

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 172**

51 Int. Cl.:

G01N 27/447 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2008** **E 08774195 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2012** **EP 2167951**

54 Título: **Medios de FFE y procedimientos de FFE que comprenden medios de separación volátiles**

30 Prioridad:

20.06.2007 US 945246 P
12.11.2007 US 987208 P
29.04.2008 US 48777

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2013

73 Titular/es:

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 BECTON DRIVE
FRANKLIN LAKES, NJ 07417-1180, US

72 Inventor/es:

WEBER, GERHARD y
NISSUM, MIKKEL

74 Agente/Representante:

ZEА CHECA, Bernabé

ES 2 396 172 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

Medios de FFE y procedimientos de FFE que comprenden medios de separación volátiles

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en conjunto, al uso de medios de separación que comprenden un sistema tampón volátil en la electroforesis de flujo libre (*Free Flow Electrophoresis*, FFE). Los medios de separación proporcionados en la presente memoria permiten realizar una separación conveniente de los analitos mediante electroforesis, y ofrecen la ventaja adicional de que los compuestos tampón y el disolvente se pueden eliminar fácilmente y sin dejar residuos mediante evaporación tras la etapa de separación electroforética. Más específicamente, en la presente invención, se proporcionan procedimientos para el análisis espectrométrico de masas de analitos que comprenden una etapa de separación de FFE en la que se emplean dichos medios de separación.

15 **Antecedentes de la invención**

La electroforesis es una tecnología consolidada para separar partículas que se basa en la migración de partículas cargadas bajo la influencia de una corriente eléctrica directa. Se han desarrollado varios modos de funcionamiento diferentes, tales como el isoelectroenfoco (*IsoElectric Focusing*, IEF), la electroforesis en zona (*Zone Electrophoresis*, ZE) y la isotacoforesis (*IsoTachoPhoresis*, ITP), como alternativas del principio de separación anterior, y son comúnmente conocidas por los expertos en la materia.

El IEF es una técnica comúnmente empleada, por ejemplo, en la caracterización de proteínas como mecanismo para determinar el punto isoeléctrico de una proteína (véase "Analytical Biochemistry", Addison Wesley Longman, tercera edición limitada, 1998), mientras que la ZE se basa en la diferencia entre el valor de la movilidad electroforética de las partículas que se van a separar y de las especies cargadas del medio de separación empleado.

Los modos de funcionamiento generales previos se pueden aplicar a diferentes tecnologías electroforéticas tales como la electroforesis sobre un soporte sólido (por ejemplo, papel de filtro, acetato de celulosa, agarosa, etc.), la electroforesis capilar y la electroforesis de flujo libre (FFE).

Entre las tecnologías electroforéticas, la FFE es una de las más prometedoras [Krivanova L. y Bocek P. (1998), "Continuous free-flow electrophoresis", *Electrophoresis* 19: 1064-1074]. La FFE es una tecnología en la cual la separación de los analitos se produce en un medio líquido en ausencia de una fase estacionaria (o un material de soporte sólido) para minimizar la pérdida de muestra por adsorción. La FFE a menudo se denomina electroforesis de deflexión sin portador o electroforesis de deflexión libre de matriz.

En el campo de la proteómica, la FFE es la tecnología seleccionada para la separación previa definida de muestras de proteínas complejas en términos de los valores variables de su punto isoeléctrico (pI). Con el uso de la FFE, se pueden separar moléculas orgánicas e inorgánicas, biopartículas, biopolímeros y biomoléculas en base a su movilidad electroforética. Ya se han descrito los correspondientes principios [por ejemplo, Bondy B. *et al.* (1995), "Sodium chloride in separation medium enhances cell compatibility of free-flow electrophoresis", *Electrophoresis* 16: 92-97].

Se ha mejorado el procedimiento de FFE, por ejemplo, mediante medios de estabilización y medios de flujo a contracorriente. Esto se refleja, por ejemplo, en la patente US 5.275.706. Según esta patente, se introduce un medio de flujo a contracorriente en el espacio de separación en contra de la dirección del flujo continuo del medio de separación neto y de la muestra que se desplaza entre los electrodos. Ambos medios (medios de separación y medios de flujo a contracorriente) se descargan o se eluyen por las salidas de fraccionamiento, comúnmente, a una placa de microtitulación, generando un procedimiento de fraccionamiento que tiene un bajo volumen hueco. Además, se mantiene un flujo laminar de los medios en la zona de las salidas de fraccionamiento (es decir, con una turbulencia muy baja o nula).

Por ejemplo, en la patente US 6.328.868, se describe una técnica de FFE particular denominada FFE de intervalos. En esta patente, se introducen tanto la muestra como el medio de separación en una cámara de electroforesis, y se separan los analitos de la muestra mediante un modo electroforético tal como ZE, IEF o ITP y, finalmente, se expulsan de la cámara por las salidas de fraccionamiento. Realizaciones de la patente US 6.328.868 describen el movimiento de los medios de separación y la muestra como unidireccional, desplazándose desde el extremo de entrada hacia el extremo de salida de la cámara, con la aplicación de una tensión efectiva que hace que se produzca una migración electroforética, mientras que la muestra y los medios no se conducen hidráulicamente desde el extremo de entrada hacia el extremo de salida, en contraste con la técnica comúnmente usada en la materia, en la cual la muestra y los medios pasan a través del aparato mientras se separan en un campo eléctrico (FFE continua).

El modo denominado cíclico o el modo cíclico en intervalos en el contexto de la FFE, como se usa en la presente

memoria, se ha descrito en el documento WO 2008/025806. En resumen, el modo cíclico en intervalos se caracteriza por al menos una, y posiblemente, múltiples inversiones de la dirección del flujo neto global mientras que la muestra se mantiene en el campo electroforético entre los electrodos alargados. En contraste con el modo estático en intervalos, la muestra está en constante movimiento, permitiendo de ese modo una mayor intensidad de campo y, así, una mejor separación (o más rápida). Además, mediante la inversión del flujo neto global de la muestra entre los electrodos alargados, se puede aumentar considerablemente el tiempo de residencia de los analitos en el campo eléctrico, ofreciendo de ese modo un mayor tiempo de separación y/o una mayor eficiencia de separación y mejor resolución. La inversión del flujo neto global en cualquier dirección paralela a los electrodos alargados (denominada un ciclo) se puede repetir tantas veces como sea necesario en una determinada situación, aunque las razones prácticas y el deseo de obtener una separación en un breve periodo de tiempo, normalmente, limitarán el número de ciclos llevados a cabo en este modo.

La solicitud de patente internacional WO 02/50524 describe un procedimiento de electroforesis en el que se emplea un aparato con una cámara de separación a través de la cual el medio de separación fluye y que proporciona un espacio de separación definido por un fondo y una cubierta, y espaciadores que separan estas dos partes entre sí. Además, este aparato de FFE comprende una bomba para suministrar el medio de separación, que entra en la cámara de separación a través de conductos de suministro del medio, y sale de la cámara por las salidas. El aparato de FFE también incluye electrodos para aplicar un campo eléctrico dentro del medio de separación y los puntos de inyección de muestra para la adición de la mezcla de partículas o analitos y los puntos de fraccionamiento para eliminar las partículas separadas mediante FFE en el medio de separación. Las partículas separadas se pueden usar para fines analíticos o para un procesamiento preparativo posterior. En cualquier caso, la solicitud no describe ningún medio de separación.

En la técnica, se conoce una serie de medios de separación para la separación de analitos tales como biopartículas y biopolímeros. Por ejemplo, en el libro "Free-flow Electrophoresis", publicado por K. Hannig y K. H. Heidrich (ISBN 3-921956-88-9) se publica una lista de medios de separación adecuados para la FFE y, en particular, para la ZE de flujo libre (FF-ZE). La patente US 5.447.612 (Bier *et al.*) describe otro medio de separación que es un sistema tampón del pH para la separación de analitos por IEF mediante la formación de gradientes de zonas de pH reducidos funcionalmente estables previamente preparados. Emplea componentes de tamponamiento en pares tampón complementarios. Los componentes de tamponamiento se seleccionan entre determinados anfóteros químicamente puros, ácidos débiles y bases débiles, y se emparejan en base a sus características de disociación para proporcionar un gradiente de pH bastante bajo de entre 0,4 a 1,25 unidades de pH. Bier *et al.*, "Electrophoresis", Vol. 10(10) (1989), p. 690-697, informan sobre una variedad de separaciones de cromosomas mediante FFE, empleando, entre otros, TRIS/ácido acético como componentes de tamponamiento del medio de separación. Nath *et al.*, "Biotechnology and Bioengineering", Vol. 51 (1) (1996), p. 15-22 también describen una separación por FFE con TRIS/ácido acético como medio tampón y un análisis posterior de una fracción obtenida de la separación por FFE mediante espectroscopia UV/VIS.

El análisis espectrométrico de masas (EM) es una potente técnica analítica que se usa para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para desvelar la estructura y las propiedades químicas de las moléculas. Es un importante procedimiento de análisis emergente para la caracterización de moléculas inorgánicas y orgánicas y, especialmente, de biopartículas, biopolímeros y biomoléculas. Existen dos procedimientos principales para la ionización de moléculas biológicas tales como proteínas o polisacáridos: la ionización por electrospray (Electro Spray Ionization, ESI) y la desorción/ionización por láser asistida por matriz (Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization, MALDI). Para obtener una muestra lista para su uso para un análisis MALDI, se mezcla la muestra que se vaya a analizar con una matriz tras etapas anteriores opcionales, tales como la fragmentación de un analito (por ejemplo, la digestión) o la eliminación de compuestos perturbadores, y se deja secar antes de introducirla en el espectrómetro de masas.

Hay varios problemas posibles que se deben resolver con el fin de llevar a cabo satisfactoriamente un análisis espectrométrico de masas de un compuesto de interés, en particular, de biomoléculas tales como proteínas. Las proteínas u otras moléculas biológicas de interés para los investigadores suelen formar parte de una mezcla muy compleja de otras proteínas y moléculas que coexisten en un medio biológico. Esto presenta varios problemas importantes. En primer lugar, las dos técnicas de ionización usadas para moléculas de gran tamaño, por lo general, sólo funcionan bien cuando la mezcla contiene cantidades aproximadamente iguales de los componentes, mientras que en muestras de origen biológico, las diferentes proteínas o moléculas tienden a estar presentes en cantidades muy diferentes. Si dicha mezcla se ioniza mediante ESI o MALDI, las especies más abundantes tienen una tendencia a "ahogar" las señales producidas por las menos abundantes. El segundo problema es que el espectro de masas de una mezcla compleja es muy difícil de interpretar debido a la gran cantidad de componentes de la mezcla. Esto se agrava, por ejemplo, por el hecho de que la digestión enzimática de una proteína da lugar a un gran número de productos peptídicos. Además, muchas sustancias (por ejemplo, sales inorgánicas) que están comúnmente presentes en las muestras que comprenden las biomoléculas no son volátiles en las condiciones de trabajo de la espectrometría de masas o interfieren en el procedimiento de ionización durante las mediciones espectrométricas de masas y, por lo tanto, inhiben las señales de los analitos.

De hecho, uno de los principales obstáculos del análisis de EM ampliamente aplicable de muestras biológicas es la purificación correcta o, al menos, el enriquecimiento sustancial de las moléculas de interés para que sean adecuadas para el análisis por EM. Incluso el instrumento más sofisticado y sensible es incapaz de generar datos útiles a partir de cantidades impuras y/o inadecuadas de la molécula que se vaya a analizar. Desafortunadamente, la mayoría de las biomoléculas de interés sólo se encuentran en una abundancia muy baja. Por lo tanto, la preparación de la muestra es una tarea fundamental y, habitualmente, técnicamente difícil en los proyectos de análisis de biomoléculas mediante EM que se realizan satisfactoriamente en la actualidad. Para hacer frente a este problema, se usan procedimientos para fraccionar y enriquecer sustancias, normalmente, antes del análisis de espectrometría de masas.

Aunque la electroforesis es una potente técnica para la separación o el fraccionamiento de sustancias, el uso de la electroforesis convencional para la separación de analitos presenta algunos inconvenientes con respecto a un posterior análisis de EM de los analitos separados.

Como es ampliamente conocido en la técnica, es necesario eliminar los compuestos tampón iónicos, las sales y los detergentes antes del análisis de EM. De hecho, muchos iones inorgánicos (por ejemplo, iones metálicos o iones halogenuros), que comúnmente están presentes en los sistemas tampón para la electroforesis, inhiben la señal espectrométrica de masas, interfieren en el procedimiento de ionización y forman aductos con muchos compuestos. Por consiguiente, las muestras que se van a analizar mediante EM tienen que ser sometidas a procedimientos que requieren mucho tiempo y que pueden conducir a la pérdida de material de analito. Entre esos procedimientos se encuentran, por ejemplo, la extracción en líquido (Davidsson P. *et al.*, (1999) *Anal. Chem.*, 71, 642-647), los reactivos de par iónico (Königsberg, W. H. y Henderson, L.; (1983) *Meth. Enzymol.*, 91, 254-259) o la precipitación de proteínas con cloruro de guanidinio (Chirgwin, J. M. *et al.*, (1979) *Biochemistry* 18, 5294-5299).

En vista de lo anterior, es muy evidente que hay una necesidad en la materia por técnicas de separación o fraccionamiento potentes y convenientes, especialmente, para muestras inorgánicas, orgánicas o de origen biológico, que sean capaces de purificar o al menos enriquecer sustancialmente el/los analito/s de interés antes de su análisis mediante, por ejemplo, espectrometría de masas, pero que eviten los inconvenientes de los procedimientos previamente conocidos en la materia.

Descripción resumida de la invención

Así, es un objeto de las realizaciones de la presente invención proporcionar procedimientos que permitan la separación/el fraccionamiento conveniente y reproducible de moléculas de interés y que permitan que la muestra separada o, al menos, enriquecida se someta a un análisis posterior, sin tener que recurrir a etapas de preparación de la muestra que requieran tiempo y materiales antes del análisis mediante espectroscopia de masas posterior.

Otro objeto adicional de las realizaciones de la presente invención es proporcionar sistemas de medios libres de matriz para su uso en procedimientos de separación de FFE que sean ventajosos frente a los sistemas de medios de FFE comúnmente usados, ya que los compuestos tampón potencialmente perturbadores (por ejemplo, las sales inorgánicas) bien se puedan eliminar fácilmente o no interfieran en el análisis de espectrometría de masas posterior de un analito de interés separado.

Los inventores han encontrado que, sorprendentemente, los medios de separación que comprenden compuestos tampón volátiles son adecuados para las separaciones mediante FFE analítica y preparativa, y permiten la correcta separación o fraccionamiento de los analitos, produciendo de esta manera muestras sustancialmente purificadas o enriquecidas que se pueden usar convenientemente en una EM realizada aguas abajo sin necesidad de etapas de preparación de las muestras que requieran tiempo (por ejemplo, la desalinización).

La presente invención proporciona un procedimiento para analizar analitos que comprende una separación de los analitos mediante electroforesis de flujo libre (FFE) que comprende dicho medio de separación acuoso y un análisis posterior aguas abajo de al menos un analito de interés obtenido de dicha etapa de separación de FFE, en el cual dicho análisis posterior realizado más adelante es un análisis espectrométrico de masas seleccionado entre ionización por electronebulización (ESI), desorción/ionización por láser en superficie (*Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization*, SELDI), desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI o MALDI-TOF-EM (/EM) o CL-EM (/EM). Los medios de separación de FFE usados en dicho procedimiento comprenden al menos un ácido tampón y, al menos, una base tampón, en los cuales todos los tampones de ácido y de base son volátiles. Tras recoger los analitos de interés producidos mediante la etapa de separación de FFE, y, opcionalmente, una posible digestión de las proteínas (en aplicaciones de proteómica) o de muestras que contienen ADN, los compuestos tampón volátiles y el disolvente se pueden eliminar fácilmente y sin dejar residuos para proporcionar bien un analito puro o una muestra que comprenda el/los analito/s que se pueda usar en un análisis posterior, tal como un análisis de espectrometría de masas.

Los medios de separación descritos en la presente memoria son particularmente adecuados, por ejemplo, para la ZE de flujo libre (FF-ZE) y, más preferentemente, para la IEF de flujo libre (FF-IEF), aunque será evidente para los expertos en la materia que los medios de separación proporcionados en la presente memoria también se pueden usar, en principio, en otras aplicaciones tales como en la electroforesis con portador.

El perfil del pH del medio de separación de la cámara de separación durante la electroforesis puede no ser lineal; es decir, se producirán una o más variaciones y/o mesetas de pH en el espacio de separación entre el ánodo y el cátodo de un aparato de FFE. Dichos medios son particularmente útiles en aplicaciones de FFE ejecutadas en el modo de IEF.

Alternativamente, el perfil de pH mostrado por el medio de separación puede ser prácticamente lineal (es decir, sin ninguna variación importante del pH durante la separación electroforética) o incluso prácticamente constante (es decir, un perfil de pH "plano" o un gradiente de pH más bien suave en la cámara de separación).

Los medios de separación pueden comprender sólo un ácido tampón y una base tampón. En otras palabras, dichos medios de separación representan medios de separación binarios (denominados medios A/B), en los cuales una función de ácido de un compuesto volátil y una función de base de otro o del mismo compuesto volátil sirven fundamentalmente para establecer un medio de separación con el perfil de pH y conductividad deseados. Aunque también se pueden obtener buenos resultados con dos o más tampones de ácido y de base en el medio de separación, normalmente, resulta ventajoso usar el menor número de componentes posible, no sólo porque dichos medios son más baratos de preparar y, posiblemente, más fáciles de usar, sino también porque las propiedades electroquímicas del medio se volverán más complejas si se aumenta el número de especies cargadas presentes en la cámara de separación.

Breve descripción de las figuras

Las **Fig. 1 y 2** ilustran los resultados de una separación por FFE de proteínas plasmáticas humanas realizada en el modo de electroforesis de IEF continuo (FF-IEF), como se describe en el Ejemplo 1 que figura a continuación.

La **Fig. 1** muestra la separación fraccionada de la muestra entre el ánodo (izquierda) y el cátodo (derecha) (96 fracciones recogidas en una placa de microtitulación estándar de 96 pocillos) e indica el pH de las fracciones. Se separaron los marcadores del pl coloreados para evaluar el rendimiento de la separación del sistema. En la Fig. 1, también se muestra la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm, que representan la absorbancia de los respectivos marcadores del pl.

La **Fig. 2** representa el correspondiente gel de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS obtenido para las diversas fracciones que indican la presencia de analitos fraccionados en la muestra.

Las **Fig. 3 y 4** ilustran los resultados de otra separación por FFE que disminuye la albúmina de suero humano de una muestra de proteínas plasmáticas humanas realizada en modo de electroforesis de IEF continuo (FF-IEF), como se describe en el Ejemplo 2 que figura a continuación.

La **Fig. 3** muestra la separación fraccionada de la muestra entre el ánodo (izquierda) y el cátodo (derecha) (96 fracciones recogidas en una placa de microtitulación estándar de 96 pocillos) e indica el pH de las fracciones. Se separaron los marcadores del pl coloreados para evaluar el rendimiento de la separación del sistema. En la Fig. 3, también se presenta la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm, que representan la absorbancia de los respectivos marcadores del pl.

La **Fig. 4** muestra el correspondiente gel de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS obtenido para las diversas fracciones que demuestra las capacidades de disminución de la albúmina de suero humano.

La **Fig. 5** ilustra los resultados de una separación por FFE realizada en modo de electroforesis de IEF cíclico de intervalos (FF-IEF cíclico), como se describe en el Ejemplo 3 que figura a continuación. Se muestra la separación fraccionada de la muestra entre el ánodo (izquierda) y el cátodo (derecha) (96 fracciones recogidas en una placa de microtitulación de 96 pocillos estándar) y se indica el pH de las fracciones. Se separaron los marcadores del pl coloreados para evaluar el rendimiento de la separación del sistema. En la Fig. 5, también se muestra la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm, que representan la absorbancia de los respectivos marcadores del pl.

La **Fig. 6** ilustra los resultados de otra separación por FFE de péptidos obtenidos tras la tripsinización de células HeLa realizada en modo de electroforesis de IEF continuo (FF-IEF), como se describe en el Ejemplo 4 que figura a continuación. Se describe la separación fraccionada de la muestra entre el ánodo (izquierda) y el cátodo (derecha) (96 fracciones recogidas en una placa de microtitulación de 96 pocillos estándar) y se indica el pH de las fracciones. Se separaron los marcadores del pl coloreados para evaluar el rendimiento de la separación del sistema. En la Fig.

6, también se muestra la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm, que representan la absorbancia de los respectivos marcadores del pl.

La **Fig. 7** muestra un cromatograma de picos de referencia registrado a partir de una muestra de la fracción 42 del experimento descrito en el Ejemplo 4. La fracción recuperada se sometió directamente a un análisis de CL-EM/EM sin ninguna etapa de preparación de la muestra adicional.

Las **Fig. 8 a 10** ilustran los resultados de otra separación por FFE de una muestra que contiene proteínas plasmáticas humanas realizada en modo de electroforesis de IEF continuo (FF-IEF) seguida por un análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y un análisis espectrométrico de masas MALDI-TOF posterior de una fracción recuperada según lo descrito más detalladamente en el Ejemplo 5 que figura a continuación.

La **Fig. 8** representa la separación fraccionada de la muestra entre el ánodo (izquierda) y el cátodo (derecha) (96 fracciones recogidas en una placa de microtitulación estándar de 96 pocillos) e indica el pH de las fracciones. Se separaron los marcadores del pl coloreados para evaluar el rendimiento de la separación del sistema. En la Fig. 8, también se muestra la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm, que representan la absorbancia de los respectivos marcadores del pl.

La **Fig. 9** muestra el gel de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS correspondiente obtenido para las diversas fracciones.

La **Fig. 10** muestra un cromatograma de picos de referencia registrado a partir de una muestra de la fracción 53 del experimento descrito en el Ejemplo 5. La fracción recuperada se sometió directamente a análisis de MALDI-TOF sin ninguna etapa de desalinización adicional.

Las **Fig. 11 y 12** ilustran los resultados de otra separación por FFE de extracto liofilizado de proteína de avispa realizada en modo de electroforesis de IEF continuo (FF-IEF) y usando un sistema tampón volátil diferente tal como se describe más detalladamente en el Ejemplo 6 que figura a continuación.

La **Fig. 11** muestra la separación fraccionada de la muestra entre el ánodo (izquierda) y el cátodo (derecha) (96 fracciones recogidas en una placa de microtitulación estándar de 96 pocillos) e indica el pH de las fracciones. Se separaron los marcadores del pl coloreados para evaluar el rendimiento de la separación del sistema. También se muestra en la Fig. 11 la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm, que representan la absorbancia de los respectivos marcadores del pl.

La **Fig. 12** muestra el gel de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS correspondiente obtenido para las diversas fracciones recuperadas tras la separación por FFE.

La **Fig. 13** muestra dos electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS teñidas de plata de fracciones producidas mediante electroforesis de isoelectroenfoque de flujo libre, con el uso un sistema tampón volátil de suero de *Phyathon sebae*, en las cuales la separación se llevó a cabo en presencia de 3-[3-(1,1-bisalquiloetil)piridin-1-il]propan-1-sulfonato (PPS) (primer gel) y en ausencia de PPS (segundo gel).

La **Fig. 14** muestra el espectro de MALDI-TOF de una proteína de 25 kDa aislada de la fracción 26 de una etapa de electroforesis de flujo libre en presencia de un sistema tampón volátil y el detergente PPS eliminable.

La **Fig. 15** representa la separación fraccionada de la muestra entre el ánodo (izquierda) y el cátodo (derecha) (96 fracciones recogidas en una placa de microtitulación estándar de 96 pocillos) e indica el pH de las fracciones. Se separaron los marcadores del pl coloreados para evaluar el rendimiento de la separación del sistema. En la Fig. 15, también se muestra la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm, que representan la absorbancia de los respectivos marcadores del pl.

La **Fig. 16** muestra un ejemplo no restrictivo de ilustrar el principio de un procedimiento en el cual una zona de separación comprende una zona A formada por un medio tampón de separación (MTS) que comprende un sistema tampón volátil (MTS de tipo A) y una zona B formada por un MTS que comprende un sistema tampón no volátil (MTS de tipo B). El procedimiento ilustrado en la Fig. 16 es un isoelectroenfoque cíclico de intervalos, en el cual la muestra se introduce en la zona B y los analitos ácidos de interés se eluyen en un MTS de tipo A. Opcionalmente, también se podría introducir una muestra en la zona A.

La **Fig. 17** muestra un esquema de una separación isotacoforética de flujo libre (FF-ITP) llevada a cabo en una cámara de separación de FFE ejemplar.

Las **Fig. 18a a 18c** son una representación esquemática de las condiciones de las secciones 18A, 18B y 18C como se indican en la FIG. 17. La muestra se introduce en la región espaciadora que está formada por un MTS de tipo A,

es decir, en una zona A. La zona T concentrada de electrolitos terminadores y la zona T diluida forman una primera zona B, y la zona de estabilización L y la zona de electrolitos líder forman una segunda zona B.

Sección 18A (Fig. 18a): condiciones de partida iniciales que muestran los electrolitos introducidos y los electrolitos espaciadores. Entre un primer electrodo (lado derecho) y un segundo electrodo (lado izquierdo), el espacio de separación contiene una zona de estabilización de L (L conc.), una zona de electrolitos líder (L), una zona de electrolitos espaciadores (S) (que comprende iones espaciadores S1, S2 y S3), una zona T concentrada de electrolitos terminadores (T conc.) y un zona de T diluida (T conc./X) que se ha diluido por un factor X como se describe en la presente memoria.

Sección 18B (Fig. 18b): condiciones que muestran el espacio de separación una vez que se ha añadido la muestra al flujo de los electrolitos como se representa en la Fig. 4a. En este momento, el puerto de introducción de muestra (14) se coloca entre el primer y el segundo electrodo, y la muestra que incluye los iones de la muestra S1 y S2 se introduce en el medio de separación. En la sección B, ya se puede haber establecido un campo eléctrico o el campo eléctrico se establecerá poco después, mientras la muestra se encuentra entre las secciones B y C.

Sección 18C (Fig. 18c): estado que representan el movimiento y el efecto de apilamiento de la isotacoforesis generados desde un campo eléctrico aplicado entre el primer y el segundo electrodo. El estado está formado por la selección adecuada y el posicionamiento de L, los iones de la muestra (A1 y A2), los iones espaciadores (S1, S2 y S3), la T conc., la T conc./X y la T_{muy dil.} (muy diluida) como se define anteriormente. Se forma una zona T_{muy dil.} de electrolitos terminadores, en la cual la concentración de los T terminadores de la zona T_{muy dil.} es incluso menor que la concentración de T conc./X de la zona T conc./X. La concentración de la zona T de electrolitos terminadores se determina por la concentración de las zonas de electrolitos líder y de la muestra mediante la ecuación de Kohlrausch.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para analizar, identificar y cuantificar analitos mediante espectrometría de masas que comprende una etapa de FFE que comprende medios de separación volátiles.

