

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 753**

51 Int. Cl.:

**G01N 27/447** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2006 PCT/US2006/016190**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.11.2006 WO06119001**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2006 E 06769908 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 1877765**

54 Título: **Método para electroforesis utilizando medios de propiedades diferentes**

30 Prioridad:

**29.04.2005 DE 102005020135**

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

**14.06.2017**

73 Titular/es:

**BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)  
1 Becton Drive  
Franklin Lakes, New Jersey 07417-1880, US**

72 Inventor/es:

**WEBER, GERHARD**

74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

**ES 2 616 753 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 utilizando medios de propiedades diferentes

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a un método para electroforesis de deflexión continua, libre de portador que involucra medios de contraflujo

Descripción de la técnica relacionada

10 Dado que el principio del método conocido como electroforesis de flujo libre (FFE) se describió en el documento DE 805 399, Barrolier, J. et al, en Z. Naturforschung, 1958, 13B, páginas 754 a 755, Hannig, K. en Zeitschrift der Analytischen Chemie, 1961, 181, páginas 244 a 254 y Roman, M. et al, en Journal of Chromatography 992, 592, páginas 3 a 12 esta técnica ha encontrado una posición permanente entre los métodos analíticos y preparativos eficientes utilizados en la industria y la química. Si bien tanto iones pequeños como partículas grandes se pueden separar usando esta técnica, una aplicación principal es el fraccionamiento de proteínas, especialmente en la producción biotecnológica de enzimas y otras proteínas biológicamente activas, partículas de membrana e incluso células viables. En comparación con otros métodos que permiten el aislamiento de componentes de muestra separados, la FFE ofrece dos ventajas principales: (i) la separación puede realizarse de forma continua y permite obtener hasta cientos de miligramos o incluso cantidades de gramo de sustancias puras por hora y (ii) la separación es suave y preserva la actividad enzimática de los componentes separados. La tecnología de FFE es particularmente útil en la separación y fraccionamiento de proteínas complejas y, por tanto, es aplicable al campo emergente de la proteómica, que está creciendo cada vez más en los mercados de investigación académica, farmacéutica, biotecnología y diagnóstico clínico. Por ejemplo, dado que la investigación proteómica ha crecido, ha habido un aumento de la demanda en la mejora del rendimiento de separación de proteínas, especialmente en relación con la resolución del proceso de fiabilidad, y de una interfaz universal con el usuario.

15 Generalmente, los métodos de separación de flujo libre son adecuados para separar iones de cualquier peso molecular así como biopartículas. En general no importa si la muestra que se va que separar está cargada eléctricamente o si la carga es generada por la adsorción o absorción de iones. El proceso de electroforesis por deflexión continua y su mejora a través de medios de estabilización y medios de contraflujo está reflejado, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos 5.275.706. De acuerdo con esta patente, el medio de contraflujo se introduce en el espacio de separación en contra de la dirección del flujo del medio de separación. Ambos medios se descargan a través de las salidas de fraccionamiento, dando como resultado un fraccionamiento que tiene un volumen vacío reducido y, adicionalmente, mantiene un flujo laminar del medio en la región de las salidas de fraccionamiento, por ejemplo, con turbulencia muy baja. Se puede encontrar una discusión sobre diversos modos de electroforesis de flujo libre, por ejemplo, en la solicitud de patente de los Estados Unidos 2004/0050697.

20 El enfoque isoelectrónico es una técnica electroforética que añade un gradiente de pH a la solución reguladora y junto con el campo eléctrico se enfoca más en materiales biológicos que son anfotéricos. Los biomateriales anfóteros tales como proteínas, péptidos y virus están cargados positivamente en medios ácidos y cargados negativamente en medios básicos. Durante la IEF, estos materiales migran en el gradiente de pH que se establece a través de, esto es, transversal a la dirección del flujo, a su punto isoelectrónico (pI) donde no tienen carga neta y forman zonas estrechas y estables. En este punto los materiales dejan de migrar transversalmente y se focalizan. En esta técnica, no hay dependencia del voltaje. El enfoque isoelectrónico produce tales bandas de alta resolución porque cualquier biomaterial anfótero que se aleje de su punto isoelectrónico debido a la difusión o al movimiento del fluido será devuelto por la acción combinada del gradiente de pH y del campo eléctrico. El proceso de enfoque purifica y concentra las muestras en bandas que son relativamente estables. Este es un concepto poderoso que ha producido algunas de las separaciones de mayor resolución, especialmente cuando se combina con electroforesis en geles bidimensionales. En IEF, sin embargo, la tasa de migración electroforética de cada especie cargada tiende a disminuir progresivamente a medida que se aproxima a su punto isoelectrónico y, por lo tanto, suelen requerirse largos tiempos de residencia para una alta resolución. Además, las proteínas tienen menor solubilidad y una pérdida de actividad biológica en su punto isoelectrónico.

