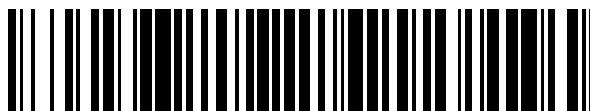


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 296**

51 Int. Cl.:

G01N 23/223 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2003 PCT/US2003/020103**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2004 WO04011898**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2003 E 03748920 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 1525458**

54 Título: **Método y aparato de flujo para la selección de sustancias químicas utilizando microfluorescencia de rayos X**

30 Prioridad:

25.07.2002 US 206524

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

10.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HAVRILLA, GEORGE, J.;
MILLER, THOMASIN, C.;
WARNER, BENJAMIN, P.;
LEWIS, CRIS, L.;
MAHAN, CYNTHIA, A. y
WELLS, CYNDI, A.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 623 296 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

Método y aparato de flujo para la selección de sustancias químicas utilizando microfluorescencia de rayos X

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a la detección de acontecimientos de unión y más particularmente a un método de flujo para detectar acontecimientos de unión entre una sustancia química farmacéutica potencial y un ligando diana usando espectroscopia de microfluorescencia de rayos X.

10

Antecedentes de la invención

Las sustancias químicas farmacéuticas son los principios activos en fármacos como los ya conocidos Prilosec™, Lipitor™, Zocor™, Prozac™, Zolof™ y Celebrex™ y se cree que sus propiedades farmacéuticas están relacionadas con su capacidad para unirse al "sitio de unión" de una o más proteínas. Las propiedades de unión de una proteína dependen en gran medida de los restos de aminoácidos expuestos de la superficie de la cadena polipeptídica (véase, por ejemplo, Bruce Alberts et al., "Molecular Biology of the Cell", 2ª edición, Garland Publishing, Inc., Nueva York, 1989 y H. Lodish et al., "Molecular Cell Biology", 4ª edición, W. H. Freeman and Company, 2000). Estos residuos de aminoácidos pueden formar enlaces débiles no covalentes con iones y otras moléculas. La unión eficaz generalmente requiere la formación de muchos enlaces débiles en el "sitio de unión" de la proteína. El sitio de unión es habitualmente una cavidad en la proteína formada por una disposición específica de aminoácidos. Debe haber un ajuste preciso con el sitio de unión para que se produzca la unión eficaz. Las formas de los sitios de unión pueden diferir mucho entre las diferentes proteínas, e incluso entre diferentes conformaciones de la misma proteína. Incluso las conformaciones ligeramente diferentes de la misma proteína pueden diferir mucho en sus capacidades de unión. Por estas razones, es extremadamente difícil predecir qué sustancias químicas se unirán eficazmente a las proteínas.

20

Pueden requerirse muchos años hasta identificar una sustancia química farmacéutica. El deseo de acelerar la identificación de importantes sustancias químicas farmacéuticas es un desafío constante que ha impulsado el uso de estrategias de selección para seleccionar una gran cantidad de materiales estructural o químicamente relacionados, conocidos en la técnica como una "biblioteca", en cuanto a sus propiedades de unión a proteínas.

30

Los métodos de selección generalmente implican combinar potenciales sustancias químicas farmacéuticas con ligandos diana y determinar cuál de las posibles sustancias químicas farmacéuticas, dado el caso, se une a cualquiera de los ligandos diana. Las potenciales sustancias químicas farmacéuticas son preferiblemente compuestos orgánicos solubles en agua que pueden disolverse en el torrente sanguíneo. Los ligandos objetivo son generalmente materiales biológicos tales como enzimas, proteínas no enzimas, ADN, ARN, microorganismos (por ejemplo, priones, virus, bacterias y similares), células humanas, células vegetales, células animales y similares. Las potenciales sustancias químicas farmacéuticas que se unen a al menos un ligando diana son candidatos probables para una investigación adicional de sus propiedades farmacéuticas (por ejemplo, eficacia y toxicidad).

35

Algunos de los métodos de selección conocidos se describen en las tres patentes siguientes.

40

La patente US-6.147.344 concedida a D. Allen Annis et al. titulada "Método para identificar compuestos en una mezcla química", expedida el 14 de noviembre de 2000, describe un método para analizar automáticamente datos de espectrografía de masas a partir de mezclas de compuestos químicos.

45

La patente US-6.344.334 concedida a Jonathan A. Ellman et al. titulada "Recombinación farmacófora para la identificación de compuestos prototipo de fármacos de molécula pequeña", expedida el 5 de febrero de 2002, describe un método para identificar un compuesto prototipo de fármaco que inhibe la unión de moléculas biológicas diana poniendo en contacto estas moléculas biológicas diana con una biblioteca de fragmentos de unión diana interrelacionados.

50

La patente US-6.395.169 concedida a Ole Hindsgaul et al. titulada "Aparato para la selección de bibliotecas de compuestos", expedida el 28 de mayo de 2002, describe un aparato que emplea cromatografía frontal combinada con espectrometría de masas para identificar y clasificar miembros de una biblioteca que se unen a un receptor diana.

55

Los métodos de selección a veces emplean materiales etiquetados ya que el material no marcado análogo no es visible de otra manera usando la técnica analítica elegida para el método de selección. El etiquetado puede implicar la unión de una parte química marcada con una sustancia química. Un ejemplo de un método de selección que requiere etiquetas es la clasificación de células activadas por fluorescencia. Un ejemplo de este método implica la preparación de una solución de células y anticuerpos que llevan una etiqueta fluorescente. Algunos de los anticuerpos se unen a algunas de las células. Las células pasan una por una por un rayo láser y un detector (tal como un detector de fluorescencia ultravioleta/visible). Se determina que las células fluorescentes están unidas a los anticuerpos etiquetados y, a continuación, se desvían a un colector (véase, por ejemplo, Bruce Alberts et al., "Molecular Biology of the Cell", 2ª edición, Garland Publishing, Inc., Nueva York, 1989, páginas 159-160).