Los presentes medios de separación que comprenden compuestos tampón volátiles tienen propiedades ventajosas, ya que, por una parte, permiten una separación o un fraccionamiento fiable y reproducible de los analitos mediante FFE, y por otra parte, ofrecen la ventaja adicional de que el sistema tampón volátil (compuestos disolventes y tampón) se puede eliminar convenientemente sin dejar atrás componentes no deseados ("eliminación libre de residuos") que sean incompatibles con procedimientos de análisis aguas abajo de espectrometría de masas. En otras palabras, la etapa de separación por FFE en la que se emplean los medios de separación volátiles según la presente invención produce fracciones de muestras que se pueden usar directamente (es decir, sin etapas de lavado o etapas de intercambio de tampones, etc) en análisis posteriores que se seleccionan, pero sin limitación, entre: EM, MALDI-EM, ESI-EM, SELDI-EM, CL-EM (/EM), MALDI-TOF-EM (/EM).

Como será evidente a partir de los ejemplos que se describen a continuación en la presente memoria, los medios de separación se pueden preparar fácilmente, generalmente, no son peligrosos, y producen condiciones electroforéticas estables y reproducibles que permiten realizar una separación potente y sensible de los analitos en una muestra mediante FFE.

Como se usa en la presente memoria, el término "muestra" se refiere a cualquier composición de la cual al menos una parte se somete a una separación electroforética de flujo libre y/o un análisis. Comúnmente, una muestra comprende o se sospecha que comprende al menos un analito de interés.

Se ha de entender que una "zona de separación", como se usa en la presente memoria, se encuentra entre los dos electrodos de un aparato adecuado para realizar una separación electroforética de flujo libre. Una zona de separación está formada, al menos, por un medio de separación. Una zona de separación típica puede estar abarcada a cada lado por un medio de estabilización, un medio de enfoque o un medio de electrodo. En ciertas realizaciones, un medio de separación forma una zona de medio de enfoque, es decir, la zona de separación comprende un medio de enfoque. En otras realizaciones, un medio de enfoque puede incluso actuar como un medio de estabilización, es decir, una zona de separación puede comprender un medio de enfoque que actúa como un medio de estabilización.

La expresión "medio de enfoque", como se usa en la presente memoria, se refiere a un medio tampón de separación que comprende un ácido para un medio de enfoque anódico o una base para un medio de enfoque catódico, respectivamente, que forma una variación de la conductividad y, opcionalmente, una variación del pH con respecto al medio tampón de separación adyacente. Una zona de enfoque formada por al menos un medio tampón de separación reduce el movimiento de los analitos hacia el ánodo o el cátodo prácticamente a cero debido a una variación de la conductividad. Dicha variaciones de la conductividad se puede lograr mediante la adición de un ácido

fuerte o una base fuerte al medio tampón de separación que forma la zona de enfoque. La concentración del ácido y de la base se seleccionará de manera que sea suficiente para aumentar la conductividad del al menos un medio tampón de separación, preferentemente, en un factor de al menos 2 y, más preferentemente, de al menos 3, al menos 5 o, incluso más con respecto a un medio tampón de separación adyacente. Este aumento brusco de la conductividad eléctrica del medio es útil para acumular analitos con un pl diferente cuando el intervalo de pH de los medios tampón de separación de la frontera entre los dos medios que tienen diferentes valores de conductividad por la movilidad de los analitos que se desplazan hacia el ánodo o el cátodo respectivamente se reduce prácticamente a cero. Los principios de los "medios de enfoque" se describen, por ejemplo, en la patente US 7.169.278 y en el documento WO 2008/087218 publicado posteriormente. Como se entenderá, una zona de enfoque está comúnmente formada por un medio de enfoque.

En el contexto de la presente solicitud, los términos "separar" y "separación" pretenden significar cualquier división espacial de una mezcla de dos o más analitos en base a su diferente comportamiento en un campo eléctrico. Por tanto, la separación incluye, pero sin limitación, el fraccionamiento, así como un enriquecimiento específico y selectivo, o una disminución, concentración y/o aislamiento de determinadas fracciones o analitos contenidos en la muestra. Sin embargo, se entenderá que el fraccionamiento, en general, significa una división o una disminución de ciertos analitos de una muestra con respecto al resto de los analitos, independientemente de si dichos otros analitos se separan posteriormente durante la etapa de electroforesis. Es muy evidente que no hay una clara distinción entre los términos fraccionamiento y separación, aunque este último significa una división espacial más exacta o detallada de los diversos analitos de una muestra. Por lo tanto, siempre que la solicitud se refiera a los términos "separar" o "separación", éstos pretenden incluir al menos uno de los significados anteriores, incluyendo la separación, el fraccionamiento o la disminución.

La separación se puede llevar a cabo principalmente de una manera preparativa, de manera que posteriormente se recojan ciertas fracciones, o se puede llevar a cabo simplemente de manera analítica, en la que el analito de interés o su presencia en una cierta fracción, simplemente, se detecta por medios adecuados, pero no se recoge, por ejemplo, para un uso posterior.

Se entenderá que la mayoría de las electroforesis de flujo libre, por razones prácticas, ya se llevan a cabo entre 0°C y aproximadamente 40°C (comúnmente, a temperatura ambiente), aunque no se limitan a este intervalo de temperaturas. La temperatura elegida depende esencialmente del analito o de los analitos de interés. Por lo tanto, la expresión "aumento de la temperatura", cuando se usa en el contexto de los componentes tampón volátiles según realizaciones de la presente invención, se refiere a temperaturas por encima de las condiciones de trabajo usadas en una serie de FFE estándar.

Los analitos más comunes que se pueden separar mediante un procedimiento de FFE según la presente invención incluyen, pero sin limitación, biopartículas, biopolímeros y biomoléculas tales como proteínas, especialmente, proteínas asociadas a la membrana, proteínas integrales de la membrana y proteínas lipófilas, agregados de proteínas, complejos de proteínas, péptidos, péptidos hidrófobos, complejos de ADN-proteína, ADN, membranas, fragmentos de membrana, lípidos, sacáridos y sus derivados, polisacáridos y sus derivados, hormonas, liposomas, partículas de virus, anticuerpos, complejos de anticuerpos, nanopartículas o cualquier combinación de las mismas, así como otras moléculas inorgánicas u orgánicas, por ejemplo, polímeros con cargas superficiales modificadas y partículas tales como componentes de plástico, resinas de melamina, partículas de pintura de látex, poliestirenos, polimetilmetacrilatos, dextranos, derivados de celulosa, poliácidos, compuestos farmacéuticos, profármacos, un metabolito de un fármaco explosivos, toxinas, carcinógenos, venenos, alérgenos, agentes infecciosos o cualquier combinación de los mismos.

La muestra que se separa bien se añade al medio de separación que está presente en el espacio de separación o en la cámara de separación entre el/los ánodo/s y el/los cátodo/s de un aparato de FFE o, preferentemente, se introduce por separado en el espacio de separación de un aparato de FFE, comúnmente, por las entradas reservadas para la muestra proporcionadas en el aparato de FFE. Los diversos analitos de la muestra del medio de separación se separan después mediante la aplicación de un campo eléctrico mientras se están impulsando hidráulicamente hacia el extremo de salida del aparato de FFE. Los dispositivos de FFE adecuados se conocen en la técnica y se comercializan, por ejemplo, con el nombre de sistema de electroforesis de flujo libre BD™ (BD GmbH, Alemania). Además, los dispositivos de FFE adecuados que se pueden usar con los medios de separación y estabilizadores de las realizaciones de la presente invención se han descrito en una serie de solicitudes de patente, entre las que se incluyen la patente US 5.275.706, patente US 6.328.868, solicitudes US 2004/050697, US 2004/050698, US 2004/045826 y US 2004/026251, y los documentos intermedios WO 2008/053047 y WO 2008/025806.

Los expertos en la materia conocen varios modos de funcionamiento de la FFE, y se contemplan en el contexto de las realizaciones de la presente invención. Por ejemplo, la muestra y el medio de separación se pueden impulsar de manera continua hacia el extremo de salida mientras se aplica un campo eléctrico entre el ánodo y el cátodo de un aparato de FFE ("modo continuo"). Se entenderá que modo continuo, en el contexto de la FFE, significa que la etapa

de inyección, así como la etapa de separación se produce de forma continua y simultánea. La separación electroforética se produce mientras que el medio y los analitos pasan a través de la cámara de electroforesis en la que se están separando las diferentes especies según su pI (IEF), densidad de carga neta (ZE) o movilidad electroforética (ITP). La FFE de modo continuo permite la inyección continua y la recuperación de los analitos sin la necesidad de llevar a cabo varias "series" independientes (entendiéndose una serie como una secuencia de inyección de la muestra, separación y posterior recogida y/o detección). Se apreciará que la FFE en modo continuo incluye técnicas de separación en las cuales se reduce el caudal neto global (pero no se detiene) en comparación con el caudal neto global inicial mientras que los analitos pasan por el espacio de separación entre los electrodos para aumentar el tiempo de separación. Sin embargo, en este último caso, ya no se puede hablar de un verdadero modo continuo, porque la reducción del caudal neto global sólo tendrá sentido para una cantidad limitada de una muestra.

También se ha descrito en la técnica otro modo de funcionamiento de la FFE conocido como el "modo de intervalos" en relación con aplicaciones de la FFE. Por ejemplo, en la patente US 6.328.868, se muestra un procedimiento de electroforesis de deflexión no continuo (es decir, a intervalos). En esta patente, tanto la muestra como el medio de separación se introducen en una cámara de electroforesis y luego se separan usando un modo electroforético tal como la electroforesis en zona, la isotacoforesis o el isoelectroenfoco y, finalmente, se expulsan de la cámara por las salidas de fraccionamiento. Las realizaciones de la patente US 6.328.868 describen un movimiento de los medios de separación y de las muestras unidireccional, desplazándose desde el extremo de entrada hacia el extremo de salida de la cámara. Esta dirección, a diferencia de la electroforesis capilar tradicional, es compartida por la orientación de los electrodos alargados. En el modo estático de intervalos que se describe, por ejemplo, en la invención de la patente US 6.328.868, la aceleración de la muestra entre los electrodos causada por una bomba o algún otro elemento de desplazamiento de fluidos sólo tiene lugar cuando se apaga el campo eléctrico o, al menos, cuando la tensión no es efectiva para la migración electroforética, es decir, cuando ninguna parte de la muestra está siendo sometida a un campo eléctrico efectivo.

En otras palabras, el procedimiento de intervalos se caracteriza por una fase de carga, en la que se introducen la muestra y los medios en la cámara de separación del aparato de electroforesis, seguida de un procedimiento de separación en el que el flujo neto global del medio que incluye la muestra se detiene al aplicar un campo eléctrico para conseguir la separación. Tras la separación/el fraccionamiento de la muestra, el campo eléctrico se apaga o se reduce para que sea inefectivo, y el flujo neto global se vuelve a encender, de modo que la muestra fraccionada es impulsada hacia el extremo de salida y, posteriormente, recogida/detectada en un recipiente adecuado, por ejemplo, en una placa de microtitulación.

El denominado modo cíclico o cíclico de intervalos, en el contexto de la FFE como se usa en la presente memoria, se ha descrito en el documento intermedio WO 2008/025806. En resumen, el modo cíclico de intervalos se caracteriza por al menos una y, posiblemente, múltiples inversiones de la dirección del flujo neto global cuando la muestra se mantiene en el campo electroforético entre los electrodos alargados. En contraste con el modo estático de intervalos, la muestra está en constante movimiento permitiendo de ese modo una mayor intensidad de campo y, así, una mejor separación (o más rápida). Además, mediante la inversión del flujo neto global de la muestra entre los electrodos alargados, se puede aumentar considerablemente el tiempo de residencia de los analitos en el campo eléctrico, lo que ofrece un mayor tiempo de separación y/o una mayor eficiencia de separación y mejor resolución. La inversión del flujo neto global en cualquier dirección paralela a los electrodos alargados (lo que se denomina un ciclo) se puede repetir tantas veces como sea necesario en una determinada situación, aunque las razones prácticas y el deseo de obtener una separación en un breve periodo de tiempo, normalmente, limitará el número de ciclos llevados a cabo en este modo.

Los tiempos de separación más comunes (los tiempos de tránsito para los analitos en el medio) durante los que se aplica un campo eléctrico varían de un par de minutos a aproximadamente una hora por serie de separación por FFE, aunque, en ciertas condiciones, también pueden ser posibles separaciones más largas. El tiempo de tránsito de los analitos en la muestra dependerá del caudal neto del medio de separación que pasa a través del aparato de FFE, siendo generalmente al menos de 10 minutos, especialmente, si los medios de separación se usan junto con los medios estabilizadores de las realizaciones de la presente invención. En cualquier caso, los medios de separación descritos en la presente memoria pueden, en determinadas condiciones, incluso permitir una separación/un fraccionamiento eficiente de los analitos en menos de 10 minutos o incluso en menos de 7 ó 5 minutos. En términos generales, las separaciones realizadas en el modo de ZE, comúnmente, serán más cortas que las realizadas en el modo de IEF, particularmente, cuando se realizan en el modo cíclico de intervalos, en el que el tiempo de transición se puede alargar principalmente tanto como se desee, con la condición de que las condiciones del espacio de separación sean suficientemente constantes durante la separación.

Tras haber logrado la separación o el fraccionamiento deseados de los analitos de la muestra, habitualmente, se apaga el campo eléctrico, y los analitos separados/fraccionados de interés posteriormente bien se recogen, comúnmente, en un número adecuado de fracciones, del dispositivo de FFE (aplicaciones preparativas) o, al menos, se detectan mediante medios adecuados (aplicaciones analíticas) en un recipiente adecuado, por ejemplo, en una

placa de microtitulación. Como resulta evidente, especialmente para las aplicaciones preparativas (que en este contexto, pretenden incluir la aplicación analítica de aguas abajo mediante EM en la que se requiere la presencia del analito/s), la separación según la presente invención ofrece la ventaja de que las muestras recogidas se pueden preparar conveniente y rápidamente para un análisis posterior.

Medios de separación volátiles de FFE

Los medios de separación volátiles de FFE usados según la presente invención están normalmente en forma de soluciones acuosas. Por supuesto, los medios descritos en la presente memoria también se pueden proporcionar en forma de una solución concentrada que se diluya a la concentración apropiada o incluso en forma seca (por ejemplo, cristalina, amorfa o incluso liofilizada) que comprenda los diversos ingredientes del medio, ya sea en un solo recipiente o distribuidos en varios recipientes (por ejemplo, en forma de kit). Los ingredientes secos se pueden reconstituir más tarde con agua antes de aplicar la FFE.

Se ha de entender que un medio de separación volátil usado según la presente invención representa, en su forma lista para usarse, una composición, preferentemente, una composición acuosa, que incluye un sistema tampón que comprende al menos un ácido tampón y al menos una base tampón, en el cual todos los compuestos tampón son volátiles. Se desea que un medio de separación volátil esté únicamente compuesto de componentes tampón volátiles y agua, es decir, que el medio no contenga otros ácidos y bases fuertes ni/o otros tampones de ácido y base que no sean volátiles. Opcionalmente, al menos uno de los compuestos tampón puede ser capaz de funcionar como una matriz (volátil) para la espectrometría de masas, particularmente, en aplicaciones de MALDI.

Se ha de entender que el término "volátil", usado en relación con los sistemas tampón de la presente invención, se refiere a la capacidad de los compuestos tampón (es decir, tampones de ácidos y bases) para ser completamente eliminados de una muestra acuosa en las condiciones de trabajo de una espectrometría de masas MALDI, es decir, que el compuesto tampón se pueda evaporar sin dejar atrás ningún compuesto residual (por ejemplo, una sal), es decir, que no deje residuos. Por el contrario, el término "no volátil", como se usa en la presente memoria, se refiere a compuestos tampón que no se pueden eliminar sin dejar residuos, es decir, al menos un compuesto del sistema tampón no es volátil y no se puede evaporar en dichas condiciones.

En su sentido más amplio, un compuesto tampón volátil según la presente invención se puede eliminar sin dejar residuos en las condiciones de trabajo de una espectrometría de masas MALDI, aunque se apreciará que un compuesto tampón volátil debe ser prácticamente "no volátil en las condiciones de trabajo de la FFE" (es decir, a la presión atmosférica y una temperatura que comúnmente varíe entre 0°C y 40°C como se ha explicado anteriormente en la presente memoria).

La expresión "no volátil en las condiciones de trabajo de la FFE" significa una volatilidad de un compuesto tampón que conduce a una reducción de la concentración del respectivo compuesto tampón en el medio de separación de menos de un 5% (p/v) o, preferentemente, de menos de un 2% (p/v) en las condiciones de trabajo y durante el período de separación de la FFE. Lo más preferente es que no se observe ninguna reducción de la concentración en absoluto en las condiciones de trabajo ni durante el período de separación de la FFE.

En este contexto, el experto entenderá que el/los analito/s que está/n presente/s en una muestra que comprende compuestos tampón volátiles será/n no volátil/es en las condiciones anteriormente mencionadas; es decir, el/los analito/s prácticamente no se modifica/n (por ejemplo, mediante fragmentación u oxidación) y permanece/n en disolución o en estado sólido. En las condiciones de trabajo de la espectrometría de masas, el/los analito/s también será/n volátil/es y será/n ionizable/s (algo necesario para la detección mediante EM).

Se entenderá que la expresión "que no deja residuos", en el sentido de la presente invención, significa que el propio compuesto volátil se evapora por completo, pero que los residuos generados, por ejemplo, por una impureza de las sustancias usadas, pueden ser no volátiles. Sin embargo, es ampliamente conocido por los expertos en la materia que, a efectos analíticos, sólo se deben usar compuestos que tengan el mayor grado de pureza disponible y, especialmente, para el análisis de espectrometría de masas.

Se ha de entender que la eliminación del disolvente y de los compuestos tampón mediante "evaporación", como se usa en la presente memoria, se refiere a la eliminación de los analitos de interés a través de la transferencia de los compuestos a la fase gaseosa y la posterior eliminación de la fase gaseosa mediante procedimientos adecuados. Así, la evaporación como se define en la presente memoria es diferente de la eliminación de los compuestos tampón mediante técnicas comúnmente denominadas como intercambio de tampones (a veces, también denominada "desalinización"), incluyendo la cromatografía en columna, diálisis o procedimientos de filtración de corte, o las técnicas conocidas como extracción en fase sólida o precipitación de analitos. Alternativamente, en ciertas aplicaciones que no se incluyen en el término "evaporación", los compuestos tampón presentes en forma de sal simplemente se lavan con agua, aunque esto obviamente conduce a una pérdida no deseada de material de muestra y, por otra parte, a la eliminación no cuantitativa de los compuestos tampón. Los expertos en la técnica

apreciarán que, asimismo, los compuestos tampón volátiles como se definen en la presente memoria se podrían, al menos en principio, eliminar mediante dichas técnicas de intercambio de tampones o de extracción en fase sólida, aunque es evidente que esto obviaría la ventaja distintiva ofrecida por la volatilidad de los tampones (y no tendría sentido en vista de los posibles problemas relacionados con las técnicas de intercambio de tampones, por ejemplo, con la dificultad de manipulación y la recuperación de poca cantidad de muestra).

Las técnicas ejemplares adecuadas para eliminar el disolvente y los compuestos tampón volátiles de una muestra recogida en una etapa de separación de EFL por evaporación incluyen, pero sin limitación, la centrifugación al vacío con el uso de dispositivos adecuados tales como un evaporador centrífugo o una centrifugadora de vacío conocida, por ejemplo, con el nombre de SpeedVac®, mediante liofilización o mediante un calentamiento (suave) de la muestra acuosa. Otras posibilidades para evaporar el disolvente y los compuestos tampón incluyen la evaporación sometiendo la muestra a condiciones de presión reducida, por ejemplo, aplicando un vacío a la muestra colocada sobre una placa de destino usada en el análisis de espectrometría de masas. Los expertos en la materia apreciarán que la mayoría de los procedimientos de espectrometría de masas se realizan en condiciones de vacío (por ejemplo, MALDI al vacío), de modo que los compuestos tampón volátiles se eliminan convenientemente tras la introducción de la muestra en el instrumento de EM, pero antes de la ionización.

Preferentemente, los compuestos tampón volátiles son eliminables en condiciones de reducción de la presión y/o aumento de la temperatura. Además, los compuestos tampón volátiles se pueden evaporar incluso en condiciones de temperatura ambiente y presión atmosférica, especialmente, si la muestra que contiene el tampón volátil está presente en un volumen bajo (por ejemplo, un análisis de espectrometría de masas). Sin embargo, en la mayoría de los casos, al menos parte de la solución tampón no se evaporará fácilmente en esas condiciones o los compuestos tampón volátiles sólo se podrán eliminar en condiciones más severas (por ejemplo, al vacío y/o a altas temperaturas, opcionalmente, con radiación tal como en las condiciones de trabajo de una espectrometría de masas).

En ciertas realizaciones de la presente invención, los medios de separación de FFE comprenden compuestos tampón volátiles en los cuales al menos uno de los compuestos tampón volátiles puede actuar como una matriz (volátil) para el análisis de espectrometría de masas; es decir, el compuesto sólo se puede eliminar en las condiciones de trabajo de una espectrometría de masas.

Un compuesto de matriz, como se usa en la presente memoria, puede ser un líquido a temperatura ambiente o un sólido opcionalmente cristalino, que sea al menos hidrosoluble a una concentración que permita la producción de un sistema tampón volátil adecuado para la FFE. La matriz volátil es una matriz "absorbente de la luz". Como se usa en la presente memoria, la expresión "absorbente de luz" se refiere a la capacidad de la matriz para absorber la luz de desorción con el fin de ayudar en la desorción y la ionización del analito. La matriz preferida tiene una alta velocidad de sublimación en las condiciones de espectrometría de masas y absorbe fuertemente la luz de desorción (por ejemplo, bombardeo láser a temperatura ambiente y al vacío).

Una mezcla de matriz y analito para aplicaciones de MALDI comprende comúnmente una mezcla física de la matriz con el compuesto que se va a analizar. Las mezclas de matriz y analito usadas como muestras para el análisis de espectrometría de masas pueden, por supuesto, comprender más de un analito. Además, pueden comprender uno o más compuestos tampón volátiles y/o otros aditivos. La mezcla de matriz y analito puede contener, o no, aductos de la matriz con la molécula. Sin embargo, si se forman aductos, comúnmente, éstos sólo estarán débilmente asociados, de modo que se podrán disociar fácilmente tras la desorción o la ionización de una radiación.

Siempre y cuando el compuesto cumpla los requisitos de volatilidad expuestos en la presente memoria, un ácido tampón pretende significar cualquier compuesto químico que tenga al menos una función de ácido; es decir, el compuesto debe ser capaz de donar un protón en una reacción (un ácido de Bronsted-Lowry). De manera similar, una base tampón pretende significar un compuesto que tiene al menos una función de base; es decir, el compuesto debe ser capaz de aceptar un protón en una reacción (una base de Bronsted-Lowry).

Como es bien conocido en la técnica, el pKa de un compuesto determina qué fracción de la función de ácido se desprotona y qué fracción tiene el átomo de hidrógeno todavía unido a un pH dado en condiciones de equilibrio. Por ejemplo, en el caso de los ácidos monofuncionales, un 50% del compuesto se desprotona (aumentando así la carga negativa del compuesto) cuando el pH de una solución acuosa es igual al pKa de un compuesto dado. Cuando el pKa es una unidad superior al pH de una solución, sólo se desprotonará un 10% del compuesto, mientras que, a un pKa una unidad inferior al pH, se desprotonará un 90%.

Se ha de desprotonar al menos una pequeña fracción del ácido tampón para los medios de separación y se ha de protonar una pequeña fracción de la base tampón a un pH o intervalo de pH determinado con el fin de proporcionar un número suficiente de especies cargadas a la solución necesaria para alcanzar una conductividad eléctrica adecuada en el medio de separación.

Asimismo, la base tampón debería tener una basicidad (para facilitar la referencia expresada por el valor de pKa (es

decir, la acidez) del ácido correspondiente)) que, a un determinado pH, produjera una determinada fracción que estuviera protonada y otra fracción en la cual el compuesto todavía estuviera sin el protón unido.

En otras palabras, los expertos en la materia entenderán que lo ideal es que el valor de pKa (que indica la "fuerza" de un ácido o de una base) de los ácidos tampón y de las bases tampón no sea muy diferente al pH del medio de separación. En este contexto, se observa que la referencia al pH del medio de separación debe entenderse que se refiere al pH del medio acuoso que incluye todos los componentes antes de la aplicación de un campo eléctrico. Dicho pH se puede determinar fácilmente, por ejemplo, mediante medidores convencionales del pH antes de introducir el medio en el espacio de separación del aparato de electroforesis. Dependiendo de los contenidos del medio de separación y del medio de estabilización, la aplicación de un campo eléctrico conducirá a la formación de un gradiente de pH en el medio de separación, de manera que el medio de separación dejará de tener un pH uniforme por todo el espacio de separación. Así, a menos que se indique lo contrario, cualquier referencia al pH del medio de separación que se realice en la presente solicitud siempre se referirá al pH antes de la aplicación del campo eléctrico.

Además, debido a que los compuestos tampón deben ser volátiles, es importante seleccionar el ácido tampón y la base tampón de modo que su diferencia de pKa no sea demasiado elevada, porque, de lo contrario, los compuestos se ionizarán, reduciendo o disminuyendo su volatilidad. En otras palabras, la diferencia de pKa entre el ácido tampón y la base tampón no debe superar las 4 unidades de pH.

Los expertos en la materia podrán calcular el pH de una solución cuando se conozcan los valores de pKa y las concentraciones de los ácidos y las bases tampón de la solución (por ejemplo, mediante la aplicación de la ecuación de Henderson-Hasselbalch). Por ejemplo, una solución acuosa diluida equimolar de un ácido que tiene un pKa de 8,0 y una base que tiene un pKa de 6,0 dará como resultado una solución que tendrá un pH de aproximadamente 7,0 ($\text{pKa}[\text{ácido}] + \text{pKa}[\text{base}] / 2$).

En general, los ácidos y las bases tampón volátiles se seleccionan de manera que el pH del medio de separación esté en el intervalo de aproximadamente 2 a 12, aunque preferentemente, el pH estará en algún punto del intervalo de aproximadamente 3 a 11. Dado que los problemas típicos de la separación abarcarán las muestras de origen biológico, los valores preferidos de pH del medio de separación (bien un pH constante o los valores finales de un gradiente de pH) a menudo variarán entre un pH de 4 y 10, o incluso entre un pH de 5 y 9, aunque es evidente que el pH del medio de separación dependerá del problema de separación específico y de la naturaleza de los analitos.

Como norma general, se puede decir que para un intervalo de pH más amplio, normalmente, se requieren más de un ácido tampón y una base tampón para proporcionar suficiente capacidad de tamponamiento y electroforética en todo el intervalo de pH, mientras que se pueden diseñar medios de separación adecuados que presenten un pH constante o un bajo gradiente de pH sólo con un ácido tampón y una base tampón. Aunque los medios de separación volátiles pueden comprender más de un ácido tampón y más de una base tampón, en general, es deseable mantener el número de ingredientes tan bajo como sea posible, especialmente, debido a que los compuestos tampón adicionales también deben ser volátiles. Además, los costes y el aumento del número de las diferentes especies presentes en el espacio de separación produce una mezcla de separación más compleja que hace más ventajoso disponer de un sistema tampón binario.

Por consiguiente, los medios de separación volátiles de FFE pueden contener un sistema tampón volátil binario acuoso que sólo comprenda un ácido tampón volátil y una base tampón volátil, particularmente, cuando la separación se pueda llevar a cabo mediante la formación de un perfil de pH más bien lineal en el espacio de separación de un aparato de FFE.