25 Una solución propuesta a estos desafíos se refleja en la patente de los Estados Unidos 6.660.146. La patente divulga un aparato y un método que involucra la oposición de la velocidad de la muestra electroforética con un flujo uniforme de fluido transversal a la dirección del flujo portador a través de la cámara. Esto se consigue utilizando una combinación de conjuntos de electrodos y pantallas aisladas para proporcionar el gradiente del campo eléctrico y el flujo transversal uniforme necesario para enfocar. Sin embargo, este enfoque no parece ser práctico.

30 La electroforesis de zona es otro modo de separación que puede utilizarse en FFE. La electroforesis de zona separa las biopartículas principalmente sobre la base de la carga, y en menor medida forma y tamaño. Un modo adicional que puede usarse en FFE es la isotacoforesis (ITP). La ITP FFE involucra el uso de un medio de separación no homogéneo. Cuando los componentes se separan de la banda principal de la muestra inicial, los componentes entran en un área cuando se aceleran o se desaceleran transversalmente al flujo de muestra en masa, en base a las

condiciones locales. Este así llamado efecto de enfoque se utiliza entonces para fraccionar los componentes deseados de la muestra completa.

Se desean otros métodos para mejorar la separación.

Resumen de la invención

- 5 La invención proporciona, entre otras cosas, métodos para mejorar la separación, incluyendo la mejora de algunos problemas típicos encontrados en los procesos IEF.

En una realización, la invención proporciona un método que comprende las etapas de:

- 10 (a) proporcionar una cámara de separación que comprende una primera pared de extremo, una segunda pared de extremo, una primera pared lateral, una segunda pared lateral y dos placas, en donde las paredes de extremo, paredes laterales y placas definen un espacio de separación; un primer electrodo y un segundo electrodo situado en la cámara de separación en proximidad a la primera pared lateral y la segunda pared lateral, respectivamente; al menos una entrada de muestra situada en proximidad de la primera pared de extremo; al menos una entrada del medio de separación situada en proximidad a la primera pared de extremo; una pluralidad de salidas de recolección situadas en proximidad de la segunda pared de extremo; y una pluralidad de entradas de contraflujo situadas en proximidad a la segunda pared de extremo;

(b) generar un campo eléctrico en la cámara a través del primero y segundo electrodos;

(c) introducir un medio de separación a través de al menos una entrada de medio de separación en la cámara de separación;

- 20 (d) introducir una muestra que se va a separar a través de al menos una entrada de muestra en la cámara de separación;

(e) introducir uno o más medios de contraflujo a través de la pluralidad de entradas de medio de contraflujo en la cámara de separación, en el que al menos dos de las entradas de medio de contraflujo han introducido a su través medios de contraflujo de propiedades diferentes; y

(f) recolectar las partes separadas de la muestra a través de la pluralidad de salidas de recolección.

- 25 (Una o más de las etapas de introducción y generación pueden realizarse simultáneamente, o en un orden diferente al presentado anteriormente.)

Las diferentes propiedades de los medios de contraflujo pueden ser, por ejemplo, diferencia en las propiedades químicas de los compuestos, diferencia en las propiedades físicas de los compuestos, o diferencia en las propiedades de flujo, por ejemplo, velocidad de flujo lineal en la proximidad de un compuesto único. Este control individual entre entradas puede, por ejemplo, alterar las condiciones próximas a las salidas de recolección para mantener mejor la actividad biológica y la solubilidad, durante los tiempos de residencia relativamente largos a veces requeridos en procesos de electroforesis.

Breve descripción de los dibujos

- 35 La figura 1 es una vista esquemática de una cámara de separación FFE convencional de acuerdo con la técnica anterior.

La figura 2 es una vista esquemática de una cámara de separación adecuada para el método de la invención.

La figura 3A demuestra la metodología de acuerdo con una realización de la invención que usa medios de contraflujo

de diferentes propiedades.

- 40 La figura 3B demuestra la metodología de acuerdo con una realización de la invención en la que difiere la rata de flujo del medio de contraflujo.

La Figura 3C demuestra la metodología de acuerdo con una realización de la invención en la que difiere la rata de flujo del medio de contraflujo.

