

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 345**

51 Int. Cl.:

G03B 42/02 (2006.01)

G01N 23/223 (2006.01)

G01N 23/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2008 E 08798006 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 2183644**

54 Título: **Placa de pocillos para mediciones XRF**

30 Prioridad:

16.08.2007 US 965052 P

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

05.10.2016

73 Titular/es:

**ICAGEN, INC. (100.0%)
4222 Emperor Boulevard, Suite 350
Durham, NC 27703, US**

72 Inventor/es:

**BIRNBAUM, EVA R.;
WARNER, BENJAMIN P.;
BALDWIN, SHARON M.;
BERGER, JENNIFER A. y
MILLER, REBECCA L.E.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 585 345 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

Placa de pocillos para mediciones XRF

- 5 Esta solicitud está relacionada con y reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos 60/965.052 titulada "Well plate", que fue presentada el 16 de agosto de 2007.

Campo de la invención

- 10 La presente invención se refiere a la preparación de muestras para un análisis espectroscópico.

Antecedentes de la invención

- 15 La espectrometría de fluorescencia de rayos X (XRF) es una técnica espectroscópica de gran alcance que se ha usado para determinar los elementos que están presentes en una muestra química, y para determinar la cantidad de esos elementos en la muestra. El principio físico subyacente del método es que cuando un átomo de un elemento específico se irradia con una radiación de rayos X, el átomo expulsa un electrón del núcleo tal como un electrón de la cubierta K. A continuación, el átomo resultante está en un estado excitado, y se puede volver al estado base reemplazando el electrón expulsado con un electrón de una órbita de energía más alta. Esto va acompañado de la emisión de un fotón. La energía de los fotones emitidos es igual a la diferencia en las energías de las dos órbitas. Cada elemento tiene un conjunto característico de energías de órbita y, por lo tanto, un espectro de fluorescencia de rayos X (XRF) característico.

- 25 Un espectrómetro de XRF es un aparato capaz de irradiar una muestra con un haz de rayos X, detectar la fluorescencia de rayos X de la muestra, y usar la fluorescencia de los rayos X para determinar qué elementos están presentes en la muestra y medir la cantidad de estos elementos. Un espectrómetro de fluorescencia de rayos X de energía dispersiva disponible comercialmente típico es el espectrómetro de fluorescencia de rayos X de energía dispersiva EDAX Eagle XPL, equipado con un tubo de rayos X de microfoco, un detector de estado sólido de silicio derivado del litio, una electrónica de procesamiento, y un software operativo suministrado por el proveedor, disponible en la división EDAX de Ametek, 91 McKee Drive Mahwah, NJ 07430. Un ejemplo de un espectrómetro de fluorescencia de rayos X de dispersión de longitud de onda es el ZSX Primus, disponible en Rigaku Americas, 9009 New Trails Drive, The Woodlands, TX 77381. En principio, cualquier elemento puede detectarse y cuantificarse con una XRF.

- 35 Los ensayos típicos de proteínas-fármacos se realizan con unas concentraciones de proteína y concentraciones de fármaco de nanomoles a micromoles. La concentración de proteína y la concentración de fármaco no necesitan ser la misma. La técnica existente para el análisis de muestras secadas por fluorescencia de rayos x solo puede medir muestras secas que se depositan a partir de un microlitro o menos de soluciones que tienen concentraciones mínimas de aproximadamente 10 micromoles (véase Thomasin C. Miller, Christopher M. Sparks, George J. Havrilla, Meredith R. Beebe, "Semiconductor applications of nanoliter droplet methodology with total reflection X-ray fluorescence analysis", Spectrochimica Acta Part B 59 (2004) 1117-1124). Este método de preparación de muestras es insuficiente para el análisis de proteínas y complejos de proteínas-fármacos, donde las concentraciones biológicamente pertinentes de la solución a partir de la que se deposita la muestra deben ser menores que 10 micromoles y preferentemente menores que 100 nanomoles.

- 45 El documento US 2005/0090019 desvela una placa de pocillos de XRF que tiene unas perforaciones que pasan a través de la placa de pocillos desde una cara a otra, cubriéndose dichas perforaciones por una película translúcida a los rayos x. Los documentos US 6426050 y US 6171780 desvelan las dimensiones de las perforaciones en las diferentes placas de pocillos.

- 50 El estado de la técnica existente es insuficiente para analizar las soluciones diluidas, especialmente las soluciones diluidas de proteínas que tienen concentraciones de menos de aproximadamente 10 micromoles.

- 55 Sigue existiendo la necesidad de unos métodos más simples para preparar muestras para su medición usando la espectrometría de fluorescencia de rayos X. La presente invención está diseñada para hacer frente a esa necesidad.

Sumario de la presente invención

- 60 Un aspecto de la presente invención comprende un aparato (2) para preparar una o más muestras para la medición por espectrometría de fluorescencia de rayos X, que comprende una placa de pocillos (4) que tiene al menos un orificio (8) que penetra dicha placa de pocillos; pasando a través de dicho al menos un orificio de la placa de pocillos desde una cara a la otra cara, cubriendo dicho orificio una película (6), siendo dicha película (6) al menos un 5 % translúcida a 2.300 eV de rayos X orientados normales a dicha película (6), y teniendo dicho orificio (8) un diámetro de menos de 500 micrómetros en al menos una dimensión paralela a dicha película (6) en la localización donde dicho orificio (8) linda con dicha película (6) y una zona de sección transversal de menos de 0,005 centímetros cuadrados donde dicho orificio (8) linda con dicha película (6), caracterizado por que las paredes de dicho orificio (8)

tienen una rugosidad RMS de menos de 20 micrómetros.

Otro aspecto más de la presente invención comprende un método de acuerdo con la reivindicación 3.

- 5 Los objetivos adicionales, ventajas y nuevas características de la invención se expondrán en parte en la descripción siguiente y en parte resultarán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de lo siguiente o pueden aprenderse por la práctica de la invención. Los objetivos y ventajas de la invención pueden realizarse y alcanzarse por medio de las instrumentalidades y combinaciones específicamente indicadas en las reivindicaciones adjuntas.

10 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 muestra una representación esquemática de la presente invención.

- 15 La figura 2 muestra una vista en corte de sección de la placa 4 que muestra unos ejemplos de las formas del orificio(s) 8.

La figura 3 muestra unas muestras de proteínas preparadas usando un aparato 2 y mediante una pipeta.

- 20 La figura 4 muestra un espectro de fluorescencia de rayos X de las muestras de proteína preparadas usando un aparato 2 y mediante una pipeta.

La figura 5 muestra una comparación del perfil de espesor de sección transversal de unas muestras de proteína preparadas usando un aparato 2 y mediante una pipeta.

25 **Descripción detallada**

- En resumen, la presente invención incluye un aparato para preparar las muestras para la medición por espectrometría de fluorescencia de rayos X. El aparato comprende una placa que tiene uno o más orificios que pasan a través de la placa. Los orificios están cubiertos por una película en un lado de la placa. Los orificios son de menos de 500 micrómetros a través de una dimensión donde la película cubre los orificios. La película es translúcida a los rayos x. La presente invención también incluye un aparato para preparar muestras para la medición por espectrometría de fluorescencia de rayos X. El aparato comprende una placa que tiene uno o más orificios que pasan a través de la placa. Los orificios están cubiertos en un lado de la placa por una cubierta desmontable que forma un cierre estanco al agua contra la placa. La cubierta está sustancialmente libre de los elementos osmio, iridio, iridio, fósforo, zirconio, platino, oro, niobio, mercurio, talio, molibdeno, azufre, plomo, bismuto, tecnecio, rutenio, cloro, rodio, paladio, argón, plata, y torio. Los orificios son de menos de aproximadamente 500 micrómetros a través de una dimensión donde la cubierta cubre los orificios. La presente invención también incluye un método para preparar muestras para la medición por espectrometría de fluorescencia de rayos X. El método comprende proporcionar una solución con menos de 10 micromoles de soluto y un volumen de entre aproximadamente 2 microlitros y aproximadamente 2 mililitros. La solución se concentra y se analiza usando la espectrometría de fluorescencia de rayos X.