60

65

Se supone generalmente que la fijación de una etiqueta fluorescente solo sirve para hacer visible el ligando químico y/o diana de otra manera invisible y no altera las propiedades de unión del análogo no etiquetado. Puesto que es bien sabido que incluso pequeños cambios en la estructura de un ligando químico o diana pueden afectar a su función, esta suposición puede no ser válida. Los sustitutos marcados son estructuralmente diferentes de sus homólogos sin etiquetar, y estas diferencias estructurales podrían afectar a sus propiedades de unión.

Un método eficiente para la selección de potenciales sustancias químicas farmacéuticas para la unión a ligandos diana sigue siendo muy deseable.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método eficiente para evaluar las propiedades de unión de potenciales sustancias químicas farmacéuticas.

Otro objetivo de la presente invención es un método eficiente para seleccionar acontecimientos de unión entre potenciales sustancias químicas farmacéuticas y ligandos diana.

Otro objetivo más de la presente invención es un método de selección que detecta acontecimientos de unión entre ligandos diana y potenciales sustancias químicas farmacéuticas que contienen al menos un átomo con un número atómico de nueve o más.

Objetivos, ventajas y características novedosas adicionales de la invención se expondrán en parte en la descripción que sigue y en parte se harán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de lo siguiente o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los objetivos y las ventajas de la invención pueden realizarse y obtenerse por medio de los instrumentos y combinaciones particularmente señalados en las reivindicaciones adjuntas.

Sumario de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

De acuerdo con los objetivos y propósitos de la presente invención, tal como se ilustra y describe ampliamente en la presente memoria, la presente invención incluye un método para seleccionar una mezcla de sustancias químicas en cuanto a la unión a al menos un ligando diana. El método incluye preparar una solución de una mezcla de sustancias químicas combinando una mezcla de sustancias químicas con al menos un ligando diana. La disolución se separa por flujo en al menos dos componentes separados. Al menos uno de los componentes separados por flujo se expone a un haz de excitación de rayos X. El método también incluye detectar una señal fluorescente de rayos X emitida por al menos un componente expuesto y separado por flujo y aislar el componente separado por flujo que tiene la señal fluorescente de rayos X detectable. Entonces se puede determinar la identidad del componente aislado separado por flujo. En el método de la invención, se utiliza un espectrómetro de fluorescencia de rayos X por dispersión de energía, equipado con un tubo de rayos X de microfoco.

La invención también incluye un aparato para seleccionar una mezcla de potenciales sustancias químicas farmacéuticas en cuanto a la unión a al menos un ligando diana. El aparato incluye un recipiente para contener una solución de una mezcla de sustancias químicas y al menos un ligando diana. El aparato también incluye un separador de flujo para separar la solución en al menos dos componentes separados. El aparato también incluye una fuente de excitación de rayos X para exponer al menos uno de los componentes separados por flujo a un haz de excitación de rayos X. La fuente de excitación de rayos X es un espectrómetro de fluorescencia de rayos X por dispersión de energía, equipado con un tubo de rayos X de microfoco. El aparato también incluye un detector de rayos X para detectar una señal fluorescente de rayos X emitida desde un componente separado por flujo, un desviador para desviar un componente separado por flujo elegido y un recipiente para aislar el componente separado por flujo elegido.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incorporan y forman parte de la memoria descriptiva, ilustran la o las realizaciones de la presente invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención. En los dibujos:

La Figura 1 muestra un diagrama de flujo de proceso típico de la invención;

La Figura 2 muestra una representación esquemática de una realización de un aparato de la invención; y

La Figura 3 muestra una realización de un separador/clasificador que se puede usar con la invención.

Descripción detallada de la invención

Brevemente, la presente invención incluye un método para identificar acontecimientos de unión entre potenciales sustancias químicas farmacéuticas y ligandos diana. El método implica modificar una mezcla de potenciales sustancias químicas farmacéuticas añadiendo al menos un ligando diana a la mezcla. Después de dejar suficiente tiempo para que se forme cualquier complejo unido entre cualquiera de las potenciales sustancias químicas farmacéuticas y cualquiera de los ligandos diana, si tal complejo puede formar, la solución resultante se separa por flujo en al menos dos componentes. Cada componente se expone a un haz de excitación de rayos X. Si el componente expuesto emite

una señal de fluorescencia de rayos X detectable, ese componente se aísla. La identidad de cualquier componente aislado puede determinarse usando una o más técnicas analíticas estándar, tales como cromatografía de gases, cromatografía líquida, espectrometría de masas, espectroscopia de resonancia magnética nuclear, espectroscopia infrarroja, espectroscopia ultravioleta, espectroscopia visible, análisis elemental, cultivo celular, inmunoensayo, y similares.