Descripción detallada

- 45 La figura 1 es una vista esquemática de una cámara 1 de separación de acuerdo con la técnica anterior en donde, la proximidad a su pared 14 de extremo inferior tiene, como ejemplo, nueve entradas 20, 22, 24, que típicamente tienen puertos (no mostrados) que están conectados por tubos, tales como tubos flexibles, a los canales de alimentación de una bomba multicanal, tal como una bomba peristáltica. Las entradas 20 son provistas con el medio de separación. Las entradas 22 y 24 se proveen con el medio de estabilización electrolítico para el ánodo 36 y el

5 cátodo 32, respectivamente. La muestra que contiene los analitos se inyecta en el espacio de separación a través de la entrada 26 de muestra. Todos los medios fluyen a través del espacio de separación bajo condiciones de flujo laminar. Los electrodos 32 y 36 están dispuestos en paralelo a ambos lados de la cámara de separación, próximos a las paredes 16 y 18 laterales para generar un campo eléctrico, y típicamente se purgan en un flujo circular a una rata de flujo elevado utilizando una bomba. Las membranas 34 y 38, que son eléctricamente conductoras, separan el espacio del electrodo del espacio de separación e inhiben cualquier intercambio de medios causado por el flujo hidrodinámico. Un medio de contraflujo se introduce en la cámara de separación a través del elemento 30 de contraflujo. El contraflujo mejora la separación al permitir el ajuste y control de las condiciones de flujo y presión en las salidas 28 de recolección.

10 A medida que la muestra fluye a través de la cámara, el campo creado por los electrodos induce la separación de componentes dentro de la muestra. La muestra separada, por ejemplo, los analitos de interés, se recolectan a través de las salidas 28 de recolección que están dispuestas a lo largo de una línea, generalmente en proximidad y paralelas a la pared 12 superior o de salida de la cámara de separación. El componente de muestra seleccionado recolectado es llevado generalmente a través de tubería a un recipiente de recolección y puede ser usado con fines analíticos o preparativos. Los recipientes de recolección adecuados son, por ejemplo, pocillos de microtitulación. Pueden descartarse los componentes extraños de la muestra que no se recolectan a través de las salidas de recolección a través de las cuales se extrae la muestra deseada o que se recolectan a través de diferentes puntos de recolección.

20 Una realización de la invención, reflejada en la Fig. 2, es un método para electroforesis con deflexión continua, libre de portador. El método se realiza en un dispositivo 100 que comprende una cámara de separación rectangular que tiene una primera pared 114 (inferior) y una segunda pared 112 (superior), dos paredes 116 y 118 laterales y dos placas planas paralelas superpuestas (no mostradas). Juntos, estos elementos forman la cámara de separación sellada. Dos electrodos 132 y 136 capaces de y diseñados para generar un campo eléctrico de alto voltaje están situados en la cámara y ayudan a definir un espacio de separación. La cámara de separación, en o cerca (es decir, en proximidad de) del primer extremo, contiene al menos una entrada 126 de muestra para la inyección de la muestra y al menos una entrada 120 de medio de separación para la inyección del medio de separación. (Téngase en cuenta que en el caso de múltiples entradas 120, se puede proporcionar más de un medio de separación.) En la proximidad del segundo extremo está situada una pluralidad de salidas 128 de recolección de muestras y una pluralidad de entradas 130 de medios de contraflujo. Tanto las salidas de recolección como las entradas de medio de contraflujo están dispuestas típicamente a lo largo de una línea perpendicular a la dirección del flujo.

35 Los analitos individuales salen de la cámara de separación a través de las múltiples salidas 128 de recolección y se conducen generalmente a través de tubos individuales a recipientes de recolección individuales de cualquier tipo adecuado. En los recipientes de recolección el analito se recolecta junto con el medio de separación y el medio de contraflujo. La distancia entre las salidas 128 de recolección individuales de la serie de salidas de recolección debe ser generalmente tan pequeña como sea posible con el fin de proporcionar un fraccionamiento/separación adecuados. La distancia entre las salidas de recolección individuales, medida desde los centros de las salidas de recolección, puede ser de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 2 mm, más típicamente de aproximadamente 0,3 mm a aproximadamente 1,5 mm.

40 Al menos dos de las entradas 130 del medio de contraflujo tienen medios de contraflujo de al menos dos propiedades diferentes introducidas en el mismo. El flujo está en la dirección mostrada, que es contraria al flujo del medio de separación desde las entradas 120.

45 En diversas realizaciones, el número de entradas 120 de medio de separación varía de 1 a 9, o de 1 a 7; el número de entradas 126 de muestra oscila entre 1 a 5, o de 1 a 3, el número de salidas 128 de recolección oscila entre 3 y 384, o entre 3 y 96; y el número de entradas 130 de medios de contraflujo varía de 2 a 9, o de 3 a 7. El número de entradas y salidas proporcionadas depende en general de las dimensiones del dispositivo de separación.

De acuerdo con una realización, una cámara 100 de separación contiene una entrada 120 de medio de separación, tres entradas 126 de muestra para la inyección de la muestra, tres a noventa y seis salidas 128 de recolección y siete entradas 130 de medios de contraflujo.