- La presente invención comprende un aparato 2, que incluye una placa 4 y una película 6. La película 6 cubre una cara de la placa 4. La placa 4 tiene uno o más orificios 8. Los orificios 8 pasan a través de la placa 4 desde la cara de la placa 4 que está cubierta por la película 6 hasta la cara opuesta de la placa 4. La película 6 puede estar unida a la placa 4.

- El aparato 2 no debería tener fugas de disolvente en la unión de la película 6 y la placa 4. Preferentemente, la unión de la película 6 y la placa 4 mantiene un cierre estanco al agua cuando el aparato 2 se somete o a temperaturas por encima de aproximadamente 37,7 °C o la aceleración excede aproximadamente 20 veces la constante gravitacional de la tierra al nivel del mar, o la presión atmosférica es inferior a aproximadamente 760 torr.

- Las dimensiones de la placa 4 son más preferentemente de 127,76 mm ± 0,25 mm por 85,48 mm ± 0,25 mm, cuando se mide desde una posición dentro de 12,7 mm (0,5000 pulgadas) de las esquinas exteriores de la placa 4. Si la placa 4 es sustancialmente rectangular o si la placa 4 tiene una pestaña en la parte inferior entonces la placa 4 o su pestaña tiene preferentemente un radio de esquina hasta el exterior de 3,18 mm ± 1,6 mm. Si la placa 4 es sustancialmente rectangular pero tiene uno o más chaflanes o esquinas biseladas, entonces los radios de esquina de las esquinas no biseladas son preferentemente de 3,18 mm ± 1,6 mm hacia el exterior. Si el aparato 2 comprende 96 unos orificios 8, entonces los orificios 8 están dispuestos preferentemente en forma de ocho filas por doce columnas. En este caso, la distancia entre al menos un borde exterior de la placa 4 y el centro de la primera columna de orificios 8 es preferentemente de 14,38 mm ± 4 mm. La distancia entre cada columna de orificios 8 es preferentemente de 9 mm ± 4 mm. La distancia entre al menos un borde exterior de la placa 4 y el centro de la primera fila de orificios 8 es preferentemente de 11,24 mm ± 4 mm. La distancia entre cada fila de orificios 8 es preferentemente de 9 mm ± 4 mm. Al menos uno de los orificios 8 se marca preferentemente de una manera distintiva, y más preferentemente cada fila se marca de una manera distintiva y cada columna se marca de una manera distintiva. Si el aparato 2 comprende 384 orificios 8, entonces los orificios 8 están dispuestos

preferentemente en forma de dieciséis filas por veinticuatro columnas. En este caso, la distancia entre al menos un borde exterior de la placa 4 y el centro de la primera columna de orificios 8 es preferentemente de $12,13 \text{ mm} \pm 4 \text{ mm}$. La distancia entre cada columna de orificios 8 es preferentemente de $4,5 \text{ mm} \pm 2 \text{ mm}$. La distancia entre al menos un borde exterior de la placa 4 y el centro de la primera fila de orificios 8 es preferentemente de $8,99 \text{ mm} \pm 4 \text{ mm}$. La distancia entre cada fila de orificios 8 es preferentemente de $4,5 \text{ mm} \pm 2 \text{ mm}$. Al menos uno de orificios 8 se marca preferentemente de una manera distintiva, y más preferentemente cada fila se marca de una manera distintiva y cada columna se marca de una manera distintiva. Si el aparato 2 comprende 1536 orificios 8, entonces los orificios 8 están dispuestos preferentemente como treinta y dos filas por cuarenta y ocho columnas. En este caso, la distancia entre al menos un borde exterior de la placa 4 y el centro de la primera columna de orificios 8 es preferentemente de $11,005 \text{ mm} \pm 4 \text{ mm}$. La distancia entre cada columna de orificios 8 es preferentemente de $2,25 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$. La distancia entre al menos un borde exterior de la placa 4 y el centro de la primera fila de orificios 8 es preferentemente de $7,865 \text{ mm} \pm 4 \text{ mm}$. La distancia entre cada fila de orificios 8 es preferentemente de $2,25 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$. Al menos uno de orificios 8 se marca preferentemente de una manera distintiva, y más preferentemente cada fila se marca de una manera distintiva y cada columna se marca de una manera distintiva. La placa 4 está preferentemente entre 7 mm y 35 mm de altura. La cara superior 12 y la cara inferior 10 preferentemente son sustancialmente paralelas entre sí. La placa 4 puede comprender un pestaña en uno o más lados de la placa 4. Si la placa 4 comprende una pestaña, entonces la altura de la pestaña está preferentemente entre 1 mm y 10 mm, y más preferentemente es de $2,41 \text{ mm} \pm 0,38 \text{ mm}$ o $6,10 \text{ mm} \pm 0,38 \text{ mm}$ o $7,62 \text{ mm} \pm 0,38 \text{ mm}$ cuando se mide desde el plano de apoyo inferior de la placa 4 hasta la parte superior de la pestaña. Es preferible, si la placa 4 es sustancialmente rectangular, con o sin chaflanes en las esquinas, que las pestañas de al menos dos de los lados de la placa 4 tengan la misma altura de pestaña cuando se mide desde el plano de apoyo inferior de la placa 4 hasta la parte superior de la pestaña. La pestaña se extiende preferentemente desde la placa 4 al menos 0,5 mm y preferentemente 1,27 mm cuando se mide en la parte superior de la pestaña. Cualquiera de los chaflanes no tiene preferentemente unas pestañas. Una pestaña en la placa 4 puede tener interrupciones o salientes. Preferentemente, cualquier borde de cualquier interrupción o saliente en una pestaña es de un mínimo de 47,8 mm desde los bordes de la placa 4 que son sustancialmente perpendiculares hasta la pestaña que tiene la interrupción(s) o el saliente(s).

La placa 4 se compone preferentemente de plástico, aunque el uso de metal para componer la placa 4 hará la placa 4 más duradera. La placa 4 tiene preferentemente unas dimensiones de una longitud de 127,7 mm (más o menos 12,7 mm) por una anchura de 85,4 mm (más o menos 12,7 mm). La altura de la placa 4 está preferentemente entre 1 milímetro y 150 milímetros. La placa 4 se ajusta más preferentemente a las normas ANSI/SBS 1-2004 y ANSI/SBS 2-2004. La placa 4 tiene una cara superior 12 y una cara inferior 10.

La placa 4 tiene uno o más orificios 8, que pasan a través de la cara inferior 10 de la placa 4 y de la cara superior 12 de la placa 4. Si hay noventa y seis (96) orificios 8, o trescientos ochenta y cuatro (384) orificios 8, o mil quinientos treinta y seis (1.536) orificios 8, entonces, la colocación de los orificios 8 se ajusta preferentemente a la norma ANSI/SBS 4-2004. Los orificios 8 pasan a través de la placa 4. En la cara superior 12, el orificio 8 tiene un diámetro de entre 500 micrómetros y treinta (30) milímetros. En la cara inferior 10, los orificios 8 tienen un diámetro de entre 10 micrómetros y dos milímetros, y preferentemente un diámetro de entre 50 micrómetros y 500 micrómetros, y más preferentemente un diámetro de entre 50 micrómetros y 350 micrómetros. Cada orificio 8 tiene preferentemente un volumen suficiente para contener un mínimo de 10 microlitros entre los planos definidos por la cara superior 12 y la cara inferior 10. Cada orificio 8 puede estar recubierto opcionalmente con silicona u otro recubrimiento que minimice la unión de proteína a las paredes del orificio 8. El orificio(s) 8 puede ser cónico o cónico truncado con el extremo ancho del cono en la cara superior 12 de la placa 4 y el extremo estrecho del cono en la cara inferior 10 de la placa 4. El orificio(s) 8 puede ser cilíndrico en la parte superior y cónico o cónico truncado en la parte inferior. El orificio(s) 8 puede ser cilíndrico en la parte superior y cónico o cónico truncado en el medio, y cilíndrico en la parte inferior. El orificio(s) 8 puede ser cilíndrico en la parte superior y cónico o cónico truncado en el medio, y cónico en la parte inferior con el extremo ancho de la abertura de cono inferior en la cara inferior 10 de la placa 4; en esta configuración, el orificio(s) 8 tiene forma de mancuerna. Cualquier forma que permita que el líquido fluya a través del orificio(s) 8 es aceptable. El perímetro en la parte más ancha del orificio(s) 8 es preferentemente mayor que el perímetro del orificio(s) 8 donde el orificio(s) 8 está cubierto por la película 6.