El método de la invención utiliza fluorescencia de rayos X como una sonda para detectar acontecimientos de unión. La fluorescencia de rayos X es una potente técnica que se ha utilizado para determinar los elementos químicos 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 particular es irradiado con radiación de rayos X, el átomo expulsa un electrón central tal como un electrón de la capa K. El átomo resultante está en un estado excitado y puede volver al estado fundamental reemplazando el electrón expulsado por un electrón de un orbital de energía más alta. Esto va acompañado por la emisión de un fotón, es decir, fluorescencia de rayos X, y la energía del fotón es igual a la diferencia en las energías de los dos electrones. Cada elemento tiene un conjunto característico de energías orbitales y por lo tanto, un espectro característico de fluorescencia de rayos X.

Muchas sustancias químicas farmacéuticas conocidas, como Prilosec™, Lipitor™, Zocor™, Prozac™, Zolof™ y Celebrex™, contienen los elementos flúor, cloro y/o azufre. La fluorescencia de rayos X es especialmente adecuada para detectar posibles sustancias químicas farmacéuticas porque puede usarse para detectar y cuantificar estos elementos y, en general, para detectar y cuantificar cualquier elemento con un número atómico de nueve o más.

La invención también incluye un aparato para seleccionar una mezcla de potenciales sustancias químicas farmacéuticas para la unión a al menos un ligando diana. El aparato incluye un recipiente para contener una solución de una mezcla de sustancias químicas y al menos un ligando diana. El aparato también incluye un separador de flujo para separar la solución en al menos dos componentes separados. El aparato también incluye una fuente de excitación de rayos X para exponer al menos uno de los componentes separados por flujo a un haz de excitación de rayos X. La fuente de excitación de rayos X es un espectrómetro de fluorescencia de rayos X por dispersión de energía, equipado con un tubo de rayos X de microfoco. El aparato también incluye un detector de rayos X para detectar una señal fluorescente de rayos X emitida desde un componente separado por flujo, un desviador para desviar un componente separado por flujo elegido y un recipiente para aislar el componente separado por flujo elegido.

Un espectrómetro de fluorescencia de rayos X incluye una fuente de excitación de rayos X y un detector de rayos X. Es 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 rayos X para determinar qué elementos están presentes en la muestra y proporcionar la cantidad de estos elementos. El espectrómetro de fluorescencia de rayos X utilizado para demostrar la invención era el espectrómetro de fluorescencia de rayos X por dispersión de energía EDAX Eagle XPL comercialmente disponible, equipado con un tubo de rayos X de microfoco, un detector de estado sólido de silicio dopado con litio, electrónica de procesamiento y software operativo suministrado por el proveedor.

El uso de la electroforesis capilar con fluorescencia de rayos X ha sido descrito por S. E. Mann et al. en "Element-Specific Detection in Capillary Electrophoresis Using X-Ray Fluorescence Spectroscopy", *Analytical Chemistry*, vol. 72, pp. 1754-1758, (2000). Mann et al. describen la preparación de una mezcla de complejos de quelación de CDTA (ácido ciclohexanodiamino tetraacético) y posterior separación usando electroforesis capilar. Los complejos separados se detectaron utilizando un haz de rayos X monocromático de 10 keV generado por sincrotrón.

La práctica de la invención se puede comprender adicionalmente con las figuras adjuntas. Una estructura similar o idéntica se identifica usando leyendas idénticas. La figura 1 muestra un diagrama de flujo de proceso típico de la invención. De acuerdo con la invención, las potenciales sustancias químicas farmacéuticas del depósito 12 se combinan con al menos un ligando diana del depósito de ligando diana 14 para formar una solución en el depósito 16. Las potenciales sustancias químicas farmacéuticas usadas con la invención son generalmente sustancias químicas orgánicas solubles en agua, y tienen al menos un elemento con un número atómico de nueve o mayor. Preferiblemente, incluyen al menos un elemento seleccionado entre flúor, cloro, bromo, yodo, azufre, fósforo, selenio, lantano, cerio, praseodimio, neodimio, samario, europio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio, iterbio, lutecio, antimonio, bismuto y arsénico. Los ligandos diana que se pueden usar con la invención incluyen enzimas, proteínas no enzimas, ADN, ARN, células vegetales, células animales, células humanas y microorganismos (por ejemplo, comprenden priones, virus, bacterias) y similares.

La solución de la mezcla de potenciales sustancias químicas farmacéuticas y ligando(s) diana se introduce en el separador de flujo 18, que utiliza una fase móvil para fluir separando la solución en al menos dos componentes. Los separadores de flujo que se pueden usar con la invención incluyen, pero no se limitan a, centrifugadoras, clasificadoras de células o cromatógrafos (por ejemplo, cromatógrafos líquidos tales como cromatógrafos líquidos de alto rendimiento, separadores electroforéticos tales como separadores electroforéticos capilares, cromatógrafos de filtración en gel y similares). Preferiblemente, el separador es un separador de electroforesis capilar, es decir, un tubo delgado largo con una fase móvil (por ejemplo, una solución tampón acuosa) dentro del tubo y un potencial eléctrico que recorre la longitud del tubo.

A medida que la mezcla se separa en componentes, estos se exponen a rayos X. Después de que la fuente de excitación de rayos X 20, preferiblemente un tubo de rayos X de rodio, suministra un haz de rayos X 22 a un componente separado, ese componente puede o no emitir una señal fluorescente de rayos X 24, que es detectada por un detector de fluorescencia de rayos X 26. Los detectores de rayos X que se pueden usar con la invención incluyen, pero no se limitan a, detectores de silicio dopados con litio, detectores dopados con silicio o diodos PIN. Si el componente expuesto no emite una señal de fluorescencia de rayos X, ese componente se dirige al primer colector 28. Si el componente expuesto emite una señal de fluorescencia que es detectada por el detector de fluorescencia de rayos X 26, se dirige al segundo colector 30. Se espera que este componente incluya al menos un complejo unido de una posible sustancia química farmacéutica y un ligando diana.

