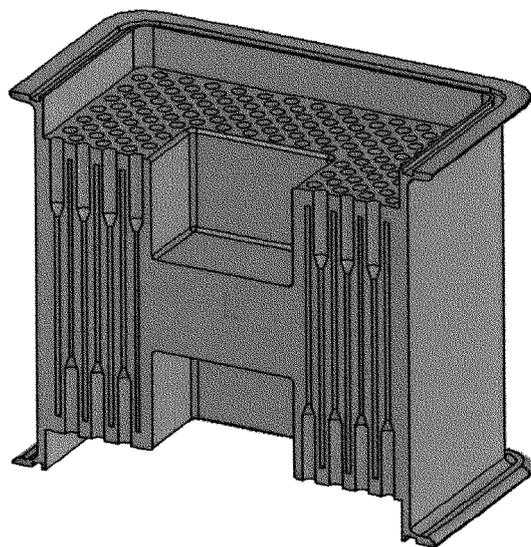
**Figura 1**



**Figura 2**

**Figura 3**





**Figura 4**



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 304 263

② Nº de solicitud: 200401200

③ Fecha de presentación de la solicitud: **19.05.2004**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2164032 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 01.02.2002, todo el documento.	1-16
A	ES 2172363 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 16.09.2002, todo el documento.	1-16
A	US 5641681 A (CARTER, D.C.) 24.06.1997, todo el documento	1-16
A	MX PA00003022 A (UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO) 08.03.2002, todo el documento.	1-16
A	US 6409832 B2 (WEIGL, B.H. et al.) 25.06.2002, todo el documento.	1-16

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

15.09.2005

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C30B 7/00** (2006.01)

**C30B 29/58** (2006.01)

**C30B 30/08** (2006.01)