El orificio(s) 8 debería ser químicamente inerte bajo las condiciones de uso. Preferentemente, el orificio(s) 8 no libera contaminantes que interfieren con las mediciones XRF de la muestra 18. Más preferentemente, los orificios (8) no liberan más de 5 partes por billón de azufre o 5 partes por billón de cloro o cinco partes por billón de fósforo en cualquier forma química cuando se expone a una solución que comprende agua, proteínas, dimetilsulfóxido o dimetilformamida a 50 °C durante 3 horas.

El orificio(s) 8 es también preferentemente liso de tal manera que la muestra 18 no quede atrapada en superficies rugosas. Cualquier característica de superficie en el orificio(s) 8 es preferentemente menor que 200 micrómetros en la dimensión normal de la cara interior del orificio(s) 8. La cara interior del orificio(s) 8 tiene una rugosidad media cuadrática (RMS) de menos de aproximadamente 20 micrómetros. Un orificio (8) que tiene una depresión interna de 200 micrómetros funcionó aceptablemente en la presente invención. Un orificio (8) que tiene una rugosidad de aproximadamente 5 micrómetros funcionó aceptablemente en la presente invención. Para minimizar la cantidad de muestra 18 que llega a adherirse al lateral del orificio(s) 8, el orificio(s) 8 debería tener un ángulo incluido de menos de aproximadamente 45 grados, y más preferentemente de menos de aproximadamente 42 grados, y lo más

preferentemente de menos de aproximadamente 40 grados. La totalidad del orificio(s) 8 puede tener estos ángulos incluidos, o simplemente la parte del orificio(s) 8 donde la zona de sección transversal se está reduciendo puede formarse para tener este ángulo incluido.

5 La línea que define la interfaz entre la solución, la superficie sólida del orificio(s) 8, y la atmósfera se llama la línea de contacto. El orificio(s) 8 está conformado preferentemente de tal manera que la longitud de la línea de contacto disminuye durante al menos una parte del tiempo en el que se reduce el volumen de la solución. Es deseable que una parte de la muestra 18 se adhiera a la película 6 si la película 6 se separa; por lo tanto, es deseable que el orificio(s) 8 sea más ancho donde linda con la película 6 que donde el orificio(s) 8 es más estrecho.

10 El orificio(s) 8 debería tener una pequeña zona de sección transversal en la parte inferior, es decir, la localización donde el orificio(s) 8 linda con la película 6. La sección transversal del orificio(s) 8 en esta localización es de menos de aproximadamente 500 micrómetros de diámetro en una dimensión, y es más preferentemente de menos de 1000 micrómetros de diámetro en la otra dimensión, de tal manera que la totalidad de la zona de sección transversal del orificio(s) 8 en la localización donde el orificio(s) 8 linda con la película 6 es de menos de aproximadamente 0,005 centímetros cuadrados.

La película 6 se localiza al otro lado de la cara inferior 10 de la placa 4. La película 6 puede sujetarse contra la cara inferior 10 de la placa 4 mediante un adhesivo opcional 14. Como alternativa, la película 6 puede sujetarse contra la cara inferior 10 de la placa 4 mediante una placa inferior opcional 16, en cuyo caso la película 6 se coloca entre la placa inferior 14 y la cara inferior 10 de la placa 4. Una junta 20 puede colocarse entre la película 6 y la placa inferior 16. La película 6 puede unirse a la cara inferior 10 de la placa 4 por calor o por un disolvente. La película 6 puede estar unida de manera permanente a la placa 4 o puede ser extraíble. La película 6 está preferentemente sustancialmente libre de al menos uno de los elementos de azufre, fósforo o cloro. Unos ejemplos de materiales adecuados incluyen Porvair #229302, Porvair #229112, Porvair #229058, Porvair #229304, y Porvair #229301, todos los cuales están disponibles en Porvair plc, Brampton House, 50 Bergen Way, King's Lynn, Norfolk PE30 2JG, Reino Unido), unas láminas de aluminio (ejemplos: Lámina 'F' de microsellado de Bio-Rad Laboratories, 1000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547). Otras cintas que pueden usarse para la película 6 incluyen: cinta de protección superficial superdelgada de poliéster, cinta de protección superficial Surlyn resistente a productos químicos, cinta de protección superficial de poliuretano resistente a la abrasión, cinta Kapton resistente al calor con adhesivo de silicona o con adhesivo acrílico, cinta de protección superficial de polietileno resistente a UV, cinta de protección superficial de poliuretano de liberación de limpieza, cinta de poliimida de baja estática, todas disponibles en McMaster-Carr, 6100 Fulton Industrial Blvd., Atlanta, GA 30336 a 2852. Otros materiales que pueden usarse para la película 6 incluyen una lámina de oro puro al 99,99 %, de 0,02 micrómetros de espesor, disponible en Lebow Company, 5960 Mandarin Ave., Goleta, CA 93117 Estados Unidos; una lámina de aluminio puro al 99,95 % de 0,07 micrómetros de espesor, disponible en Lebow Company, 5960 Mandarin Ave., Goleta, CA 93117 Estados Unidos; PARYLENE N[®] de 0,1 micrómetros a 20 micrómetros de espesor, disponible en Lebow Company, 5960 Mandarin Ave., Goleta, CA 93117 Estados Unidos; y una lámina de titanio puro al 99,99 % de 0,5 micrómetros de espesor a 25,0 micrómetros de espesor, disponible en Lebow Company, 5960 Mandarin Ave., Goleta, CA 93117 Estados Unidos; y polipropileno de 4 micrómetros de espesor a 8 micrómetros de espesor, disponible en Lebow Company, 5960 Mandarin Ave., Goleta, CA 93117 Estados Unidos. Otros sustratos que se usan convenientemente son AP1, AP3, ProLINE serie 10, ProLINE serie 20, sustratos DuraBeryllium de Moxtek, 452 West 1260 North, Orem, Utah 84057. Otros materiales que pueden usarse para la película 6 son Ultralene[®], mylar, policarbonato, prolono y kapton, disponibles en SPEX CertiPrep Ltd, 2 Dalston Gardens, Stanmore, Middlesex HA7 1BQ, Inglaterra. Otros materiales que pueden usarse convenientemente son Hostaphan[®], poliéster, y Etnom[®] disponibles en Chemplex Industries, Inc., 2820 SW 42a Avenue, Palm City, FL 34990-5573 Estados Unidos. Otro material que puede usarse convenientemente es una parte de película de zona libre ZAF-PE-50, disponible en Excel Scientific, 18350 George Blvd, Victorville, CA, 92394. Esta lista no es exhaustiva, y pueden usarse otros materiales para la película 6. La película 6 puede estar hecha de fluorocarbonos. La película 6 también está preferentemente sustancialmente libre de elementos que tienen picos de emisión de fluorescencia de rayos X que tienen energías entre 1,9 KeV y 3 KeV, debido a que estos picos tienden a interferir con las señales de mayor interés para la aplicación del aparato 2 en aplicaciones bioquímicas y biológicas. Los elementos que tienen picos de emisión de fluorescencia de rayos X que tienen energías entre 1,9 KeV y 3 KeV son: osmio, itrio, iridio, fósforo, zirconio, platino, oro, niobio, mercurio, talio, molibdeno, azufre, plomo, bismuto, tecnecio, rutenio, cloro, rodio, paladio, argón, plata, y torio. Si el aparato 2 se usa con un espectrómetro de fluorescencia de rayos X que usa un detector de rayos x que comprende silicio, entonces la película 6 también está preferentemente libre de elementos que tienen picos de escape de fluorescencia de rayos X (es decir, picos de emisión de fluorescencia de rayos X de menos de 1,74 KeV) que tienen energías entre 1,9 KeV y 3 KeV, debido a que estos picos de escape tienden a interferir con las señales de mayor interés para la aplicación del aparato 2 en aplicaciones bioquímicas y biológicas. Los elementos que tienen picos de escape de fluorescencia de rayos X que tienen energías entre 1,9 KeV y 3 KeV son: calcio, telurio, yodo, escandio, xenón, cesio, bario, titanio, y lantano. "Sustancialmente libre" se define en el presente documento como que es menos de aproximadamente un 4 % en peso. La película 6 puede tener elementos químicos adicionales, que pueden usarse para medir el espesor de la muestra 18. Si se usa la fluorescencia de rayos X de dispersión de longitud de onda, entonces la pureza elemental de la película 6 no es tan importante; en este caso, la película debería estar sustancialmente libre del elemento o los elementos que se usan para cuantificar la muestra. La película 6 puede tratarse para aumentar la adhesión de proteínas; una lista no inclusiva de tratamientos incluye tratar la película 6 con

