

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 583**

51 Int. Cl.:

G01N 27/447 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2001** **E 09016061 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015** **EP 2172771**

54 Título: **Método para electroforesis capilar de alta resolución a alta velocidad**

30 Prioridad:

25.09.2000 US 668960

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

09.06.2015

73 Titular/es:

**APPLIED BIOSYSTEMS, LLC (100.0%)
5791 VAN ALLEN WAY
CARLSBAD, CA 92008, US**

72 Inventor/es:

**VOSS, KARL O. y
LAU, ALDRICH, N., K.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 537 583 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para electroforesis capilar de alta resolución a alta velocidad

Campo de la invención

Las invenciones se refieren a composiciones y elementos de electroforesis capilar para la separación de analitos por electroforesis capilar. Se proporcionan además kits para la separación de analitos por electroforesis capilar.

Antecedentes de la invención

La electroforesis capilar se ha aplicado extensamente como técnica analítica debido a varias ventajas técnicas: (i) los capilares tienen relaciones superficie a volumen elevadas que permiten una disipación de calor más eficiente que, a su vez, permiten utilizar campos eléctricos elevados para separaciones más rápidas; (ii) la técnica requiere volúmenes de muestra mínimos; (iii) se obtiene resolución superior de la mayoría de los analitos; y (iv) la técnica es susceptible de automatización, véase, p. ej., Camilleri, editor, *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice* (CRC Press, Boca Raton, 1993); y Grossman *et al.*, editores, *Capillary Electrophoresis* (Academic Press, San Diego, 1992). Debido a estas ventajas, ha habido gran interés en aplicar la electroforesis capilar a la separación de biomoléculas, sobre todo de ácidos nucleicos. La necesidad de una rápida y precisa separación de ácidos nucleicos, específicamente ácido desoxirribonucleico (ADN) surge en el análisis de los productos de la reacción en cadena de polimerasa (RCP) y la secuenciación del ADN, véase, p. ej., Williams, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 4: 227-232 (1992); Drossman *et al.*, *Anal. Chem.*, 62: 900-903 (1990); Huang *et al.*, *Anal. Chem.*, 64: 2149-2154 (1992); y Swerdlow *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 18: 1415-1419 (1990).

Ya que la relación de carga a resistencia a la fricción es la misma para diferentes tamaños de polinucleótidos en solución libre, la separación electroforética de polinucleótidos por lo general conlleva un medio de cribado. Los medios de cribado iniciales de elección fueron por lo general geles reticulados, pero en algunos casos los problemas de estabilidad y producción han conducido al examen de medios poliméricos de cribado líquidos sin gel, tales como poliacrilamida lineal, hidroxialquilcelulosa, agarosa y acetato de celulosa, y similares, p. ej., Bode, *Anal. Biochem.*, 83: 204-210 (1977); Bode, *Anal. Biochem.*, 83: 364-371 (1977); Bode, *Anal. Biochem.*, 92: 99-110 (1979); Hjerten *et al.*, *J. Liquid Chromatography*, 12: 2471-2477 (1989); Grossman, patente de EE.UU. nº 5.126.021; Zhu *et al.*, patente de EE.UU. nº 5.089.111; Tietz *et al.*, *Electrophoresis*, 13: 614-616 (1992).

Otro factor que puede complicar las separaciones por electroforesis capilar es el fenómeno de la electroendosmosis. Este fenómeno, a veces denominado electroosmosis o flujo electroendosmótico (FEO), es el flujo fluido en un capilar provocado por un campo eléctrico. Este fenómeno ha impedido la aplicación de la electroforesis capilar a situaciones donde por lo general se buscan separaciones a alta resolución, tales como en el análisis de fragmentos de secuenciación de ADN. El fenómeno puede surgir en electroforesis capilar cuando la pared interna del capilar contiene cargas inmovilizadas. Dichas cargas pueden dar lugar a la formación de una capa móvil de contraiones que, a su vez, se desplaza en presencia de un campo eléctrico para crear un flujo voluminoso de líquido. Desgraciadamente, la magnitud del FEO puede variar dependiendo de una multitud de factores, como por ejemplo la variación en la distribución de cargas, la adsorción selectiva de componentes del analito y/o el medio de separación, el pH del medio de separación y similares. Debido a que esta variabilidad puede reducirse la capacidad para resolver bandas de analito estrechamente espaciadas, se han hecho muchos intentos para controlar directa o indirectamente dicho flujo. Los intentos han incluido recubrimiento covalente o modificación de la pared interna del capilar para suprimir grupos cargados, utilización de polímeros de alta viscosidad, ajuste de pH y/o concentración del tampón, utilización de un medio de separación de gel para recubrir covalentemente la pared del capilar, y la aplicación de un campo eléctrico radial a los ejes del capilar.

Actualmente, la electroforesis capilar de fragmentos de ácido nucleico se lleva a cabo con frecuencia utilizando capilares recubiertos previamente. Los tubos capilares recubiertos previamente por lo general son costosos de fabricar, tienen una duración limitada, y pueden estar supeditados a problemas de reproducibilidad. Estos problemas son especialmente importantes en electroforesis capilar a gran escala utilizando una serie de capilares múltiples en paralelo.

El documento US nº 5 552 028 A describe polímeros adsorbentes de sílice hidrosolubles sin carga para suprimir el flujo electroendosmótico y para reducir interacciones analito-pared en electroforesis capilar. Una publicación de Radko *et al.* (*Journal of Chromatography*, 848(1-2):443-455 (1999)) trata de selectividad, extensión del pico y resolución en electroforesis de zona capilar de partículas rígidas de tamaño submicrónico en solución se poliacrilamida. La separación de oligonucleótidos y fragmentos de ADN por electroforesis capilar en capilares dinámica y permanentemente recubiertos, utilizando un copolímero de acrilamida y β -D-glucopiranosido como matriz de baja viscosidad con alta capacidad de cribado, es descrita por Chiari *et al.*, *Electrophoresis* 19(18):3154-3159 (1998).

Compendio de la invención

La presente invención definida por las reivindicaciones proporciona composiciones para la separación de analitos en una muestra. Por ejemplo, resolución monobásica de fragmentos de secuenciación de ADN u otros fragmentos de

polinucleótido. Se proporcionan composiciones como las reivindicadas que comprenden un componente del cribado, que comprenden al menos un polímero de acrilamida no reticulado, de alto peso molecular y baja viscosidad y un componente de interacción con la superficie, que comprende al menos un polímero no reticulado; las composiciones no comprenden un gel de polímero reticulado.

- 5 En otro aspecto, la presente invención comprende un elemento de electroforesis capilar. El elemento de electroforesis capilar según se reivindica comprende un capilar no recubierto en el que se inserta una composición para la separación de analitos. La composición situada dentro del capilar comprende un componente del cribado y un componente de interacción con la superficie.

10 Se proporcionan además kits para la separación de analitos por electroforesis capilar, que comprenden una de las composiciones reivindicadas.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 ilustra los datos de la resolución monobásica recogidos por electroforesis capilar de escalas de peso molecular de polinucleótido marcado utilizando temperatura de serie de 50 °C y composiciones que comprenden componentes de cribado de polímero de acrilamida no reticulado con pesos moleculares medios de aproximadamente 744.000 daltons (Da) (0,75 M); 1.376.000 Da (1,4 M); 2.015.000 Da (2,0 M); 2.517.000 Da (2,5 M); o 6.377.000 Da (6,4 M). La Figura 1A (parte superior) presenta un gráfico de la resolución monobásica frente al tamaño del fragmento, medida en bases nucleotídicas. La Figura 1B presenta un gráfico del tiempo de migración de fragmentos, en minutos, frente al tamaño del fragmento, medido en bases nucleotídicas.