50 Según realizaciones de la invención, el método puede combinarse con variaciones de procesos y dispositivos de electroforesis de flujo libre. Por ejemplo, se pueden usar múltiples dispositivos, que se disponen entonces en paralelo y/o en serie. Alternativamente, el flujo de componentes recogido en las salidas de recolección de un dispositivo puede reciclarse de nuevo a las entradas de muestra correspondientes para formar un proceso de reciclado que puede mejorar la resolución aumentando el tiempo de residencia del componente de muestra. Además, son posibles diferentes modos de FFE, por ejemplo IEF y de Zona.

55 En el caso de IEF, es útil seleccionar medios con valores de pH específicos, para facilitar la separación del componente de interés. En general, los valores de pH se seleccionan basándose en el punto isoeléctrico del componente o componentes de interés, para asegurar que los componentes son separados apropiadamente. El medio de contraflujo se selecciona típicamente para ser capaz de modificar o sobrepasar la capacidad de amortiguación del medio de separación que se aproxima a las salidas de fraccionamiento, y por lo tanto puede ser

un material que tiene la misma viscosidad y densidad pero que difiere en la conductividad y/o valor de pH y/o sus ingredientes químicos. En una realización, los valores de pH del medio o medios de contraflujo son mayores que el valor de pH del medio o medios de separación.

5 Los medios de contraflujo y de separación típicos se seleccionan del mismo grupo de medios, y típicamente contienen componentes tales como urea, glicerol, carbohidratos, glucosa, y compuestos similares. Tales medios están disponibles comercialmente de varias fuentes, por ejemplo, Immobiline™ Ampholine™ y Pharmalyte™ de General Electric, Servalyt™ de SERVA Electrophoresis GmbH, y materiales similares de Becton, Dickinson and Company.

10 De acuerdo con las realizaciones de la invención, los medios de contraflujo que se introducen en las entradas 130 de medio de contraflujo no son de las mismas propiedades a través de toda la serie de entradas de medio de contraflujo pero difieren de entrada a entrada y/o entre grupos de entradas en sus propiedades, por ejemplo, medios que tienen propiedades químicas y/o físicas diferentes y/o medios de diferentes características de flujo. Cuando se varía el medio de contraflujo entre grupos de entradas, un grupo que forma un segmento de propiedades idénticas es, en una realización, de dos a nueve entradas individuales, o de tres a aproximadamente siete entradas en otra realización. Por ejemplo, se inyecta un medio de contraflujo (A) a través de un primer segmento de medio de contracorriente (entradas 1 a 10), un segundo medio de contraflujo (B), de diferentes características de flujo o diferentes propiedades químicas y/o propiedades físicas comparadas con el medio (A) se inyecta a través de un segundo segmento (entradas 11 a 20) y se inyecta un tercer medio de contraflujo (C) de propiedades diferentes del medio (B) a través de un tercer segmento (entradas 21 a 30).

20 Las distinciones químicas y físicas incluyen, pero no se limitan a, diferencias en el valor de pH, viscosidad o conductividad. Un ejemplo en el que se utilizan tales medios de contraflujo diferentes se refleja en la figura 3A. En la figura 3A, una cámara 200 está provista de entradas 230a a 230g de flujo múltiple, y las entradas 230a a 230c están provistas de un primer medio, mientras que las entradas 230d a 230g están provistas de un medio diferente. Los medios de contraflujo, anotados anteriormente, se seleccionan para mejorar la solubilidad y preservar la actividad biológica. Así, por ejemplo, con base en los analitos presentes en las trayectorias 240 y 242 de muestra adyacentes, los medios de contraflujo se eligen para modificar el pH y/o la conductividad del medio de separación, a escala local, con el fin de alcanzar la solubilidad y mejoras biológicas en la actividad. (Para mayor claridad, no se muestran otros elementos de la cámara 200. Este es también el caso en las figuras 3B y 3C).

30 Las diferencias en otras propiedades, pero donde no existen distinciones químicas o físicas en el medio de contraflujo pueden incluir la tasa de flujo. Por ejemplo, de acuerdo con las realizaciones de la invención, la tasa de flujo lineal del medio de contraflujo individual introducido a través de las entradas de contraflujo individuales es diferente. Esto da lugar a perfiles de flujo diferentes en la región de las salidas de recolección que pueden, en algunos casos, provocar un aumento de las distancias geométricas entre trayectorias de flujo adyacentes de analitos separados o, en otros casos, una disminución de las distancias geométricas entre trayectorias adyacentes de analitos.

35 En la figura 3B se muestra un ejemplo de distancias geométricas aumentadas entre trayectorias adyacentes de analitos separados. En esta realización, se proporciona un único medio de contraflujo a las entradas 330a a 330g. Sin embargo, la tasa de flujo desde la entrada 330c es más alta que en las otras entradas. Este aumento de la tasa de flujo provoca una mayor separación entre las trayectorias adyacentes 340 y 342 de componentes separados de la muestra. Este enfoque puede ser útil, por ejemplo, en casos en los que el analito de interés tiende a estar espaciado estrechamente con otros componentes y, por lo tanto, es difícil recolectar una muestra pura.