plasma de oxígeno o nitrógeno o con poli-lisina.

Si la película 6 está unida a la placa 4, entonces la película 6 debe deformarse con la muestra 18. La película 6 deformada a partir del plano definido por el perímetro del orificio(s) 8 donde el orificio(s) 8 linda con la película 6, una distancia mínima de 100 nanómetros.

Si la película 6 puede desmontarse de la placa 4, entonces la placa 4 se deforma como resultado de la carga durante el uso normal. La placa 4 se deforma desde el plano de película 6 una distancia mínima de 10 micrómetros.

Si la película 6 no puede desmontarse de la cara inferior 10 de la placa 4, entonces la película 6 es preferentemente translúcida a los rayos X tienen energías de 2,3 KeV. En este caso, translúcido se define como que permite al menos un 5 % de los rayos X que son normales a la película 6 y que tienen una energía de 2,3 KeV para que pasen a través de la película 6, cuando la película 6 se coloca en un plano que es perpendicular a una línea definida por la muestra 18 y un detector de rayos x. Las composiciones y espesores de material que pueden usarse para la película 6 (si la película 6 no puede desmontarse de la cara inferior 10 de la placa 4) pueden medirse o calcularse usando los parámetros de atenuación de rayos x para los diversos materiales. Una lista no exhaustiva de materiales que son adecuados para la película 6 (si la película 6 no puede desmontarse de la cara inferior 10 de la placa 4) incluye polipropileno, que es de menos de aproximadamente 195 micrómetros de espesor, y policarbonato que es de menos de aproximadamente 105 micrómetros de espesor.

El aparato 2 se usa con un espectrómetro de fluorescencia de rayos X. El aparato 2 se usa preferentemente colocando una solución de la muestra 18 en uno o más orificios 8. Al menos una parte del disolvente que contiene la muestra 18 que se evapora a continuación. Preferentemente, al menos el 80 % del disolvente de la muestra 18 se evapora; más preferentemente, se evapora sustancialmente la totalidad del disolvente de la muestra 18. El disolvente se evapora preferentemente usando unas temperaturas elevadas que están por encima de 22 °C o una reducción de la presión atmosférica que es inferior a aproximadamente 760 torr. El aparato 2 se coloca preferentemente en una centrifugadora de vacío, tal como una Savant Speed Vac Plus SC 250DDA o un Thermo Savant SPD 1010 SpeedVac®. El disolvente se elimina preferentemente de la muestra 18 mientras el aparato 2 centrifuga y la muestra 18 se concentra reuniéndose en la parte del orificio 8 que pasa a través de la cara inferior 10 de la placa 4 y sobre una película 6. La ventaja del aparato 2 es que la muestra se concentra en una zona pequeña. Si la película 6 puede desmontarse y la película 6 es lo suficientemente gruesa de manera que no es translúcida (translúcida se define como que permite que al menos el 5 % de los rayos X que son normales a la película 6 y que tienen una energía de 2.300 eV pasen a través de la película 6, cuando la película 6 se coloca en un plano que es perpendicular a una línea definida por la muestra 18 y un detector de rayos x), entonces la película 6 se separa a continuación de la placa 4 y se mide en un espectrómetro de fluorescencia de rayos X (por ejemplo, un EDAX Eagle III μ probe, disponible en EDAX, 91 McKee Drive Mahwah, NJ 07430; o un MicroXR VXR Microbeam XRF System, disponible en Thermo Fisher Scientific, Inc., 81 Wyman Street, Waltham, MA 02454). En este caso, la película 6 está orientada en el espectrómetro de fluorescencia de rayos X de manera que la muestra 18 está entre la película 6 y el detector de rayos X del espectrómetro de fluorescencia de rayos X. La película 6 se sujeta preferentemente en un bastidor 20 para sujetar la película 6 plana. Si la película 6 es translúcida a los rayos X como se ha definido anteriormente, entonces la muestra 18 puede medirse sin separar la película 6 de la placa 4. Si la película 6 es translúcida a los rayos X, entonces la muestra 18 puede medirse usando un espectrómetro de fluorescencia de rayos X con la película 6 orientada entre la muestra 18 y el detector de rayos x, si se separa o no la película 6 de la placa 4. La ventaja de no separar la película 6 de la placa 4 es que la placa 4 funciona como un bastidor, y por lo tanto no es necesario un bastidor adicional 20. La ventaja de separar la película 6 es que la muestra 18 puede medirse sin atenuación de la película 6. El aparato 2 se usa preferentemente con un espectrómetro de fluorescencia de rayos X, cuyo tamaño del haz se corresponde con el tamaño de la muestra 18 después de que el disolvente se ha evaporado; en este caso un tamaño de haz coincidente se define como la zona del haz de excitación de rayos X que contiene al menos un 80 % del flujo de rayos X que incide sobre la muestra 18 que está dentro de un factor de 100 de la zona de la muestra 18. La fuente de excitación de rayos X puede ser enfocada, tal como por medio de una óptica de enfoque policapilar ofrecida por X-Ray Optical Systems, Inc., 15 Tech Valley Drive, East Greenbush, Nueva York 12061. Un espectrómetro de fluorescencia de rayos X equipado con un colimador u otro tipo de óptica de enfoque en la fuente de excitación de rayos X también es aceptable.