Los medios de separación volátiles de FFE formarán un gradiente de pH en el espacio de separación entre el ánodo y el cátodo de un aparato de FFE. El gradiente podría estar bien en forma de un gradiente prácticamente lineal o en forma de gradiente no lineal, por ejemplo, un "gradiente" de pH escalonado, en el cual la diferencia de pH entre el pH más bajo y el pH más alto en el medio de separación durante la electroforesis sea generalmente de más de aproximadamente 0,2 unidades de pH y de menos de 5 unidades de pH. Preferentemente, la diferencia de pH es de entre 0,5 y 4 unidades de pH.

En los casos en los que se requiere o se desea la formación de un gradiente de pH de entre 0,2 y 5 unidades de pH durante la electroforesis (es decir, para las separaciones de FFE ejecutadas en el modo de IEF), se entenderá que el medio de separación volátil de FFE consistirá normalmente en varias fracciones separadas (medios de separación separados) que comprenderán concentraciones variables de los ácidos y las bases tampón en el medio con el fin de establecer un gradiente de pH preformado. En otras palabras, el medio de separación puede comprender una pluralidad de fracciones de medios de separación que tienen un valor de pH diferente para crear un gradiente de pH entre el ánodo y el cátodo de un aparato de FFE. Comúnmente, el número de fracciones separadas (medios de separación) será de al menos 2 y, por razones prácticas, rara vez superará las 15 fracciones. Para realizaciones particulares, el número de fracciones que tienen diferentes concentraciones o proporciones de concentración de

ácido y de base es de entre 2 y 15, 3 y 12, 4 y 9 o incluso 5 y 8 fracciones. El pH de cada fracción puede ser prácticamente el mismo o puede ser diferente al de cualquier otra fracción. Alternativamente, varias fracciones pueden tener prácticamente el mismo pH, pero pueden tener un pH diferente en comparación con otras fracciones más, formando de esta manera escalones de pH dentro del medio de separación.

Aunque no se especifica técnicamente el número de sub-fracciones, en la práctica, el número a menudo se registrará o al menos estará influido por el número de las diferentes entradas de medio del aparato de electroforesis usado para la separación. El medio de separación podría formar un gradiente escalonado, que puede comprender ascensos y descensos del pH en un orden variable. Alternativamente, los medios de separación pueden formar un gradiente en el cual el pH de las fracciones de los medios de separación introducidas en el aparato de FFE aumente desde el ánodo hacia el cátodo de un aparato de FFE para crear un gradiente de pH que tenga un bajo valor de pH hacia el ánodo y un alto valor de pH hacia el cátodo. Aunque los medios de separación volátiles son particularmente adecuados para el IEF de flujo libre, no se limitan estrictamente a aplicaciones de IEF de flujo libre. Sin embargo, preferentemente, los medios de separación volátiles se usan en aplicaciones de IEF de flujo libre.

En otras realizaciones, el medio de separación volátil formará un pH prácticamente constante entre el cátodo y el ánodo de un aparato de FFE, al menos, al principio de una etapa de separación de FFE y, por tanto, será particularmente útil para los procedimientos de separación de FFE ejecutados, por ejemplo, en el modo de electroforesis en zona (FF-ZE).

Para los medios de separación volátiles de FFE, las concentraciones relativas de los ácidos y las bases tampón deberían estar en una cierta proporción. Así, la proporción entre la concentración de todos los ácidos y las bases tampón debería estar comúnmente entre aproximadamente 9:1 y aproximadamente 1:9. En realizaciones preferidas, la proporción es incluso menor, tal como de 4:1 a 1:4, o de 3:1 a 1:3, o incluso de 2:1 a 1:2. Particularmente en las aplicaciones en las que se desea un pH constante (es decir, en aplicaciones de ZE), se prefiere una proporción de aproximadamente 1, es decir, en la cual la concentración de la base tampón sea prácticamente igual a la concentración de la base tampón.

Independientemente de lo anterior, el experto entenderá que la concentración exacta de un ácido dado o de una base dada puede depender de una serie de factores, entre los que se incluyen la naturaleza de la muestra, la presencia de otros aditivos (véase más adelante) y el pH deseado del medio de separación, pudiéndose adaptar en consecuencia. Sin embargo, en algún momento, se puede perder la capacidad de tamponamiento y electroforética del medio, si se selecciona una concentración del compuesto (bien del ácido tampón o de la base tampón) demasiado baja, es decir, fuera de las proporciones mencionadas anteriormente.

Con respecto a las concentraciones absolutas de los compuestos tampón necesarias para lograr separaciones correctas, los expertos en la materia se darán cuenta de que no puede haber ninguna regla rígida, a pesar de que se debe entender que, en general, la concentración debería ser lo suficientemente alta como para proporcionar suficiente conductividad eléctrica y capacidad de tamponamiento, pero al mismo tiempo lo más baja posible, en particular, cuando la muestra obtenida de la etapa de separación de FFE se vaya a someter a un análisis aguas abajo, tal como a una EM, en el cual los compuestos tampón se deben eliminar de la muestra. Los analitos que tienen una alta densidad de carga (superficial) (por ejemplo, péptidos o proteínas) requerirán, por regla general, mayores concentraciones de los compuestos tampón que los analitos que tienen una densidad de carga relativamente baja (por ejemplo, células u orgánulos celulares). Del mismo modo, para aplicaciones en las cuales el medio de separación presenta un pH constante (es decir, un perfil de pH plano), se requiere una concentración más baja de los compuestos tampón para lograr la capacidad de tamponamiento deseada, mientras que para gradientes de pH (por ejemplo, en aplicaciones de IEF), la concentración debería ser mayor, en particular, en los casos en los que solo haya uno o dos ácidos/bases tampón, porque la diferencia entre el pH y el pKa del compuesto tampón puede ser mayor, conduciendo a una menor ionización (protonación y desprotonación, respectivamente) del compuesto.

Teniendo en cuenta los principios anteriores, se contempla que los medios de separación volátiles incluyen ácidos tampón volátiles y bases tampón volátiles a una concentración de al menos aproximadamente 1mM a aproximadamente 200mM, más preferentemente, las concentraciones de los compuestos tampón volátiles se seleccionan individualmente entre aproximadamente 2mM a 100mM y, más preferentemente, de 5mM a aproximadamente 50mM. Cuando se hace referencia a la concentración de los ácidos y las bases tampón, respectivamente, se apreciará que los números dados pretenden referirse a la concentración total de cualquier (si hay más de uno) ácido tampón/base tampón en un medio de separación (así como medio de estabilización) dado.

Los ácidos tampón volátiles adecuados que se pueden usar para la separación de analitos, particularmente, analitos de origen biológico, incluyen, pero sin limitación, ácido fórmico, ácido acético, ácido picolínico, diacetilacetona, *o*-, *m*- y *p*-cresoles, *o*-, *m*-, *p*-clorofenoles, hidroxipiridinas, alcoholes fluorados y compuestos carbonílicos fluorados tales como trifluoroetanol, tetrafluoropropanol, tetrafluoroacetona y similares. Se entenderá que la lista anterior no pretende ser, en modo alguno, exhaustiva ni restrictiva, ya que los expertos en la materia podrán encontrar

numerosos ácidos tampón posibles que tengan un pKa adecuado y las propiedades volátiles necesarias para su inclusión en la medios de separación.

De manera similar, las bases tampón volátiles incluyen, pero sin limitación, los compuestos tampón de TRIS, diversas hidroxipiridinas, amida de ácido isonicotínico, diversos piridin-carbinoles, dietanolamina, bencilamina, piridin-etanol y dimetilaminopropionitrilo. De nuevo, la lista no pretende ser exhaustiva ni restrictiva, porque los expertos en la materia podrán encontrar otras bases tampón posibles que tengan un pKa adecuado y las propiedades volátiles deseadas necesarias para su inclusión en los medios de separación.

Los medios de separación volátiles sólo pueden comprender un ácido tampón y una base tampón, por ejemplo, ácido acético y TRIS, ácido picolínico y dietanolamina, ácido acético y dimetilaminopropionitrilo, ácido picolínico y 2-piridin-etanol, bencilamina y 2-hidroxipiridina, tri-*n*-propilamina y trifluoroetanol, como se describe con más detalle en el apartado de ejemplos.

Los expertos en la materia apreciarán que el medio de separación ideal sólo comprende el sistema tampón acuoso volátil, aunque se contempla específicamente en la presente memoria que el medio de separación también puede comprender otros aditivos para, por ejemplo, mantener la integridad o la función de los analitos. Por supuesto, dichos aditivos sólo se deberían añadir si fuera absolutamente necesario y únicamente a la concentración más baja posible necesaria para lograr un efecto deseado, especialmente, si se sabe que son incompatibles con el análisis de EM de aguas abajo.

Los posibles aditivos se seleccionan preferentemente entre, pero sin limitación, otros ácidos y/o bases, aniones y cationes mono- y di-valentes "esenciales", potenciadores de la viscosidad, agentes solubilizantes, ligandos de afinidad, agentes protectores o agentes reductores. Los aniones y cationes mono- y di-valentes esenciales en el sentido de la presente solicitud son los iones que pueden ser necesarios para mantener la integridad estructural y/o funcional de los analitos de la muestra. Los iones tales como iones calcio, iones magnesio, iones cinc o iones ferrosos podrían estar presentes a concentraciones muy bajas. En una muestra, también puede haber potenciadores de la viscosidad y los agentes solubilizantes (tales como hidroxipropilmetilcelulosa, derivados poliméricos hidrófilos, incluyendo polietilenglicol o polialcoholes, hidratos de carbono (tal como sacarosa), dextrinas, ciclodextrinas y lectinas), así como bajas concentraciones de ligandos de afinidad (tales como EDTA o EGTA) o agentes protectores para evitar la contaminación de una muestra con microorganismos (por ejemplo, azida). En ciertos casos, puede ser necesario añadir agentes reductores para evitar la oxidación de un analito en la solución. Un agente reductor adecuado que se puede añadir a la muestra y/o al medio de separación incluye mercaptoetanol, ditiotretol (DTT), ácido ascórbico y similares.

Tampones volátiles en combinación con tensioactivos escindibles

Una realización de la presente invención se refiere al uso de medios que comprenden compuestos tampón volátiles en combinación con tensioactivos zwitteriónicos o no iónicos compatibles con la EM según lo descrito a continuación. La naturaleza zwitteriónica o no iónica de estos tensioactivos los hace adecuados para la electroforesis de flujo libre.

Los términos y las expresiones "tensioactivo", "detergente", "agente humectante" y "emulsionante" se pueden usar indistintamente en la presente memoria y se refieren a moléculas o composiciones que son capaces de reducir la tensión superficial en el agua. Por ejemplo, un tensioactivo potencia el mantenimiento de una proteína o un péptido hidrófobo en una solución acuosa.

La expresión "tensioactivo zwitteriónico o no iónico compatible con la EM" como se usa en la presente memoria significa tensioactivos compatibles con la EM que pueden ser zwitteriónicos o no iónicos. Un tensioactivo zwitteriónico o no iónico puede estar, en resumen, cargado negativa o positivamente dependiendo del pH de una zona diferenciada entre dos electrodos, pero un tensioactivo no iónico compatible con la EM nunca estará cargado en el intervalo de pH en el cual se introduce y del cual se eluye un analito interés en un aparato adecuado para la electroforesis de flujo libre. Además, se debe entender que el punto isoeléctrico de un tensioactivo zwitteriónico compatible con la EM como se usa en la presente invención está generalmente en el intervalo de pH de la zona de separación. Las expresiones "tensioactivo compatible con la EM" y "tensioactivo zwitteriónico o no iónico compatible con la EM", como se usan en la presente memoria, se pueden usar indistintamente, ya que un tensioactivo adecuado para la FFE debe ser bien zwitteriónico o no iónico en el intervalo de pH de la zona de separación.

El término "zwitteriónico", como se usa en la presente memoria, en el contexto de los tensioactivos se refiere a un compuesto que es eléctricamente neutro, pero que porta cargas positivas y negativas formales en diferentes átomos. Los ejemplos, que no deben entenderse como restrictivos, son, por ejemplo, derivados de betaína, preferentemente, sulfobetainas tales como 3-(trimetilamonio)-propilsulfonato o fosfobetainas. Comúnmente, el punto isoeléctrico de un tensioactivo zwitteriónico como se usa en la presente invención está en el intervalo de pH de la zona de separación.

El término "no iónico", como se usa en la presente memoria en el contexto de los tensioactivos, se refiere a

compuestos (bi)polares. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, derivados de sacáridos. Comúnmente, un tensioactivo no iónico no tiene carga en el intervalo de pH de la zona de separación. Sin embargo, dependiendo del intervalo de pH de dicha zona, puede suceder que un compuesto no iónico se cargue a un cierto pH fuera del intervalo de pH usado para separar un analito de interés

La expresión "compatible con la EM", como se usa en la presente memoria, indica tensioactivos que se pueden usar en análisis de EM. La expresión "tensioactivos compatibles con la EM" abarca tensioactivos que son adecuados en sí para los análisis de EM, es decir, sin modificarlos, y también abarca tensioactivos "escindibles" que no son compatibles con la EM en su estado no escindido, pero que se pueden escindir en al menos una posición en al menos dos restos. Dichos restos pueden ser compatibles con la EM o no compatibles con la EM. Un resto no compatible con la EM de un tensioactivo escindible según lo descrito en la presente memoria se puede eliminar fácilmente mediante, por ejemplo, centrifugación, filtración o evaporación, mientras que un resto compatible con la EM puede permanecer en disolución y puede estar presente durante un análisis aguas abajo o, asimismo, se puede eliminar en ciertas condiciones mediante centrifugación, filtración o evaporación. En algunas realizaciones, más de un resto resultante es compatible con la EM. Dichos tensioactivos escindibles compatibles con la EM son adecuados, por ejemplo, en procedimientos que comprenden una etapa de digestión proteica. Una proteína puede ser insoluble en agua, pero sus fragmentos o parte de los fragmentos resultantes de la digestión pueden ser solubles y se pueden analizar, por ejemplo, mediante EM.

Como ejemplo no restrictivo de las ventajas proporcionadas por los tensioactivos escindibles descritos en la presente memoria, la sensibilidad de una detección espectrométrica de masas de un analito en presencia de un tensioactivo compatible con la EM adecuado es mucho mayor que la sensibilidad de una detección espectrométrica de masas de un analito en presencia, por ejemplo, de SDS. En la mayoría de los casos, un espectro de masas de una muestra que comprende SDS no presenta ninguna señal en absoluto o sólo presenta señales débiles debidas a un analito tratado con SDS o a los productos de degradación de dicho analito. Por el contrario, una muestra que comprende dicho analito y que se somete a un análisis espectrométrico de masas en presencia de un tensioactivo compatible con la EM en lugar de SDS presenta señales relacionadas con el analito y con los productos de degradación de dicho analito.

Por consiguiente, se puede entender que un tensioactivo compatible con la EM es un tensioactivo cuya presencia en una muestra que comprende un analito de control soluble que tiene una concentración definida (muestra T) que se somete a un análisis espectrométrico de masas conduce a espectros de masas que comprenden esencialmente al menos los mismos picos de masas (a una intensidad similar o incluso superior) en comparación con un espectro de masas de una muestra que comprende dicho analito de control a la misma concentración definida, pero sin un tensioactivo (muestra C (control)), es decir, los espectros de masa son prácticamente idénticos. En algunas realizaciones, un espectro de EM obtenido de una muestra T puede comprender incluso más picos de masa debido a productos de degradación del analito de control en comparación con el espectro de EM obtenido de una muestra C, por ejemplo, cuando un analito de control se digiere antes del análisis espectrométrico de masas y los productos de degradación son hidrófobos y precipitan en una muestra C antes del análisis espectrométrico de masas.

Un procedimiento adecuado para identificar tensioactivos compatibles con la EM se describe, por ejemplo, en el documento WO 2006/047614. Se puede usar ASB, una proteína de ensayo comúnmente usada, como una proteína intacta ejemplar, y se puede usar un digesto tríptico de β -galactosidasa (t-beta-gal) como una mezcla peptídica ejemplar. Los fragmentos trípticos de β -galactosidasa tienen un intervalo de solubilidades de hidrófila a hidrófoba. Además, muchas otras sustancias también pueden actuar como analitos de control, siempre y cuando sean suficientemente solubles en agua para producir un espectro de EM.

Como ejemplo no restrictivo, se puede comparar un análisis de MALDI-TOF de una muestra T de β -galactosidasa con un análisis de MALDI-TOF de una muestra C equivalente. La inhibición de la ionización en el intervalo de 900-3700 m/z se puede determinar comparando las coincidencias de los iones de masa identificados en la muestra T y la muestra C. El experto en la materia sabrá cómo llevar a cabo un análisis de MALDI-TOF útil.

Preferentemente, la intensidad de cada uno de los picos de masa alineados de la muestra T no es menor de un 25% en comparación con la intensidad del pico de masa idéntico de la muestra C, más preferentemente, es prácticamente la misma o, más preferentemente, es incluso superior a la intensidad del mismo pico de la muestra C.

Con respecto al/a los analito/s o los productos de digestión sólo ligeramente soluble/s o insoluble/s de un analito (de control), se prefiere que la intensidad de los picos de masa en un espectro de masas de una muestra que comprende dicho analito/producto de la digestión sólo ligeramente soluble o insoluble y un tensioactivo compatible con EM sea al menos 1; 1,5; 3; 5; 10; 100 o 1000 veces mayor que la intensidad de los picos de masa idénticos de un espectro de masas obtenido para una muestra que no contiene ningún tensioactivo en absoluto.

"Prácticamente idénticos", como se usa en la presente memoria, significa que al menos un 60%, al menos un 70%, preferentemente, al menos un 80%, más preferentemente, al menos un 90% y, lo más preferentemente,

aproximadamente un 100% de los picos de masa debidos a los productos de degradación del analito de control de la muestra C también están presentes en los espectros de la muestra T. Se pueden usar motores de búsqueda tales como MASCOT[®] para comparar un espectro de EM de, por ejemplo, t-beta-gal digerida o ASB con un espectro de EM teórico de un digesto de t-beta-gal o un espectro de EM teórico de ASB. Comúnmente, se debe considerar el intervalo de 900 a 2.600 *m/z*.

En otras palabras, un espectro de masas obtenido en presencia de un tensioactivo zwitteriónico o no iónico compatible con la EM de la presente invención comprende al menos un 60%, al menos un 70%, preferentemente, al menos un 80%, más preferentemente, al menos un 90% y, lo más preferentemente, un 100% de los picos de masa debidos a los productos de degradación de un analito de control de una muestra C.

La diferencia de masa entre una señal de masa de la muestra C y la señal de masa idéntica de la muestra T puede variar en el error de medición, dependiendo del procedimiento o del aparato usado. El experto entenderá cómo determinar dicho error de medición. Por ejemplo, la exactitud de la medida de la masa de un espectrómetro de masas de trampa de iones se calcula comúnmente entre 0,5 y 2,5 dalton, mientras que se puede obtener una exactitud de la medida de la masa con errores inferiores a 50 ppm o incluso menores a 25 ppm midiendo las señales de masa que varían de alrededor de 900 a 3.700 dalton con aplicaciones de MALDI-TOF.

Independientemente de la compatibilidad de los tensioactivos de la invención, se entenderá que la concentración de un tensioactivo en la electroforesis de flujo libre y un análisis posterior de EM debe ser, no obstante, tan baja como sea posible, preferentemente, en torno a su concentración micelar crítica (CMC). El experto en la materia conoce los procedimientos adecuados en la técnica para determinar la CMC de un tensioactivo. Además, para muchos tensioactivos, ya se conoce la CMC.

Los tensioactivos compatibles con la EM se usan comúnmente a concentraciones inferiores a 100mM. Dependiendo del tensioactivo, pueden ser adecuadas las concentraciones inferiores a 50mM, inferiores a 30mM, inferiores a 15, inferiores a 5, inferiores a 1 e incluso inferiores a 0,1mM. Por ejemplo, la cantidad del tensioactivo PPS escindible de una muestra sometida a una electroforesis de flujo libre como se usa en la presente invención fue de un 0,1% (p/v). Esta cantidad corresponde a una concentración de entre 2 y 10mM (dependiendo de la combinación de cadenas de alquilo de PPS).

El experto en la materia puede identificar fácilmente un tensioactivo compatible con la EM típico como se describe en la presente memoria mediante la comparación de los espectros de masas de una muestra C y una muestra T, comprendiendo cada una de las cuales un analito de control con una concentración distinta. Este procedimiento permite a los expertos determinar si un tensioactivo es compatible con la EM o no. En particular, cabe esperar que los analitos que fueran casi insolubles o insolubles en agua (sin tensioactivo) apenas darían un espectro de masas analizable si no se incluyera en la preparación de la muestra el uso de un tensioactivo. Por lo tanto, una separación de un analito de interés mediante electroforesis de flujo libre en presencia de un tensioactivo compatible con la EM produce muestras que son adecuadas para identificar y caracterizar dichos analitos en un análisis de espectrometría de masas aguas abajo.

En algunas realizaciones, puede ser necesaria la adición de tensioactivos en los procedimientos de la presente invención. En este último caso, lo más preferible es que dicho tensioactivo sea un tensioactivo zwitteriónico o no iónico compatible con la EM. Se entenderá que un tensioactivo zwitteriónico o no iónico compatible con la EM según lo descrito en la presente memoria puede estar comprendido en un medio de muestra y/o en al menos un medio de separación. En otras palabras, un procedimiento para la separación de analitos de una muestra mediante electroforesis de flujo libre según realizaciones de la presente invención puede comprender el uso de al menos un tensioactivo zwitteriónico o no iónico compatible con la EM, en el cual dicho tensioactivo esté presente en el medio de muestra y/o en al menos un medio de separación. Aunque se entenderá que es preferible la presencia de un solo tensioactivo zwitteriónico o no iónico compatible con la EM en un medio de muestra o en un medio de separación, es posible cualquier combinación de múltiples tensioactivos zwitteriónicos o no iónicos compatibles con la EM en un medio de muestra y/o un medio de separación. Cuando un tensioactivo o tensioactivos tienen que estar presentes en al menos un medio de la presente invención, será ventajoso que todos los tensioactivos sean tensioactivos zwitteriónicos o no iónicos compatibles con la EM. El experto en la materia comprenderá que cada uno de los tensioactivos puede estar presente en un medio de muestra y/o al menos un medio de separación.

Además, un tensioactivo compatible con la EM como se describe en la presente memoria puede ser compatible con la EM en sí durante la separación de la electroforesis de flujo libre, o puede convertirse en compatible con la EM mediante la escisión del tensioactivo. En el último caso, un tensioactivo compatible con la EM es un tensioactivo escindible compatible con la EM. Puede ser preferible que al menos un tensioactivo zwitteriónico o no iónico compatible con la EM sea escindible, aunque pueden estar presentes otros tensioactivos zwitteriónicos o no iónicos compatibles con la EM. Puede ser ventajoso que todos los tensioactivos compatibles con la EM de un medio de muestra y/o un medio de separación sean tensioactivos escindibles.

Las expresiones "tensoactivo escindible zwiteriónico o no iónico compatible con la EM", "tensoactivo escindible compatible con la EM" o "tensoactivo escindible" se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a los tensoactivos que se pueden escindir en al menos dos restos en determinadas condiciones. En una realización, al menos uno de los restos escindidos es compatible con la EM según lo definido anteriormente. Dicho resto compatible con la EM puede estar presente durante el análisis de espectrometría de masas o ausente, por ejemplo, ser evaporado antes del análisis de EM. Los restos no compatibles con la EM precipitan después de la escisión o se puede evaporar antes del análisis de EM.

Como se explicará más adelante, se entenderá que una etapa de escisión puede generar más de dos restos. Como ejemplo, se pueden escindir un tensoactivo escindible compatible con la EM en un grupo de cabeza hidrófila que sea compatible con la EM y permanecer en disolución, y una cola no compatible con la EM hidrófoba que se pueda eliminar fácilmente de la muestra mediante centrifugación o filtración. Por consiguiente, un procedimiento puede comprender el uso de al menos un tensoactivo zwiteriónico o no iónico escindible compatible con la EM del que se pueda eliminar al menos un resto de una muestra o una muestra fraccionada mediante filtración, centrifugación y/o evaporación después de una escisión.

Cualquier tensoactivo que comprenda un enlace que combine un resto hidrófobo (cola) con un resto hidrófilo (grupo de cabeza) que pueda ser degradado por un agente de escisión en condiciones, preferentemente, en las cuales el analito de interés sea esencialmente estable y en las cuales todos los restos no compatibles con la EM resultantes se puedan eliminar fácilmente mediante centrifugación, filtración o evaporación, es adecuado como tensoactivo escindible compatible con la EM. Dicho enlace se denominará enlace escindible. Preferentemente, dicho enlace se escinde en condiciones en las cuales un analito de interés sea esencialmente estable. Un analito esencialmente estable en condiciones adecuadas para escindir un tensoactivo escindible se debe entender como un analito de interés del cual, al menos aproximadamente un 80%, aproximadamente un 90%, preferentemente, aproximadamente un 97%, más preferentemente, aproximadamente un 99% y, lo más preferentemente, un 100% de la cantidad de dicho analito presente en una etapa de escisión permanezca invariable tras la etapa de escisión, es decir, el analito sea principalmente, preferentemente, completamente inerte a una reacción química en las condiciones específicas durante la etapa de escisión. Inerte a una reacción química en el presente contexto significa que no se rompe ni se establece ningún enlace covalente en el analito durante la etapa de escisión del tensoactivo.

Un "agente de escisión" como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier instrumento o compuesto o mezcla de compuestos en cualquier forma adecuada para escindir selectivamente un enlace de un tensoactivo escindible. Los ejemplos no restrictivos de los compuestos adecuados para escindir selectivamente un tensoactivo escindible serían ácidos o bases, o una solución/mezcla de los mismos para escindir selectivamente un enlace lábil a ácidos o bases de un tensoactivo escindible. Este y otros ejemplos se describen con más detalle a continuación. Además, la expresión "agente de escisión" abarca los instrumentos adecuados para escindir selectivamente un enlace de un tensoactivo escindible. Dicho instrumento puede ser, por ejemplo, un instrumento de emisión de luz que emita luz de una longitud de onda diferenciada para escindir un tensoactivo escindible fotolábil.

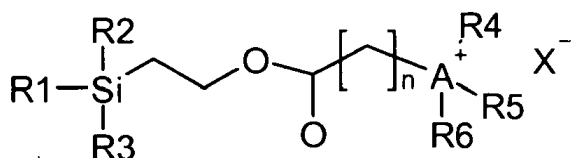
La expresión "solución para escindir un tensoactivo escindible", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier solución que comprenda un agente o una composición adecuada para escindir selectivamente uno o más enlaces entre un ligador y un resto de un tensoactivo escindible, produciendo al menos dos restos, de los cuales los restos que no sean compatibles con la EM se puedan eliminar fácilmente de la muestra mediante centrifugación, filtración o evaporación y los restos compatibles con la EM puedan permanecer en disolución o se puedan eliminar igualmente mediante centrifugación, filtración o evaporación.

Un tensoactivo escindible compatible con la EM puede comprender más de un enlace escindible, por ejemplo, dos enlaces escindibles que produzcan tres restos a partir de una o más etapas de escisión. Cada enlace escindible se puede seleccionar independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, un enlace iónico, un enlace de hidrógeno o un enlace complejo. Se prefieren uno o más enlaces covalentes.