Aunque solo se muestra un primer colector y un segundo colector en la Fig. 1, debe entenderse que pueden usarse más colectores, dependiendo del número de componentes separados que se aíslan de la mezcla.

El componente separado que emite una señal de fluorescencia de rayos X detectable, es decir, el componente dirigido al segundo colector 30, puede enviarse entonces al analizador 32. Los analizadores que se pueden usar con la invención incluyen, pero no se limitan a, cromatógrafos de gases, cromatógrafos líquidos, espectrómetros de masas, espectrómetros de resonancia magnética nuclear, espectrómetros infrarrojos, espectrómetros ultravioleta-visible (UV-VIS), fluorímetros, analizadores de combustión (para el análisis elemental), cultivos celulares, inmunoensayos y similares. La elección del analizador dependerá de la naturaleza de las potenciales sustancias químicas farmacéuticas y/o ligandos que se analizan.

La figura 2 muestra una vista esquemática de una realización de un aparato de selección de la invención. Como muestra la Fig. 2, el aparato de selección 34 incluye el depósito de la fase móvil de entrada 36, que proporciona la fase móvil 38 para el separador capilar 40. El extremo de la entrada 42 del separador reside en el depósito de la fase móvil de entrada 36, mientras que el extremo de la salida 44 reside en el depósito de la fase móvil de salida 46. Después de que la fase móvil 38 llene el separador 40, se introduce una cantidad de una mezcla de potenciales sustancias químicas farmacéuticas y al menos un ligando diana en el extremo de la entrada 42 del separador 40. El extremo de la entrada 42 se reemplaza a continuación en el depósito de la fase móvil 36. Un potencial eléctrico entre el extremo de la entrada 42 y el extremo de la salida 44 del separador 40, que impulsa el flujo de la fase móvil 38 y de la mezcla a través del separador 40. La Figura 2 muestra que el componente 48 se ha separado de la mezcla. La Figura 2 muestra la fuente de excitación de rayos X 20 que dirige el haz de excitación de rayos X 22 al componente separado 48, el cual emite entonces una señal de fluorescencia de rayos X 24 que es detectada por el detector de fluorescencia de rayos X 26. La detección de una señal de fluorescencia de rayos X emitida activa la válvula de desvío 50, la cual desvía el flujo de la fase móvil 36 y el componente separado 48 al desviador 52, el cual dirige la fase móvil 36 y el componente separado 48 al colector de componentes 54:

La separación descrita anteriormente se consiguió utilizando un potencial eléctrico, el cual proporcionó un gradiente eléctrico a lo largo de la longitud del separador capilar 40. La separación también puede conseguirse aplicando un gradiente de presión a lo largo de la longitud del tubo. En esta realización, el tubo incluiría una fase estacionaria; se usaría una entrada de inyección de la muestra para introducir la solución en el tubo y una bomba proporcionaría el gradiente de presión, como sucede en la cromatografía líquida de alto rendimiento.

Como muestra la Fig. 2 muestra, el componente 48 está separado a lo largo de una parte horizontal del separador capilar 40. Es probable que esta configuración particular no sea óptima para separar complejos derivados del uso de microorganismos o ligandos de dianas celulares. Para estos ligandos diana, se prefiere un separador/clasificador que se separa a lo largo de una porción vertical. La figura 3 muestra una realización de tal separador/clasificador que se puede usar con la invención. El separador/clasificador 56 puede usarse para separar y clasificar mezclas derivadas de células, microorganismos, microesferas que tienen proteínas u ácidos nucleicos unidos y similares. El separador/clasificador 56 incluye un separador vertical 58 a través del cual se produce la separación. Como muestra la Fig. 3, la mezcla se ha separado en el componente 48 y en el componente 60. El componente 48 sometido al haz de rayos X 22 de la fuente de excitación de rayos X 20 ha emitido una señal de fluorescencia de rayos X, la cual se detectó mediante un detector de fluorescencia de rayos X 26. Esto provocó una respuesta en la fuente de tensión 62 aplicada, la cual aplica una tensión que desvía el componente 48 al colector 64. Si el componente 60 no emite una señal de fluorescencia de rayos X detectable, no se aplicará tensión al componente de desviación 60 y fluirá hacia el colector 66. Sin embargo, si el componente 60 emite una señal de fluorescencia de rayos X detectable, se aplicará una tensión para desviar el componente 60 y fluirá hacia el colector 68.

El separador/clasificador 56 puede incluir una fuente de láser y detectores asociados para realizar la clasificación de células activadas por fluorescencia convencional del tipo descrito por Bruce Alberts et al., "Molecular Biology of the Cell", 2ª edición, Garland Publishing, Inc., Nueva York, 1989, páginas 159-160.

Si se necesita que una sustancia química farmacéutica se una a una proteína ligando diana específica, por ejemplo, se pueden seleccionar de acuerdo con la invención un gran número de potenciales sustancias químicas farmacéuticas diferentes en cuanto a la unión a esa proteína. La invención se puede usar para distinguir cuáles de las potenciales sustancias químicas farmacéuticas se unen fuertemente a la proteína de aquellas que se unen débilmente o no se unen en absoluto. La proteína se combinaría con aproximadamente 10 a 10.000 potenciales sustancias químicas

farmacéuticas, en la que cada una de las potenciales sustancias químicas farmacéuticas incluye al menos un elemento que tiene un número atómico de nueve o más. Preferiblemente, las potenciales sustancias químicas farmacéuticas incluyen un elemento que tiene un número atómico de nueve o más que no se encuentra en el ligando diana para simplificar el método de selección.