40 Un ejemplo de distancias geométricas disminuidas entre trayectorias adyacentes de analitos separados se muestra en la figura 3C. En esta realización, se proporciona un único medio de contraflujo a las entradas 430a a 430g. Sin embargo, la tasa de flujo lineal desde las entradas 430b y 430d es más alta que la tasa de flujo lineal desde la entrada 430c situado entre ellas. Esta tasa de flujo aumentada alrededor de la entrada 430c provoca una reducción en la separación entre las trayectorias 440 y 442 adyacentes de los componentes separados de la muestra. Este enfoque puede ser útil, por ejemplo, en los casos en que un analito o analitos de interés tienden a estar espaciados de alguna forma ampliamente, y se desea enfocar la banda o bandas anchas hacia una única o a unas pocas salidas de recolección, o cuando ciertos componentes precipitan y se desea recolectar dichos precipitados en una área.

50 En el caso de diferentes tasas de flujo lineales de medios de contraflujo introducidos a través de diferentes entradas o grupos de entradas de medios de contraflujo, la relación de la tasa de flujo de dicha entrada o grupo de entradas con respecto a una o un grupo de entradas adyacentes típicamente es de aproximadamente 5:1 o menos, o 3:1 o menos.

55 También es posible controlar el flujo usando tanto los medios de contraflujo que tienen diferentes propiedades químicas y/o físicas, como las diferencias en las tasas de flujo de los diferentes medios

Una proporción útil de la tasa de flujo del medio de separación respecto a la tasa de flujo del medio de contraflujo es aproximadamente de 1:10 a aproximadamente 10:1, más típicamente de aproximadamente 1:3 a aproximadamente

3:1. Las ratas de flujo reales para el medio de separación y los medios de contraflujo dependen de una variedad de consideraciones, incluyendo las dimensiones geométricas del instrumento, el modo de separación particular utilizado (que puede hacer variar el tiempo de tránsito requerido), la muestra que se va a separar, el medio de separación utilizado y el medio o medios de contraflujo utilizados para obtener una separación óptima de los analitos. Por lo tanto, las ratas de flujo típicas de todos los medios en el sistema (estabilización y contraflujo) pueden variar ampliamente de 0,3 ml/hora a 3000 ml/hora.

Un aparato de acuerdo con realizaciones de la invención contiene además una bomba multicanal para el medio de separación, una bomba multicanal para la muestra y una bomba multicanal para medio/medios de contraflujo. El dispositivo contiene además una salida de colector de fracciones y tubos de salida. Típicamente, las bombas son bombas peristálticas multicanal.

La placa inferior y la placa superior de la cámara de separación pueden fabricarse independientemente de vidrio, o plásticos adecuados, tales como PVC, poliolefinas, policarbonato, plexiglás, polihalohidrocarburos o Lucite® (una resina acrílica que consiste esencialmente en metacrilato de metilo polimerizado), siendo preferido el vidrio revestido con polímero. Las placas superior e inferior están típicamente separadas por espaciadores que actúan como juntas o sellos.

Los electrodos están compuestos típicamente de un metal tal como el platino que no se oxida fácilmente en el campo eléctrico. Los electrodos se separan típicamente de la cámara de separación por medio de membranas de intercambio iónico, nylon o acetato de celulosa. Los electrodos son lavados típicamente de forma constante por una solución de sal o reguladora para eliminar los productos de electrólisis que se crean durante el proceso.

El espacio de separación (espacio entre placas) suele tener un espesor de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,5 mm, preferiblemente entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 1,0 mm.

El control de la temperatura también es útil según las realizaciones de la invención. Cuando pasa corriente a través de una solución electrolítica, la temperatura del medio de conducción aumenta, según el fenómeno conocido como calentamiento de Joule. Para reducir las perturbaciones del perfil de flujo laminar del medio que fluye causadas por dicho calentamiento, es deseable en general disipar el calor Joule hacia el entorno. En una realización, la cámara de separación está dispuesta con su placa inferior sobre un soporte metálico que contiene canales de flujo de fluido conectados a un dispositivo de control de temperatura, tal como un sistema de termostato para controlar la temperatura de la cámara de separación. Los intervalos de temperatura útiles son de aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 35°C, más típicamente de aproximadamente 5°C hasta temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

La invención es particularmente adecuada para, pero sin limitarse a, el análisis y la separación preparativa de iones, péptidos, biopolímeros, biopartículas así como polímeros y partículas sintéticos.