Se puede escindir al menos un tensoactivo zwiteriónico o no iónico escindible de al menos una fracción de una muestra separada mediante una separación electroforética de flujo libre después de la separación electroforética, es decir, al menos un tensoactivo zwiteriónico o no iónico compatible con la EM es escindible en al menos un resto compatible con la EM y un resto que se pueda eliminar fácilmente mediante filtración, evaporación o centrifugación. De nuevo, se observa que también se podría eliminar un resto compatible con la EM mediante evaporación antes de un análisis posterior, es decir, un resto no compatible con la EM producto de una etapa de escisión no se somete a dicho análisis de aguas abajo, mientras que un resto compatible con la EM podría estar presente u, opcionalmente, ausente en un análisis posterior.

Los tensoactivos escindibles compatibles con la EM pueden comprender al menos un enlace lábil a ácidos, es decir, que el tensoactivo sea lábil en medio ácido, o al menos un enlace lábil a bases, es decir, que el tensoactivo sea lábil en medio básico, o al menos un enlace fotolábil, es decir, que el tensoactivo sea lábil a la luz, o al menos un enlace quimiorreactivo, es decir, que el tensoactivo reaccione químicamente.

Los tensioactivos escindible lábiles a ácidos y a bases se pueden escindir cambiando el pH de al menos parte de una muestra fraccionada/fracción, por ejemplo, mediante la acidificación o la basificación de al menos parte de una muestra fraccionada/fracción que comprenda un tensioactivo escindible lábil a ácidos o bases. Los tensioactivos escindibles fotolábiles se pueden escindir aplicando una radiación, es decir, la escisión de un tensioactivo escindible se lleva a cabo sometiendo al menos parte de una muestra fraccionada/fracción que comprenda al menos un tensioactivo escindible fotolábil a una radiación de luz que comprenda o que consista en una longitud de onda definida adecuada para romper selectivamente el enlace entre un ligador y un resto de dicho tensioactivo. Los tensioactivos escindibles quimiorreactivos se pueden escindir mediante la adición de agentes reactivos, es decir, la escisión de un tensioactivo escindible se lleva a cabo mediante la adición de un reactivo a al menos parte de una muestra fraccionada/fracción que sea capaz de romper un enlace de un tensioactivo quimiorreactivo. Por ejemplo, un reactivo adecuado para escindir los enlaces de tipo disulfuro y similares es el DTT (ditiotreititol) o un reactivo adecuado para escindir los compuestos de silano de la fórmula general:



en la cual R1 se selecciona entre alquilo C₇-C₂₀ o alquilarilo C₇-C₃₀;

R2, R3, R4, R5 y R6 son independientemente alquilo C₁-C₅;

A es N o P;

X⁻ es haluro;

n es 1-5.

Un tensioactivo escindible quimioactivo preferido para su uso en una separación de EFL según realizaciones de la presente invención es bromuro de {2-[(dimetil-octil-silanil)-etoxi]-2-hidroxietil}-trimetilamonio.

Un grupo de tensioactivos fotolábiles son, por ejemplo, ésteres de cinnamato tales como octiléster de ácido 3-(2,4,6-trihidroxifenil)acrílico.

Un ejemplo no restrictivo de un tensioactivo escindible lábil en medio ácido es 3-[1,1-(1-bisalcóxietil)piridin-1-il]propano-1-sulfonato (PPS).

Para los tensioactivos escindibles quimioactivos y, especialmente, para los tensioactivos escindibles lábiles en medio ácido o básico, los procedimientos de FFE ofrecen distintas ventajas frente a otras técnicas/otros procedimientos electroforéticos. De hecho, la FFE permite el uso de una amplia variedad de tensioactivos escindibles, lo cual no es posible con otras técnicas de electroforesis. Por ejemplo, los tensioactivos escindibles lábiles a ácidos tales como el PPS son sumamente higroscópicos y son escindidos lentamente por el agua a pH neutro, y a una velocidad acelerada a pH ácido o básico. Según Protein Discovery, el fabricante del PPS, se aconseja que una vez abierto el paquete, se reconstituya inmediatamente el contenido en tampón acuoso (pH 7-8), se proteja de temperaturas elevadas y se use en un plazo de 12 horas. Esto significa que los tensioactivos escindible especialmente lábiles al pH sólo se pueden usar para la electroforesis si la duración del experimento es relativamente corta. La duración máxima del experimento es aún menor cuando se disminuye o se aumenta el pH. Por lo tanto, a un pH no neutro, el experimento electroforético debe llevarse a cabo en un plazo de tiempo aún más corto. La ventaja de la FFE es que es posible realizar una separación electroforética, por ejemplo, de IEF de flujo libre, en este plazo de tiempo corto necesario para mantener la estabilidad del tensioactivo. Por el contrario, el IEF como se realizó en la primera dimensión de la electroforesis en gel bidimensional (o en el instrumento sin gel) típicamente requiere duraciones experimentales de 5 horas o más, o incluso plazos más largos de tiempo (de hasta 7-9 horas o más). Así, el detergente escindible se degradaría en mayor medida, especialmente, a un pH muy bajo o muy alto.

Además, la electroforesis en zona (a intervalos) de flujo libre para la separación de analitos se puede realizar a un pH constante, en el cual el tensioactivo sea estable durante un tiempo suficientemente largo.

Es más, el uso de medios de flujo a contracorriente puede estabilizar el detergente escindible inmediatamente después de que se produzca la separación. Esto permite una separación de los analitos a valores de pH muy ácidos o básicos en un plazo de tiempo muy corto (por ejemplo, de hasta alrededor de 5 min) seguida inmediatamente por el ajuste del pH a través del flujo a contracorriente. Por consiguiente, una realización de la presente invención se refiere a un procedimiento de FFE, en el cual se usa un medio de flujo a contracorriente para adoptar las condiciones del medio necesarias para estabilizar un detergente escindible comprendido en el mismo tras la electroforesis de flujo libre, por ejemplo, ajustando el pH de una fracción distinta tras una etapa de separación de electroforesis de

flujo libre.

Se entenderá que estos principios según lo descrito en el ejemplo no restrictivo anterior se pueden extender a otros tipos de detergentes escindibles que sólo sean estables en determinadas condiciones de separación durante una cantidad limitada de tiempo.

Los medios de flujo a contracorriente también se puede usar de una manera diferente, por ejemplo, para introducir un agente de escisión que escinda el tensioactivo para el procesamiento adicional inmediato de las fracciones de FFE.

Por consiguiente, en otra realización de la presente invención, el procedimiento comprende una etapa de electroforesis de flujo libre en la cual se usa un medio de flujo a contracorriente que comprende un agente de escisión para proporcionar dicho agente de escisión a una muestra o una fracción de la misma tras la separación electroforética de flujo libre que comprende un tensioactivo escindible para escindir dicho tensioactivo escindible.

En caso de que el analito de interés sea una proteína o un polipéptido, se puede llevar a cabo una etapa de digestión de dicha proteína o dicho polipéptido antes o después de la etapa de electroforesis de flujo libre. Los expertos en la materia saben cómo llevar a cabo una etapa de digestión de una proteína, por ejemplo, usando tripsina. Tampoco hay necesidad de eliminar los tensioactivos compatibles con la EM usados en la electroforesis de flujo libre para llevar a cabo dicha etapa de digestión. Al contrario, la presencia de dichos tensioactivos puede incluso mejorar la digestión, mientras que, por ejemplo, la urea tiene que ser al menos parcialmente eliminada antes de dicha etapa de digestión.

La etapa de digestión de la proteína se puede llevar a cabo en al menos una fracción obtenida de la etapa de electroforesis de flujo libre antes o después de la etapa de escisión de un tensioactivo escindible según lo descrito en la presente memoria.

Comúnmente, la eliminación de los restos no compatibles con la EM se consigue fácilmente mediante procedimientos bien conocidos que conducen a una pérdida de muestra nula o prácticamente nula. Una etapa de purificación comúnmente se selecciona del grupo que consiste en evaporación, filtración y centrifugación para eliminar un resto de precipitado de un tensioactivo escindible.

La expresión "pérdida de muestra prácticamente nula", como se usa en la presente memoria, significa que menos de un 5% de un analito de interés, preferentemente, menos de un 1%, más preferentemente, menos de un 0,2% y, lo más preferentemente, menos de un 0,1% se puede, por ejemplo, acumular en un filtro usado para eliminar un resto precipitado de un tensioactivo escindido o puede permanecer en los microgránulos de un resto precipitado de un tensioactivo escindible que se elimine mediante centrifugación, o se puede evaporar junto con un resto de un tensioactivo escindible o un compuesto tampón volátil.

En cualquier caso, para obtener buenos resultados en los análisis aguas abajo mediante aplicaciones de espectrometría de masas, se deberían o, a veces, se deben preferentemente evitar aditivos como los mencionados anteriormente, en buena parte porque se sabe que la mayoría de los aditivos no son compatibles con la espectrometría de masas en general, al menos si están presentes por encima de ciertos umbrales que son generalmente conocidos en la técnica.

Resulta ventajosa la presencia de tensioactivos compatibles con la EM que sean compatibles con la EM en sí o que se puedan escindir para producir al menos un resto compatible con la EM y, opcionalmente, un radical no compatible con la EM que se pueda eliminar fácilmente, pues no se necesitan etapas de purificación que requieren tiempo y/o conducen a la pérdida de muestra. Por consiguiente, se lleva a cabo un procedimiento según realizaciones de la presente invención que comprende el uso de tensioactivos compatibles con la EM según lo descrito en la presente memoria sin una etapa de purificación para eliminar los tensioactivos seleccionado del grupo que consiste en diálisis, cromatografía, cromatografía en fase inversa, cromatografía de intercambio iónico, intercambio de tensioactivos, precipitación de proteínas, cromatografía de afinidad, electrotransferencia, extracción en fase líquida-líquida y extracción en fase sólida-líquida. En otras palabras, no es necesario someter una fracción obtenida a partir de una separación de FFE según realizaciones de la presente invención a dicha etapa de purificación antes de un análisis aguas abajo.

La combinación de los compuestos tampón volátil y los tensioactivos compatibles con la EM según lo descrito en la presente memoria ofrece la ventaja de preparar una muestra notablemente reducida de una fracción de una muestra separada por FFE según la presente invención.

Por consiguiente, una realización de la presente invención se refiere a un procedimiento para analizar analitos según lo descrito en la presente memoria, en el cual la etapa de FFE emplea un medio de separación que comprende un sistema tampón volátil que comprende además al menos un tensioactivo zwitteriónico o no iónico compatible con la

EM.

Los ejemplos específicos para los medios de separación adecuados se describen a continuación en el apartado de Ejemplos.

Los presentes inventores han encontrado que los medios de separación volátiles descritos en la presente memoria son particularmente adecuados y ventajosos para las aplicaciones libres de matriz tales como la FFE, ya que permiten una buena separación de los analitos y ofrecen la ventaja adicional de que los componentes tampón se pueden eliminar fácilmente y sin dejar residuos tras eluir las fracciones separadas que contienen el/los analito/s de interés desde el dispositivo de FFE. Los medios descritos en la presente memoria son particularmente ventajosos para las separaciones de FFE realizadas en condiciones nativas (es decir, que no afectan a la integridad estructural de los analitos).

Además, será evidente para los expertos en la materia que la mayoría de las aplicaciones de electroforesis emplearán ventajosamente un conjunto de medios de separación y medios de estabilización adaptados a la aplicación y al aparato específicos usados para la separación/el fraccionamiento en cuestión. Sin embargo, ciertas realizaciones de la presente invención pueden usar los medios de separación volátiles en conjunto con los medios estabilizadores de marca registrada disponibles en el mercado (por ejemplo, los disponibles en BD GmbH, Alemania).

Kits que comprenden medios electroforéticos

Será evidente para los expertos en la materia que los medios de separación volátiles descritos en la presente memoria se pueden seleccionar, preparar y usar solos o, alternativamente, junto con medios estabilizadores adecuados y otros medios de separación, respectivamente.

Por consiguiente, un kit para llevar a cabo una FFE puede comprender al menos uno de los medios de separación volátiles descritos en la presente memoria.

Los kits para llevar a cabo una etapa de separación de FFE pueden comprender al menos un medio de estabilización además de uno o más de un medio de separación volátil. Los medios de estabilización en el contexto de las aplicaciones de la FFE son capaces de estabilizar las condiciones electroquímicas (por ejemplo, el pH) del espacio de separación de un dispositivo de electroforesis, evitando de este modo efectos o artefactos no deseados que, de otro modo, se podrían observar durante el procedimiento de separación electroforética, en particular, en la FFE. Como tal, el uso de medios de estabilización aporta una mayor precisión, sensibilidad y reproducibilidad a la separación/el fraccionamiento electroforético de los analitos de una muestra.

El medio de estabilización puede ser un medio estabilizador catódico o un medio estabilizador anódico. Por lo general, se encuentran ubicados entre el ánodo/cátodo y el medio de separación, respectivamente. Los medios estabilizadores, en conjunto, se caracterizan por tener una conductividad eléctrica que es mayor que la conductividad del medio de separación. En virtud de su alta conductividad eléctrica, el medio de estabilización impide que los analitos puedan migrar todo el camino hasta el ánodo y el cátodo, respectivamente.

La conductividad se puede aumentar por 2, preferentemente, por 3 y, más preferentemente, por más de 3. Las diferencias en la conductividad entre los medios de separación y los medios de estabilización se logra mediante la adición de iones mucho más conductores a los medios de estabilización o mediante el aumento de la concentración de los compuestos tampón de los medios de estabilización. Normalmente, los valores típicos de conductividad observados en los medios de estabilización son de más de aproximadamente 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$, a menudo de más de aproximadamente 1.000 o incluso 2.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y, en algunos casos, puede incluso llegar a 10.000 o 20.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Aunque la conductividad eléctrica de los medios de estabilización es mayor que la conductividad de los medios de separación, el pH de los medios de estabilización puede ser mayor, casi igual o incluso menor que el pH del medio de separación adyacente en función de la separación en cuestión. Comúnmente, sin embargo, el pH del medio de estabilización anódico será menor que el del medio de separación, y el pH del medio de estabilización catódico será mayor que el del medio de separación.

Los compuestos tampón de los medios de estabilización pueden ser idénticos a los compuestos tampón de los medios de separación o pueden ser diferentes. Dado que la muestra que se vaya a recuperar de la etapa de separación de FFE, habitualmente, no entrará en el medio de estabilización debido a la barrera de conductividad formada por el mismo, no es absolutamente necesario emplear compuestos tampón volátiles para los medios de estabilización. Sin embargo, a menudo, es conveniente usar los mismos compuestos en el caso de someter fracciones del o de cerca del medio de la estabilización a un análisis aguas abajo, tal como a una espectrometría de masas. Sin embargo, en el caso de que los compuestos tampón empleados para los medios de estabilización sean diferentes a los empleados para el medio de separación (volátil), los ácidos tampón del medio estabilizador anódico

deberían ser más fuertes (es decir, tener un pKa inferior) al de los ácidos tampón del medio de separación. Del mismo modo, las bases tampón del medio de estabilización catódico también deberían ser más fuertes (es decir, tener un pKa más alto) que las bases tampón respectivas del medio de separación. Además, la concentración de estos ácidos/bases tampón debería ser suficientemente elevada para que se pudiera producir el aumento de conductividad deseado.

Ya que ambos medios de estabilización anódico y catódico serán muy útiles para realizar una correcta FFE, los kits usados en los procedimientos según la presente invención comprenderán un medio de estabilización catódico o un medio de estabilización anódico según lo definido en la presente memoria, además de los medios de separación volátiles descritos en la presente memoria. Los kits pueden comprender medios de estabilización catódicos y/o anódicos que sean útiles para aplicaciones de ZE o los kits pueden comprender medios de estabilización catódicos y/o anódicos útiles para aplicaciones de IEF.

Se entenderá que la combinación de los sistemas tampón volátiles y los tensioactivos zwitteriónicos o no iónicos compatibles con la EM ofrece la ventaja de preparar muestras notablemente reducidas y/o simplificadas antes de realizar un análisis posterior aguas abajo a una separación de electroforesis de flujo libre según la presente invención. Por lo tanto, una realización se refiere a un procedimiento en el que se emplea un kit, en el cual al menos un medio de separación comprende al menos un tensioactivo zwitteriónico o no iónico compatible con la EM según lo descrito en la presente memoria.

Otra realización se refiere a un procedimiento en el que se emplea un kit, en el cual al menos un medio de separación comprende al menos un tensioactivo zwitteriónico o no iónico compatible con la EM que es un tensioactivo escindible según lo descrito en la presente memoria.

El kit puede incluir todos los medios necesarios para una separación electroforética dada, es decir, un medio de estabilización catódico y anódico, así como un medio de separación (que puede consistir en sí en varias fracciones según lo explicado anteriormente). En dichas realizaciones, los medios de separación volátiles y los medios de estabilización, por supuesto, se seleccionarán de manera que sean útiles para el modo de funcionamiento deseado, ya sea ZE o IEF.

El kit puede comprender uno o varios de los medios de separación y los medios adicionales, tales como los medios de estabilización y los medios de flujo a contracorriente, como una o más soluciones acuosas que estén listas para ser usadas (es decir, todos los componentes están presentes a la concentración deseada para la separación electroforética en cuestión) o puede comprender uno o varios de los medios en forma de una solución concentrada que se vaya a diluir con una cantidad predeterminada de disolvente antes de su uso. Alternativamente, el kit puede comprender uno o varios medios en forma seca o en forma liofilizada que comprendan los diversos ingredientes de un medio en varios, pero preferentemente, en un recipiente, que luego se reconstituyan con una cantidad predeterminada de disolvente antes de su uso en un procedimiento de separación electroforética.

Preferentemente, cada medio (medio de separación, medio de estabilización catódico, medio de estabilización anódico) estará presente en un recipiente separado, aunque será evidente para los expertos en la materia que, en ciertas situaciones, pueden ser posibles y útiles otras combinaciones y envases. Por ejemplo, se ha mencionado anteriormente que los medios de separación para aplicaciones de IEF pueden consistir en un número distinto de "fracciones" que tengan diferentes concentraciones de los ingredientes (y, por lo tanto, un pH diferente) con el fin de crear un gradiente de pH preformado dentro del aparato de electroforesis.

El pH de cada medio de separación usado para formar el gradiente es diferente. El número de fracciones empleadas en aplicaciones de IEF dependerá de la separación en cuestión, del intervalo de pH deseado alcanzado con el medio de separación y del aparato de electroforesis usado para la separación. El pH de los medios de separación normalmente varía entre pH 2 y pH 13, aunque, en la mayoría de los casos, especialmente cuando se trabaja con muestras de origen biológico, lo más habitual es que el pH del medio de separación varíe entre pH 4 y pH 10. Los expertos en la materia entenderán que el gradiente de pH que se puede crear con los compuestos tampón volátiles, particularmente, cuando el medio de separación es un medio binario que sólo comprende un ácido tampón y una base tampón, habitualmente, es más limitado, por ejemplo, de pH 4 a pH 9 o incluso de pH 4 a pH 8 o de pH 5 a pH 9.

En aplicaciones de electroforesis de flujo libre, el aparato comúnmente comprenderá varias entradas de medios (por ejemplo, N = 7, 8 ó 9 entradas), por lo que las fracciones que crean el espacio de separación dentro del aparato se pueden introducir en al menos una hasta un máximo de N-2 entradas (habitualmente, se reserva al menos una entrada a cada lado para un medio de estabilización, si está presente). El número de medios de separación que se puede introducir en un aparato adecuado para la FFE es comúnmente de entre 2 y 15, preferentemente, de entre 3 y 12, y lo más preferentemente de entre 4 y 9. Con la introducción de fracciones de los medios de separación volátiles que tienen un pH creciente desde el ánodo hacia el cátodo, generalmente, es posible generar lo que se denomina "gradiente predeterminado" dentro del aparato de FFE.

Los medios de separación volátiles del kit pueden representar medios binarios que sólo comprendan un ácido tampón y una base tampón como se ha explicado anteriormente en la presente memoria. Se contempla que todos los medios de separación y los medios de estabilización descritos en la presente memoria pueden estar incluidos en los kits.

Opcionalmente, los kits empleados en los procedimientos de la presente invención pueden comprender además instrucciones para el uso de los medios en aplicaciones electroforéticas.

Será evidente para los expertos en la materia que los medios de separación volátiles, particularmente, en combinación con los medios de estabilización según lo descrito en la presente memoria, son capaces de proporcionar excelentes condiciones para una correcta separación de los analitos mediante electroforesis de flujo libre, y ofrecen la ventaja adicional de que las muestras recuperadas se pueden emplear directamente, sin una etapa de limpieza, en aplicaciones aguas abajo, ya que los componentes tampón empleados para la etapa de separación de FFE se pueden eliminar convenientemente mediante una simple evaporación.

Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a procedimientos en los cuales están presentes tensioactivos zwiteriónicos o no iónicos escindibles en un medio de muestra y/o un medio de separación. Se apreciará que la evaporación de los compuestos tampón volátiles y la eliminación de los restos obtenidos mediante una escisión de un tensioactivo escindible compatible con la EM mediante una simple filtración, centrifugación o evaporación no han de entenderse como dichas etapas de limpieza o de purificación perjudiciales y que requieren tiempo que se pueden evitar según lo descrito anteriormente en la presente memoria.

Procedimientos de FFE que comprenden medios de separación volátiles

El procedimiento para la separación de analitos mediante FFE que comprende un medio de separación volátil o un kit según lo descrito en la presente memoria comprende, comúnmente, las etapas de:

- a) introducir los analitos en un aparato adecuado para la FFE que comprende los medios de separación volátiles;
- b) separar los analitos mediante FFE;
- c) eluir la muestra del aparato de FFE y, opcionalmente, recoger al menos una parte de la muestra en una pluralidad de fracciones.

La separación de FFE descrita anteriormente se lleva a cabo para producir una muestra adecuada para un posterior procedimiento analítico aguas abajo mediante espectrometría de masas.

Según lo indicado anteriormente en la presente memoria, la separación de FFE puede llevarse a cabo con cualquiera de los medios de separación volátiles, preferentemente, en combinación con los medios estabilizadores descritos en la presente memoria. Así, los procedimientos de separación de FFE de realizaciones de la presente invención se pueden llevar a cabo de una manera conveniente empleando los kits que comprenden los medios de separación y, opcionalmente, los medios de estabilización tratados en la presente memoria.

Como se trata en la presente memoria, el procedimiento de separación de FFE es principalmente capaz de separar cualquier analito, incluyendo moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas, biopartículas, biopolímeros o biomoléculas que tenga una solubilidad lo suficientemente elevada en los medios de separación volátiles acuosos. Los ejemplos de analitos de origen biológico que se pueden separar mediante el procedimiento de separación de FFE de las realizaciones de la presente invención incluyen proteínas, agregados de proteínas, péptidos, hormonas, complejos de ADN-proteína tales como la cromatina, ADN, anticuerpos, células, orgánulos celulares, virus o partículas de virus, membranas, fragmentos de membrana, lípidos, sacáridos, polisacáridos, liposomas, nanopartículas o mezclas de cualquiera de los anteriores.

En particular, cuando la muestra que se va a separar es de origen biológico, por ejemplo, está compuesta principalmente de material proteico, el procedimiento de separación de FFE se puede realizar en condiciones nativas que no perturben la integridad estructural de los analitos. Además, es ampliamente conocido por los expertos en la materia que la mayoría de los agentes usados para la desnaturalización de una muestra durante la electroforesis son incompatibles con una EM realizada aguas abajo y se deben eliminar antes del análisis, menoscabando así las ventajas ofrecidas por los medios de separación volátiles de las realizaciones de la presente invención. No obstante, en ciertas realizaciones, por ejemplo, si el analito de interés es una proteína lipófila, el procedimiento puede llevarse a cabo en presencia de al menos un tensioactivo zwiteriónico o no iónico compatible con la EM como se describe en la presente memoria, que ofrezca la ventaja de que no sea necesario eliminar el tensioactivo en absoluto antes de realizar un análisis de EM posterior. En caso de que el tensioactivo compatible con la EM sea un tensioactivo escindible, los restos no compatibles con la EM de un tensioactivo escindido se pueden eliminar fácilmente mediante una simple etapa de centrifugación, filtración o evaporación.

En conjunto, la invención se refiere a un procedimiento para analizar analitos que comprende una separación de FFE y un análisis posterior realizado aguas abajo de al menos un analito de interés mediante espectrometría de masas (EM). Dicho análisis realizado aguas abajo de al menos una fracción obtenida a partir de dicha separación de FFE se selecciona del grupo que consiste en MALDI-EM, ESI-EM, SELDI-EM, CL-EM(/EM) y MALDI-TOF-EM(/EM).

En la práctica, un procedimiento para analizar analitos que comprende una separación de FFE en la que se emplean los medios de separación volátiles según lo descrito en la presente memoria que se lleva a cabo antes de un análisis aguas abajo (es decir, un análisis de espectrometría de masas) comúnmente comprende las siguientes etapas:

- a) separar los analitos de una muestra introducida en un aparato adecuado para la electroforesis de flujo libre;
- b) eluir el/los analito/s obtenido/s a partir de la etapa de separación de FFE en una multiplicidad de fracciones;
- c) recoger al menos una fracción que contiene el/los analito/s que se vaya/n a analizar; y
- d) someter al menos una de las fracciones a un análisis de espectrometría de masas en ausencia de una etapa de limpieza o purificación.

En virtud de la volatilidad de los compuestos tampón usados para la separación de FFE, no se necesitan etapas adicionales de limpieza o de purificación para eliminar los compuestos tampón volátiles antes de llevar a cabo un análisis de EM. Por lo tanto, la ausencia de una etapa de limpieza o de purificación como la usada en este contexto significa que un compuesto tampón volátil se elimina simplemente mediante evaporación. En otras palabras, este procedimiento evita las etapas que requieren tiempo y que son potencialmente perjudiciales, que conducen a una pérdida del precitado analito tales como, por ejemplo, filtración de corte según el peso molecular, diálisis, cromatografía en fase inversa o cromatografía de afinidad, precipitación del analito (por ejemplo, precipitación de proteínas), extracción en líquido o el uso de reactivos de par iónico.

Sin embargo, en ciertas realizaciones, podría/n estar presente/s tensioactivo/s para, por ejemplo, mejorar la solubilidad de los analitos de interés. En dichas realizaciones, es deseable que al menos un tensioactivo sea un tensioactivo zwiteriónico o no iónico compatible con la EM según lo descrito en la presente memoria. Preferentemente, todos los tensioactivos comprendidos en al menos un medio de separación y/o al menos un medio de muestra son tensioactivos zwiteriónicos o no iónicos compatibles con la EM.

En particular, un tensioactivo zwiteriónico o no iónico compatible con la EM usado en un procedimiento según realizaciones de la presente invención puede ser un tensioactivo escindible.

Se entenderá que, en presencia de al menos un tensioactivo escindible compatible con la EM según lo descrito en la presente memoria, puede ser necesario escindir dicho tensioactivo escindible y posteriormente eliminar un resto escindido mediante una simple centrifugación, filtración o evaporación. Dichas etapas de centrifugación, filtración o evaporación anteriormente mencionadas no han de entenderse como etapas de limpieza o de purificación que requieren tiempo y son perjudiciales destinadas a eliminar tensioactivos o restos de tensioactivos según lo definido a continuación en la presente memoria.