La ventaja de usar un aparato 2 para preparar muestras para las mediciones de espectrometría de fluorescencia de rayos X es que los límites de medición son mejores cuando se usa un aparato 2 en comparación con simplemente pipeteando o imprimiendo una muestra en una película como se describe, por ejemplo, en Miller TC et al. "Semiconductor applications of nanoliter droplet methodology with total reflection x-ray fluorescence analysis". *Spectrochimica Acta B*. 2004, 59: 1117-1124; o Miller TC y GJ Havrilla. "Nanodroplets: a new method for dried spot preparation and analysis" *X-Ray Spect* 2004, 33:101-106. La segunda ventaja de usar el aparato 2 es que muchas muestras biológicas se preparan como soluciones diluidas, por ejemplo, como unas soluciones diluidas de proteínas. El aparato 2 permite volúmenes relativamente grandes de una solución de muestra a prepararse, y la muestra se concentra en una gota seca de muestra con unas propiedades óptimas. Los volúmenes de solución están preferentemente entre 2 microlitros a 2 mililitros, y más preferentemente están entre 10 microlitros y 250 microlitros. En contraste, los métodos de preparación de muestras existentes requieren unas soluciones de muestra altamente concentradas con el fin de depositar una cantidad suficiente de muestra para la medición. También en contraste, los

métodos de preparación de muestras existentes requieren una gran cantidad de muestra para cebar el cabezal de impresión o llenar sus depósitos, lo que desecha muestra valiosa. Por ejemplo, supóngase que se desea medir aproximadamente 30 picogramos de azufre en una muestra. Usando los métodos de deposición convencionales, que podrían usar 10 nanolitros de solución, la concentración de azufre en la solución inicial tendría que ser 100 micromoles. Usando un aparato 2, pueden usarse 100 microlitros de disolvente, lo que resulta en una concentración de muestra inicial de 10 nanomoles. Para la biología, la bioquímica, y el desarrollo de fármacos, es importante ser capaz de trabajar con soluciones que tengan una concentración de nanomoles, frente a unas soluciones con decenas o cientos de concentraciones de micromoles. Si el aparato 2 se usa con una proteína o un ácido nucleico, la masa del azufre o de fósforo o una combinación de azufre y fósforo en la proteína o en el ácido nucleico está preferentemente entre 50 femtogramos y 1 microgramo, y más preferentemente la masa del fósforo o del azufre o las combinaciones de los mismos en la muestra 18 está entre 100 picogramos y 100 nanogramos.

La muestra 18 se deposita en una forma que está definida por la forma del orificio 8 a medida que penetra en la cara inferior 10 de la placa 4. La forma más eficiente para la muestra 18 es una que sea similar al tamaño del haz de excitación de rayos x del espectrómetro de fluorescencia de rayos X. Por lo general, tanto la muestra 18 como el haz de excitación de rayos X son aproximadamente de contorno circular. Similitud, en este contexto, significa que la zona de la muestra 18 está dentro de un factor de 100 veces mayor o menor que la zona del haz de excitación de rayos X, ya que ilumina la muestra 18 (por ejemplo, el diámetro de la muestra 18 está dentro de un factor de 10 del haz de excitación de rayos X, ya que ilumina la muestra 18). Preferentemente, la muestra 18 está dentro de un factor de 25 veces más grande o más pequeño que la zona del haz de excitación de rayos X, ya que ilumina la muestra 18 (por ejemplo, el diámetro de la muestra 18 está dentro de un factor de 5 del haz de excitación de rayos X que ilumina la muestra 18). Si la zona del haz de excitación de rayos X, que ilumina la muestra 18 es significativamente mayor que la zona de la muestra 18, entonces se desperdician los fotones de rayos X. Si la zona del haz de excitación de rayos X, que ilumina la muestra 18 es significativamente menor que la zona de la muestra 18, entonces el tiempo de medición será innecesariamente largo, o bien una parte de la muestra 18 se desperdiciará porque no se está midiendo.

La muestra 18 comprende normalmente una muestra acuosa de una proteína o un ácido nucleico, que se ha modificado opcionalmente sumando un inhibidor, un cofactor, un metal, una proteína, un azúcar, u otro producto químico. La muestra 18 puede medirse convenientemente usando un instrumento de fluorescencia de rayos X. Este instrumento de fluorescencia de rayos X comprende preferentemente al menos uno de los siguientes: una óptica de enfoque monocapilar, una óptica de enfoque policapilar, un colimador, un tubo de rayos X de micro enfoque, una fuente de rayos X de sincrotrón, una fuente de rayos X de acelerador lineal, un tubo de rayos X de rodio, un tubo de rayos X de molibdeno, un tubo de rayos X de cromo, un tubo de rayos X de plata, un tubo de rayos X de paladio, una fuente de rayos X monocromática, una fuente de rayos X policromática, una fuente de rayos X polarizada, una disposición de enfoque de espectrómetro de fluorescencia de rayos X confocal, un detector de diodo PIN, un detector de rayos X de semiconductor, un detector de rayos X de germanio o dopado de germanio, un detector de rayos X de silicio o dopado de silicio, un espectrómetro de fluorescencia de rayos X de dispersión de longitud de onda, un espectrómetro de fluorescencia de rayos X de dispersión de energía, un espectrómetro de fluorescencia de rayos X de reflectancia total, y similares.

Si la película 6 contiene unos elementos químicos adicionales que puedan medirse con el espectrómetro de fluorescencia de rayos X que se usa con el aparato 2, entonces estos elementos pueden usarse para medir el espesor de la muestra 18. Por ejemplo, si la película 6 contiene silicio, entonces la atenuación de la señal de rayos x de silicio por la muestra 18 permitirá que se estime el espesor de la muestra 18. La figura 5 muestra los espesores relativos de una muestra de proteína depositada usando el aparato 2 y una muestra de proteína depositada usando una pipeta. La muestra de proteína depositada usando un aparato 2 es significativamente más compacta y carece de la forma de anillo, en comparación con las muestras depositadas por una pipeta que muestran alternativamente unos anillos de muestra depositada y unos anillos que se agotan en la muestra. La figura 3 muestra una fotografía de una muestra depositada por una pipeta. La figura 3 muestra también una fotografía de una muestra depositada usando el aparato 2. La muestra depositada usando una pipeta es significativamente más grande y tiene más anillos que la muestra depositada usando el aparato 2. La muestra más compacta depositada usando un aparato 2 proporciona una señal más intensa en el espectro de fluorescencia de rayos x, como se muestra en la figura 4. Unas correcciones de espesor se realizan midiendo la señal de la película 6 (por ejemplo, una señal de silicio) en una región donde no hay muestra 18, y midiendo la misma señal elemental de una región de la película 6 que está cubierta por la muestra 18. La diferencia en la señal de rayos X de la película puede relacionarse con el espesor de la muestra 18 calculando el espesor de la muestra 18 necesario para atenuar la señal de rayos x por la cantidad medida.

El aparato 2 puede usarse con proteínas. Muchas proteínas requieren un regulador para mantener el pH dentro de un intervalo específico (por ejemplo un regulador de pH), o para mantener el estado redox de un producto químico (por ejemplo, un regulador redox), o para mantener una fuerza iónica (por ejemplo, un regulador isotónico). Muchos reguladores contienen elementos que pueden interferir con la medición de la química. El regulador debe estar preferentemente libre de al menos un elemento químico con un número atómico mayor que cuatro, donde ese elemento químico está presente en la muestra 18. El regulador debería estar más preferentemente libre de al menos un elemento químico que tenga un número atómico mayor de ocho, donde ese elemento químico está presente en la