Las realizaciones descriptivas anteriores son sólo un ejemplo de la presente invención, y hay numerosas modificaciones y modos alternativos que estarían dentro del alcance de la invención, el cual se estipula en las reivindicaciones adjuntas a aquí.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para electroforesis, comprendiendo el método las etapas de
- (a) proporcionar una cámara de separación que comprende una primera pared (114) de extremo, una segunda pared (112) de extremo, una primera pared (116) lateral, una segunda pared (118) lateral y dos placas, en la que las paredes (114, 112) de extremo, las paredes (116, 118) laterales y las placas definen un espacio de separación; un primer electrodo (132) y un segundo electrodo (136) situados en la cámara de separación en proximidad de la primera pared (116) lateral y la segunda pared (118) lateral, respectivamente; al menos una entrada (126) de muestra situada en la proximidad de la primera pared (114) de extremo; al menos una entrada (120) de medio de separación situada en proximidad de la primera pared (114) de extremo; una pluralidad de salidas (128) de recolección situadas en proximidad a la segunda pared (112) de extremo; y una pluralidad de entradas (130) de contraflujo situadas en proximidad a la segunda pared (112) de extremo;
  - (b) generar un campo eléctrico en la cámara a través del primero y segundo electrodos (132, 136);
  - (c) introducir un medio de separación a través de al menos una entrada (120) de medio de separación en la cámara de separación;
  - (d) introducir una muestra que se va a separar a través de al menos una entrada (126) de muestra en la cámara de separación;
  - (e) introducir, con un contador de flujo al flujo del medio de separación, uno o más medios de contraflujo a través de la pluralidad de entradas (130) de medio de contraflujo en la cámara de separación, en donde al menos dos de las entradas (130) de medio de contraflujo se han introducido a través de los medios de contraflujo de los mismos de diferentes propiedades; y
  - (f) recolectar porciones separadas de la muestra a través de la pluralidad de salidas (128) de recolección.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las placas planas están superpuestas y dispuestas en paralelo, y en el que las entradas (130) de medio de contraflujo están dispuestas a lo largo de una línea perpendicular a la dirección del flujo del medio de separación.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde se introducen al menos dos medios de contraflujo, siendo los al menos dos medios de contraflujo distintos en sus propiedades químicas, propiedades físicas, o tanto propiedades químicas como físicas.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde los al menos dos medios de contraflujo son distintos en una o más propiedades seleccionadas del grupo consistente en pH, viscosidad y conductividad.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que una pluralidad de medios de contraflujo o un medio de contraflujo individual se introducen a través de la pluralidad de entradas (130) de contraflujo a dos o más ratas de flujo lineales diferentes.
6. El método acuerdo con la reivindicación 5, en donde se introduce un único medio de contraflujo a través de la pluralidad de entradas (130) de contraflujo a dos o más ratas de flujo lineales diferentes.
7. El método acuerdo con la reivindicación 5, en donde la relación de la rata de flujo lineal de un primer medio de contraflujo a través de una primera entrada o primer grupo de entradas, con respecto a la ratas de flujo lineal de un segundo medio de contraflujo a través de una segunda entrada adyacente o segundo grupo adyacente de entradas es de aproximadamente 5:1 o menos, en el que el primero y segundo medios de contraflujo puede ser igual o diferente.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que las ratas de flujo se seleccionan para proporcionar un incremento en las distancia entre al menos dos trayectorias adyacentes de porciones separadas de la muestra.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que las ratas de flujo se seleccionan para proporcionar una disminución de la distancia entre al menos dos trayectorias adyacentes de porciones separadas de la muestra.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la relación de la rata de flujo del medio de contraflujo con respecto a la rata de flujo del medio de separación está entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 10:1.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el número de entradas de medio de separación es de 1 a 9, el número de entradas de medio de contraflujo es de 2 a 9, el número de salidas de recolección es de 3 a 384, y el número de entradas de muestra es de 1 a 5.

12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la cámara de separación comprende además primera y segunda membranas (134, 138) conductoras de electricidad adyacentes al primero y segundo electrodos, respectivamente.
- 5 13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la pluralidad de salidas de recolección está dispuesta a lo largo de una línea perpendicular a la dirección de flujo del medio de separación, y en el que la distancia entre las salidas de recolección adyacentes es de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 2 mm.
14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el valor de pH del medio de contraflujo es mayor que el valor de pH del medio de separación.
- 10 15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el medio o medios de contraflujo contiene uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en urea, glicerol, carbohidratos y glucosa.
16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el espacio de separación entre la primera y la segunda placas comprende un espesor de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,5 mm.
- 15 17. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende además la etapa de regular la temperatura de la cámara de separación para mantener una temperatura de aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 35°C.