En algunas realizaciones, se prefiere que un procedimiento comprenda el uso de al menos un medio de flujo a contracorriente que comprenda un agente de escisión. Cuando dicho medio de flujo a contracorriente entra en contacto y/o se mezcla con una fracción de una separación de FFE, por ejemplo, dentro de la cámara de separación o durante la elución de dicha fracción de la cámara de separación, dicho medio de flujo a contracorriente, por ejemplo, permite la escisión de un tensioactivo escindible directamente después de dicha separación de FFE.

En algunas otras realizaciones, un procedimiento según la presente invención puede comprender el uso de un medio de flujo a contracorriente que adapte las condiciones del medio de al menos una fracción de una separación de FFE a las condiciones que establecen un detergente escindible que pueda estar comprendido en dicha fracción, es decir, se usa un medio de flujo a contracorriente para estabilizar un tensioactivo escindible comprendido en al menos una fracción después de la separación electroforética de flujo libre. Como ejemplo no restrictivo, dicha estabilización se puede lograr mediante la adaptación del pH de una solución, es decir, el pH de una fracción obtenida mediante FFE puede conducir a la descomposición de un detergente escindible, mientras que la solución combinada con el medio de flujo a contracorriente se lleva a un pH en el cual el tensioactivo escindible sea prácticamente estable, es decir, se usa un medio de flujo a contracorriente para estabilizar un tensioactivo escindible comprendido en al menos una fracción tras una separación electroforética de flujo libre.

En realizaciones en las cuales el tensioactivo zwiteriónico o no iónico compatible con la EM es un tensioactivo escindible, una escisión de dicho tensioactivo escindible genera al menos dos restos que bien son compatibles con la EM y/o se pueden eliminar fácilmente de una solución que comprende un analito de interés mediante filtración, centrifugación y/o evaporación. En otras palabras, un procedimiento según realizaciones de la presente invención no requiere una etapa de purificación para eliminar los tensioactivos o restos de tensioactivos escindibles escindidos, tales como diálisis, cromatografía, cromatografía de fase inversa, cromatografía de intercambio iónico, intercambio

de tensioactivos, precipitación de proteínas, cromatografía de afinidad, electrotransferencia, extracción en fase líquida-líquida y/o extracción en fase sólida-líquida.

Independientemente de lo anterior, se contempla específicamente en la presente memoria que los procedimientos de análisis aguas abajo según la invención, es decir, el análisis de espectrometría de masas, pueden, no obstante, incluir otras etapas adicionales, por ejemplo, para efectuar una fragmentación de los analitos recuperados de una separación de FFE, pero antes de la etapa de análisis posterior. La fragmentación se realiza comúnmente para reducir el peso molecular de un analito con el fin de generar fragmentos volátiles de dicho analito o para generar un patrón de fragmentación del analito que se vaya a identificar o analizar mediante EM. La etapa de fragmentación se puede seleccionar, pero sin limitación, del grupo que consiste en fragmentación física (bombardeo con un haz de electrones de alta energía), fragmentación química (por ejemplo, ácidos débiles para péptidos) o digestión (por ejemplo, mediante enzimas) de los analitos.

En ciertas realizaciones, un procedimiento puede comprender además una etapa de adición a al menos una fracción obtenida a partir de la separación de FFE de un agente para reducir el peso molecular de los analitos que se van a analizar mediante un análisis aguas abajo tal como una EM. Particularmente, cuando el/los analito/s es/son principalmente proteína/s o péptido/s, el agente para reducir el peso molecular del analito podría ser una proteasa o una mezcla de proteasas. En otras realizaciones en las cuales se separan uno o varios nucleótidos, el agente puede ser una nucleasa o una mezcla de nucleasas.

Así, al menos una parte de los compuestos tampón volátiles y el disolvente (es decir, agua) se separan preferentemente de la porción de muestra recogida que se va a analizar mediante un análisis de EM aguas abajo mediante una simple evaporación antes de dicho análisis realizado más adelante. La eliminación de al menos una parte de los compuestos tampón volátiles y el disolvente se lleva a cabo después de la separación de los analitos mediante FFE, pero antes de su análisis posterior. Como ejemplo no restrictivo, se elimina una parte suficiente de los compuestos tampón volátiles y el disolvente para permitir una interpretación válida de los espectros de EM resultantes en un análisis de EM posterior. La parte de los compuestos tampón volátiles y el disolvente eliminada puede ser de al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o de todo un 100% (en masa) de los compuestos tampón volátiles totales y del disolvente. Ventajosamente, se eliminan sustancialmente todos los compuestos tampón volátiles y el disolvente tras la separación de los analitos mediante FFE, pero antes de su análisis de EM realizado aguas abajo. Se conocen muchos procedimientos convenientes para eliminar el disolvente y los compuestos tampón volátiles por parte de los expertos en la materia, y también se han descrito en la presente memoria. Por ejemplo, la eliminación se puede realizar, entre otros procedimientos, mediante centrifugación al vacío o mediante liofilización. También se puede calentar la muestra para facilitar la evaporación del disolvente y los tampones volátiles.

Tras una separación de FFE, se puede llevar a cabo la etapa de análisis de espectrometría de masas para identificar compuestos desconocidos por la masa de la molécula del compuesto o de sus fragmentos, para determinar la composición isotópica de los elementos de un compuesto, para determinar la estructura de un compuesto mediante la observación de su patrón de fragmentación, para cuantificar la cantidad de un compuesto de una muestra, para estudiar los fundamentos de la química de iones en fase gaseosa (la química de iones y partículas neutras al vacío) o para determinar otras propiedades físicas, químicas o incluso biológicas de los compuestos en combinación con una variedad de otros enfoques.

Existen muchos procedimientos de espectrometría de masas diferentes en la técnica. El procedimiento de espectrometría de masas usado en los procedimientos de la presente invención se selecciona entre ionización de electrospray (ESI), desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI) o desorción/ionización por láser en superficie (SELDI). Se prefieren particularmente las técnicas de análisis de espectrometría de masas tanto ESI como MALDI para aplicaciones proteómicas.

En otras realizaciones, los compuestos tampón volátiles se eliminan por evaporación, no antes, sino durante una etapa posterior de análisis de espectrometría de masas. De nuevo, no se requiere ninguna etapa adicional para intercambiar o eliminar los compuestos tampón volátiles cuando se usan los medios de separación volátiles descritos en la presente memoria. Muchos procedimientos de EM funcionan en condiciones de presión reducida que pueden ser suficientes para lograr la evaporación completa y libre de residuos del disolvente y los compuestos tampón, dejando la muestra pura y, opcionalmente (por ejemplo en el caso de MALDI), un compuesto que sirva como matriz. Se entenderá que el término matriz en el contexto de la espectroscopia de masas (EM), como se usa en la presente memoria, es diferente al término "matriz" usado en el contexto de la electroforesis (por ejemplo, poliacrilamida o agarosa). Por lo tanto, en algunas realizaciones en las cuales el análisis de aguas abajo es, por ejemplo, una aplicación de MALDI, se añade un componente matricial para el análisis MALDI a la solución tampón de analitos antes del análisis espectrométrico de masas.

En otras realizaciones, el medio de separación empleado en la etapa de separación de FFE ya comprende al menos un compuesto tampón que puede actuar como matriz para el análisis de MALDI y en el cual los compuestos tampón

adicionales son volátiles según lo definido en la presente memoria.

En una cierta realización del presente aspecto de la presente invención en la cual el medio de separación de FFE comprende compuestos tampón volátiles y el análisis de EM de aguas abajo es MALDI, un procedimiento para el análisis espectrométrico de masas de los analitos que comprende una etapa de separación de FFE antes del análisis espectrométrico de masas por MALDI comprende las etapas de:

- a) introducir los analitos en un aparato adecuado para la FFE que comprende los medios de separación volátiles;
- b) separar los analitos mediante FFE;
- c) añadir un componente matricial para analizar mediante MALDI la solución tampón de analitos recogida;
- d) eliminar al menos una parte del disolvente y de los compuestos tampón volátiles; y
- e) someter la mezcla de la matriz y los analitos seca a un análisis de MALDI sin etapas adicionales de purificación.

Una realización alternativa del presente aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para el análisis espectrométrico de masas de analitos que comprende una etapa de separación de FFE anterior a dicho análisis espectrométrico de masas, en la cual el medio de separación de FFE comprende al menos un compuesto tampón que puede actuar como matriz para el análisis de MALDI y en la cual los otros compuestos tampón son volátiles. Dicho procedimiento alternativo comprende las etapas de:

- a) introducir analitos en un aparato adecuado para la FFE que comprende los medios de separación;
- b) separar los analitos mediante FFE;
- c) eliminar al menos una parte del disolvente; y
- d) someter la mezcla de matriz y analitos seca a un análisis de MALDI sin someter la muestra a ninguna otra etapa de limpieza o purificación.

Para que sea adecuado como una matriz de MALDI, el compuesto debe cumplir simultáneamente una serie de requisitos. Debe ser capaz de integrar y aislar analitos (por ejemplo, mediante cocrystalización), ser soluble en disolventes compatibles con el analito, ser estable al vacío, absorber la longitud de onda del láser, provocar la codesorción del analito tras una radiación por láser y potenciar la ionización de los analitos. Se sabe que los compuestos con protones lábiles, tales como ácidos carboxílicos, son compuestos buenos como matriz para la MALDI en el modo de iones positivos, porque pueden protonar fácilmente moléculas neutras de analito en la columna de humo. Sin embargo, no siempre se desea un ambiente ácido, en particular, si se debe evitar la desnaturalización de la estructura terciaria de las biomoléculas. Por lo tanto, principalmente, se usan matrices no ácidas para la medición de proteínas.

Los compuestos de matriz adecuados para la MALDI incluyen, pero sin limitación, ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico, sal dietilamina de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico, sal butilamina de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico, ácido sinápico, ácido 4-(2-hidroxifenilazo)benzoico (HABA), 2-mercapto-benzotiazol, ácido succínico, 2,6-dihidroxiacetofenona, ácido ferúlico, ácido cafeico, 4-nitroanilina, 2,4,6-trihidroxiacetofenona, ácido 3-hidroxipicolínico, ácido antranílico, ácido nicotínico, salicilamida, ácido *trans*-3-indolacrílico, ditranol, ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), isovanilina y 3-aminoquinolina (dependiendo del analito y del tipo de láser empleado para el análisis de MALDI).

Aunque los procedimientos proporcionados en la presente memoria no se limitan a analitos específicos, se apreciará que son especialmente adecuados para la separación de moléculas inorgánicas, orgánicas o de muestras biológicas que comprendan biopartículas, biopolímeros y biomoléculas en vista de la composición bien definida de los medios y de su fácil reproducibilidad.

En todas las realizaciones, el procedimiento de separación de FFE se puede realizar bien en modo continuo, en el modo de intervalos (también denominado de lotes) o en el modo cíclico de intervalos.

Las realizaciones de la presente invención incluyen procedimientos de separación de FFE ejecutados en el modo de electroforesis en zona (FF-ZE). Otros procedimientos de separación de FFE se ejecutan en el modo de isoelectroenfoque (FF-IEF). Otros procedimientos de separación de FFE más se ejecutan en el modo de isotacoforesis (FF-ITP).

En ciertas realizaciones, la separación de FFE se lleva a cabo como una FFE-IEF ejecutada en el modo continuo. Este último es particularmente útil para una inyección continua de muestras en la cámara de separación de un aparato de FFE. En otras realizaciones alternativas, la etapa de separación de FFE se lleva a cabo como una FFE-IEF ejecutada en el modo de intervalos o en el modo cíclico de intervalos, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

Como será evidente, los sistemas tampón volátiles son adecuados para realizar una separación de FFE. Sin embargo, puede ser ventajoso combinar el uso de los sistemas tampón volátiles proporcionados en la presente memoria con otros sistemas tampón no volátiles tales como un sistema tampón formado por anfolitos comerciales, un sistema binario de ácido tampón/base tampón (medio A/B) como se describe en el documento WO 2008/087218 publicado posteriormente, o sistemas tampón de múltiples pares complementarios (*Complementary Multi Pair Buffer Systems*, CMPBS). Un CMPBS es una mezcla tampón compuesta de ácidos y bases cuidadosamente asociados de manera que la mezcla puede proporcionar un gradiente de pH suave cuando la corriente fluye a través del sistema tampón. Se selecciona una mezcla de ácidos y bases orgánicos de bajo peso molecular que permita un aumento de la capacidad de tamponamiento en comparación con anfolitos de alto peso molecular comercialmente disponibles. Estas mezclas de ácidos y bases cuidadosamente asociados están sumamente bien caracterizados en términos de peso molecular, pl, pureza y toxicidad. Generalmente, los ácidos y las bases tienen un peso molecular más bajo que el de los anfolitos comerciales. En la técnica, se conocen sistemas tampón de múltiples pares complementarios adecuados. Específicamente, BD GmbH Germany comercializa una mezcla con un intervalo de pH 3 a 5 como medio de separación de FFE BD 1, mientras que comercializa otra mezcla con un intervalo de pH 5 a 8 como medio de separación de FFE BD 2. Estos sistemas tampón se han descrito, por ejemplo, de forma general en la solicitud de patente US 2004/0101973 y en EP 1 320 747.

El experto entenderá que el uso de dichos medios de sistemas tampón no volátiles está limitado a las partes de la zona de separación que no contienen el/los analito/s de interés después de la separación, es decir, el/los analito/s de interés eluido/s de la zona de separación en el medio tampón volátil.

Esto significa que, en este último caso, una zona de separación comprende al menos dos tipos de medios tampón diferentes. En particular, la expresión "tipo de tampón", como se usa en la presente memoria, se refiere a un tipo de medio tampón de separación que comprende un sistema tampón volátil y a un tipo de medio tampón de separación que comprende un sistema tampón no volátil, respectivamente. Así, un medio tampón de separación (MTS) de tipo A como se usa en la presente memoria se refiere a un MTS que comprende un sistema tampón volátil, y un MTS de tipo B como se usa en la presente memoria se refiere a un MTS que comprende un sistema tampón no volátil. Un MTS de tipo A o varios MTS adyacentes de tipo A pueden formar una zona A, y un MTS de tipo B o varios MTS de tipo B adyacentes pueden formar una zona B dentro de una zona de separación.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un procedimiento que comprende una etapa de separación de FFE que comprende:

formar entre los electrodos de un aparato adecuado para la electroforesis de flujo libre una zona de separación que comprende una zona A formada por al menos un medio tampón de separación (MTS) de tipo A, en el cual el sistema tampón es un sistema tampón volátil, y una zona B formada al menos por un medio tampón de separación de tipo B, en el cual el sistema tampón es un sistema tampón no volátil, entre un ánodo y un cátodo; en el cual dicha zona A está ubicada en la zona de separación, de manera que se puede eluir al menos un analito de interés de la zona de separación en dicha zona de A, es decir, el al menos un analito de interés está presente en un MTS de tipo A tras la separación; separar los analitos de una muestra introducida en dicho aparato adecuado para la electroforesis de flujo libre; y eluir al menos un analito de interés de la zona de separación en un MTS de tipo A.

En una realización, la muestra se introduce en una zona A y al menos un analito de interés permanece en dicha zona de A, es decir, se eluye en una o varias fracciones de MTS de tipo A. Un ejemplo no restrictivo es una separación de ITP de flujo libre, en la cual la muestra se introduce en la región espaciadora que es una zona A que está rodeada por dos zonas B (véanse las Fig. 17 y 18).

En otra realización, la muestra se introduce en una zona B y al menos un analito de interés se transfiere a una zona A durante la separación de FFE, es decir, al menos un analito de interés, preferentemente, todos los analitos de interés, se eluye de la zona de separación en fracciones formadas por un MTS de tipo A. Un ejemplo no restrictivo es un isoelectroenfoco cíclico de intervalos como el representado en la Fig 16. La muestra se introduce en un MTS de tipo B que forma junto con más MTS DE tipo B una zona B, y el analito de interés se transfiere durante la separación a una zona A y se eluye de la cámara de separación en un MTS de tipo A.

Un MTS de tipo A puede comprender además un tensioactivo zwitteriónico o no iónico compatible con la EM.

Un MTS de tipo B puede comprender un sistema tampón seleccionado entre anfolitos comerciales, un sistema tampón binario de ácido tampón/base tampón (medio A/B) o un sistema tampón de múltiples pares complementarios (CMPBS).

Las realizaciones de la presente invención y sus ventajas se ilustran más detalladamente en los siguientes ejemplos no restrictivos.

Ejemplos**EJEMPLO 1: Separación de proteínas de plasma humano en condiciones nativas**

- 5 El medio de separación y los medios de estabilización se probaron en un sistema de electroforesis de flujo libre BD™ en el modo de FF-IEF usando una solución de control de calidad. El aparato se configuró para que comprendiera nueve entradas de medios (E1-E9) y cuatro entradas de muestra (S1-S4). Por la entrada E1, se introdujo medio de estabilización anódico. El medio de estabilización catódico se introdujo por la entrada E9 y la muestra se introdujo por la entrada de muestra S2. El tiempo total de duración de la electroforesis fue de aproximadamente 10 minutos. El voltaje aplicado fue de 500 V y la corriente fue de 30 mA. La muestra y los medios se introdujeron a un caudal de 1,5 ml/h y 120 ml/h, respectivamente.

Medio de estabilización anódico: HAc 450mM, TRIS 225mM (pH = 4,5; conductividad: 9.080 (μS/cm) (E1).

- 15 Medio de estabilización catódico: HAc 225mM, TRIS 1148mM (pH = 8,40; conductividad: 7.730 (μS/cm) (E9).

Medio de separación:

Entrada de medio	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Medio	HAc 150mM	TRIS 15mM	TRIS 15mM	TRIS 15mM	HAc 15mM	HAc 15mM	HAc 100mM
	TRIS 25mM	HAc* mM	HAc* mM	HAc 15mM	TRIS* mM	TRIS* mM	TRIS* mM
	Betaina 100mM						EACA 100mM
pH	4,03	4,70	5,42	6,37	7,80	8,32	9,04
Conductividad ((μS/cm)	1.494	912	891	881	894	896	777

- 20 **: las soluciones se valoraron con respecto al pH de la tabla bien con HAc o con TRIS usando un electrodo de pH para medir el pH.

- El pH de cada una de las fracciones de la FFE se determinó usando un electrodo de pH, y se muestra en el gráfico de la Fig. 1. Se separaron los marcadores del pl coloreados para evaluar el rendimiento de la separación del sistema. La absorbancia de la fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm, que representa la absorbancia de los respectivos marcadores del pl, también se muestra en la Fig. 1.

En la Fig. 2, se muestran los geles de SDS teñidos de plata de varias fracciones que muestran la separación de las proteínas plasmáticas humanas.

EJEMPLO 2: Disminución nativa de la albúmina de suero humano del plasma humano

- El medio de separación y los medios de estabilización se probaron en un sistema de electroforesis de flujo libre BD™ en el modo de FF-IEF, usando una solución de control de calidad. El aparato se configuró para que comprendiera nueve entradas de medios (E1-E9) y cuatro entradas de muestra (S1-S4). Por la entrada E1, se introdujo medio de estabilización anódico. El medio de estabilización catódico se introdujo por la entrada E9 y la muestra se introdujo por la entrada de muestra S2. El tiempo total de duración de la electroforesis fue de aproximadamente 10 minutos. El voltaje aplicado fue de 500 V y la corriente fue de 31 mA. La muestra y los medios se introdujeron a un caudal de 1,5 ml/h y 120 ml/h, respectivamente.

Medio de estabilización anódico: HAc 450mM, TRIS 225mM (pH = 4,5; conductividad: 9.080 (μS/cm) (E1).

Medio de estabilización catódico: HAc 225mM, TRIS 1.148mM (pH = 8,40; conductividad: 7.730 (μS/cm) (E9).

Medio de separación:

Entrada de medio	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Medio	HAc 150mM	TRIS 15mM	TRIS 15mM	TRIS 15mM	HAc 15mM	TRIS 15mM	HAc 100mM

	TRIS 25mM	HAc* x mM	HAc* x mM	HAc 15mM	HAc* x mM	HAc* x mM	TRIS* x mM
	Betaina 100mM						EACA 100mM
pH	4,03	4,43	4,71	4,84	5,03	6,06	7,47
Conductividad (μ S/cm)	1.494	904	901	895	899	881	3.770

*: las soluciones se valoraron con respecto al pH de la tabla bien con HAc o con TRIS usando un electrodo de pH para medir el pH.

5 El pH de cada una de las fracciones de la FFE se determinó usando un electrodo de pH, y se muestra en el gráfico de la Fig. 3. Se separaron los marcadores del pl coloreados para evaluar el rendimiento de la separación del sistema. La absorbancia de la fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm, que representa la absorbancia de los respectivos marcadores del pl, se indica en la Fig. 5.

10 En la Fig. 4, se muestran los geles de SDS teñidos de plata de varias fracciones que muestran la separación de las proteínas plasmáticas humanas.

EJEMPLO 3: Separación de FFE en el modo cíclico de intervalos

15 El medio de separación y los medios de estabilización se probaron en un sistema de electroforesis de flujo libre BD™ en el modo de FF-IEF, usando una solución de control de calidad. El aparato se configuró para que comprendiera nueve entradas de medios (E1-E9) y cuatro entradas de muestra (S1-S4). Por la entrada E1, se introdujo medio de estabilización anódico. El medio de estabilización catódico se introdujo por la entrada E9 y la muestra se introdujo por la entrada de muestra S2. El tiempo total de la electroforesis fue de aproximadamente 40 minutos. El voltaje aplicado fue de 500 V y la corriente fue de 30 mA. La muestra y los medios se introdujeron a un caudal de 1,5 ml/h y 150 ml/h, respectivamente. El experimento se realizó en el modo de FF-IEF cíclico de intervalos a 50 ml/h y la muestra fraccionada se eluyó a 150 ml/h.

Medio de estabilización anódico: HAc 450mM, TRIS 225mM (pH = 4,54; conductividad: 9.120 (μ S/cm) (E1).

25 Medio de estabilización catódico: HAc 225mM, TRIS 1.148mM (pH = 8,40; conductividad: 8.040 μ S/cm) (E9).

Medio de separación:

Entrada de medio	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Medio	HAc 150mM	TRIS 15mM	TRIS 15mM	TRIS 15mM	HAc 15mM	TRIS 15mM	HAc 100mM
	TRIS 25mM	HAc* x mM	HAc* x mM	HAc* 15mM	TRIS* x mM	TRIS* x mM	TRIS* x mM
	Betaina 100mM						EACA 100mM
pH	3,97	4,73	5,60	6,38	7,66	8,34	9,05
Conductividad (μ S/cm)	1.432	915	900	885	892	886	791

30 *: las soluciones se valoraron con respecto al pH de la tabla bien con HAc o con TRIS usando un electrodo de pH para medir el pH.

35 El pH de cada una de las fracciones de la FFE se determinó usando un electrodo de pH y se muestra en el gráfico de la Fig. 5. Se separaron los marcadores del pl coloreados para evaluar el rendimiento de la separación del sistema. La absorbancia de la fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm, que representa la absorbancia de los respectivos marcadores del pl se indica en la Fig. 5.

EJEMPLO 4: Separación de proteínas de células HeLa digeridas seguida por un análisis CL-EM/EM

Las células HeLa se digirieron según el siguiente protocolo de digestión enzimática:

1. Añadir solución de TCEP 200mM a una concentración final de 5mM. Incubar durante 60 min a temperatura ambiente. Añadir yodoacetamida 200mM a una concentración de 15mM e incubar durante 60 min en la oscuridad.
2. Ajustar el pH a 7,8 con bicarbonato de amonio 100mM.
3. Añadir tripsina hasta una proporción de enzima y proteína de 1:37,5 e incubar durante un mínimo de 4 horas a 37°C.
4. Acidificar la solución con un ácido trifluoroacético al 0,1% (TFA) para terminar el procedimiento de digestión.
5. Purificar los péptidos generados usando un cartucho de fase inversa C18 SepPak™: equilibrar el cartucho dos veces con 1 ml de acetonitrilo y otras dos veces con 1 ml de TFA al 0,1%. Cargar la muestra. Lavar dos veces con 1 ml de TFA 0,1%. Eluir los péptidos a un tubo de microcentrifugación usando 400 µl de acetonitrilo al 70%.
6. Evaporar la muestra hasta la sequedad mediante centrifugación al vacío y reconstituirla en medio de separación de FFE.

El medio de separación y los medios de estabilización se probaron en un sistema de electroforesis de flujo libre BD™ en el modo de FF-IEF, usando una solución de control de calidad. El aparato se configuró para que comprendiera nueve entradas de medios (E1-E9) y cuatro entradas de muestra (S1-S4). Por la entrada E1, se introdujo medio de estabilización anódico. El medio de estabilización catódico se introdujo por la entrada E9 y la muestra se introdujo por la entrada de muestra S2. El tiempo total de duración de la electroforesis fue de aproximadamente 10 minutos. El voltaje aplicado fue de 550 V y la corriente fue de 112 mA. La muestra y los medios se introdujeron a un caudal de 2,5 ml/h y 150 ml/h, respectivamente.

Medio de estabilización anódico: HAc 1.567mM, TRIS 450mM (pH = 4,09; conductividad: 6.550 µS/cm) (E1).

Medio de estabilización catódico: HAc 450mM, TRIS 900mM (pH = 8,35; conductividad: 8.360 µS/cm) (E9).

Medio de separación: HAc 150mM, TRIS 25mM, betaína 100mM (pH = 3,98; conductividad: 1.563 µS/cm) (E2); TRIS 10mM + 300 µl de HAc en 300 ml (pH = 4,85; conductividad = 622 µS/cm) (E3-E5); HAc 10mM + 260 mg de TRIS en 200 ml (pH = 6,4, conductividad = 667 µS/cm) (E6-E7); HAc 150mM, TRIS 150mM + 560 mg de TRIS en 100 ml (pH = 7,82; conductividad: 6.730 µS/cm) (E8).

El pH de cada una de las fracciones de la FFE se determinó usando un electrodo de pH y se muestra en el gráfico de la Fig. 6. Se separaron los marcadores del pi coloreados para evaluar el rendimiento de la separación del sistema. La absorbancia de la fracción λ = 420 nm, 515 nm y 595 nm, que representa la absorbancia de los respectivos marcadores del Pi, se indica en la Fig. 6.

Se recogió la fracción 42 y, posteriormente, se sometió a un análisis de CL-EM/EM sin otra etapa de limpieza. Se evaporaron 100 µl de la fracción recogida de la FFE hasta la sequedad usando un SpeedVac y se disolvieron en 25 µl de TFA al 0,1%. Se usó un volumen de 5 µl para el experimento de CL-EM/EM. Los análisis de CL-EM/EM basados en ESI (HCTultra, Bruker, Bremen, Alemania) se llevaron a cabo con el uso de NanoPump serie 1100 de Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) en una columna de fase inversa microcapilar de sílice fusionada de 75 µm x 15 cm (Agilent). El volumen de la muestra se cargó en la pre-columna (columna de fase inversa de 300 µm x 0,5 cm (C18) de Agilent) a un caudal de 10 µl/min durante 5 min usando una CapPump de microflujo (Agilent). Tras cargar la muestra, ésta se separó y se analizó a un caudal de 200 nl/min con un gradiente de B al 2% a B al 40% durante 30 minutos. La columna se acopló directamente en la aguja de pulverización de New Objective (Woburn, MA, EE.UU.). La fase móvil A era ácido fórmico al 0,1% y la fase móvil B era acetonitrilo al 100%. Los péptidos que eluyeron de la columna capilar se seleccionaron para la CID mediante el espectrómetro de masas usando un protocolo que se alternó entre un barrido de EM (300-1500 m/z) y tres barridos de EM/EM. Se seleccionaron los tres iones precursores más abundantes en cada barrido del estudio para la CID, si la intensidad del pico del ión precursor superaba los 10.000 recuentos de iones. El voltaje de electronebulización se fijó en 1,8 kV y se excluyó el valor m/z específico del péptido fragmentado mediante CID de la repetición del análisis durante 2 min. En la Fig. 7, se muestra un cromatograma de picos de base obtenido a partir del experimento de CL-EM/EM. Se buscó cada espectro de EM/EM en la base de datos IPI humana, versión n.º 3.18. En la Tabla 1, se muestra la lista de las proteínas identificadas de la fracción 42 de la FFE.