- muestra 18. El regulador debería estar preferentemente libre de al menos uno de los siguientes productos químicos o grupos funcionales: dimetilsulfóxido, tioles, anión de sulfato, anión de sulfonato, anión de cloruro, anión de bromuro, anión de fluoruro, anión de yoduro, anión de perclorato, anión de fosfato, y anión de fosfonato. El regulador comprende preferentemente uno o más de los siguientes grupos químicos o funcionales: amina, imina, anión de nitrato, anión de nitrito, catión de amonio, anión de acetato, anión de carboxilato, anión de carbonato, y catión de iminio; estos productos químicos ofrecen las propiedades de regulación correctas con una mínima interferencia de fluorescencia de rayos x. El más preferentemente, el regulador comprende una sal de nitrato de amonio tal como el nitrato de tris (etanol) amina, también conocido como tris nitrato.
- 10 Las proteínas a usarse con la presente invención se purifican preferentemente para eliminar los productos químicos, incluyendo reguladores de pH y reguladores redox y reguladores isotónicos, que no están químicamente unidos o que se unen débilmente a la proteína. Esta purificación también elimina las sales que contribuyen a la mala calidad de la muestra. Débilmente unido se define en el sentido de que tiene una afinidad de unión que es más débil que alrededor de diez milimoles. Esta etapa de desalación puede realizarse convenientemente usando la cromatografía de filtración en gel o la cromatografía de exclusión por tamaño, una columna de proteína de giro rápido que usa un Sephadex G-25, está disponible en Roche Applied Science, PO Box 50414, Indianapolis, IN, 46250. Este proceso es susceptible de multiplexación usando un formato de placa de pocillos, tal como un formato de placa de 96 pocillos, 384 pocillos, o 1536 pocillos. Los sistemas de separaciones tales como las placas de 96 pocillos Zeba disponibles en Pierce Biotechnology Inc., PO Box 117, Rockford, Illinois, 61105, son específicamente convenientes. La ventaja de la eliminación de los reguladores y otros productos químicos unidos débilmente es que su eliminación minimiza los elementos de interferencia que podrían atenuar la señal de fluorescencia de rayos X deseada o añadir unas señales de fluorescencia de rayos x engañosas, o que crean unas señales de rayos x no fluorescentes por medio de la difracción y otros procesos similares.
- 25 Tanto el proceso de cromatografía de filtración en gel monoplexado como multiplexado pueden acelerarse usando una centrifugadora, tal como la IEC CL40 disponible en Thermo Fisher Scientific, producto # 11210923, 450 Fortune Blvd, Milford, MA, 01757; o un colector de vacío, tal como un aparato de vacío, tal como el colector de vacío MultiScreen con apilamiento directo de Millipore, 290 Concord Road, Billerica, MA 01821, unido a una bomba de vacío convencional (por ejemplo, Millipore, Catalogo # WP61 115 60) también disponible en Millipore. Las separaciones se realizan preferentemente en menos de 300 segundos de centrifugación, y se realizan más preferentemente en menos de 30 segundos de centrifugación. Un método alternativo de separación es la ultrafiltración, tal como podría realizarse usando un Centricon YM-3 centrifugado durante 3 horas a 7000 g.
- 35 La desalación por columnas de exclusión por tamaño puede usarse convenientemente con el aparato 2, usando una placa de pocillos de desalación que tiene el mismo número de pocillos y localizaciones de pocillos que números y localizaciones de orificios 8 en el aparato 2. La placa de desalado se coloca en la parte superior del aparato 2, y una solución de la muestra 2 se coloca en uno o más de los pocillos de la placa de desalado. La placa de desalado apilada y el aparato 2 se centrifugan hasta que la solución que contiene la muestra 18 pasa a través de la placa de desalinización y entra en el orificio 8 del aparato 2. El aparato 2 se coloca a continuación en una centrifugadora de vacío como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, la solución de la muestra 18 puede desalarse y transferirse a un aparato 2, por ejemplo, mediante una pipeta.
- 45 Si la muestra 18 comprende una proteína, esta debería estar preferentemente presente en una concentración de menos de 10 micromoles, y más preferentemente de menos de 100 nanomoles. Además de las proteínas, otras moléculas biológicas que pueden usarse incluyen ácidos nucleicos, polisacáridos, péptidos, y otras moléculas de origen biológico; como las proteínas, éstas están presentes preferentemente en la solución a concentraciones de menos de 10 micromoles, y más preferentemente de menos de 100 nanomoles.
- 50 La descripción anterior de la invención se ha presentado con fines de ilustración y descripción y no pretende ser exhaustiva o limitar la invención a la forma precisa desvelada, y obviamente, son posibles muchas modificaciones y variaciones a la luz de las enseñanzas anteriores.
- 55 La realización(s) se ha elegido y descrito con el fin de explicar mejor los principios de la invención y su aplicación práctica para permitir de este modo que otros expertos en la materia usen mejor la invención en varias realizaciones y con varias modificaciones que sean adecuadas para el uso específico contemplado. Se pretende que el alcance de la invención esté definido por las reivindicaciones adjuntas a la misma.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato (2) para preparar una o más muestras para la medición por espectrometría de fluorescencia de rayos X, que comprende una placa de pocillos (4) que tiene al menos un orificio (8) que atraviesa dicha placa de pocillos; pasándolo dicho al menos un orificio a través de la placa de pocillos desde una cara a la otra cara, cubriendo una película (6) dicho orificio, siendo dicha película (6) al menos un 5 % translúcida a 2.300 eV de rayos X orientados normales a dicha película (6), **caracterizado por que** dicho orificio (8) tiene un diámetro de menos de 500 micrómetros en al menos una dimensión paralela a dicha película (6) en el lugar donde dicho orificio (8) linda con dicha película (6) y una zona de sección transversal de menos de 0,005 centímetros cuadrados donde dicho orificio (8) linda con dicha película (6), y en el que las paredes de dicho orificio (8) tienen una rugosidad RMS de menos de 20 micrómetros.
2. El aparato (2) de la reivindicación 1, en el que dicha película (6) puede deformarse a partir del plano definido por la parte de dicho orificio (8) que linda con dicha película (6), siendo dicha deformación de al menos 100 nanómetros.
3. Un método para preparar una muestra para la medición por espectrometría de fluorescencia de rayos X, que comprende proporcionar una solución que tiene una concentración de soluto de menos de aproximadamente 10 micromoles y un volumen de entre aproximadamente 2 microlitros y aproximadamente 2 mililitros, concentrar la solución en una muestra que tiene menos de una quinta parte del volumen original de la solución y analizar la muestra usando la espectrometría de fluorescencia de rayos X, **caracterizado por que** la muestra se concentra en un orificio (8) de un aparato de acuerdo con la reivindicación 1.
4. El método de la reivindicación 3, en el que el soluto tiene una masa total de entre 50 femtogramos y 1 microgramo de un elemento seleccionado de la lista de fósforo, azufre y combinaciones de los mismos.
5. El método de la reivindicación 3, en el que el pocillo tiene un ángulo incluido de menos de 45 grados.