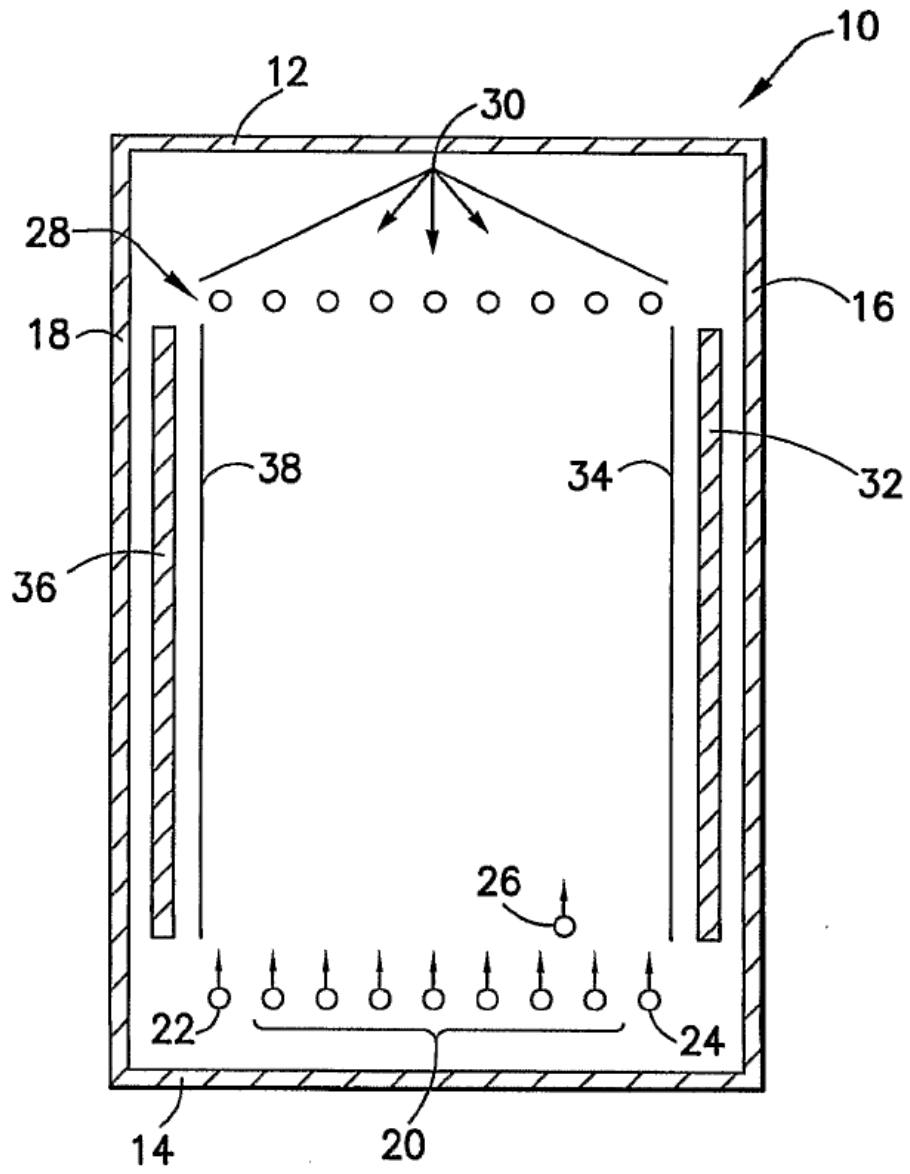


FIG. 1

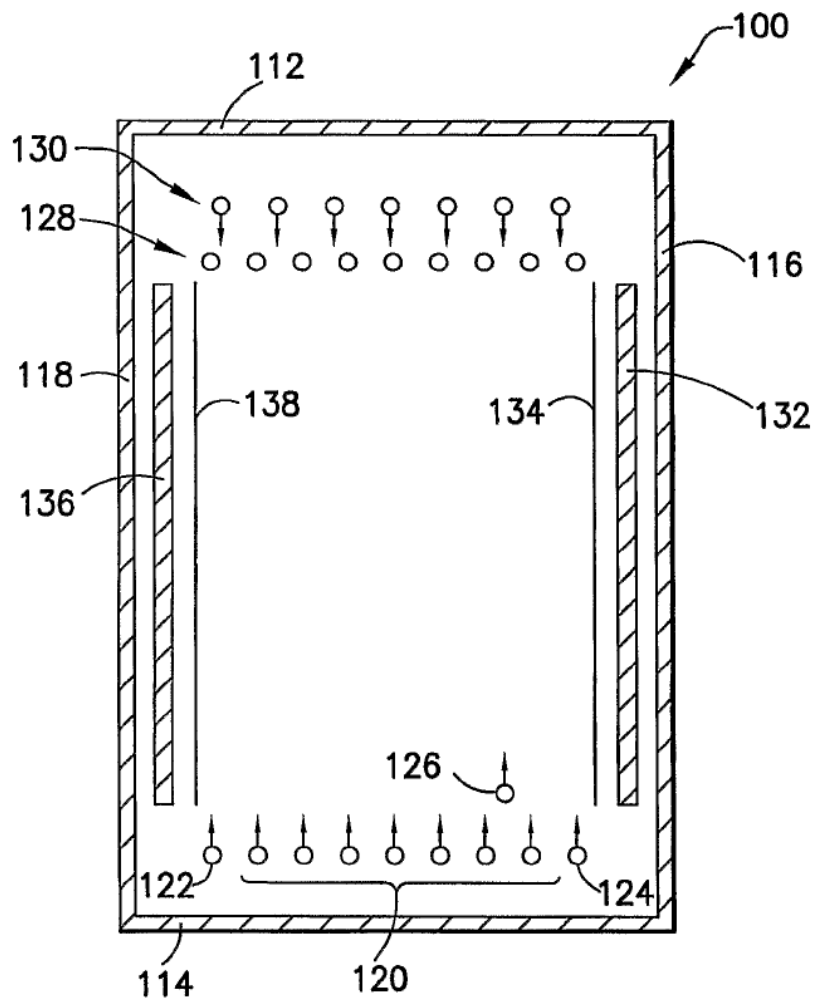


FIG. 2

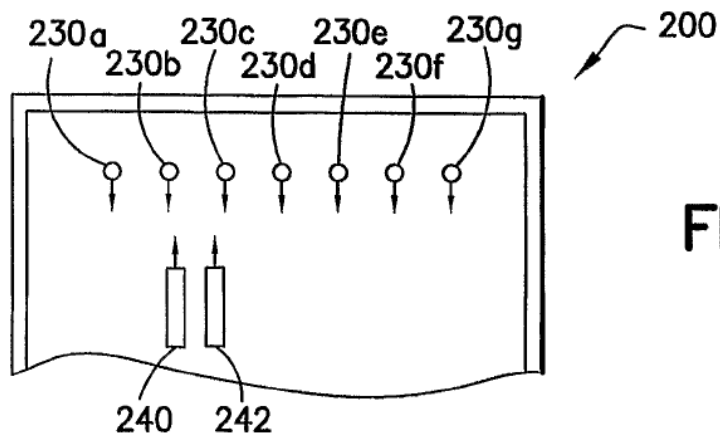