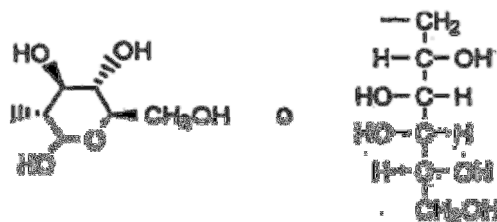
20 Figura 2 ilustra los datos de la resolución monobásica recogidos por electroforesis capilar de escalas de polinucleótido marcado utilizando las mismas cinco composiciones descritas en la Figura 1, pero en una serie de temperatura de 60 °C. La Figura 2A (parte superior) presenta un gráfico de la resolución monobásica frente al tamaño del fragmento, medida en bases nucleotídicas. La Figura 2B presenta un gráfico del tiempo de migración de fragmentos, en minutos, frente al tamaño del fragmento, medido en bases nucleotídicas.

Figura 3 ilustra los datos de la resolución monobásica recogidos por electroforesis capilar de escalas de polinucleótido marcado utilizando las mismas cinco composiciones descritas en la Figura 1, pero en una serie de temperatura de 70 °C. La Figura 3A (parte superior) presenta un gráfico de la resolución monobásica frente al tamaño del fragmento, medida en bases nucleotídicas. La Figura 3B presenta un gráfico del tiempo de migración de fragmentos, en minutos, frente al tamaño del fragmento, medido en bases nucleotídicas.

Figura 4 ilustra el límite de resolución monobásica observado al utilizar composiciones que comprende los cinco componentes del cribado descritos en la figura 1 en la serie de temperaturas de 50 °C, 60 °C o 70 °C. Los límites de resolución monobásica se estimaron por inspección visual de los datos de la resolución monobásica representados en las figuras 1, 2 y 3.

Definiciones

"Acrilamida" y "monómero de acrilamida" se refiera a una estructura que tiene la fórmula $H_2C=CR-C(=O)NR_1R_2$, donde R puede ser -H o -CH₃, R₁ y R₂ pueden ser independientemente -H, -CH₃, -(CH₂)_xOH, -CH₂CH(OH)(CH₂)_yOR₃, -CH(CH₂OH)CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_p-OR₃, -CH₂CONH₂,



40 y R₃ puede ser independientemente -H, -CH₃ o -CH₂CH₃. Los valores de x e y oscilan de 1 a 3 y el valor de p oscila entre 1 y 200.

"Peso molecular medio" se refiera al peso molecular medio ponderado (M_w) de un conjunto de muestras formado por especies de polímero que tienen una diversidad de pesos moleculares. Esta cantidad está definida por la ecuación:

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^n n_i \times (M_i)^2}{\sum_{i=1}^n n_i \times M_i}$$

donde n_i indica el número de moléculas de la especie i y M_i es el peso molecular de la especie i^a . Como se emplea en esta memoria, la expresión "peso molecular" se refiere a peso molecular medio ponderado, a menos que se especifique de otra manera.

El término "capilar" como se emplea en la presente memoria, se refiere a un tubo o canal u otra estructura para llevar a cabo la electroforesis que es capaz de soportar un volumen de medio de separación, tal como una composición para separar analitos, como se describe en la presente memoria. La geometría de un capilar puede variar ampliamente y comprende, pero no se limita a, tubos con secciones circulares, rectangulares o de cruz cuadrada, canales, muescas, placas, y similares, y pueden fabricarse por una amplia gama de tecnologías. Una característica importante de un capilar para su utilización con algunas realizaciones de la invención es la relación superficie a volumen de la superficie en contacto con el volumen del medio de separación. Valores elevados de esta relación suelen permitir mejor transferencia de calor procedente del medio de separación durante la electroforesis. Preferiblemente, en algunas realizaciones, se emplean valores comprendidos en el intervalo de aproximadamente $0,8$ a $0,02 \mu\text{m}^{-1}$. Éstos corresponden a las relaciones superficie a volumen de capilares tubulares con secciones transversales circulares con diámetros interiores comprendidos en el intervalo de aproximadamente $5 \mu\text{m}$ a aproximadamente $200 \mu\text{m}$. La expresión "capilar no recubierto" significa que el capilar está sin recubrir antes de la introducción de composiciones de la invención, es decir, no recubierto covalentemente antes de su uso. En algunas realizaciones, los capilares para uso con la invención se hacen de sílice, sílice fundida, cuarzo, vidrio silicatado, tales como vidrio de borosilicato, vidrio de fosfato, vidrio que contiene alúmina y similares, u otros materiales similares a la sílice. En algunas realizaciones se utilizan capilares formados en sustratos de plástico. Los sustratos de plástico pueden comprender, por ejemplo, poliacrilatos y poliolefinas, tal como LUCRYL[®] (BASF, Alemania), TPX[™] (Matsui Plastics, Inc., White Plains, NY), TOPAS[®] (Hoechst Celanese Corp., Summit, NJ) y ZEONOR[®] (Zeon Chemicals, Louisville, KY). Descripciones de sustratos de plástico para capilares acanalados pueden encontrarse, entre otros sitios, en la patente de EE.UU. nº 5.750.015.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "composición para la separación de analitos" comprende un componente del cribado de alto peso molecular y baja viscosidad y opcionalmente, un componente de interacción de la superficie. Dichas composiciones son especialmente útiles para la separación de polinucleótidos, u otras biomoléculas que tienen diferentes tamaños pero similares o idénticas relaciones de carga a resistencia a la fricción en solución libre utilizando electroforesis capilar. El especialista experto apreciará que un componente con carga, o electrolito se suele incluir en dichas composiciones. El componente con carga suele formar parte de un sistema tamponante para mantener el medio de separación a un pH constante. Las composiciones para separar analitos contienen uno o más polímeros de acrilamida no reticulados.

La expresión "fragmentos de secuenciación de ADN" se refiere a polinucleótidos de ADN generados para obtener información de secuencias acerca de una secuencia objetivo seleccionada de ADN. Dichos fragmentos pueden generarse con enzimas, p. ej., por el método dideoxi de Sanger, o químicamente, p. ej., por el método de Maxam y Gilbert. Los fragmentos pueden originar en una sola reacción de secuenciación (p. ej., una reacción de secuenciación dideoxi llevada a cabo en presencia de trifosfato de dideoxicitidina), o de más de una reacción de secuenciación (p. ej., de cuatro reacciones de secuenciación dideoxi diferentes que comprenden cebadores en 5 debidamente marcados para identificar la base del terminal 3' de cada fragmento).

"Polímero" se emplea en su sentido tradicional, haciendo referencia a una molécula grande compuesta de subunidades monoméricas u oligoméricas más pequeñas unidas por enlaces covalentes para formar una cadena. Un "homopolímero" es un polímero formado solamente por una unidad de repetición monomérica. Un "copolímero" hace referencia a un polímero formado por dos o más tipos de unidad de repetición monomérica. Los polímeros lineales están compuestos de unidades de repetición monomérica unidas en una longitud continua para formar moléculas de polímeros. Los polímeros ramificados son similares a los polímeros lineales pero tienen cadenas laterales que sobresalen en varios puntos de las ramas a lo largo del polímero principal. Los polímeros en forma de estrella son similares a los polímeros ramificados excepto que varias cadenas laterales radian a partir de un punto de una sola rama, dando como resultado un aspecto con forma de estrella o de rueda y radio.

Los polímeros reticulados contienen, por ejemplo, moléculas de polímero que están unidas por enlace covalente entre sí en puntos distintos de sus extremos. La reticulación puede ocurrir durante el proceso de polimerización en presencia de agentes de reticulación. En algún grado de reticulación, conocido como punto de gel, se produce gelificación. En el punto de gel, se forma un gel visible o polímero insoluble y el sistema tiende a perder fluidez. Este gel de polímero reticulado, que corresponde a la formación de una red de moléculas de polímero que están reticuladas para formar una molécula macroscópica, es insoluble en todos los disolventes, incluso a temperaturas elevadas. La exposición de los polímeros de acrilamida y de los geles de polímero puede encontrarse en referencias conocidas en la técnica, por ejemplo, Odian, Principles of Polymerization, tercera Edición (Wiley Interscience, 1991).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "polímero de acrilamida no reticulado" se refiere a moléculas de polímero que comprenden monómeros de acrilamida, con o sin ramificación, pero excluyendo a las moléculas de polímero que están reticuladas conjuntamente. Por lo tanto, un polímero no reticulado no contiene moléculas de polímero que están unidas a puntos distintos de su extremo, y no experimentan gelificación durante la polimerización.