TABLA 1

Proteína identificada mediante análisis de CL-EM/EM de la fracción 42 de la FFE
Isoforma 1 de la proteína de 71 kDa afín de choque térmico
Proteína de 70 kDa de choque térmico 1A
Proteína hipotética
Proteína de estrés 70, precursor mitocondrial

Filamina A, alfa
Actina, citoplásmica 1
Cofilina-1
Isoforma 1 de carbamoil-fosfato sintasa
Factor de iniciación de la traducción eucariota 4B
Glucosa-6-fosfato isomerasa
Enzima activadora de la ubiquitina E1
Isoforma M1 de las isozimas de piruvato quinasa M1/M2
Factor de alargamiento 1-delta
Fructosa-bifosfato aldolasa A
Proteína de tipo tioredoxina 5
Lactato deshidrogenasa A
Fascina
Cadena beta-2 de la tubulina
Proteína 1 del canal intracelular de cloruro
Proteína multifuncional ADE2
OTTHUMP00000021786
Transketolasa
Proteína zeta/delta 14-3-3
Alfa-actinina-1
Precursor S27a de la proteína ribosomal y ubiquitina
Subunidad alfa del componente de la piruvato deshidrogenasa E1
Isoforma b de la proteína de unión a poli(rC) 2
Factor de alargamiento gamma 1
PREDICHA: similar a la peptidilprolil isomerasa A
Transportina 1
Nucleósido difosfato quinasa A
6-Fosfogluconato deshidrogenasa, descarboxilatina
Proteína de 70 kDa de choque térmico 4
Tetratricopéptido pequeño rico en glutamina
Alfa-actinina 4
Ribonucleoproteína nuclear heterogénea A1
Proteína cerebral soluble en ácido 1
Subunidad de importina beta 1
Isoforma 1 de proteína de esperma autoantigénico nuclear
Proteína de choque térmico 60
Isoforma 1 de serpina B13
Componente de ribonucleoproteína nuclear pequeña U5 de 116 kDa
Subunidad beta de la proteína del complejo T 1
Isoforma 1 de la proteína hipotética LOC64423
Proteína S100-A11
Homólogo B de la proteína de reparación de la escisión por UV RAD23
Isoforma 1 expresada hematológica y neurológica
PREDICHA: similar a la isoforma S3a de la proteína ribosomal

EJEMPLO: 5 Separación de FFE seguida por un análisis de MALDI-TOF de plasma humano

- 5 El medio de separación y los medios de estabilización se probaron en un sistema de electroforesis de flujo libre BD™ en el modo de FF-IEF, usando una solución de control de calidad. El aparato se configuró para que comprendiera nueve entradas de medios (E1-E9) y cuatro entradas de muestra (S1-S4). Por la entrada E1, se introdujo medio de estabilización anódico. El medio de estabilización catódico se introdujo por la entrada E9 y la muestra se introdujo por la entrada de muestra S2. El tiempo total de duración de la electroforesis fue de aproximadamente 10 minutos. El voltaje aplicado fue de 500 V y la corriente fue de 81 mA. La muestra y los medios se introdujeron a un caudal de 3,0 ml/h y 150 ml/h, respectivamente.

Medio de estabilización anódico: HAc 1.567mM, TRIS 450mM (pH = 4,09; conductividad: 8.880 (µS/cm) (E1).

Medio de estabilización catódico: HAc 450mM, TRIS 900mM (pH = 8,32; conductividad: 8.360 (µS/cm) (E9).

Medio de separación: HAc 150mM, Tris 25mM, betaína 100mM (pH = 3,94; conductividad: 1.456 µS/cm) (E2); TRIS 10mM + 300 µl de HAc en 300 ml (pH = 4,85; conductividad = 630 µS/cm) (E3-E5); HAc 10mM + 230 mg de TRIS en 200 ml (pH = 6,42, conductividad = 603 µS/cm) (E6-E7); HAc 150mM, TRIS 150mM + 560 mg de TRIS en 100 ml

(pH = 7,82; conductividad: 6.800 $\mu\text{S}/\text{cm}$) (E8).

El pH de cada una de las fracciones de la FFE se determinó usando un electrodo de pH, y se muestra en el gráfico de la Fig. 8. Se separaron los marcadores del pl coloreados para evaluar el rendimiento de la separación del sistema. En la Fig. 8, también se muestra la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420 \text{ nm}$, 515 nm y 595 nm, que representa la absorbancia de los respectivos marcadores de pl.

En la Fig. 9, se muestran los geles de SDS teñidos de plata de varias fracciones que muestran la separación de las proteínas plasmáticas humanas. En la Fig. 10, se describe un espectro de MALDI-TOF de la fracción 53. En el espectro, se pudo identificar una serie de picos en un intervalo amplio de masa, cada uno de los cuales representa proteínas individuales. Lo más probable es que algunos de los picos procedan de la proteína adiponectina con una masa monomérica de aproximadamente 28 kDa.

EJEMPLO 6: Separación de FFE de extracto liofilizado de proteína de avispa en condiciones nativas [4176p3]

El medio de separación y los medios de estabilización se probaron en un sistema de electroforesis de flujo libre BD™ en el modo de FF-IEF, usando una solución de control de calidad. El aparato se configuró para que comprendiera nueve entradas de medios (E1-E9) y cuatro entradas de muestra (S1-S4). Por la entrada E1, se introdujo medio de estabilización anódico. El medio de estabilización catódico se introdujo en la entrada E9 y la muestra se introdujo por la entrada de muestra S3. El tiempo total de duración de la electroforesis fue de aproximadamente 10 minutos. El voltaje aplicado fue de 550 V y la corriente fue de 85 mA. La muestra y los medios se introdujeron a un caudal de 1,5 ml/h y 150 ml/h, respectivamente.

Medio de estabilización anódico: DEA 100mM, ácido picolínico 46mM (pH = 6,0; conductividad: 4.350 ($\mu\text{S}/\text{cm}$) (E1).

Medio de estabilización catódico: DEA 149mM, ácido picolínico 100mM (pH = 9,50; conductividad: 3.850 ($\mu\text{S}/\text{cm}$) (E8 + E9).

Medio de separación:

Entrada de medio	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Medio	DEA 10mM	DEA 10mM	DEA* x mM	DEA* x mM	DEA* x mM	DEA* x mM
	Ácido picolínico 4,6mM	Ácido picolínico* x mM	Ácido picolínico 10mM	Ácido picolínico 10mM	Ácido picolínico 10mM	Ácido picolínico 10mM
pH	6,0	7,0	7,8	8,5	9,2	9,5
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	550	574	589	592	599	597

*: las soluciones se valoraron con respecto al pH de la tabla bien con DEA o con ácido picolínico usando un electrodo de pH para medir el pH

El pH de cada una de las fracciones de la FFE se determinó usando un electrodo de pH, y se muestra en el gráfico de la Fig. 11. Se separaron los marcadores del pl coloreados para evaluar el rendimiento de la separación del sistema. La absorbancia de la fracción a $\lambda = 420 \text{ nm}$, 515 nm y 595 nm, que representa la absorbancia de los respectivos marcadores del pl, se indica en la Fig. 11.

En la Fig. 12, se presentan los geles de SDS teñidos de plata de varias fracciones que muestran la separación de las proteínas de avispa liofilizadas.

EJEMPLO 7: Separación de suero de *Python Sebae* con y sin PPS

Se extrajo suero de una serpiente *Python sebae*. Se diluyó la muestra de suero 1:10 en el medio de separación. El medio de separación sólo contenía los componentes tampón que son ampliamente conocidos por su compatibilidad con la MALDI-TOF. Además, uno de los experimentos se realizó añadiendo a la muestra PPS, un detergente escindible compatible con la MALDI-TOF, así como el medio de separación.

La separación de la muestra se llevó a cabo en un sistema de electroforesis de flujo libre BD™ en el modo de isoelectroenfoque de flujo libre (FF-IEF). El aparato se configuró para que comprendiera nueve entradas medios (E1-E9) y cuatro entradas de muestra (S1-S4). El medio de estabilización anódico se introdujo por la entrada E1. El medio de estabilización catódico se introdujo por la entrada E9 y la muestra se introdujo por la entrada de muestra

S2. El voltaje aplicado fue de 550 V y la corriente fue de 105 mA. La muestra y los medios se introdujeron a un caudal de 2 ml/h y 150 ml/h, respectivamente.

Medios de separación y estabilización del aparato de FFE:

Entrada de medio	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Medio	HAc 150mM/Tris 25mM/betaina 100mM	300 ml de Tris 10mM/ 300 µl de HAc			200 ml de HAc 10mM/260 mg de Tris		100 ml de HAc 150mM/Tris 150mM/560 mg de Tris
pH	3,95	4,85			7,08		7,78
Conductividad ((µS/cm)	1.475	622			611		6800

Medio de estabilización anódico: HAc 1.567mM/TRIS 450mM (pH = 4,11; conductividad: 6610 (µS/cm) (E1).

Medio de estabilización catódico: HAc 450mM, TRIS 900mM (pH = 8,23; conductividad: 6.220 (µS/cm) (E9).

Medio de flujo a contracorriente: Agua (CF1-CF3)

Los medios de separación anteriormente descritos son medios de separación volátiles, es decir, los compuestos tampón bien son compatibles con la EM o se pueden eliminar mediante evaporación antes de un análisis de EM.

Se recogieron 96 fracciones en cada uno de los dos experimentos. Se tomaron 0,2 ml de cada fracción para realizar una electroforesis sobre gel de poliacrilamida-SDS. En la Fig. 13, se muestran las imágenes del gel de la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (teñido de plata) de cada fracción de segundo de las muestras separadas (una muestra con, una muestra sin PPS).

Aunque el patrón de separación parece bastante similar, se observó algo de precipitación en la cámara de separación sin detergente en el medio de separación. Ésta fue significativamente menos marcada al usar PPS al 0,1% en el medio de separación.

Los medios de separación estaban totalmente exentos de glicerol y de otros componentes que son conocidos por interferir en las mediciones de la MALDI-TOF. Por lo tanto, la fracción obtenida con el experimento de FFE se puede aplicar directamente en la diana de la MALDI. En la Figura 14, se muestra un espectro de masas de la proteína de 25 kDa de la fracción 26.

EJEMPLO 8: Separación de FFE-ITP de intervalos usando un sistema tampón volátil A y un sistema tampón no volátil B

El medio de separación y los medios de estabilización se probaron en un sistema de electroforesis de flujo libre BD™ en el modo de FF-IEF, usando una solución de control de calidad. El aparato se configuró para que comprendiera nueve entradas de medios (E1-E8) y cuatro entradas de muestras (S1-S4). Por la entrada E1, se introdujo medio de estabilización anódico. El medio de estabilización catódico se introdujo por la entrada de E8 y la muestra se introdujo por una entrada de muestra a la región espaciadora. La FFE-ITP se realizó según un protocolo de ITP modificado como se describe en el documento PCT/EP2007/061840, que se incorpora en la presente memoria en su totalidad. El tiempo total de duración de la electroforesis fue de aproximadamente 25 minutos. El voltaje aplicado fue de 500 V y la corriente se ajustó a 20 mA. La muestra y los medios se introdujeron a un caudal de 1,5 ml/h y 150 ml/h, respectivamente. El experimento se realizó en el modo de FF-ITP de intervalos a 80 ml/h y la muestra fraccionada se eluyó a 150 ml/h.

Por la entrada E1, se introdujo un líder estabilizado que contenía HCl 100mM, amida de ácido isonicotínico 200mM (pH = 3,40; conductividad: 8.060 µS/cm). Por las entradas E2 a E5, se introdujo un líder menos concentrado de HCl (10mM) y amida de ácido isonicotínico (20mM). Por la entrada E6, se introdujo una composición espaciadora volátil que comprendía ácido fórmico 6mM, ácido acético 8mM, ácido propiónico 8mM, ácido butírico 6mM, ácido pivalico 6mM, ácido e-aminocaproico 34mM (EACA) y piridinetanol 34mM (pH 5,26). Por la entrada E7, se introdujeron un terminador diluido que comprendía NaOH (10mM) y ácido 4-piridinetanosulfónico (PES) (20mM), y un terminador no diluido que comprendía NaOH (100mM), y tras la separación electroforética, se eluyeron la muestra y los medios en colectores de fracciones, y se analizaron las fracciones.

El pH de cada una de las fracciones de la FFE se determinó usando un electrodo de pH, y se muestra en el gráfico de la Fig. 15. Se separaron los marcadores del pl coloreados para evaluar el rendimiento de la separación del sistema. La absorbancia de la fracción a 420 nm, 515 nm y 595 nm, que representa la absorbancia de los respectivos marcadores del pl, se indica en la Fig. 15. La figura muestra una separación de los marcadores del pl dentro de la zona espaciadora.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para analizar analitos que comprende:

- 5 a) una separación de los analitos mediante electroforesis de flujo libre (FFE) que comprende un medio de separación acuoso para separar analitos mediante electroforesis de flujo libre que comprende al menos un ácido tampón y al menos una base tampón, en el cual cada uno de los ácidos tampón y cada una de las bases tampón es volátil en condiciones de trabajo de espectroscopia de masas, opcionalmente, en la cual el medio de separación se proporciona en forma de kit; y
- 10 b) un análisis posterior realizado aguas abajo de al menos un analito de interés obtenido de dicha etapa a) de separación de FFE, caracterizado por el hecho de que dicho análisis realizado aguas abajo es un análisis espectrométrico de masas seleccionado del grupo que consiste en ionización de electronebulización (ESI), desorción/ionización por láser en superficie (SELDI), desorción/ionización por láser asistida con matriz (MALDI o MALDI-TOF-EM/(EM)) y CL-EM/(EM).
- 15

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el medio es un medio binario que sólo comprende un ácido tampón y una base tampón; y, opcionalmente,

- 20 en el que el al menos un ácido tampón se selecciona del grupo que consiste en ácido fórmico, ácido acético, ácido picolínico, diacetilacetona, *o*-, *m*-y *p*-cresoles, *o*-, *m*-, *p*-clorofenoles, hidroxipiridinas, alcoholes fluorados y compuestos carbonílicos, tales como trifluoroetanol, tetrafluoropropanol, tetrafluoroacetona, y/o en el que la al menos una base tampón se selecciona del grupo que consiste en TRIS, hidroxipiridinas, amida del ácido isonicotínico, carbinoles de piridina, dietanolamina, bencilamina, piridinetanol y dimetilaminopropionitrilo.
- 25

3. El procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el cual el medio de separación está sustancialmente libre de HPMC, urea, glicerol y/o PEGs.

- 30 4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual la separación de los analitos mediante electroforesis de flujo libre se realiza en condiciones nativas.

5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual al menos un medio de separación y/o una muestra comprende al menos un tensioactivo no iónico o zwitteriónico compatible con la EM; preferentemente,
- 35 en el cual dicho al menos un tensioactivo no iónico compatible con la EM o zwitteriónico es un tensioactivo escindible.

6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el cual al menos un tensioactivo o no iónico o zwitteriónico compatible con la EM es un tensioactivo escindible y en el cual un medio de flujo a contracorriente que comprende un agente de escisión se pone en contacto y/o se mezcla con una fracción que comprende un tensioactivo escindible y al menos parte de una muestra tras la separación electroforética; o
- 40

en el cual se usa un medio de flujo a contracorriente para estabilizar un tensioactivo escindible comprendido en al menos una fracción tras la separación electroforética de flujo libre,

- 45 y, opcionalmente, en el cual se elimina una porción de un tensioactivo escindible escindido mediante filtración, centrifugación o evaporación.

7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual el procedimiento comprende:

- 50 formar entre los electrodos de un aparato adecuado para la electroforesis de flujo libre una zona de separación que comprende una zona A formada por al menos un medio tampón de separación (MTS) de tipo A, en la cual dicho MTS de tipo A es un medio de separación volátil según lo definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y una zona B formada por al menos un medio tampón de separación de tipo B, en la cual el sistema tampón es un sistema tampón no volátil, entre un ánodo y un cátodo;
- 55

en la cual dicha zona A está situada en la zona de separación, de manera que al menos un analito de interés se puede eluir de la zona de separación en dicha zona A;

separar los analitos de una muestra introducida en dicho aparato adecuado para la electroforesis de flujo libre; y

- 60 eluir al menos un analito de interés de la zona de separación en un MTS de tipo A.

8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el cual la muestra se introduce en dicho aparato en una zona A o en una zona B; y en el cual todos los analitos de interés se eluyen de la zona de separación en un MTS de tipo A;

opcionalmente, en el cual dicho MTS de tipo A comprende al menos un tensioactivo no iónico compatible con la EM o zwitteriónico y en el cual al menos un MTS de tipo B comprende un sistema tampón seleccionado entre anfolitos comerciales, un sistema binario de ácido tampón/base tampón (medio A/B) o un sistema tampón de múltiples pares complementarios (CMPBS).

5 9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el cual dicho procedimiento comprende las etapas de:

- 10 a) separar los analitos de una muestra introducida en un aparato adecuado para la electroforesis de flujo libre;
b) eluir el/los analito/s obtenido/s a partir de la etapa de separación de FFE en una multiplicidad de fracciones;
c) recoger al menos una fracción que contiene el/los analito/s que se va/n a analizar; y
d) someter al menos una de las fracciones a dicho análisis realizado aguas abajo, en el cual dicha fracción no requiere una etapa de limpieza ni de purificación antes de dicho análisis de aguas abajo.

15 10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el cual dicho análisis realizado aguas abajo es espectroscopia de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI) y

- i) en el cual se añade un componente matricial para el análisis de MALDI a la solución tampón de analitos recogida antes de realizar el análisis espectrométrico de masas; o
20 ii) en el cual el medio de separación empleado en la etapa de separación de FFE comprende al menos un compuesto tampón que puede actuar como matriz para el análisis de MALDI y en el cual los compuestos tampón adicionales son volátiles en las condiciones de trabajo de la espectroscopia de masas de MALDI; o
iii) en el cual se añade un componente matricial para el análisis de MALDI a la solución tampón de analitos recogida antes del análisis espectrométrico de masas y en el cual el medio de separación empleado en la
25 etapa de separación de FFE comprende al menos un compuesto tampón que puede actuar como una matriz para el análisis de MALDI y en el cual los compuestos tampón adicionales son volátiles en las condiciones de trabajo de la espectroscopia de masas de MALDI.

30 11. El procedimiento según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, que comprende además la etapa de añadir a al menos una fracción de la etapa de separación de EFL un agente para reducir el peso molecular de los analitos que se vayan a analizar mediante dicho análisis realizado aguas abajo; preferentemente,

en el cual el/los analito/s es/son fundamentalmente proteína/s o péptido/s, y en el cual el agente para reducir el peso molecular del/de los analito/s es una proteasa o una mezcla de proteasas; o

35 en el cual el/los analito/s es/son nucleótido/s y en el cual el agente para reducir el peso molecular del/de los analito/s es una nucleasa o una mezcla de nucleasas.

40 12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 que comprende además la etapa de eliminar al menos una parte del disolvente y de los compuestos tampón volátiles antes de dicho análisis de aguas abajo; preferentemente, en el cual la eliminación se realiza mediante centrifugación al vacío o mediante liofilización.

45 13. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el cual dicho procedimiento se lleva a cabo sin una etapa de purificación para eliminar los tensioactivos o los restos de los tensioactivos escindibles escindidos seleccionada del grupo que consiste en diálisis, cromatografía, cromatografía de fase inversa, cromatografía de intercambio iónico, intercambio de tensioactivos, precipitación de proteínas, cromatografía de afinidad, electrotransferencia extracción en fase líquida-líquida, extracción en fase sólida-líquida y combinaciones de las mismas.

50 14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el cual al menos un ácido tampón del medio de separación es ácido acético; o

en el cual al menos una base tampón del medio de separación es TRIS; o

55 en el cual el medio de separación comprende un sistema tampón binario de ácido acético y TRIS; preferentemente,

en el cual las concentraciones de ácido acético y de TRIS se seleccionan individualmente de aproximadamente 1mM a aproximadamente 200mM, preferentemente, de aproximadamente 2mM a aproximadamente 100mM y, lo más preferentemente, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50mM.

60 15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el cual los analitos que se van a separar mediante dicha etapa de FFE y se van a analizar mediante dicho análisis realizado aguas abajo son biopartículas, biopolímeros o biomoléculas; preferentemente

en el cual las biopartículas, los biopolímero o las biomoléculas que se van a separar y analizar se seleccionan del grupo que consiste en proteínas, agregados de proteínas, péptidos, hormonas, complejos de ADN-proteína tales como la cromatina, ADN, anticuerpos, células, orgánulos celulares, virus o partículas de virus, membranas, fragmentos de membrana, lípidos, sacáridos, polisacáridos, liposomas, nanopartículas o mezclas de cualquiera de los anteriores.

5

16. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el cual la separación de los analitos se consigue mediante isoelectroenfoque de flujo libre (FF-IEF), isotacoforesis de flujo libre (FF-ITP) o electroforesis de flujo libre en zona (FF-ZE).

10

FIG. 1.: Separación de proteínas S134 de plasma humano en condiciones nativas usando medios de separación volátiles



FIG. 2: Separación de proteínas S134 de plasma humano en condiciones nativas usando medios de separación volátiles
Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las fracciones recogidas

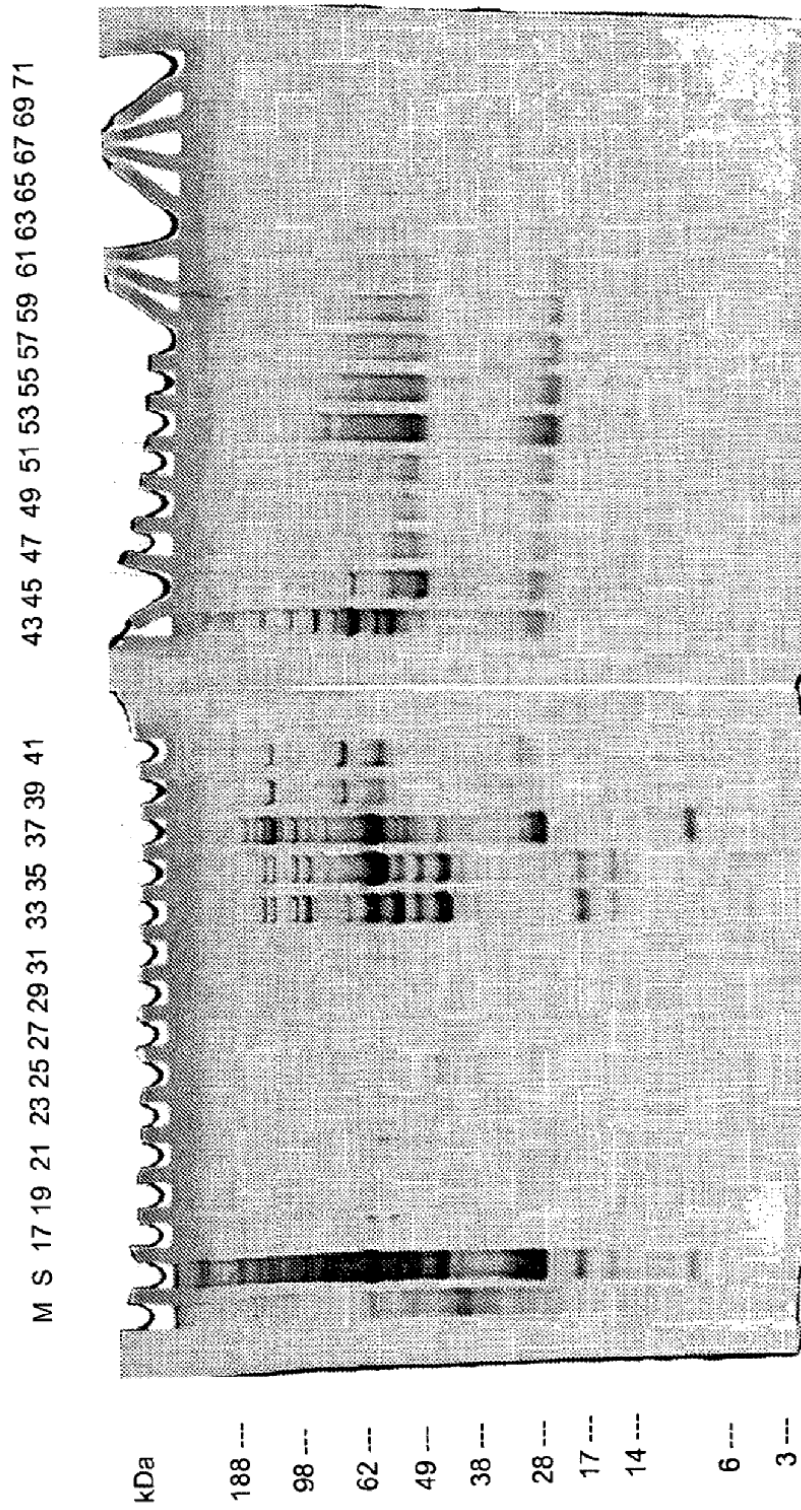


FIG. 3: Disminución nativa de la albúmina de suero humano de S134 de plasma humano en condiciones nativas usando medios de separación volátiles