5 La invención podría utilizarse para, por ejemplo, determinar si el ion cobalto (Co^{2+}) y/o la cianocobalamina se unen a la conocida proteína biológicamente activa Ure2p (véase Finny G. Kuruvilla et al., "Dissecting Glucose Signaling With Diversity-Oriented Synthesis and Small-Molecule Microarrays", Nature, vol. 416, pp. 653-657). Una solución acuosa de nitrato de cobalto (II) y cianocobalamina se añadiría a Ure2p. La solución acuosa resultante se separaría por flujo de acuerdo con la invención utilizando, por ejemplo, un separador de electroforesis capilar. Cualquier complejo formado entre Ure2p y el Co^{2+} y/o la cianocobalamina debería tener un tiempo de retención que es diferente de cualquiera de los dos, del Co^{2+} o de la cianocobalamina, y emitiría una señal de fluorescencia de rayos X detectable y sería aislable utilizando la invención.

15 La separación podría realizarse usando, por ejemplo, un tubo capilar de sílice fundida (Polymicro Technologies™) que tiene las siguientes dimensiones: 70 cm de longitud, diámetro interior (di) 100 μm , diámetro exterior (de) 170 μm y una fuente de alimentación de alta tensión Bertan™ Modelo ARB-30 para proporcionar el potencial eléctrico. El tubo se pudo acondicionar lavándolo primero con una solución 1,0 molar (M) de NaOH durante 15 minutos, enjuagando después con agua destilada y desionizada durante 15 min y enjuagando después y llenando con tampón de análisis Trisma 75 mM (pH 8,0) durante otros 15 min más.

25 Se obtuvo una línea de base introduciendo una mezcla acuosa de nitrato de cobalto ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, 200 ppm de Co^{2+}) y cianocobalamina (10,2 mM) en el tubo capilar, aplicando un potencial de 10 kV entre los extremos del tubo y separando la mezcla en sus componentes. Se utilizó un sistema de microfluorescencia de rayos X EDAX™ Eagle II equipado con una fuente de excitación objetivo de Rh y un detector SiLi para analizar cada componente separado y medir cualquier señal de fluorescencia de rayos X emitida. El tubo de rayos X del sistema fue operado a 40 kV y 1000 μA . La emisión de rayos X CoK_α se monitorizó para detectar el Co^{2+} y la cianocobalamina no unidos. El tiempo de adquisición del espectro fue de aproximadamente 10 segundos (s). El pico debido al Co^{2+} no unido se detectó a aproximadamente 4,5 minutos con una anchura total a la mitad del máximo (FWHM) de aproximadamente 1 minuto. El pico de cianocobalamina se detectó a aproximadamente 8,5 min con una FWHM de aproximadamente 1,5 min.

35 De forma similar, la invención podría usarse para determinar si la ferritina y/o la cianocobalamina se unen a Ure2p. Una solución acuosa de ferritina y cianocobalamina se añadiría a Ure2p. La solución acuosa resultante podría separarse por flujo utilizando un separador de electroforesis capilar. Cuando se exponen a un haz de rayos X, el hierro de la ferritina y el cobalto de la cianocobalamina emiten señales de fluorescencia de rayos X distintas y detectables que se pueden utilizar para determinar si se forma un complejo entre la ferritina y/o la cianocobalamina y Ure2p.

40 Se obtuvo una línea de base como sigue: Se preparó un separador de electroforesis capilar utilizando una fuente de alimentación de alta tensión Bertan™ Modelo ARB-30 para proporcionar el potencial de separación y un tubo capilar de sílice fundida (Polymicro Technologies™) que tenía las siguientes dimensiones: 70 cm de longitud, diámetro interior (di) 100 μm (di), diámetro exterior (de) 170 μm . El tubo se acondicionó enjuagándolo primero con una solución 1,0 molar (M) de NaOH durante 15 min, enjuagando después con agua destilada y desionizada durante 15 min y enjuagando después con tampón de análisis 00 mM Trisma (pH 8,0) durante 15 min más.

45 Se introdujo una solución acuosa de ferritina (1,16 mg/ml) y cobalamina (10,2 mM) en el tubo capilar. Después de que se aplicó un potencial de separación de 9,5 kV entre los extremos del tubo, la solución fluyó a través del tubo y se separó en dos componentes. Se utilizó un sistema de microfluorescencia de rayos X EDAX™ Eagle II equipado con una fuente de excitación de objetivo Rh y un detector SiLi para analizar cada componente separado y medir cualquier señal de fluorescencia de rayos X emitida. El tubo de rayos X del sistema fue operado a 40 kV y 1000 μA . Las líneas de emisión de rayos X CoK_α y FeK_α se monitorizaron para detectar la ferritina y la cobalamina unidas al Fe^{3+} . El tiempo de adquisición del espectro fue de aproximadamente 10 segundos (s). El pico debido al Fe^{3+} de la ferritina se detectó a aproximadamente 9,3 min con una anchura total a la mitad del máximo (FWHM) de aproximadamente 1,7 minutos. El pico de cianocobalamina se detectó a aproximadamente 6,3 min con una FWHM de aproximadamente 1 min.