El término "polinucleótido" tal como se utiliza en la presente memoria se refiera a polímeros lineales de monómeros nucleosídicos naturales o modificados, como por ejemplo desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, formas α -anómicas de cadena sencilla o doble de los mismos, y similares. Normalmente, los monómeros nucleosídicos están unidos por enlaces fosfodiéster o uno de sus análogos para formar polinucleótidos, sin embargo, además se contemplan los ácidos péptidonucleicos. En algunas realizaciones, los polinucleótidos varían de tamaño desde unas pocas unidades monoméricas, p. ej., 20, a varios millares de unidades monoméricas. Siempre que un polinucleótido está representado por una secuencia de letras, tal como "ATGCCTG," debe entenderse que los nucleótidos están en el orden 5' $\Rightarrow$ 3' de izquierda a derecha y que "A" indica desoxiadenosina, "C" indica desoxicitidina, "G" indica desoxiguanosina y "T" indica desoxitimidina, a menos que se indique de otra manera. Los análogos de enlaces fosfodiéster comprenden fosfotioato, fosfoditioato, fosfoseleniato, fosfodiseleniato, fosforoanilitioato, fosforanilidato, fosforamidita y similares.

La expresión "resolución monobásica" ($R_{\text{monobásica}}$) se refiera a la medición de la resolución entre dos picos que resultan de dos fragmentos de polinucleótido que difieren en tamaño por un nucleótido. La resolución monobásica puede determinarse matemáticamente utilizando la fórmula:

$$R_{\text{monobásica}} = 2 \times \frac{t_n - t_{n+1}}{W_n + W_{n+1}}$$

donde t_n es el tiempo de migración de un fragmento de polinucleótido que tiene n nucleótidos de longitud; t_{n+1} es el tiempo de migración de un fragmento de polinucleótido que tiene $n+1$ nucleótidos de longitud; W_n es la anchura total en la base del pico del fragmento de polinucleótido de n nucleótidos de longitud; y W_{n+1} es la anchura total en la base del pico del fragmento de polinucleótido de $n+1$ nucleótidos de longitud; "Tiempo de migración" es el tiempo que tarda un fragmento de polinucleótido en recorrer la longitud del capilar o microcanal, es decir, desde el punto de inyección al detector.

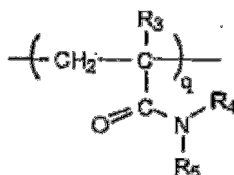
La expresión "límite de resolución monobásica" se refiera al tamaño de un fragmento de polinucleótido donde el valor de la resolución monobásica disminuye por debajo de 0,58 en un sistema concreto.

Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

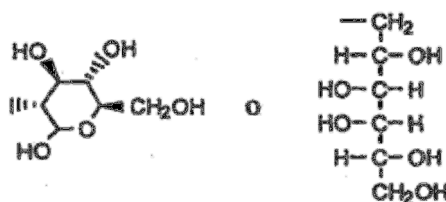
En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones como las reivindicadas que comprenden un componente del cribado de polímeros de acrilamida no reticulado de alto peso molecular y baja viscosidad, que comprenden además un componente de interacción con la superficie, tal como polidimetilacrilamida (pDMA). Además, las composiciones de la invención no comprenden un gel de polímero reticulado.

Una ventaja de las composiciones de la invención es que los polímeros de acrilamida no reticulados con un peso molecular entre 1.000.000 Da y 3.000.000 Da proporcionan ventajas inesperadas cuando se utilizan en los métodos descritos y los elementos de electroforesis en comparación con composiciones electroforéticas conocidas. Los polímeros lineales de acrilamida con pesos moleculares inferiores a aproximadamente 1.000.000 Da proporcionan resolución más deficiente que las composiciones de la invención. Los polímeros lineales de acrilamida con pesos moleculares superiores a aproximadamente 3.000.000 Da presentan problemas de viscosidad y son difíciles de manipular, p. ej., para insertar en los capilares y retirarlos de ellos. Por lo tanto, las composiciones de la invención tienen una viscosidad a 25°C menor de 1.000 mPa·s, y aún más preferiblemente menor de 600 mPa·s. Los polímeros no reticulados de acrilamida pueden incluir, por ejemplo, polímeros lineales tales como poli(acrilamida) (LPA), polímeros ramificados y polímeros en forma de estrella.

El componente del cribado puede comprender polímeros hidrófilos de acrilamida N-sustituida (es decir, el sustituyente está unido al nitrógeno de la acrilamida) distintos de poli(acrilamida). Los polímeros hidrófilos ilustrativos de acrilamida N-sustituida comprenden los homopolímeros siguientes y sus copolímeros:

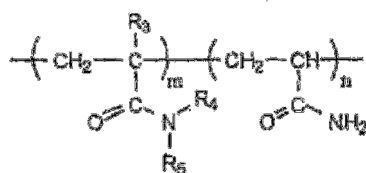


donde R_3 puede ser -H o -CH₃, R_4 y R_5 pueden ser independientemente -H, -CH₃, -(CH₂)_xOH, -CH₂CH(OH)(CH₂)_yOR₆, -CH(CH₂OH)CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_pOR₆, -CH₂CONH₂,



y R_6 puede ser independientemente -H, -CH₃ o -CH₂CH₃. Los valores de x e y oscilan de 1 a 3, el valor de p oscila entre 1 y 200 y q es directamente proporcional al peso molecular del polímero y oscila entre unos pocos centenares y centenas de millares. El peso molecular medio oscila entre 100.000 Da y 25.000.000 Da, preferiblemente de 1.000.000 Da a 3.000.000 Da.

Un copolímero hidrófilo ilustrativo de acrilamida N-sustituida adecuado para su utilización como componente del cribado en las composiciones descritas es:



donde, R_3 , R_4 , R_5 y el peso molecular de los copolímeros, son como se describió anteriormente, y la relación de m:n oscila entre aproximadamente 100:1 y aproximadamente 1:100.

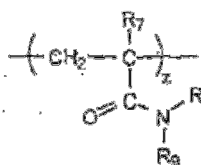
En algunas realizaciones, el componente del cribado comprende un polímero de acrilamida no reticulado que tiene un peso molecular medio comprendido entre aproximadamente 1.000.000 Da y 3.000.000 Da. Los polímeros de acrilamida no reticulados con pesos moleculares medios de 1.000.000 Da o mayores proporcionan mejor resolución. Los polímeros de acrilamida no reticulados con pesos moleculares medios de 3.000.000 Da o menos proporcionan mejor fluidez, haciendo a dichos polímeros más fáciles de manipular y cargar en los capilares no recubiertos.

El componente de interacción con la superficie puede comprender uno o más polímeros no reticulados. Dichos componentes pueden pertenecer a una variedad de clases químicas, tales como las descritas en las siguientes referencias: Molyneux, *Water-Soluble Synthetic Polymers: Properties and Behavior*, volúmenes I y II (CRC Press, Boca Raton, 1982); Davidson, Editor, *Handbook of Water-Soluble Gums and Resins* (McGraw-Hill, Nueva York, 1980); Franks, editor, *Water: A Comprehensive Treatise* (Plenum Press, Nueva York, 1973); y similares.

Ejemplos de polímeros no reticulados que puede ser adecuados como componentes de interacción con la superficie comprenden polividona, poliacrilamida N,N-disustituida, poliacrilamidas N-monosustituidas y similares. En algunas realizaciones el componente de interacción con la superficie comprende poli(N,N-dimetilacrilamida) (pDMA) en el intervalo 0,05-0,5%, preferiblemente 0,1-0,4%, y aún más preferiblemente 0,2%.