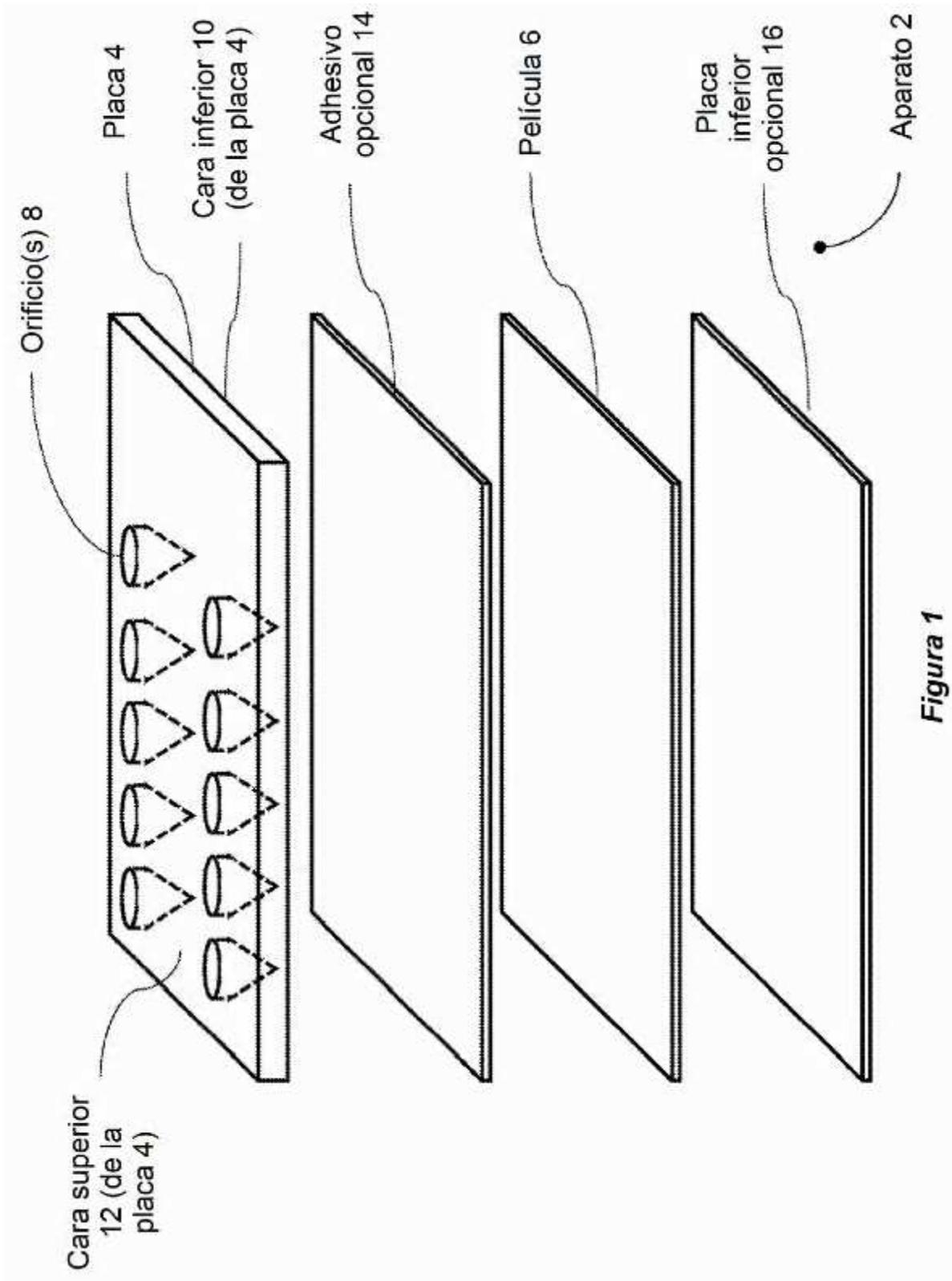


Figura 1

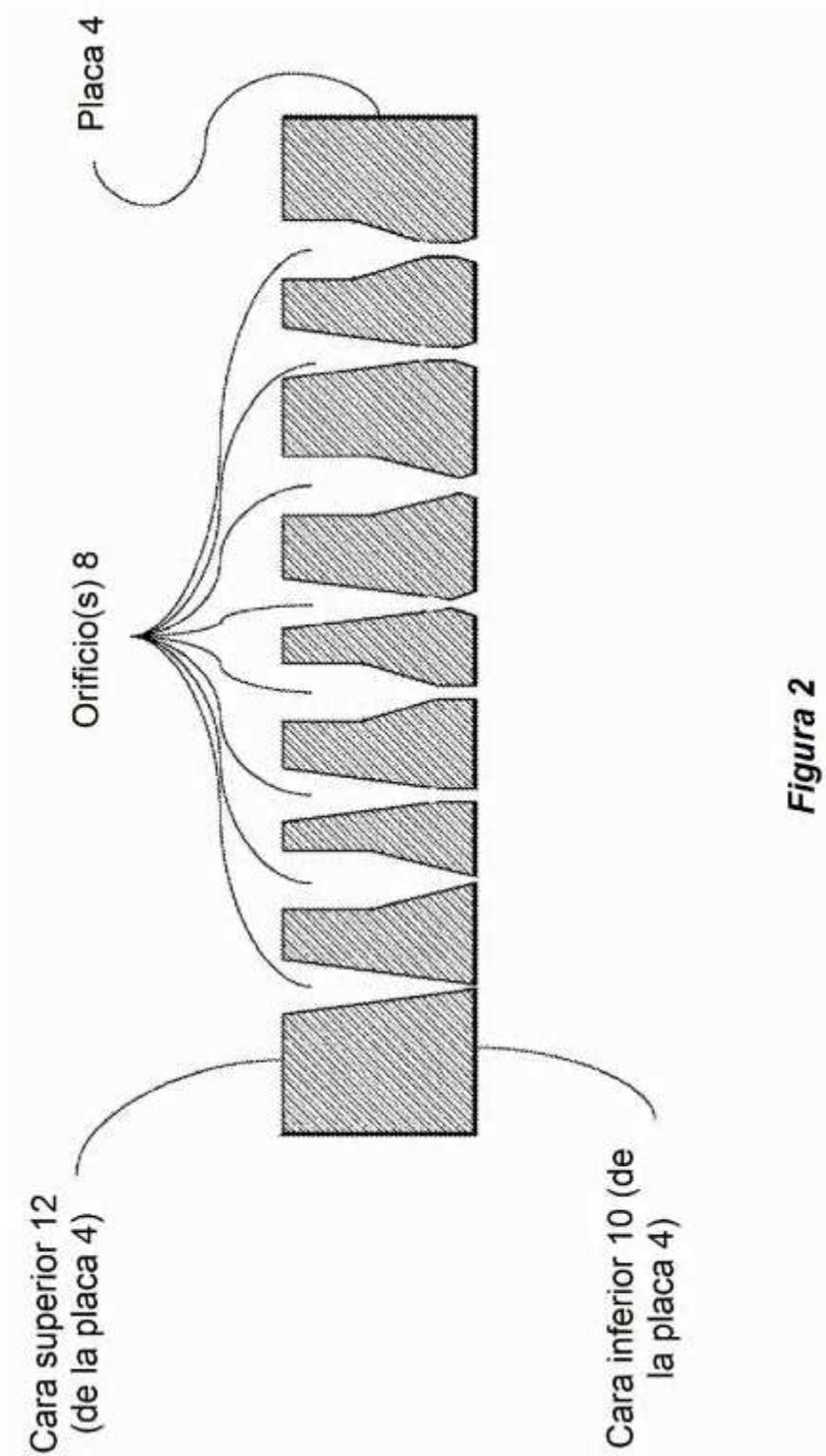
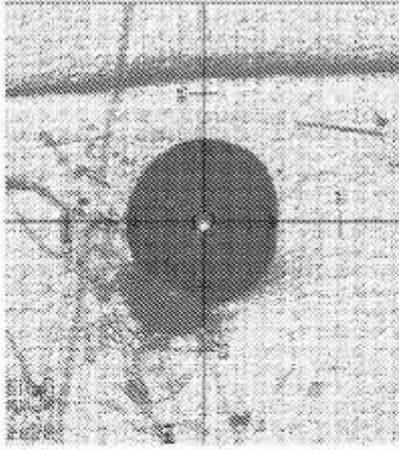
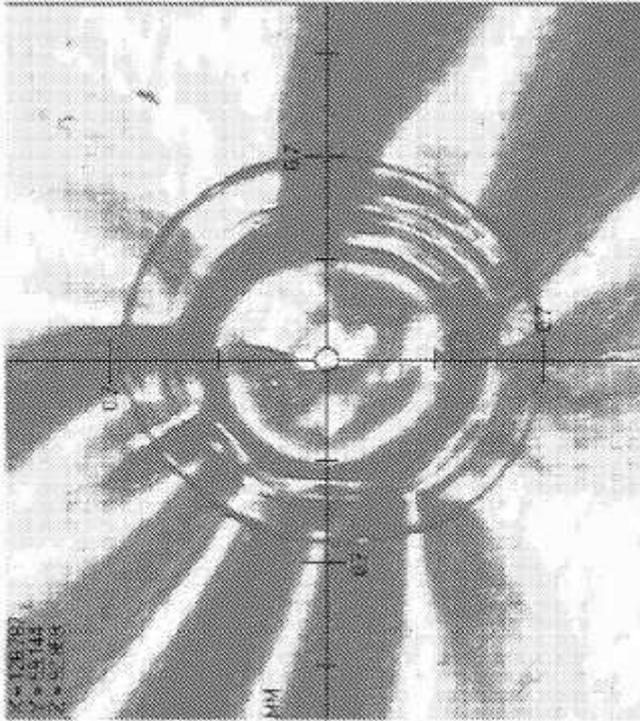