55 La invención puede utilizarse en estudios de metabolitos farmacéuticos para detectar subproductos metabólicos peligrosos de una potencial sustancia química. Una potencial sustancia química farmacéutica que tiene al menos un átomo con un número atómico de nueve o superior se podría administrar a una rata (u otro animal de ensayo). Se tomaría una muestra de sangre de la rata antes de administrar la potencial sustancia química farmacéutica para proporcionar una línea de base. Después de administrar la potencial sustancia química farmacéutica, se examinaría la sangre de la rata para determinar la presencia de metabolitos usando el método de la invención.

60 En resumen, la presente invención proporciona un aparato y un método para detectar acontecimientos de unión entre potenciales sustancias químicas farmacéuticas y ligandos diana. La presente invención utiliza microfluorescencia de rayos X para determinar la presencia y cantidades relativas de elementos tales como flúor, cloro, bromo, yodo, fósforo y azufre, siendo estos dos últimos constituyentes importantes de enzimas, proteínas no enzimas, ADN y ARN. Por lo tanto, la invención proporciona un método no destructivo de selección de la unión de una potencial sustancia química

farmacéutica con un ligando diana tal como una proteína o un ácido nucleico. Aunque los métodos conocidos requieren a menudo que el ligando y/o la potencial sustancia química farmacéutica incluyan una etiqueta unida covalentemente que fluoresce al exponerse a radiación de excitación ultravioleta, la invención no requiere materiales etiquetados.

5 La descripción anterior de la invención se ha presentado con fines de ilustración y descripción y no pretende ser exhaustiva ni limitar la invención a la forma precisa divulgada y obviamente son posibles muchas modificaciones y variaciones a la luz de la enseñanza anterior.

10 La realización o las de realización se eligieron y describieron con el fin de explicar mejor los principios de la invención y su aplicación práctica para permitir así a los expertos en la materia utilizar mejor la invención en diversas realizaciones y con diversas modificaciones que son adecuadas para el uso particular contemplado. Se pretende que el alcance de la invención sea definido por las reivindicaciones adjuntas a la presente.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para seleccionar potenciales sustancias químicas farmacéuticas por la unión a al menos un ligando diana, que comprende las etapas de:
- (a) preparar una solución de potenciales sustancias químicas farmacéuticas y al menos un ligando diana;
 - (b) separar por flujo la solución en al menos dos componentes separados;
 - (c) exponer al menos uno de los componentes separados por flujo a un haz de excitación de rayos X y
 - (d) detectar una señal fluorescente de rayos X emitida por el al menos un componente separado por flujo expuesto;
- 10 **caracterizado por que** el método comprende adicionalmente la etapa de
- (e) aislar cualquier componente separado por flujo que tenga una señal fluorescente de rayos X detectable,
- 15 y por que se utiliza un espectrómetro de fluorescencia de rayos X por dispersión de energía, equipado con un tubo de rayos X de microfoco.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que el haz de excitación de rayos X comprende rayos X que tienen energías superiores a 10 keV.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el haz de excitación de rayos X comprende una potencia de menos de aproximadamente 100 vatios.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de determinar la identidad del componente aislado separado por flujo.
5. El método de la reivindicación 1, en el que las potenciales sustancias químicas farmacéuticas comprenden al menos un elemento que tiene un número atómico mayor de ocho.
- 30 6. El método de la reivindicación 5, en el que el al menos un elemento que tiene un número atómico mayor de ocho se selecciona de flúor, cloro, bromo, yodo, azufre, fósforo, selenio, lantano, cerio, praseodimio, neodimio, samario, europio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio, iterbio, lutecio, antimonio, bismuto y arsénico.
- 35 7. Un aparato para seleccionar potenciales sustancias químicas farmacéuticas por unión a al menos un ligando diana, que comprende en combinación:
- (a) un recipiente para una solución de potenciales sustancias químicas farmacéuticas y al menos un ligando diana, en donde dichas potenciales sustancias químicas farmacéuticas comprenden un elemento que tiene un número atómico de al menos nueve;
 - (b) un separador de flujo para separar dicha solución en al menos dos componentes separados;
 - (c) una fuente de excitación de rayos X para exponer al menos uno de dichos componentes separados por flujo a un haz de excitación de rayos X y
 - (d) un detector de rayos X para detectar una señal fluorescente de rayos X emitida desde un componente separado por flujo;
- 45 **caracterizado por que** el aparato comprende adicionalmente
- (e) un desviador para desviar de la mezcla restante dicho componente separado por flujo elegido,
- 50 y por que la fuente de excitación de rayos X es un espectrómetro de fluorescencia de rayos X por dispersión de energía, equipado con un tubo de rayos X de microfoco.
- 55 8. El aparato de la reivindicación 7, en el que dicho haz de excitación de rayos X comprende rayos X que tienen energías superiores a 10 keV.
9. El aparato de la reivindicación 7, en el que dicho haz de excitación de rayos X comprende una potencia de menos de aproximadamente 100 vatios.