Ejemplos de N-sustituyentes de las poliacrilamidas N-sustituidas comprenden alquilo C₁ a C₁₂; alquilo C₁ a C₁₂ halo-sustituido; alquilo C₁ a C₁₂ metoxi-sustituido; alquilo C₁ a C₁₂ hidroxil-sustituido y similares. Preferiblemente, el sustituyente halo es fluoro y el alquilo C₁ a C₁₂ hidroxil-sustituido está monosustituido. Se entiende que los sustituyentes monoméricos anteriores se seleccionan normalmente de manera que el polímero resultante sea soluble en agua. Por ejemplo, el monómero que contiene alquilo C₁₂ está con frecuencia solamente presente como componente fraccionario pequeño de un copolímero. Más preferiblemente, se seleccionan sustituyentes ilustrativos del grupo consistente en alquilo C₁ a C₃; alquilo C₁ a C₃ halo-sustituido; alquilo C₁ a C₃ metoxi-sustituido y alquilo C₁ a C₃ hidroxil-sustituido. Dichos polímeros se sintetizan por técnicas convencionales, p. ej., como las descritas en Odian, *Principles of Polymerization*, tercera edición (John Wiley, Nueva York, 1991), Glass, editor, *Water-Soluble Polymers: Beauty and Performance* (*Adv. Chem. Ser.*, n° 213, American Chemical Society, Washington, D.C., 1986) y Molyneux, *Water-Soluble Polymers: Properties and Behavior*, Vols. I y II (CRC Press, Boca Raton, FL, 1982).

Un componente de interacción con la superficie preferido es pDMA. Según algunas realizaciones, pueden utilizarse otros polímeros hidrófobos aparte de pDMA como componente de interacción con la superficie. Éstos comprenden, según la presente invención, los homopolímeros siguientes: acrilamidas N-alquil-sustituidas y sus copolímeros,



donde R_7 puede ser -H o -CH₃, R_8 y R_9 puede ser independientemente -H, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂ o -CH₂CONH₂, y z oscila entre aproximadamente 2000 y 50,000. El peso molecular medio oscila entre 200.000 Da y 5,000,000 Da, preferiblemente entre 300,000 Da y 2,500,000 Da.

- 5 En algunas realizaciones, los polímeros que comprenden el componente de interacción con la superficie del medio de separación pueden estar presentes a una concentración desde aproximadamente 0,001% a aproximadamente 10% peso:peso (p:p). Preferiblemente, dichos polímeros están presentes en una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1% p:p.

- 10 En algunas realizaciones, la composición puede comprender otros componentes tales como desnaturalizantes. Dichos desnaturalizantes pueden ser útiles cuando se desee evitar la formación de estructuras dobles o secundarias, por ejemplo, con analitos que comprenden polinucleótidos. Los desnaturalizantes ilustrativos comprenden formamida, p. ej., 40-90%, urea, p. ej., 6-8 M, lactamas disponibles en el mercado, tales como pirrolidona, 2-pirrolidinona y similares. En algunas realizaciones, los desnaturalizantes comprenden urea, formamida o 2-pirrolidinona, sola o en combinación. La orientación para la utilización de desnaturalizantes en electroforesis puede encontrarse en referencias de biología molecular bien conocidas, p. ej., Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989).

- 15 De acuerdo con la presente invención, la viscosidad de la composición es inferior a 1.000 mPa·s a 25 °C o inferior a 600 mPa·s a 25 °C. Todas las mediciones de viscosidad se hicieron utilizando un viscosímetro BrookField Model DV-II (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA). Para las composiciones con viscosidades inferiores a 4000 mPa·s, huso n° 18 se utilizó con el adaptador para muestras pequeñas. La velocidad del huso fue de 3 rpm para muestras con una viscosidad inferior a 1000 mPa·s, 1,5 rpm para muestras con viscosidad entre 1000 y 2000 mPa·s, y 0,6 rpm para muestras con una viscosidad entre 2000 y 4000 mPa·s. Para muestras de viscosidad superior a 4000 mPa·s se necesitan un huso más pequeño y diferente adaptador.

- 20 Los aparatos para llevar a cabo la electroforesis capilar son muy conocidos. Se dispone de muchas referencias que describen aparatos básicos y varios instrumentos de electroforesis capilar están disponibles en el mercado, p. ej., los instrumentos modelo 270A, 310, 3100 o 3700 de Applied Biosystems (Foster City, CA). Ejemplos de referencias que describen aparatos de electroforesis capilar y su operación comprenden Jorgenson, Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 4: 179-190 (1992); Colburn *et al.*, Applied Biosystems Research News, número 1 (invierno de 1990); Grossman *et al.* (citado anteriormente); y similares.

- 25 Preferiblemente, se emplea un sistema tamponante para controlar el pH y como componente con carga. Ejemplos de tampones comprenden: soluciones acuosas de ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico, acético o fórmico; iones dipolares, tales como TES ácido (N-tris[hidroximetil]-2-aminoetansulfónico, BICINE (N,N-bis[2-hidroxietil]glicina, ACES ácido (N-[2-acetamido]-2-aminoetanesulfónico), TAPS ácido (N-tris[hidroximetil]metil-3-aminopropansulfónico) o glicilglicina; ácidos inorgánicos, tal como ácido fosfórico; y bases orgánicas, tales como tampones de Tris (Tris[hidroximetil]aminometano), p. ej., disponible en Sigma o Calbiochem. La concentración del tampón puede variar ampliamente, por ejemplo entre aproximadamente 1 mM y 1 M. Ejemplos de soluciones tampón para su utilización en métodos de electroforesis capilar comprenden: (i) TAPS 100 mM, urea 7 M, pH 8,0; o (ii) TTE (50 mM Tris - 50 mM TAPS), urea 7 M, pH 8,0.

- 30 En una aplicación, los polinucleótidos bicatenarios, p. ej., los fragmentos de ADN procedentes de amplificaciones de RCP o RCL, productos de digestión enzimática, o similares, se separan por los protocolos habituales, o los protocolos sugeridos por el fabricante donde se emplea un instrumento de electroforesis capilar comercial, p. ej., un instrumento modelo 270-HT, 310, 3100 o 3700 (Applied Biosystems, Foster City). Una excepción a dichos protocolos habituales o sugeridos es que se emplean composiciones y/o elementos de electroforesis capilar de la invención. Un método para separar analitos por electroforesis capilar comprende la inserción en un capilar no recubierto, que tiene un primer y un segundo extremo y una composición según la presente invención. Una muestra de analitos de diferentes tamaños se carga en el capilar y se aplica un campo eléctrico entre el primer y segundo extremos del capilar. Los analitos de diferentes tamaños en la muestra migran a través de la composición dentro del capilar, separando los analitos. Puede utilizarse un capilar recubierto previamente.

- 35 El método puede emplearse para la secuenciación de ADN. Dicha secuenciación conlleva la separación de polinucleótidos monocatenarios preparados por protocolos de secuenciación de ADN. Pueden encontrarse descripciones detalladas de protocolos de secuenciación de ADN, entre otros lugares, en Automated DNA Sequencing Chemistry Guide (Applied Biosystems, parte n° 4305080); Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989); Ausbel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, 1993, que incluye suplementos durante Agosto de 2000); o similares.

- 40 Una característica importante de algunos protocolos de secuenciación de ADN actualmente disponibles es la generación de una "serie anidada" o "escala" de polinucleótidos monocatenarios o fragmentos de secuenciación de ADN, que pueden separarse por tamaño. Los métodos de terminación de la cadena de secuenciación de ADN pueden comprender (1) proporcionar un cebador oligonucleotídico y un ácido nucleico plantilla que contiene, un ácido nucleico diana cuya secuencia debe determinarse, (2) hibridar el cebador oligonucleotídico al ácido nucleico

plantilla, (3) extender el cebador con una ácido nucleico polimerasa, p. ej., T7 ADN polimerasa, Sequenase™, transcriptasa inversa, o similares, en una mezcla de reacción que contiene precursores de trifosfato de nucleósido y al menos un nucleótido de terminación de la cadena para formar una serie anidada de poblaciones de fragmentos de ADN, de tal manera que cada fragmento más corto de ADN es una subsecuencia de cada fragmento más largo de ADN y de tal manera que cada fragmento de ADN del mismo tamaño termina con el mismo nucleótido de terminación de cadena, (4) separar las poblaciones de fragmentos de ADN según tamaño, y (5) identificar el nucleótido de terminación de cadena asociada a cada población de fragmentos de ADN. El especialista experto apreciará, sin embargo, que estén disponibles muchas variaciones en los métodos de secuenciación de ADN.