FIG. 3A

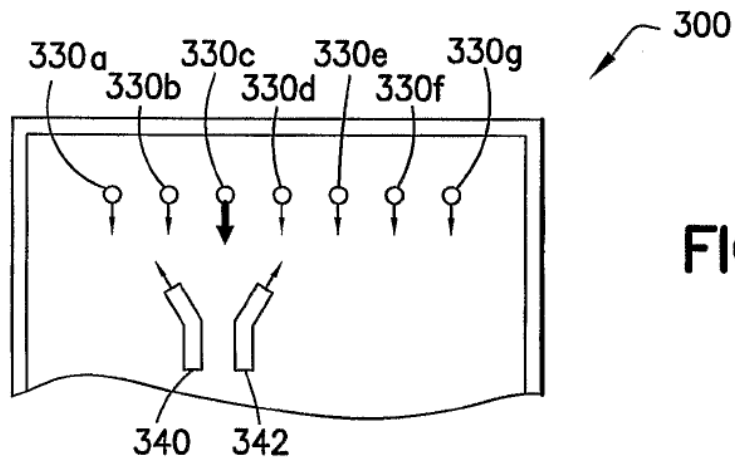


FIG. 3B

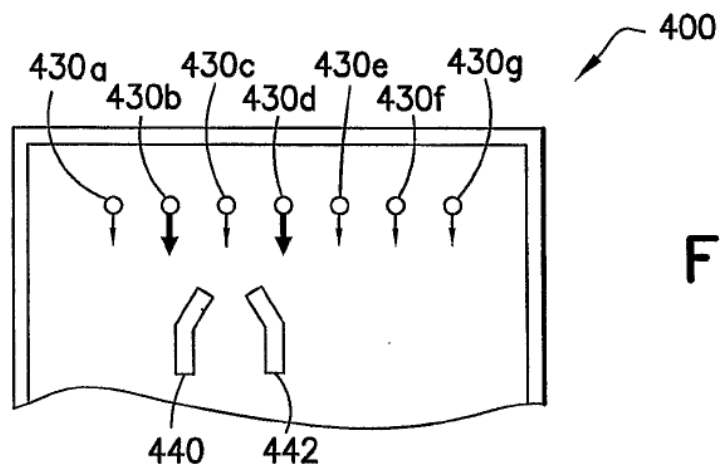


FIG. 3C