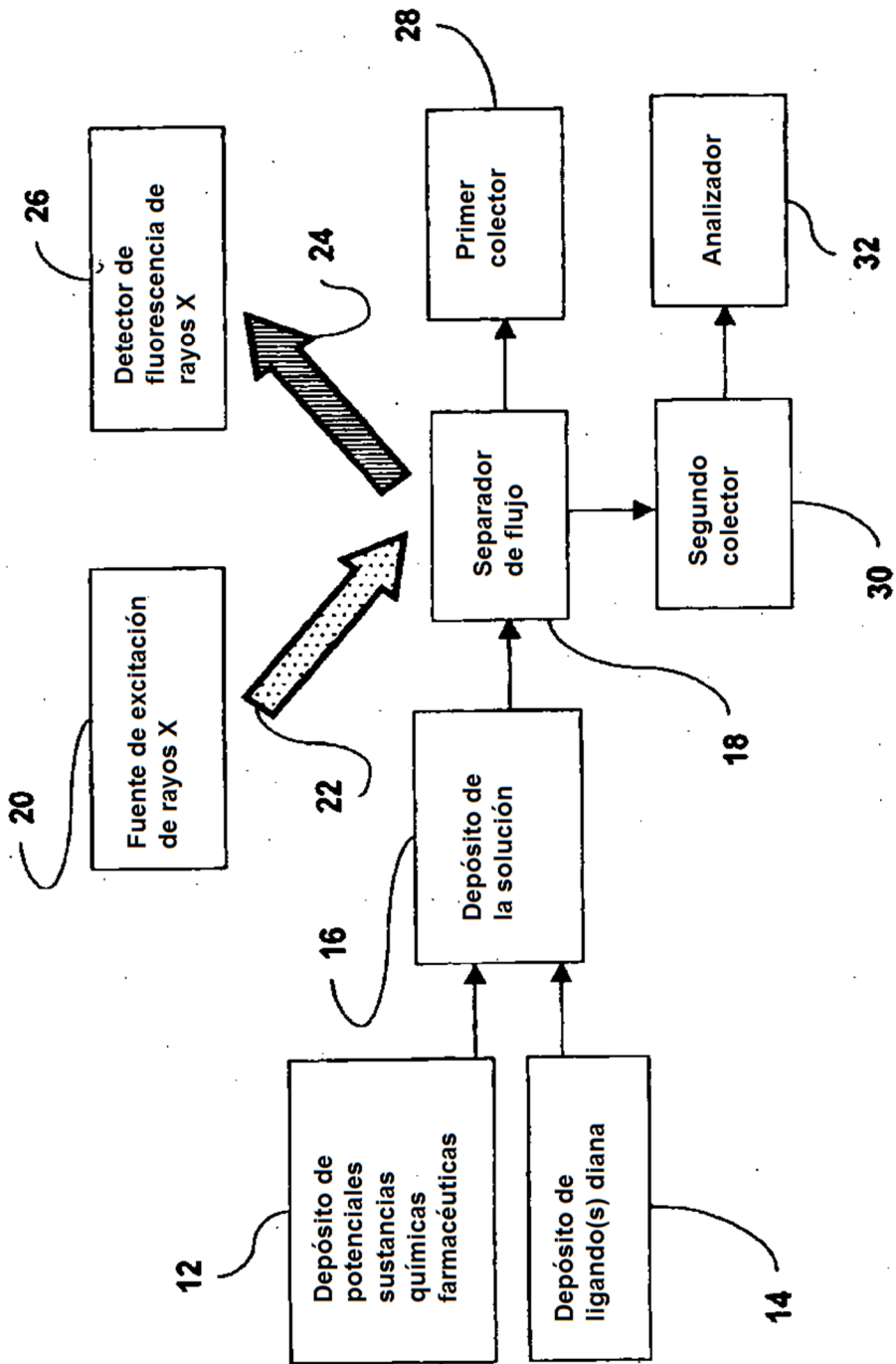


Fig 1

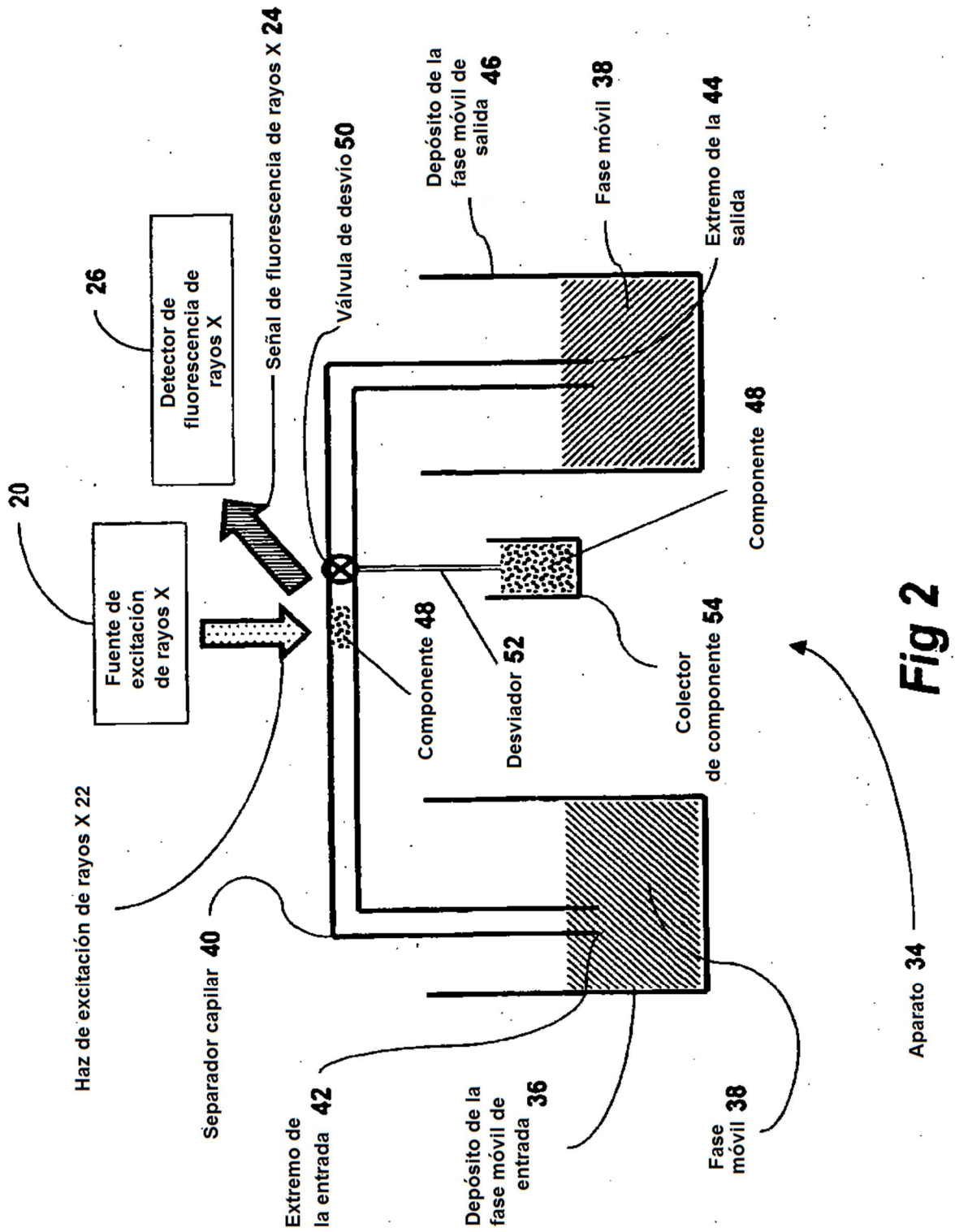