Las plantillas aceptables comprenden las expuestas en la técnica, p. ej., Technical Manual for ABI Model 370A DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Por ejemplo, la secuencia diana puede insertarse en un vector de clonación adecuado, tal como la forma repetitiva de un vector de clonación M13, que se propaga a continuación para ampliar el número de copias de la secuencia diana. La forma monocatenaria de M13 se aísla para su empleo como plantilla. Además, puede proporcionarse una plantilla por reacción en cadena de la polimerasa (RCP) como se da a conocer en la técnica, p. ej., Innis *et al.*, (citado anteriormente); Wilson *et al.*, Biotechniques, Vol. 8, págs. 184-189 (1990); Gyllensten, Biotechniques, Vol. 7, págs. 700-708 (1989); y similares. Después de la ampliación, la plantilla puede utilizarse en la reacción o reacciones de polimerización ya sea en fase líquida o unida a un soporte en fase sólida, p. ej., como se da a conocer Stahl *et al.*, Nucleic Acids Research, Vol. 16, págs. 3025-3038 (1988); Hultman *et al.*, Nucleic Acids Research, Vol. 17, págs. 4937-4946 (1989); o similares.

Una vez se generan los fragmentos de ADN de la serie anidada, éstos se separan por electroforesis capilar utilizando las composiciones, elementos de electroforesis capilar o métodos de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Preparación de un polímero de acrilamida no reticulado mediante polimerización en solución

Se preparó una solución que contiene 94,50 g de agua destilada (18 M ohm-cm) y 32,02 g (0,129 mol) de una solución de acrilamida al 28,57% en peso (Bio-Rad, Hercules, CA) en un matraz de fondo redondo de tres bocas de 500 ml equipado con una paleta de Teflon de 5 cm (2") para agitación mecánica, un tubo de purga y un termómetro. Se barboteó helio ultrapuro (99,99%) en la solución, con agitación mecánica constante, a una ritmo de 150 ml/min durante 120 minutos, para desoxigenar la solución. A esta solución desoxigenada se añadieron con jeringuillas, 1,0 ml (13,06 mmol) de 2-propanol (isopropanol) y 4,0 ml (0,35 mmol) de una solución de persulfato amónico al 1,99 % en peso (99,99% puro, Aldrich) . El matraz se sumergió en un baño de aceite a 50±1 °C durante 120 minutos con agitación mecánica constante a 150 rpm y purga de helio a 150 ml/minuto. La reacción se enfrió mediante la adición de 200 ml de agua destilada con agitación y se barboteó con aire durante 10 minutos. La solución en agua clara resultante se colocó en una membrana de celulosa Spectra/Por-7 regenerada en el umbral de peso molecular 50 K (MWCO) y dializada frente a 17,0 litros (4,5 galones) de agua destilada (18 M ohm-cm) durante tres días. El agua se cambió dos veces al día. La solución dializada se liofilizó y se obtuvieron 8,41 g de polímero de acrilamida no reticulado (92% de rendimiento).

Este polímero se caracterizó por cromatografía de penetración en gel (CPG) utilizando patrones primarios de poli(acrilamida) de American Polymer Standards (Mentor, Ohio). Se llevaron a cabo separaciones a 30 °C con tres columnas cromatográficas en serie, una columna Ultrahydrogel (Waters Corp., Milford, MA) de 2.000 Angstrom, una columna Ultrahydrogel de 1.000 Angstrom y una columna de control, utilizando NaNO₃ 0,05 M, a un caudal de 1 ml/min. El volumen de inyección fue de 100 µl y el detector fue un Knauer DRI 8X. Este polímero de acrilamida no reticulado se halló que tiene un M_n de 589 kilodaltons (kDa), un M_w de 2.517 kDa (2,5 M en las figuras 1-3) y una polidispersidad de 4,23. El M_w, determinado por dispersión de la luz en modo discontinuo, fue de 1.936 kDa (Prep. nº 1 en Table 1). El especialista experto apreciará que el peso molecular observado de un polímero puede variar dependiendo del método de caracterización. Los pesos moleculares mencionados en las reivindicaciones adjuntas están basados en el método CPG descrito anteriormente.

El polímero se secó al vacío a 40 °C durante al menos 4 horas antes de su uso.

Ejemplo 2:

Preparación de otro polímero de acrilamida no reticulado por polimerización en solución

Se preparó un segundo polímero de acrilamida no reticulado como se describe en el ejemplo 1, excepto que se añadieron 2,0 ml (26,12 mmol) de isopropanol a la solución desoxigenada. El especialista experto sobreentenderá que el isopropanol sirve como agente de transferencia de cadenas, limitando el peso molecular del polímero a medida que se prepara. Por lo tanto, al variar la cantidad de isopropanol, el peso molecular del polímero puede alterarse.

La solución en agua clara resultante se dializó y liofilizó, como en el ejemplo 1. El rendimiento fue de 9,0 g de polímero de acrilamida no reticulado (98% de rendimiento). El polímero se caracterizó por cromatografía de

penetración en gel y se halló que tiene un M_n de 310 kDa, un M_w de 1.376 kDa (1,4 M en las figuras 1-3) y una polidispersidad de 4,40. El M_w determinado por dispersión de la luz en modo discontinuo fue de 975 kDa. (Prep. nº 2 en la Table 1).

- 5 Siguiendo el procedimiento de polimerización en la solución descrito en los ejemplos 1 y 2, se prepararon más polímeros de acrilamida no reticulados con diferentes pesos moleculares variando la concentración de iso-propanol (véase la Table 1, Prep. nºs 1-4).

Tabla 1. Preparaciones de polímero de acrilamida no reticulado.

Prep. nº	Relación molar propanol]:[acrilamida]	[iso-	Rendimiento (%)	Pm (por lotes modo dispersión de la luz)	Pm (método GPC)
1	0,101		92,0	1.936 kDa	2.517 kDa (2,5 M)
2	0,203		98,0	975 kDa	1.376 kDa (1,4 M)
3	0,112		98,0	1.325 kDa	2.015 kDa (2,0 M)
4	0,406		82,0	697 kDa	744 kDa (0,75 M)
5	N/A		-	12.500 kDa	6.377 kDa (6,4 M)

Ejemplo 3:

- 10 Preparación de un polímero de acrilamida no reticulado por polimerización en emulsión inversa

Se preparó un quinto polímero de acrilamida no reticulado por polimerización en emulsión inversa (PEI) de la manera siguiente. A un vaso de 1 l de polipropileno se añadieron 100,05 g de Petroleum Special (p.e. 180-220°C, Fluka), 100,01 g de una solución de acrilamida al 28,57% en peso (Bio-Rad), 2,50 g de monooleato de sorbitán (Fluka) y 1,00 ml de una solución al 1,0109% en peso de persulfato amónico (99,99%, Aldrich). La mezcla se emulsionó agitando con una barra magnética de agitación de 5 cm (2") durante 10 minutos a 800 rpm. La emulsión se transfirió a continuación a un matraz de fondo redondo de tres bocas de 1 l equipado con una paleta de agitación de Teflon de 5 cm (2") para agitación mecánica, un tubo de purga y un termómetro. La emulsión se purgó con helio ultra puro (99,99%) a un ritmo de 150 ml/min durante 120 minutos con agitación mecánica constante a 300 rpm. A la emulsión se añadieron 0,010 ml de N,N,N,N-tetrametiletilendiamina (ultrapura, Armesco) empleando una microjeringuilla. El matraz se sumergió en un baño de aceite a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ con agitación mecánica constante a 300 rpm y purga de helio a 150 ml/minuto durante 19 horas. Durante la polimerización, la temperatura de la emulsión nunca sobrepasó los 35°C .