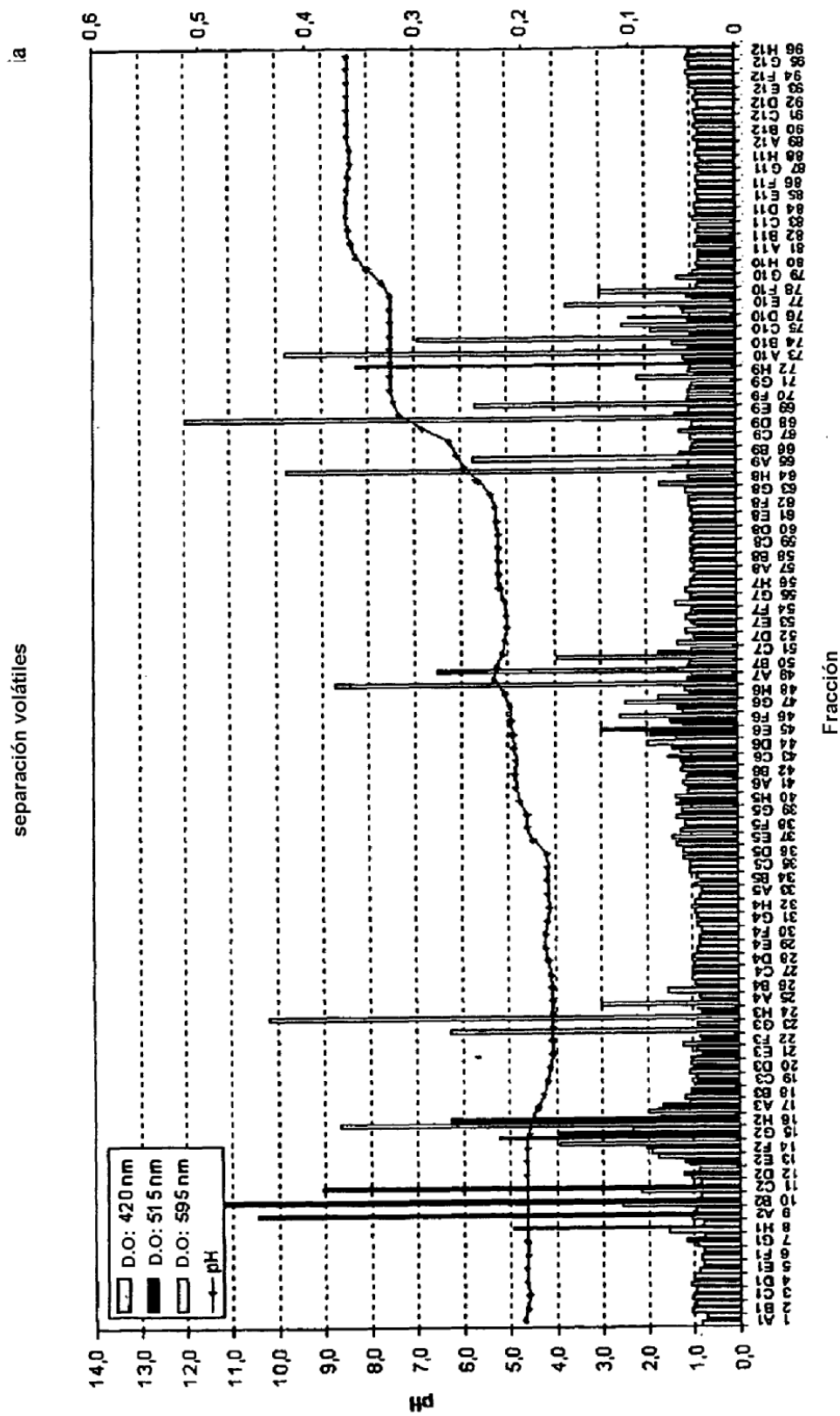


FIG. 4: Disminución nativa de la albúmina de suero humano de S134 de plasma humano en condiciones nativas usando medios de separación volátiles

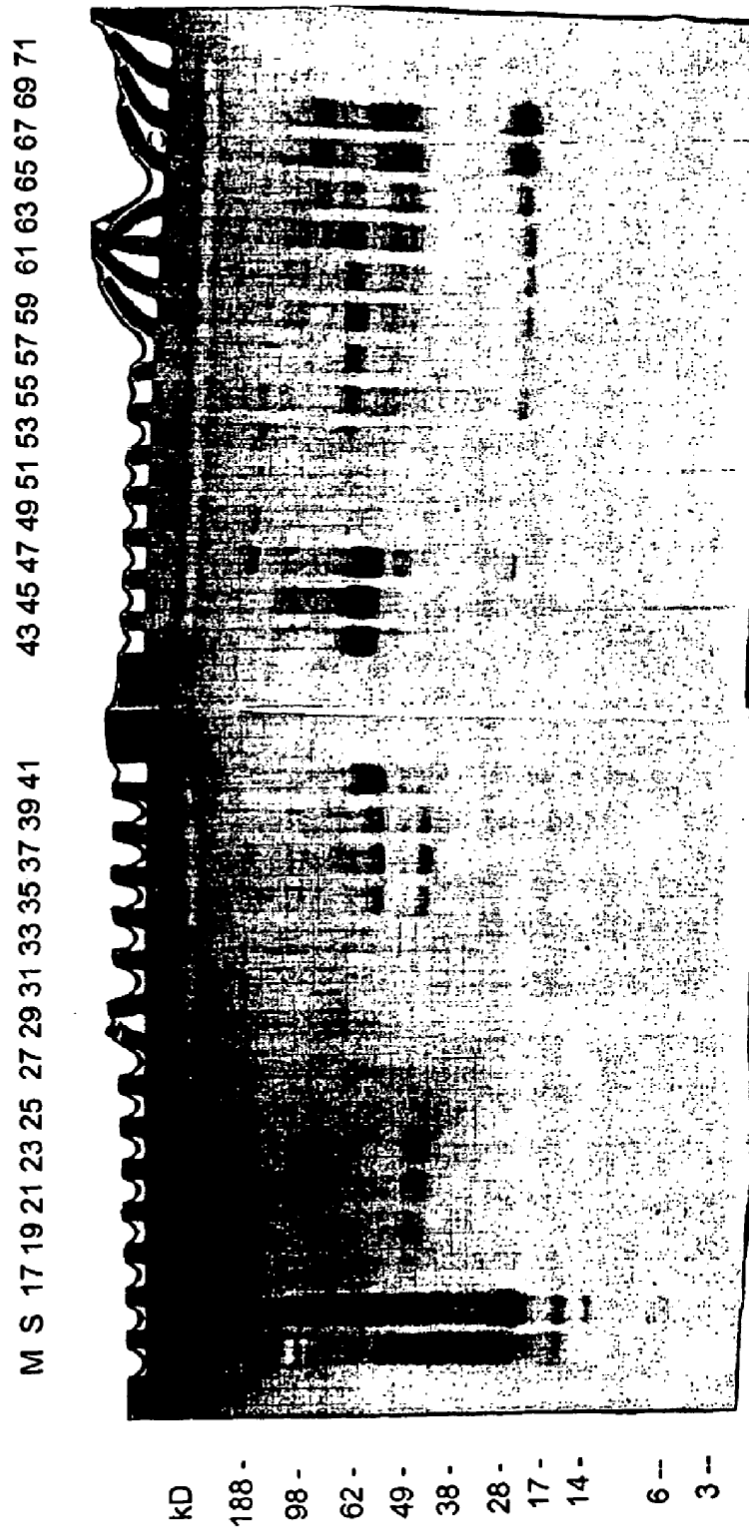


FIG. 5: Evaluación de medios de separación volátiles en el modo cíclico de intervalos

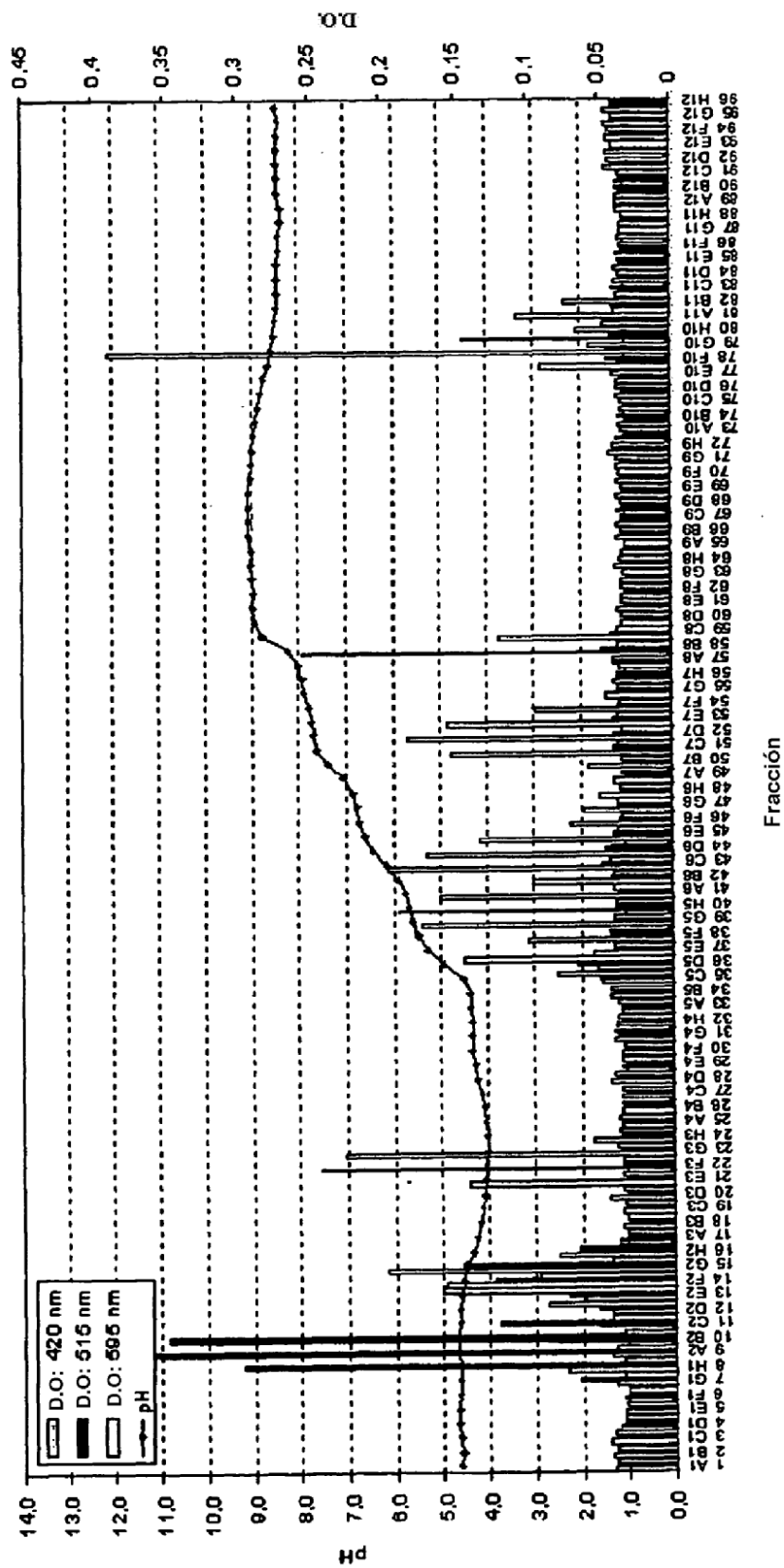


FIG. 6: Separación de péptidos obtenidos tras la tripsinación de células HeLa en condiciones nativas usando medios de separación volátiles

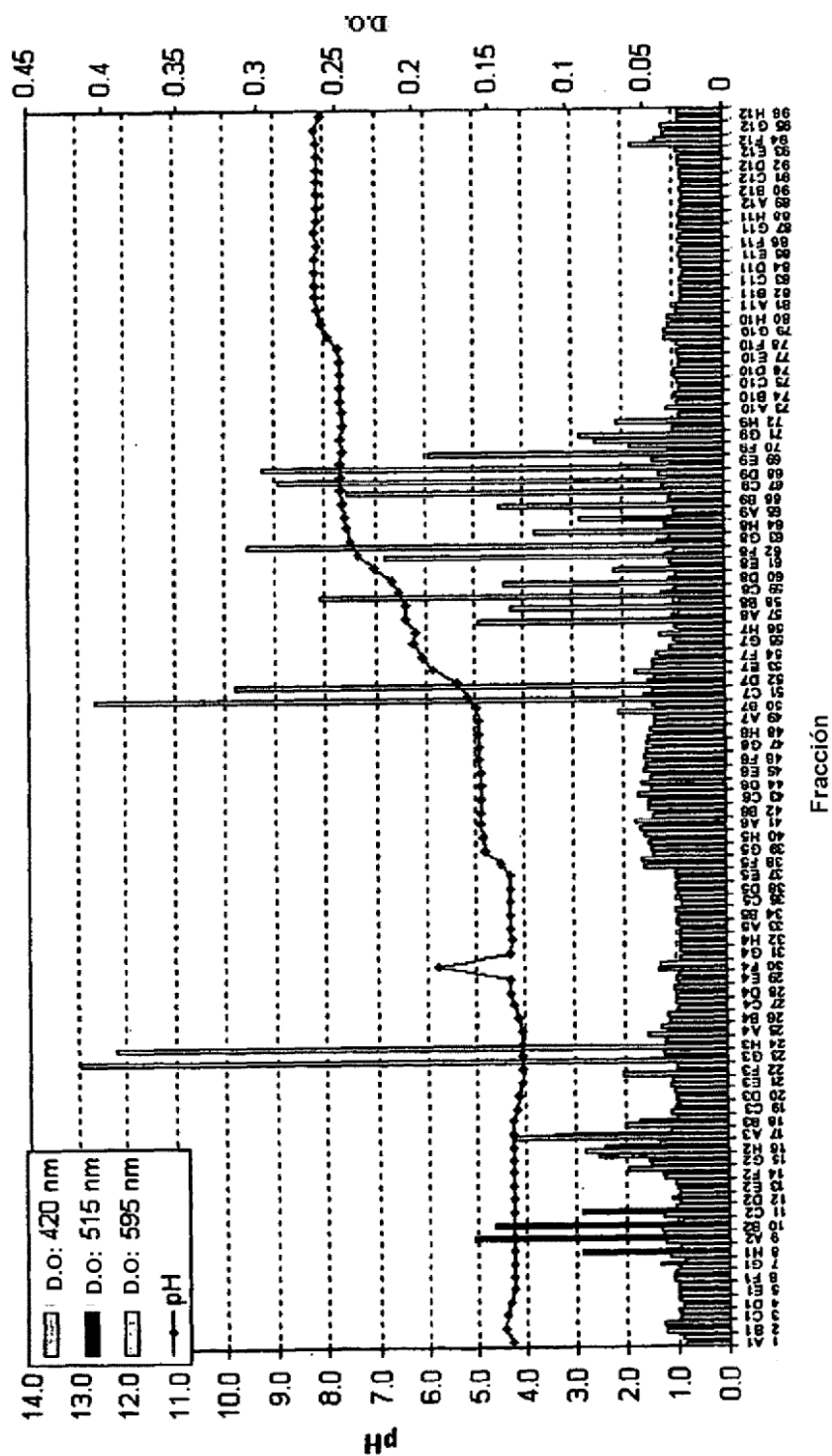


FIG. 7: Separación de proteínas de células HeLa en condiciones nativas usando medios de separación volátiles
Análisis de la fracción 42 mediante CL-EM/EM

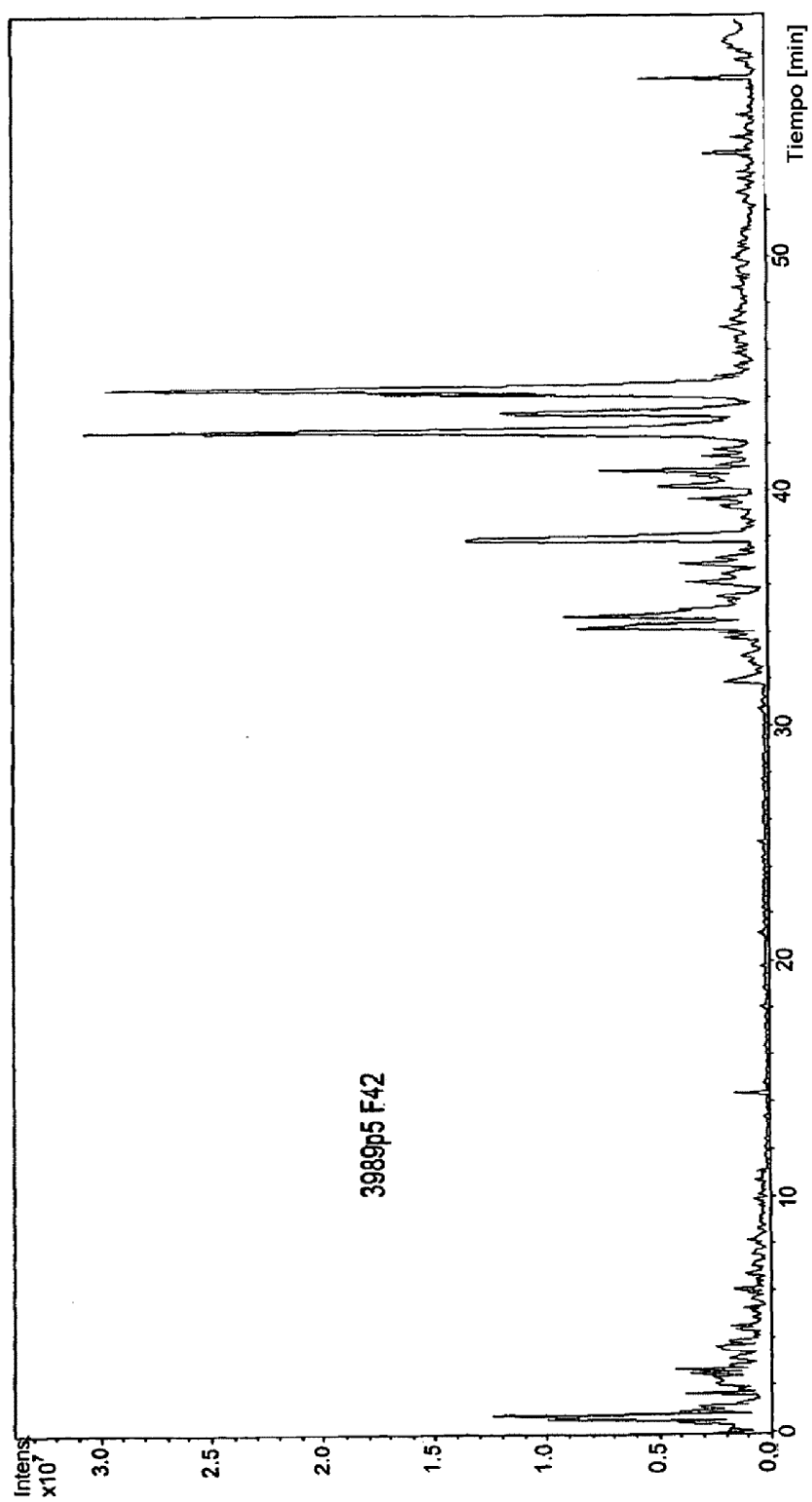


FIG. 8: Separación de proteínas de plasma humano mediante FFE en condiciones nativas

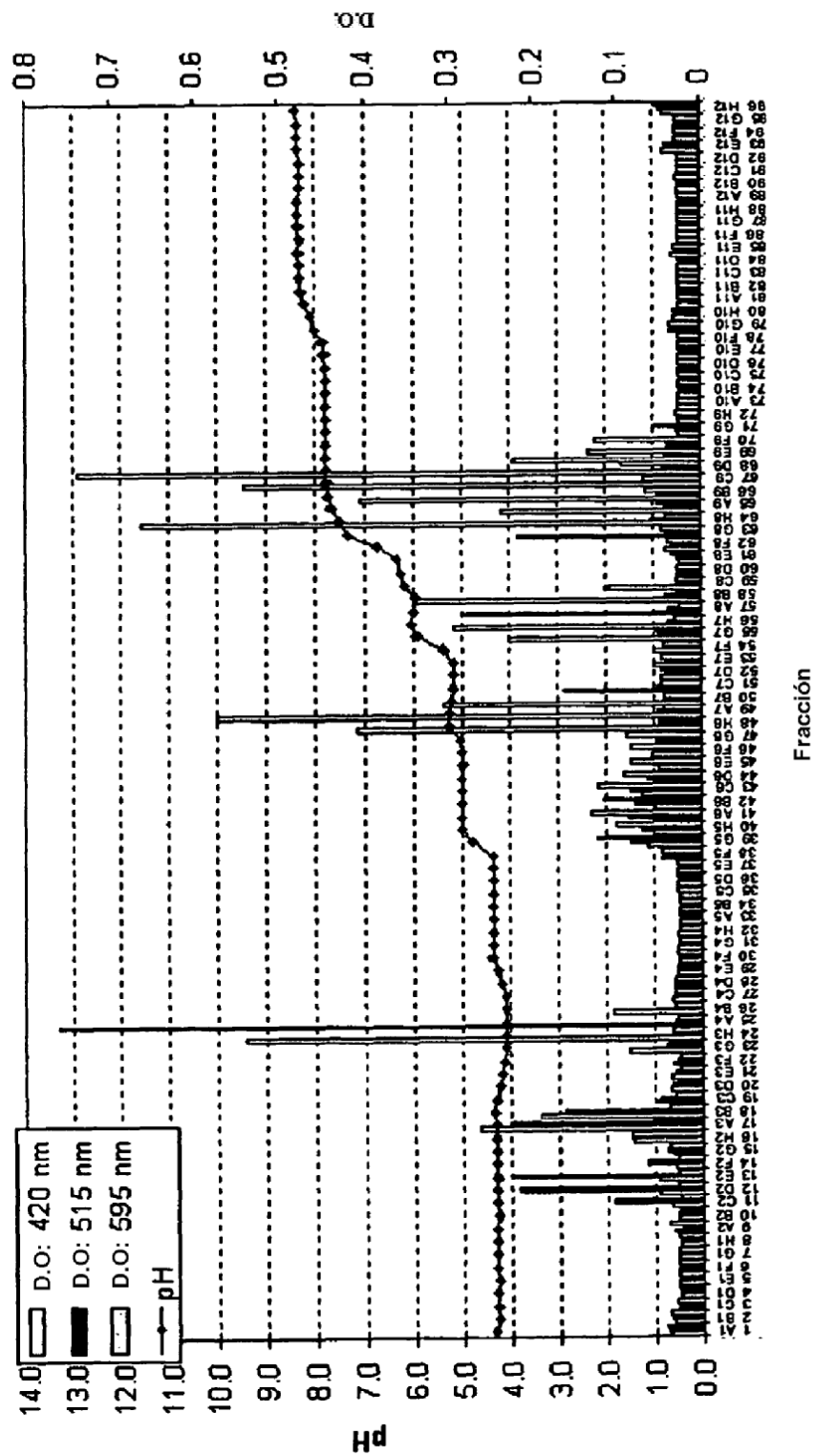


FIG. 9: Separación de proteínas de plasma humano mediante FFE en condiciones nativas
Gel de Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS teñido de plata de cada fracción de segundo de la FFE de las fracciones de FFE 17 a 67
La fracción 47 contiene albúmina humana

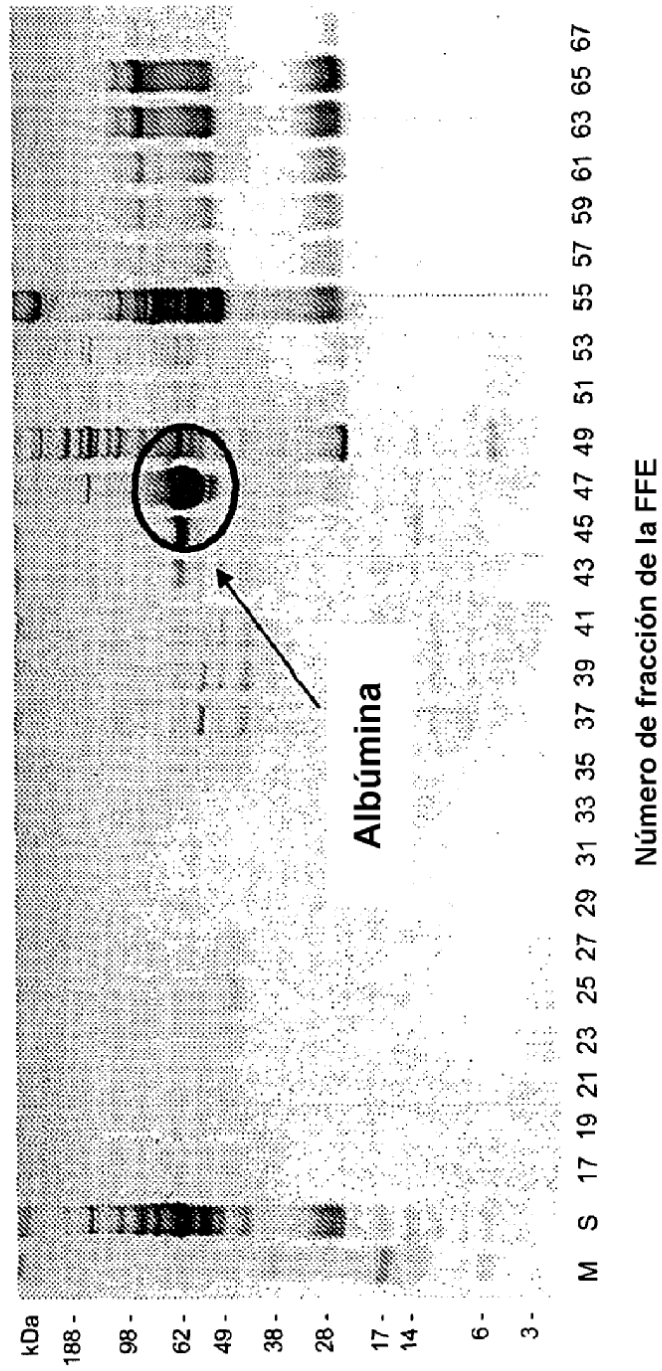


FIG. 10: Separación de proteínas plasmáticas humanas mediante FFE en condiciones nativas
Análisis MALDI-TOF de la fracción 53

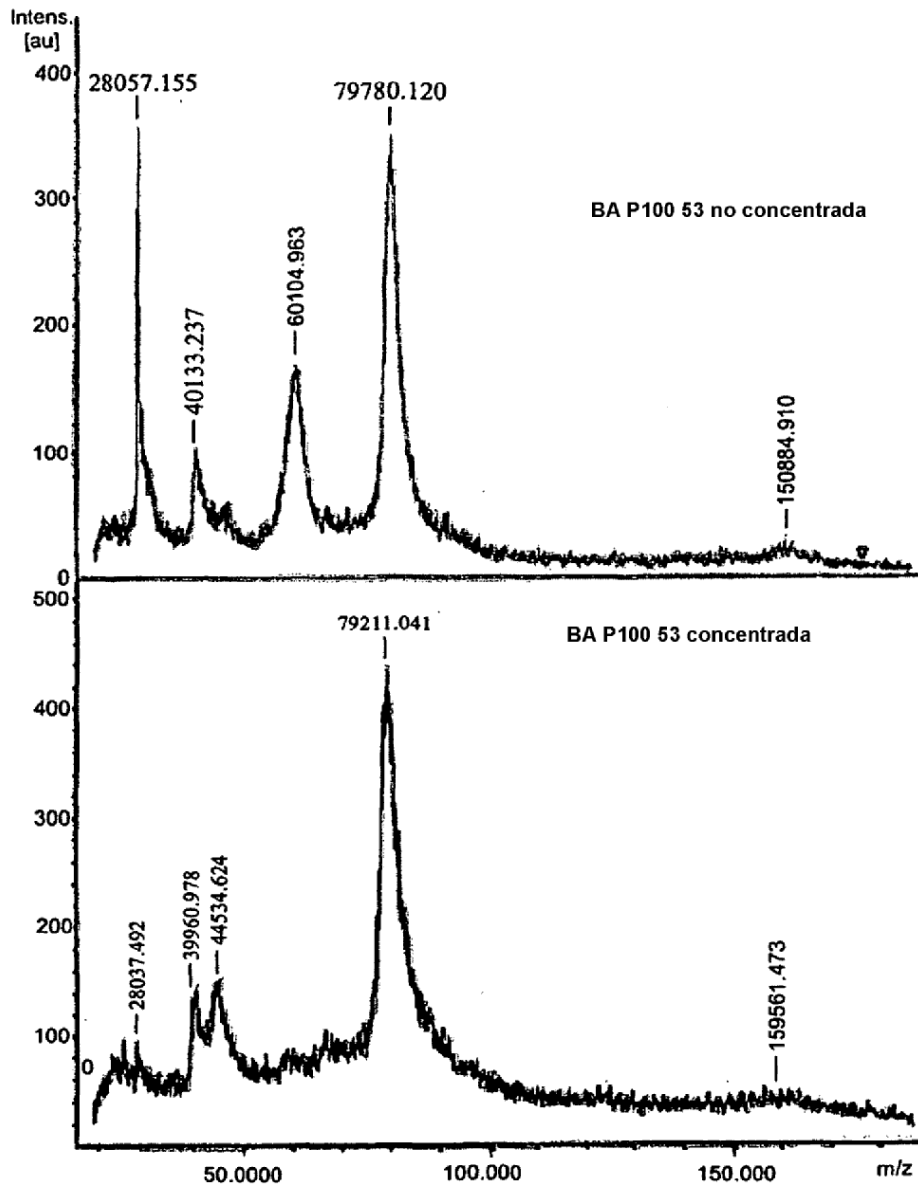


FIG. 11: Separación de extracto de proteína de avispa liofilizado mediante FFE en condiciones nativas