Figura 2

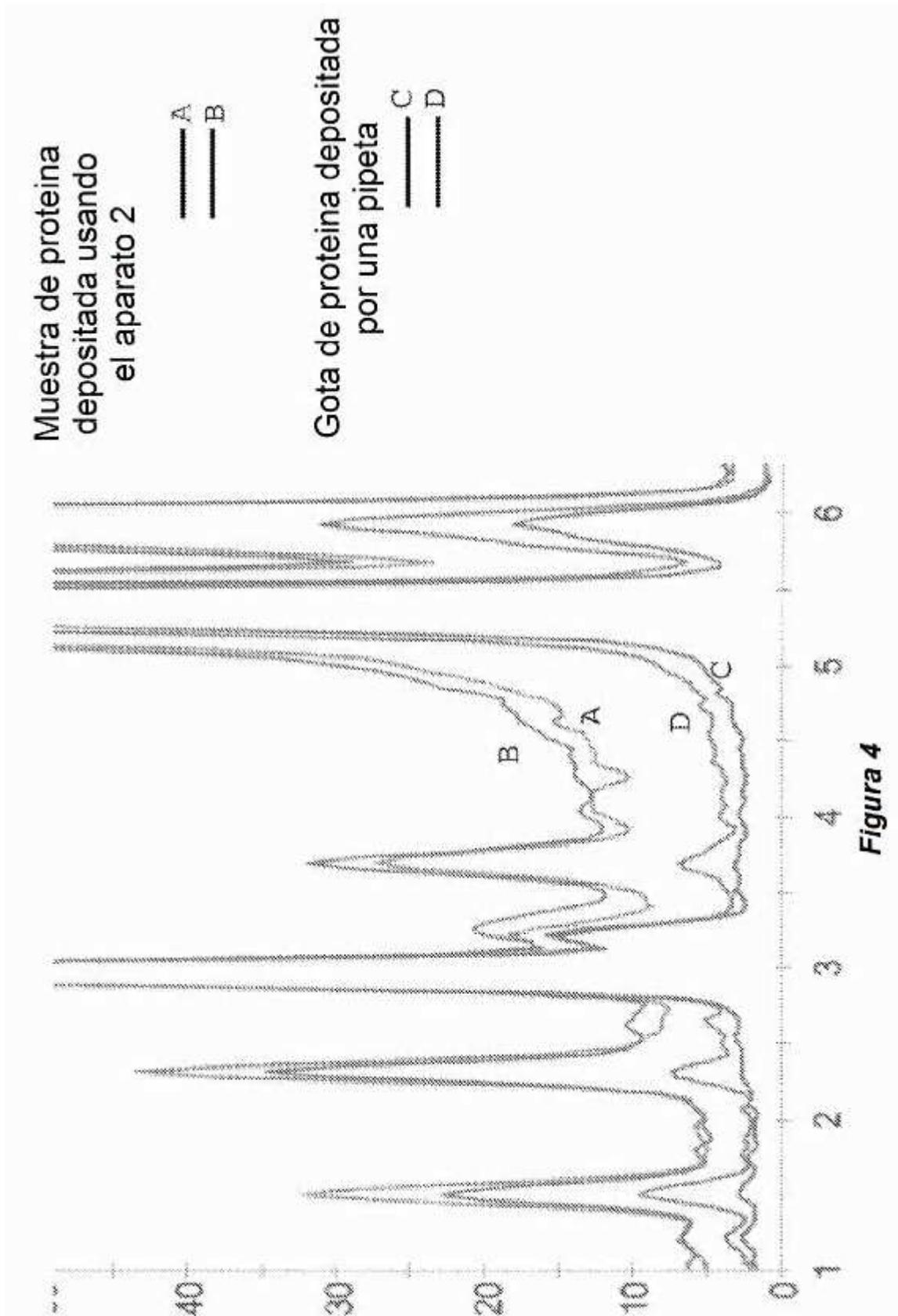


Muestra de proteina
depositada usando el
aparato 2



Gota de proteina depositada por una
pipeta

Figura 3



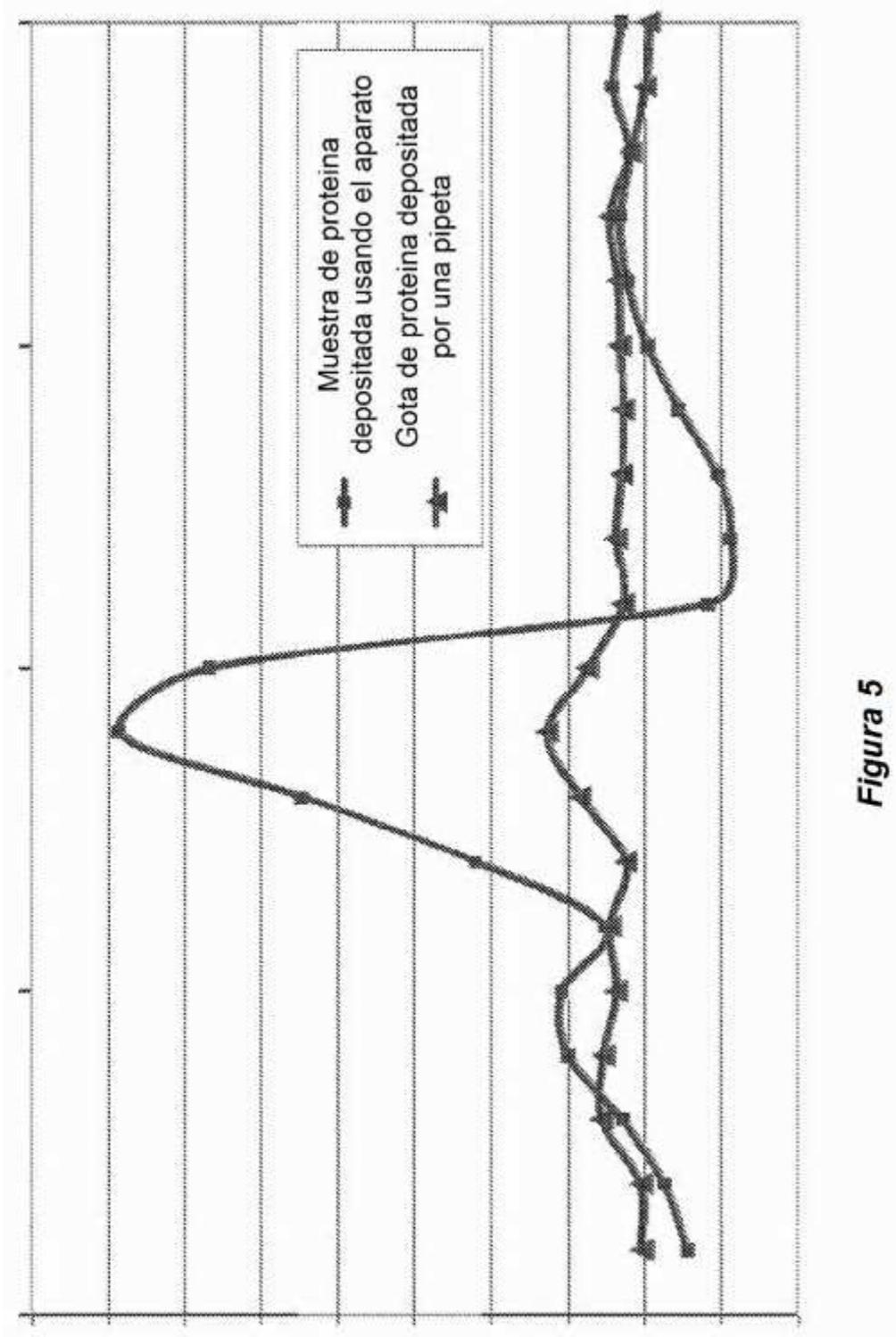


Figura 5