Después de 19 horas, se añadieron 400 ml de acetona y la emulsión se agitó a 300 rpm durante 2 horas. El polímero en polvo se dejó precipitar y se decantó la capa sobrenadante. Al polímero precipitado, se añadieron 300 ml de acetona, el agitador mecánico se sustituyó por una barra magnética de agitación en forma de huevo de 3,8 cm (1,5"), y se agitó a 800 rpm durante 3 horas. El precipitado polímero se convirtió en un polvo muy fino. Este polvo se dejó sedimentar y la capa orgánica se decantó. El polímero en polvo se disgregó con 300 ml de acetona y se agitó a 800 rpm durante otras 3 horas. El polímero se filtró por succión y se enjuagó con una cantidad copiosa de acetona. Se añadieron aproximadamente 5,4 gramos de polvo de polímero húmedo a 450 ml de agua destilada y la solución se agitó con una barra magnética de agitación de 2,5 cm (1") a 75 rpm durante dos días. La mezcla resultante se dividió en cinco tubos Falcon de 50 ml y se removió durante dos días para dar una solución muy viscosa. Esta solución se colocó en una membrana de celulosa regenerada Spectra/Por-7 de 50K MWCO y se dializó frente a 17,0 litros (4,5 galones) de agua destilada (18 M ohm-cm) durante tres días. El agua se cambió dos veces al día. La solución dializada se liofilizó para dar 4,50 g de polímero de acrilamida no reticulado. El P_m , determinado por dispersión de la luz en modo discontinuo, fue de 12.500 kDa, y determinado por cromatografía de penetración en gel, fue de 6.377 kDa (Prep. 5 en Tabla 1; 6,4 M en las figuras 1-3).

Ejemplo 4:

Preparación de componentes de cribado a título de ejemplo

- 40 Se prepararon componentes de cribado a título de ejemplo para su utilización en las composiciones de la invención de la manera siguiente. Se añadieron 1.000 miligramos de cualesquiera de los polímeros de acrilamida no reticulados mostrados en la Tabla 1 a 2,44 gramos de agua, 0,075 gramos de solución de pDMA al 12,3% y 0,5 gramos de Na-TAPS 1 M/tampón EDTA 10mM, pH 8,0. La mezcla se disolvió girando en una rueda giratoria durante la noche. Siguiendo este procedimiento se prepararon, cinco componentes de cribado diferentes, que comprende cada uno un polímero de acrilamida no reticulado diferente mostrado en la Tabla 1.

Ejemplo 5:

Separación de analitos por electroforesis capilar

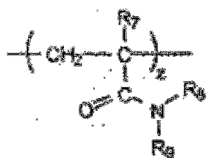
- 5 Se prepararon cinco ejemplos de composiciones para separar analitos combinando uno de los cinco componentes de cribado del ejemplo 4 con pDMA al 0,2%. Se analizaron estas cinco composiciones para evaluar su capacidad para separar analitos de polinucleótidos utilizando un aparato de electroforesis capilar ABI 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA) con capilares de 47cm no recubiertos (36 cm desde el extremo de la inyección al detector). Se prepararon elementos de electroforesis capilar bombeando una de las cinco composiciones a través de capilares no recubiertos durante 400 segundos antes de cada análisis.
- 10 Se disolvieron en formamida analitos, que comprenden fragmentos de secuenciación de ADN marcados con fluorescencia y una escala de secuenciación de ADN monocatenario, incluidos 18 fragmentos de ADN de tamaño conocido, marcados con el colorante fluorescente TET. Esta solución de analito se inyectó en los elementos de la electroforesis capilar a 1,5 kV durante 10 segundos. Se llevaron a cabo separaciones a unas temperaturas de la serie de 50°C, 60°C o 70°C, utilizando un campo eléctrico de 200 V/cm.
- 15 Se midieron la anchura del pico (definida como 4 veces la desviación típica de un pico gaussiano) y el tiempo de migración de los picos de la escala y los fragmentos de secuenciación de ADN. Estos valores se utilizaron para calcular valores de la resolución monobásica. El valor de la resolución monobásica y el tiempo de migración para tres o cuatro series de duplicados llevado a cabo a cada una de las temperaturas de la serie se muestra en las figuras 1, 2 y 3.
- 20 El límite de la resolución monobásica para las cinco composiciones y las tres temperaturas de la serie se muestran en la figura 4. Independientemente de la temperatura de la serie, la resolución monobásica aumenta a medida que el peso molecular del polímero aumenta hasta aproximadamente 3.000.000 Da (véase la figura 4). Cada una de las tres curvas de temperatura de la serie se estabiliza, sin embargo, cuando el peso molecular del polímero aumenta por encima de aproximadamente 3.000.000 Da. Por lo tanto, aumentando el peso molecular del polímero por encima de aproximadamente 3.000.000 Da la resolución monobásica no aumenta sensiblemente. El aumento del peso
- 25 molecular del polímero por encima de aproximadamente 3.000.000 Da, sin embargo, da lugar a un rápido aumento en la viscosidad de la solución de polímero. Por ejemplo, la viscosidad del polímero de 2.500.000 Da utilizado en los ejemplos fue de aproximadamente 500 centipoises, mientras que la viscosidad del polímero de 6.400.000 Da fue mayor de 50.000 mPa·s. Por lo tanto, las composiciones del cribado con pesos moleculares de 1.000.000 a 3.000.000 Da proporcionan resolución monobásica eficiente mientras que conservan suficientemente baja
- 30 viscosidad para la carga capilar.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para separar analitos por electroforesis capilar que comprende:

un componente de cribado que comprende un polímero de acrilamida no reticulado que tiene un peso molecular medio ponderado mayor de 1.000.000 Daltons (Da) y menos de o igual a 3.000.000 Da; y

- 5 un componente de interacción con la superficie que comprende uno o más homopolímeros y copolímeros de acrilamida hidrófobos N-alquil-sustituídos de fórmula:



10 en donde R_7 es -H o $-CH_3$, R_9 y R_8 son independientemente -H, $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2CH_3$, $CH(CH_3)_2$ o $-CH_2CONH_2$, y **caracterizado por que** z oscila entre aproximadamente 2.000 y 50.000, oscilando el peso molecular medio entre 200.000 Da y 5.000.000 Da,

en donde el componente de cribado y el componente de interacción con la superficie son diferentes;

en donde la composición tiene una viscosidad inferior a 1000 mPa·s a 25°C; y en donde la composición no comprende un gel de polímero reticulado.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición tiene una viscosidad inferior a 600 mPa·s a 25°C.

- 15 3. La composición de la reivindicación 1, en donde componente de interacción con la superficie comprende poli(N,N-dimetilacrilamida).

4. La composición de la reivindicación 3, en donde el peso molecular medio ponderado de la poli(N,N-dimetilacrilamida) oscila entre 200.000 Da y 5.000.000 Da.

- 20 5. La composición de la reivindicación 1, en donde uno o más polímeros que comprenden el componente de interacción con la superficie están presentes a una concentración desde aproximadamente 0,001% a aproximadamente 10% peso:peso (p:p).

6. La composición de la reivindicación 1, en donde uno o más polímeros que comprenden el componente de interacción con la superficie están presentes a una concentración desde aproximadamente 0,01% a aproximadamente 1% peso:peso (p:p).

- 25 7. La composición de la reivindicación 1, que comprende además al menos un desnaturalizante que se selecciona del grupo consistente en formamida, urea y 2-pirrolidinona.

8. La composición de la reivindicación 7, en donde al menos un desnaturalizante comprende urea.

9. Un elemento de electroforesis capilar que comprende:

un capilar no recubierto; y

- 30 una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 situada dentro del capilar no recubierto.