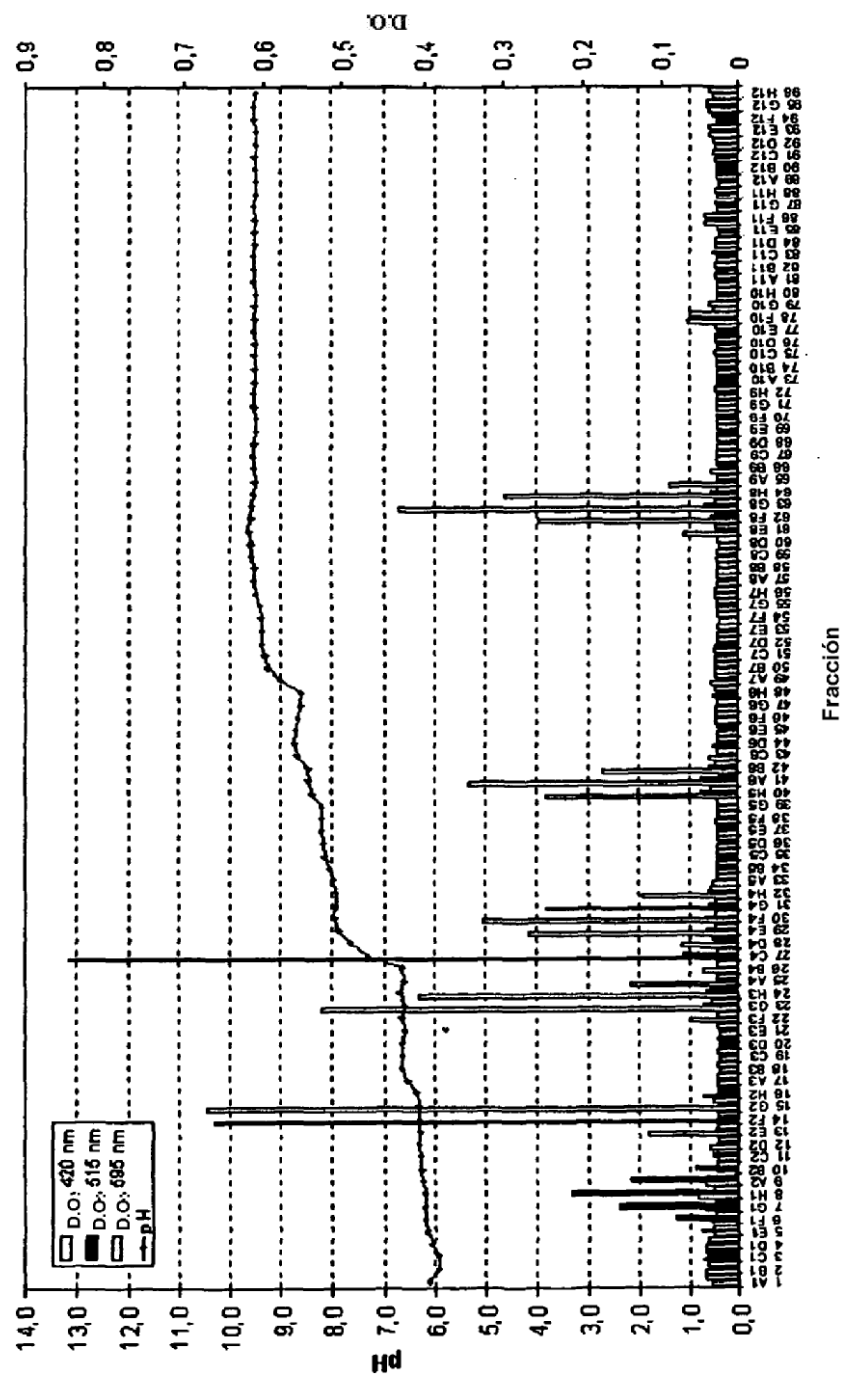


FIG. 12: Separación de extracto de proteína de avispa liofilizado mediante FFE en condiciones nativas usando medios de separación volátiles
Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las fracciones recogidas

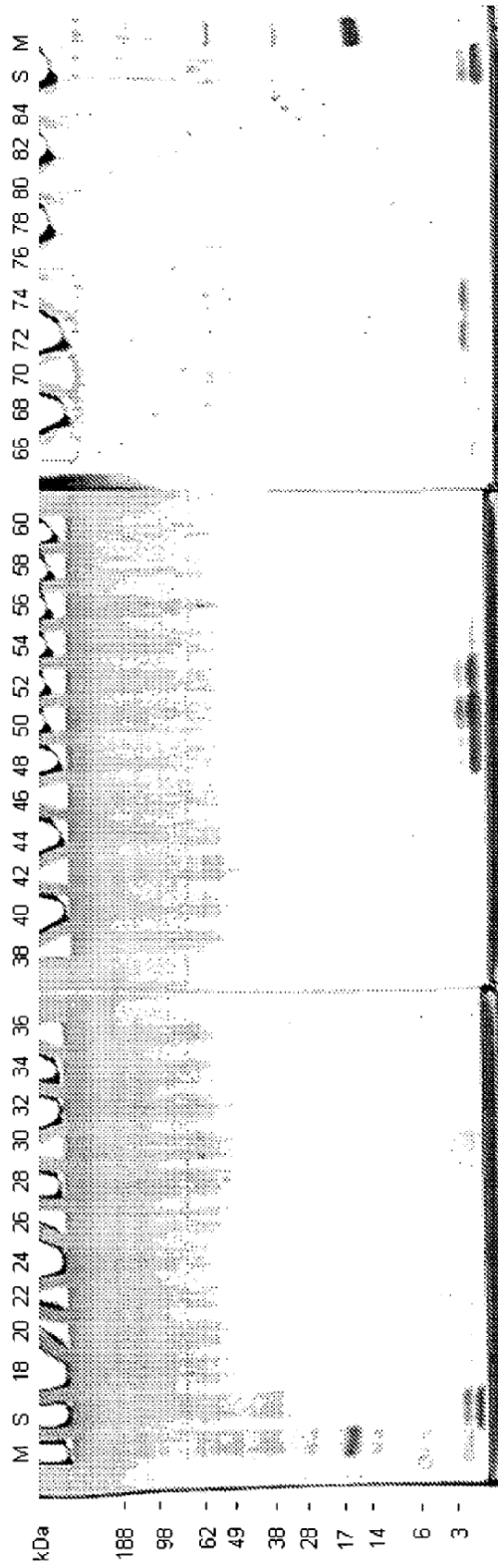


FIG. 13: Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS teñido de plata de fracciones resultantes de la electroforesis de isoelectroenfoque de flujo libre usando un sistema tampón volátil de suero de *Python sebae*, en la cual la separación se lleva a cabo en presencia de 3-[3-(1,1-bis(hidroxiisopropil)piridin-1-il)propano-1-sulfonato (PPS) (primer gel) y en ausencia de PPS (segundo gel)

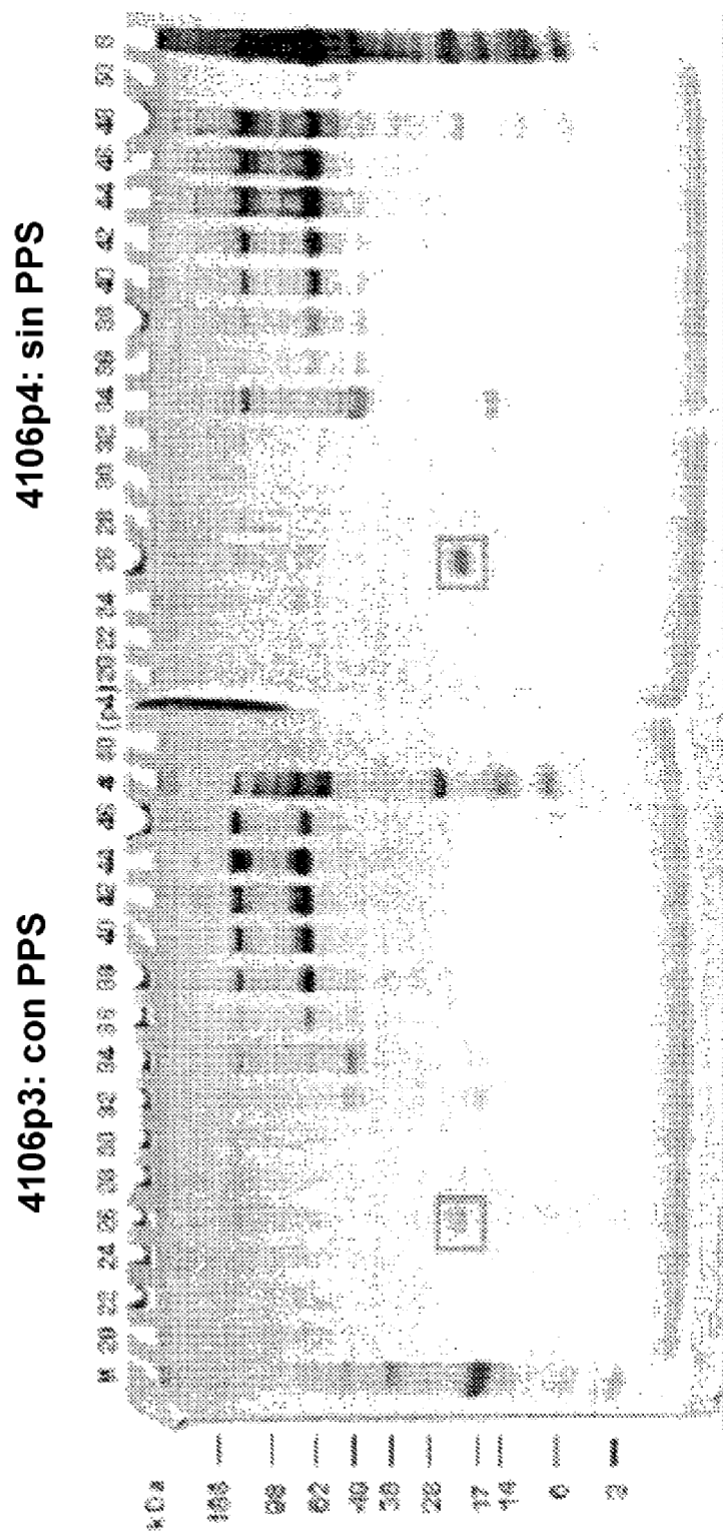


Fig. 14: Espectro de MALDI-TOF de la fracción 26

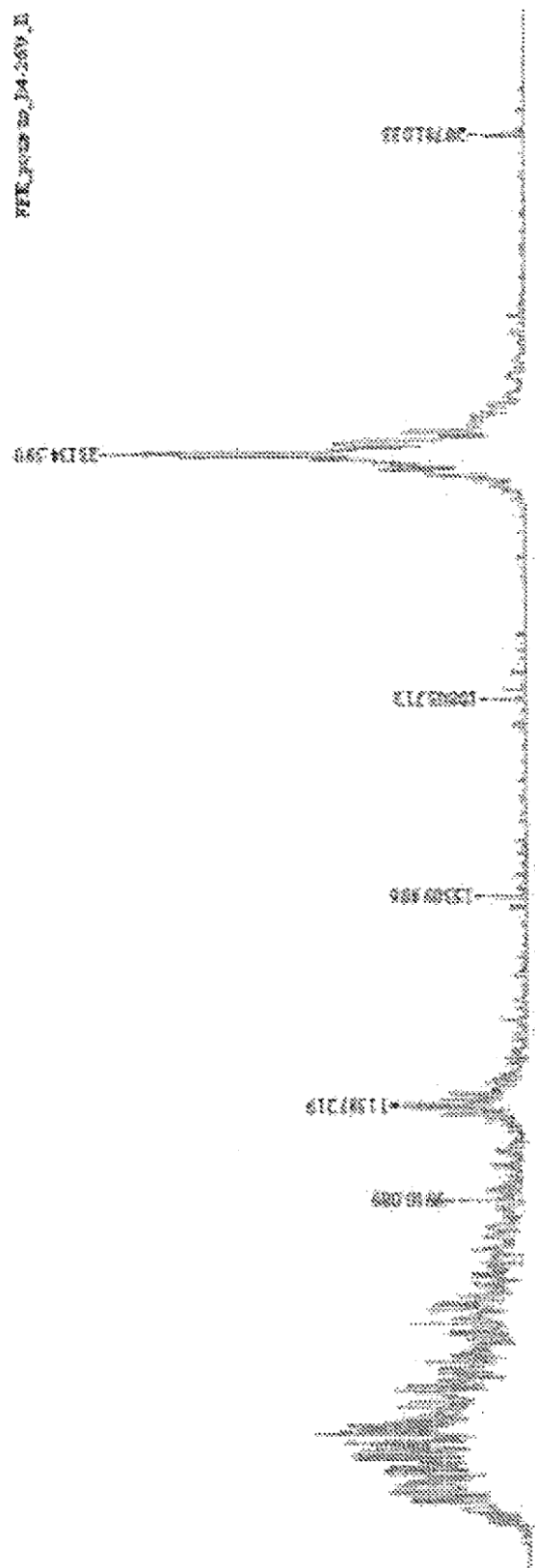


Fig. 15: FFE-ITP con sistemas tampón volátiles/no volátiles

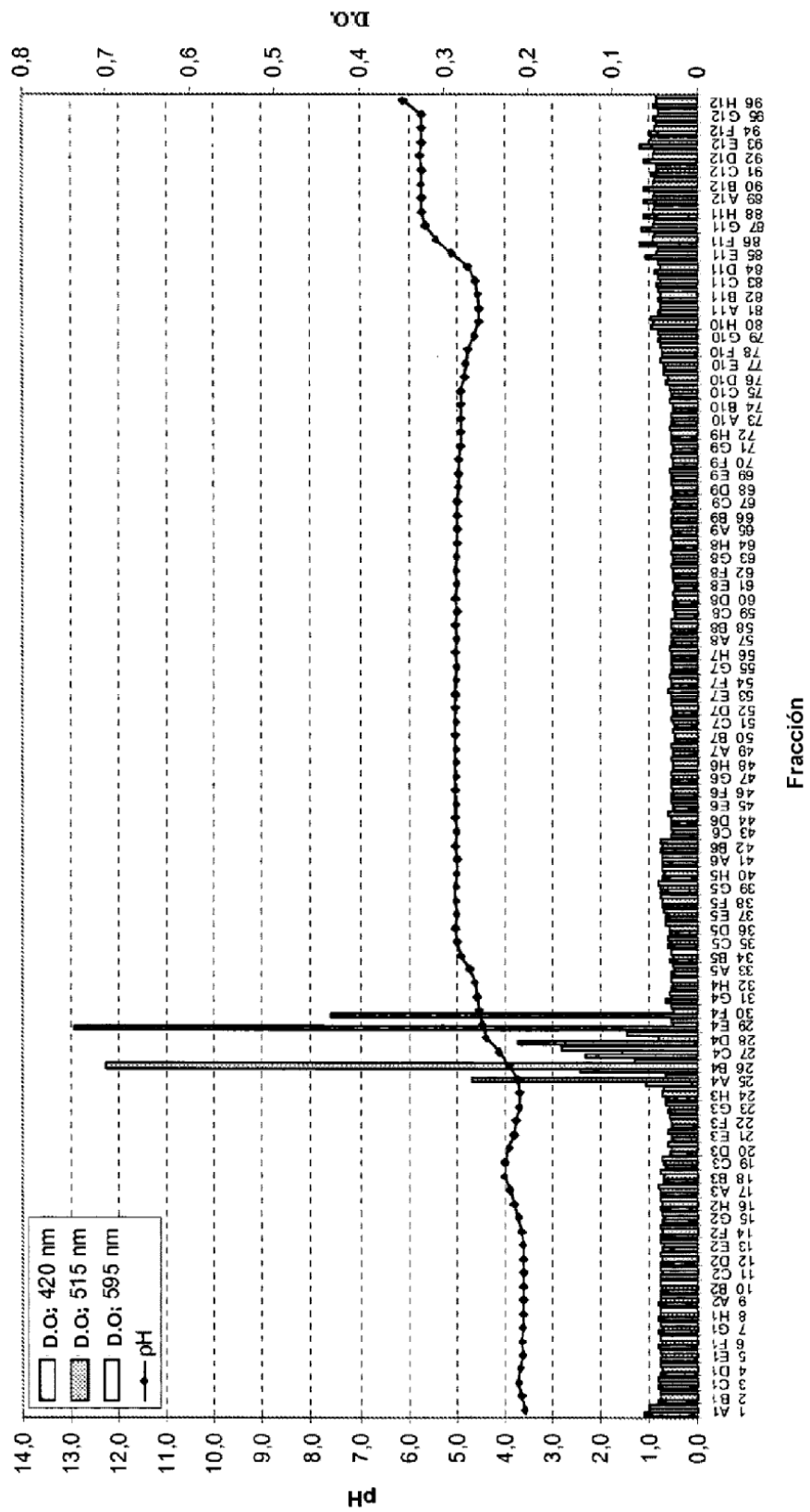


FIG. 16: Isoelectroenfoque cíclico de intervalos y transferencia del/de los analito/s de interés de la zona B a la zona A

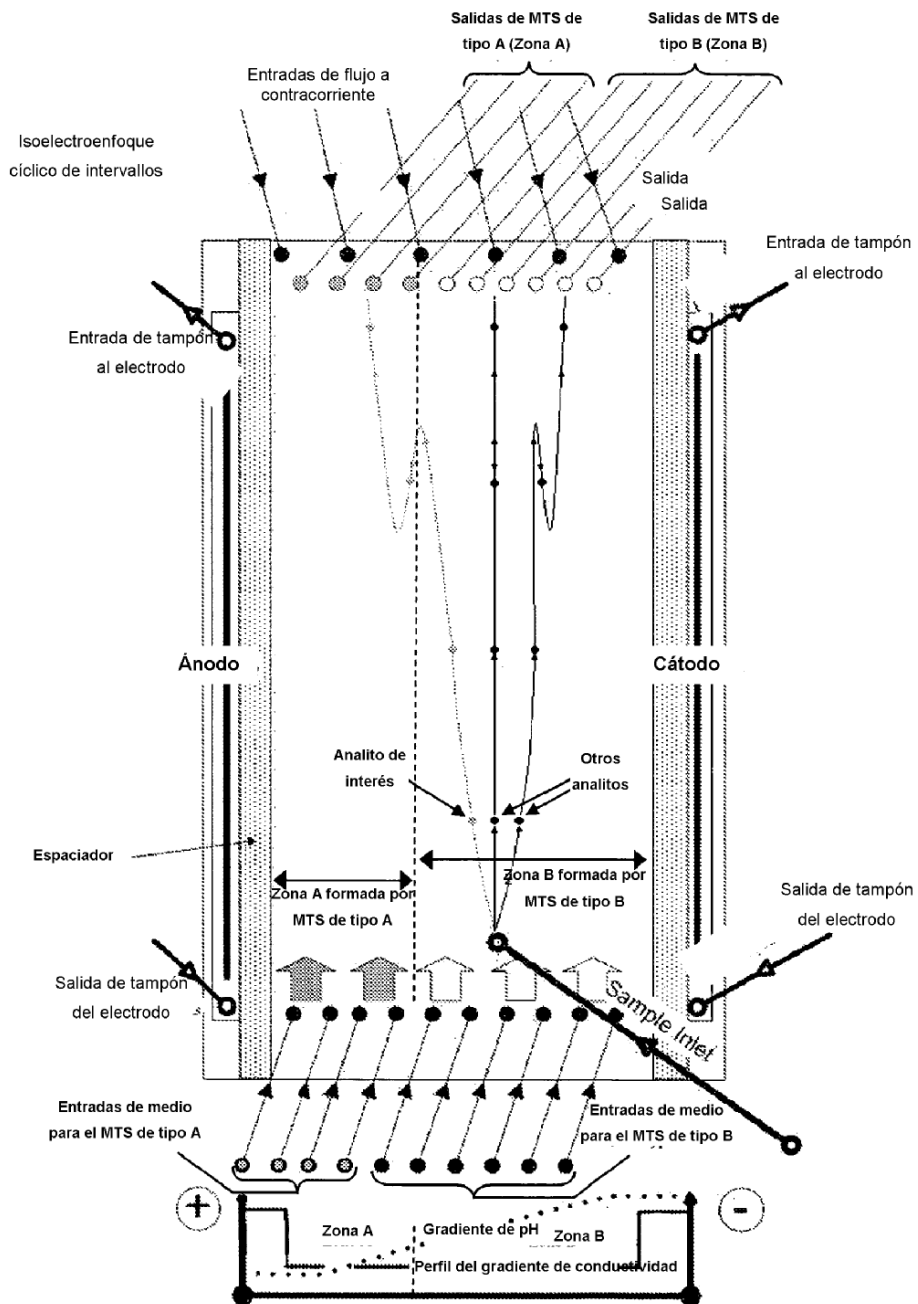


FIG. 17: Cámara de isotacoforesis de flujo libre

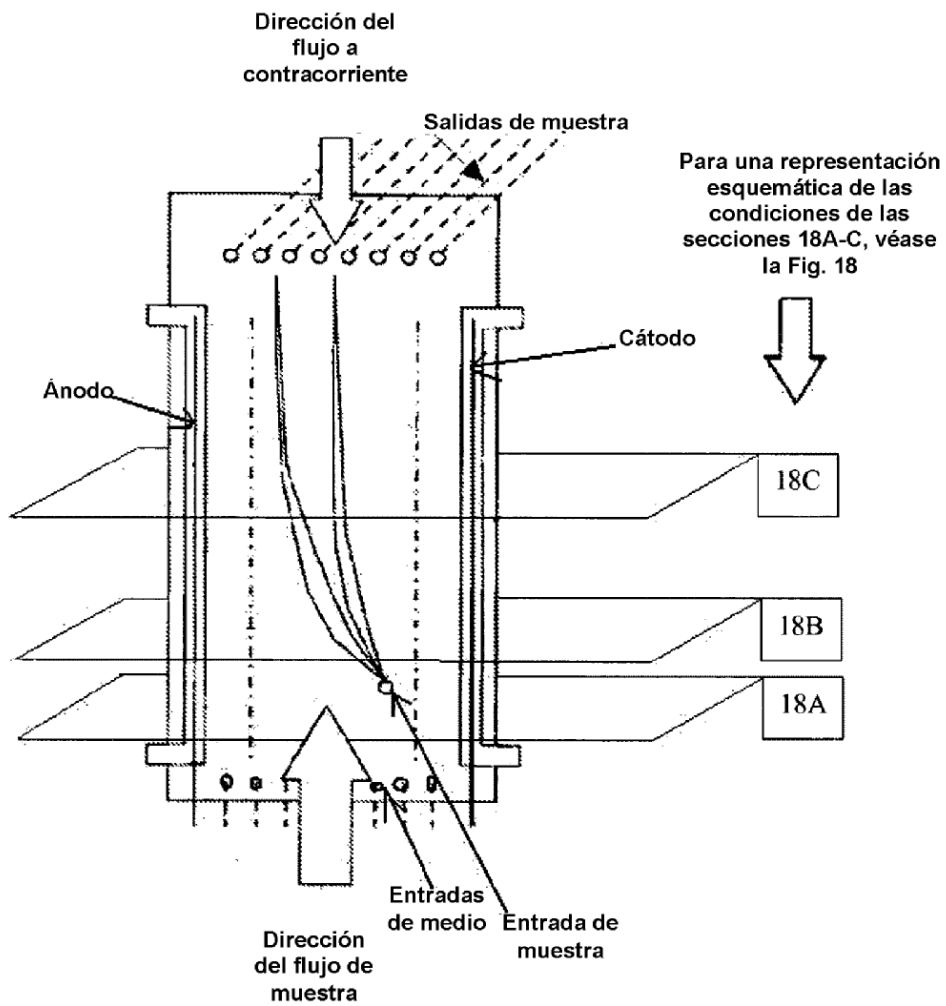


FIG. 18: Representación esquemática de las condiciones de los apartados 18A, 18B y 18C de la FIG. 17

FIG. 18A

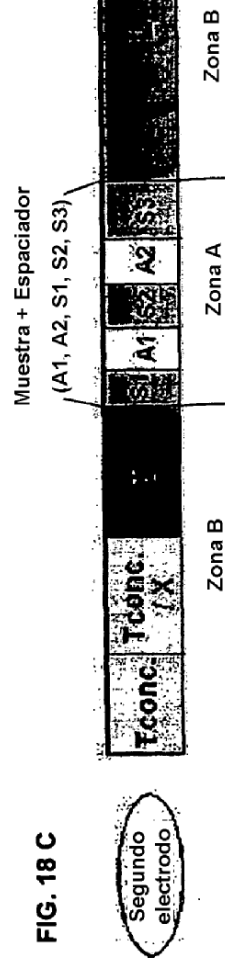


FIG. 18 B

Introducción de muestra (A1, A2) por la entrada de muestra



FIG. 18 C



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 5275706 A [0007] [0060]
- US 6328868 B [0008] [0060] [0062]
- WO 2008025806 A [0009] [0060] [0064]
- WO 0250524 A [0010]
- US 5447612 A, Bier [0011]
- US 7169278 B [0055]
- WO 2008087218 A [0055]
- US 2004050697 A [0060]
- US 2004050698 A [0060]
- US 2004045826 A [0060]
- US 2004026251 A [0060]
- WO 2008053047 A [0060]
- WO 2006047614 A [0111]
- US 20040101973 A [0200]
- EP 1320747 A [0200]
- EP 2007061840 W [0255]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- Analytical Biochemistry. Addison Wesley Longman Limited, 1998 [0003]
- Krivanova L. ; Bocek P. Continuous free-flow electrophoresis. *Electrophoresis*, 1998, vol. 19, 1064-1074 [0005]
- Bondy B. et al. Sodium chloride in separation medium enhances cell compatibility of free-flow electrophoresis. *Electrophoresis*, 1995, vol. 16, 92-97 [0006]
- Free-flow Electrophoresis. K. Hannig and K. H. Heidrich [0011]
- Bier et al. *Electrophoresis*, 1989, vol. 10 (10), 690-697 [0011]
- Nath et al. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, vol. 51 (1), 15-22 [0011]
- Davidsson P. et al. *Anal. Chem.*, 1999, vol. 71, 642-647 [0016]
- Königsberg, WH ; Henderson, L. *Meth. Enzymol.*, 1983, vol. 91, 254-259 [0016]
- Chirgwin, J. M. et al. *Biochemistry*, 1979, vol. 18, 5294-5299 [0016]