Fig 2

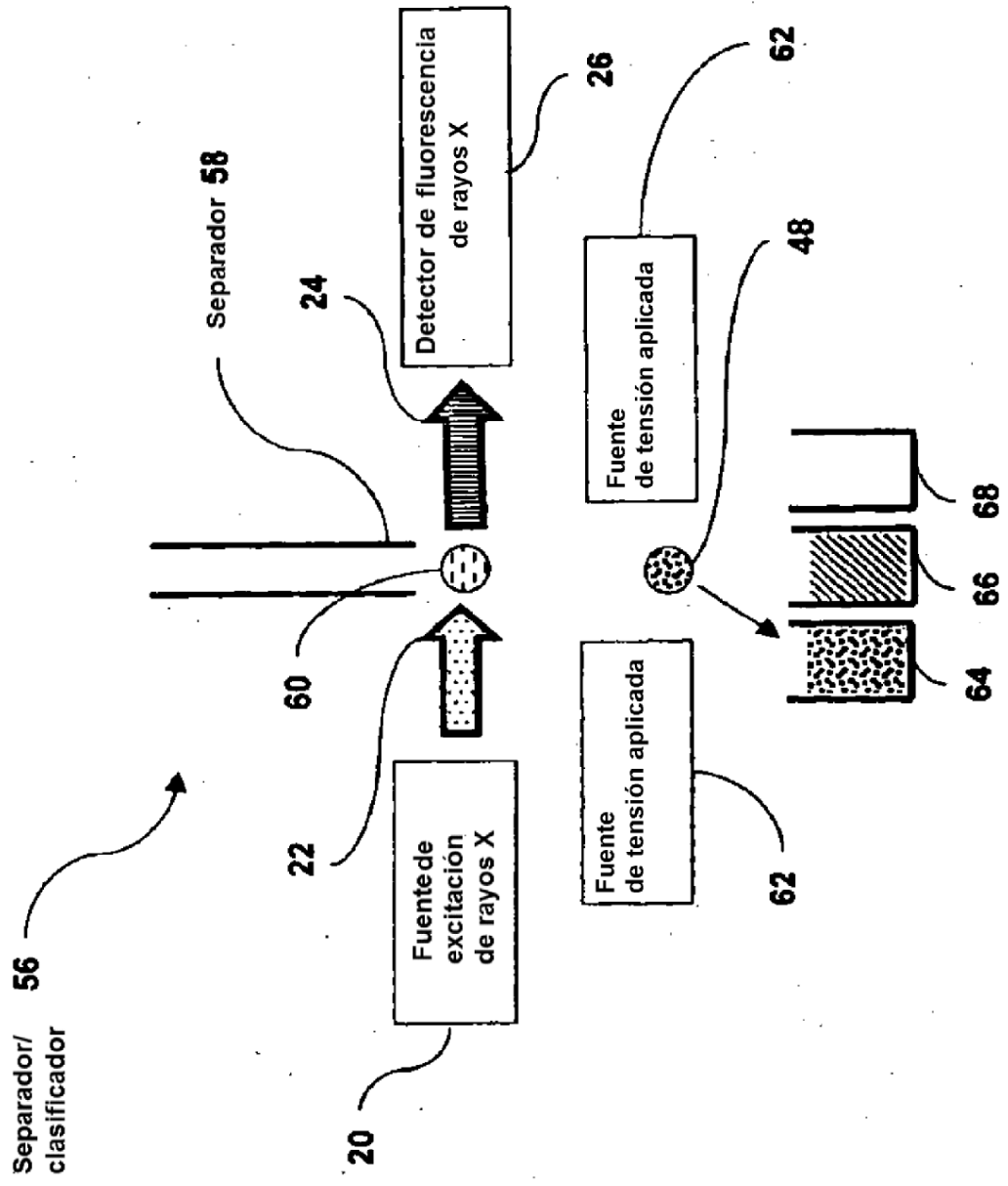


Fig 3