10. Un kit para separar analitos por electroforesis capilar que comprende una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

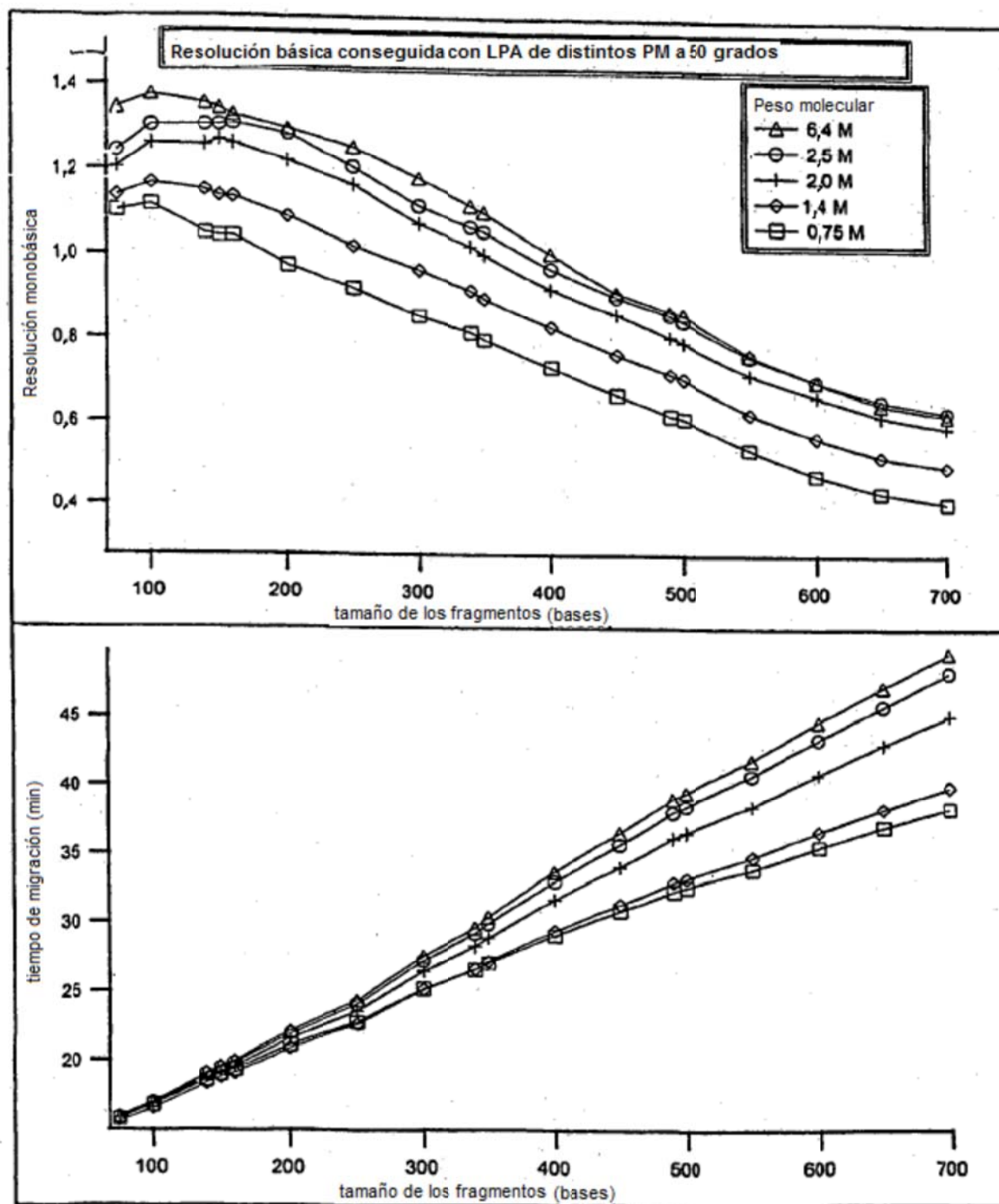


FIGURA 1

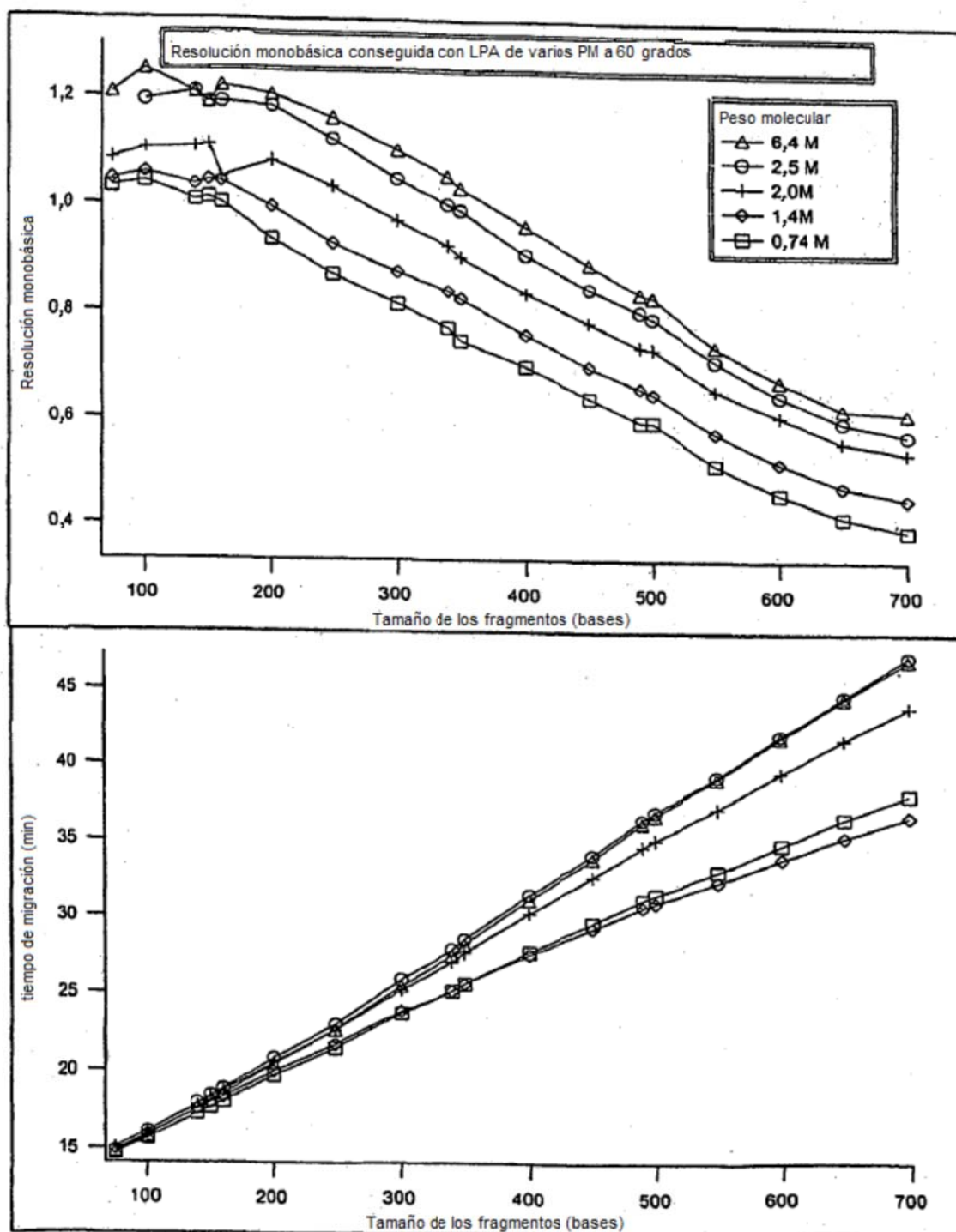
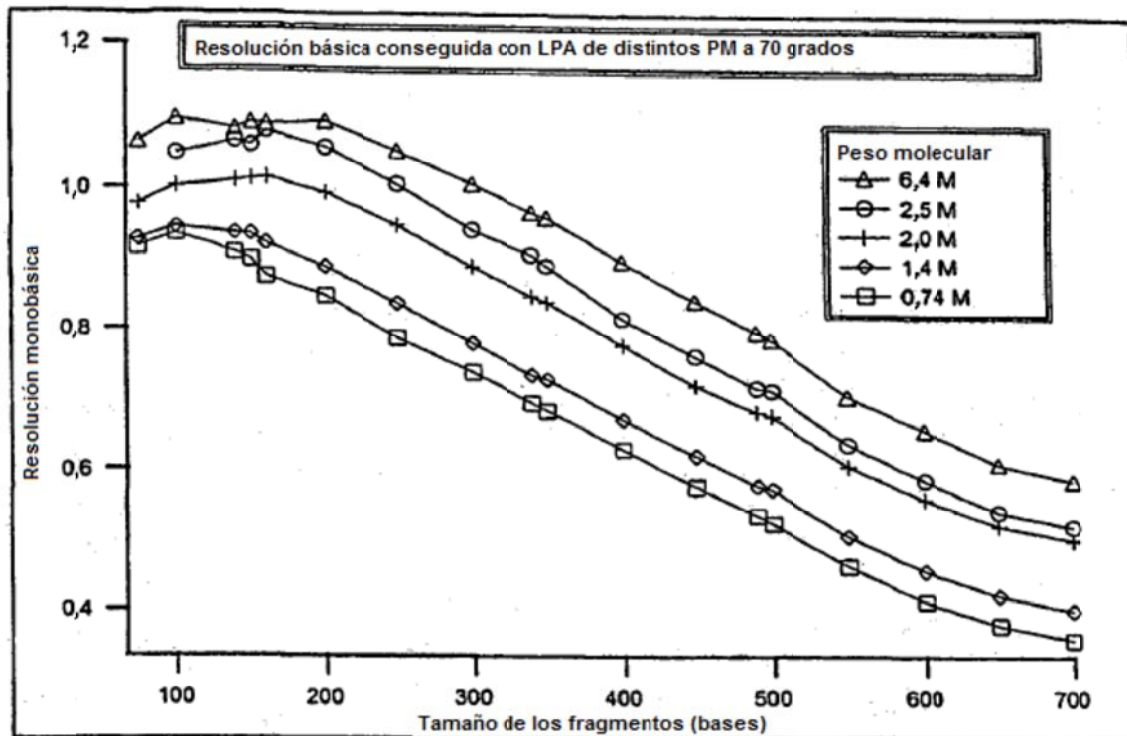
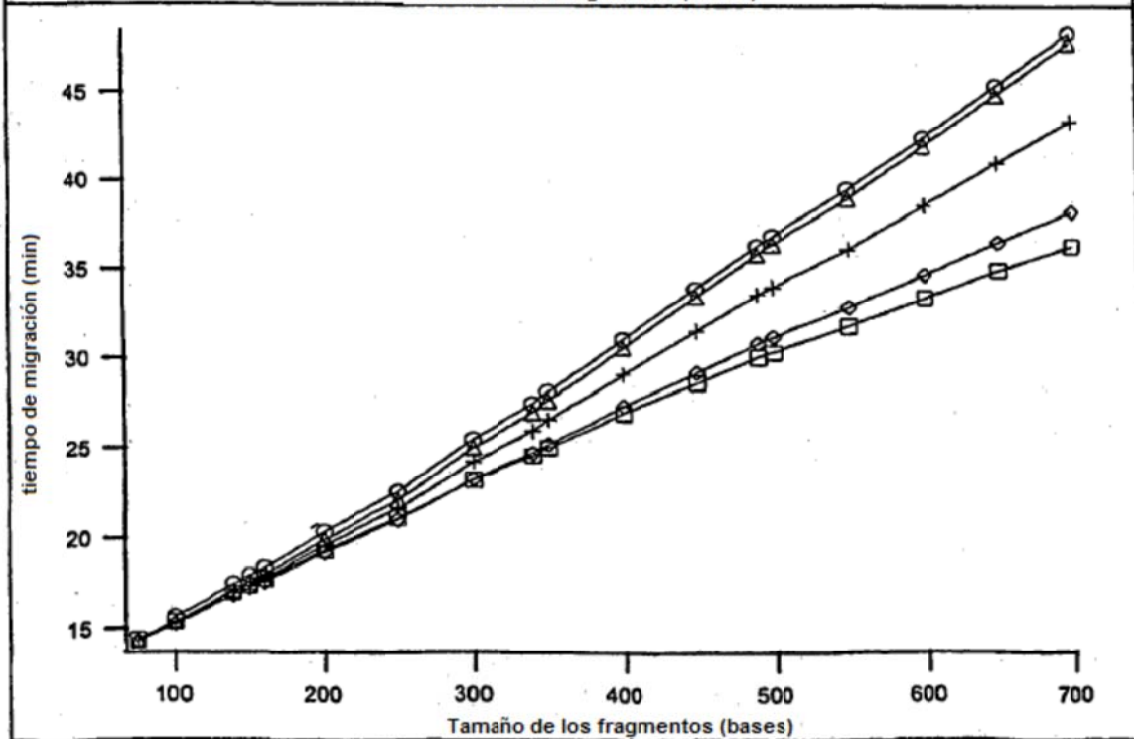


FIGURA 2



3A



3B

FIGURA 3

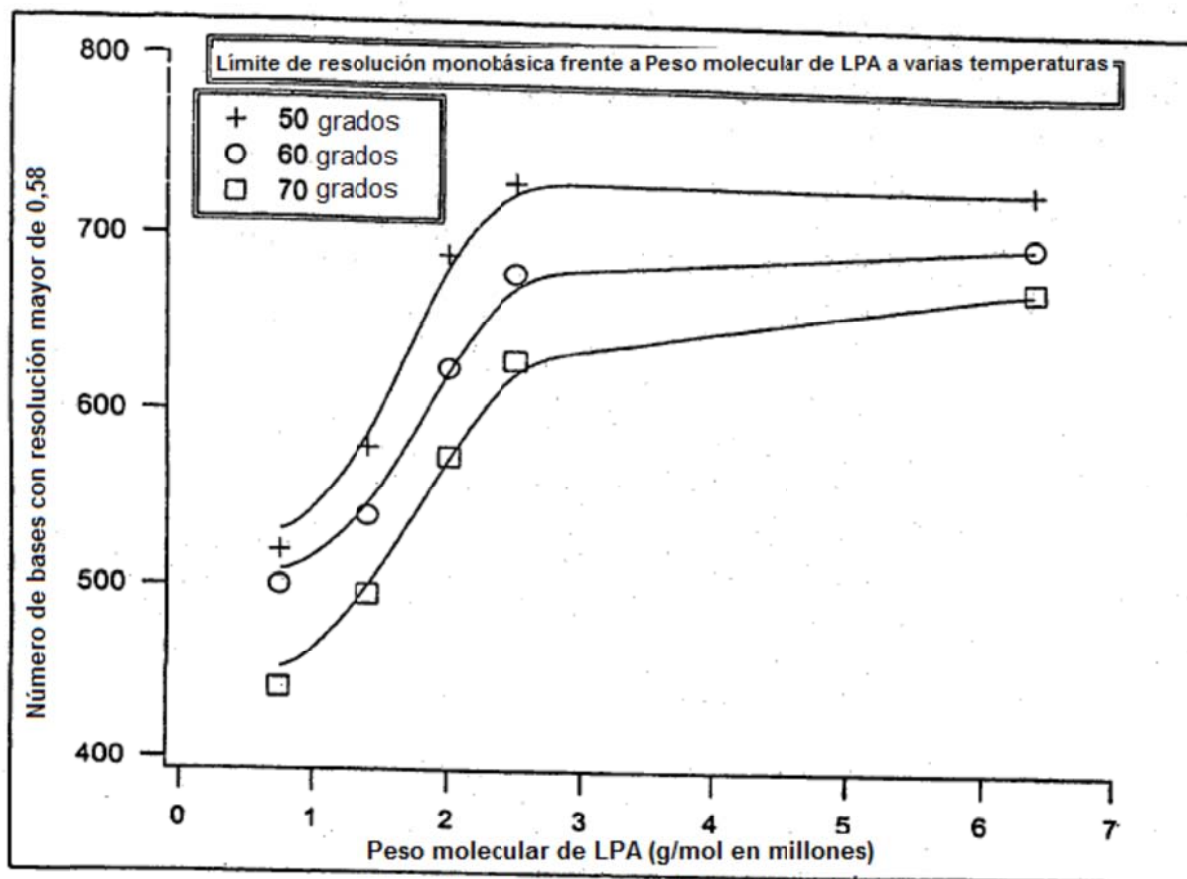


FIGURA 4