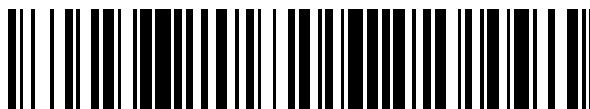


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 255**

51 Int. Cl.:

G01N 27/447 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2007 PCT/EP2007/059010**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2017 WO08025806**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2007 E 07803025 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2059799**

54 Título: **Método y aparato para electroforesis de desviación libre de portador**

30 Prioridad:

29.08.2006 US 823833 P
03.01.2007 US 883260 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.10.2017

73 Titular/es:

BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
One Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US

72 Inventor/es:

WEBER, GERHARD

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 635 255 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método y aparato para electroforesis de desviación libre de portador.

5 Campo de la invención

La invención se refiere a electroforesis de desviación libre de portador, que incluye un aparato y método para llevar a cabo el mismo.

10 Antecedente de la invención

Los fundamentos de la electroforesis de desviación libre de portador, especialmente con respecto a los procesos operados continuamente, se han descrito en la literatura por hace más de 30 años. El proceso se describe en ocasiones bajo el término FFE (electroforesis de flujo libre) o, más comúnmente, CFE (electroforesis de flujo continuo). K. Hannig: Carrier-free continuous electrophoresis and its application. Anal. Chem. 181, 233 (1961); M. C. Roman and P. R. Brown: Anal. Chem. Free Flow Electrophoresis. 66(N2), 86-94, (1994); R. Braun, H. Wagner and G. Weber: Preparative Free Flow Electrophoresis--a powerful procedure for separating natural substances, GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium 39 (1995), 317-322).

20 En general, se utilizan procedimientos de separación FFE para separar los iones de cualquier peso molecular hasta biopartículas. Es irrelevante aquí si la muestra que se va a separar está encargada por sí misma, o si la carga se produjo a través de la adición o sorción de iones.

25 La electroforesis de desviación libre de portador se ha utilizado tradicionalmente en procesos continuos, denominados comúnmente como electroforesis de flujo libre continuo (CFFE). Este método utilizado en ausencia de una matriz de soporte tal como un gel permite la separación, fraccionamiento y posible aislamiento de componentes tanto solubles como insolubles. En comparación con otros métodos que permiten el aislamiento de componentes de muestra separados, la electroforesis de flujo libre continuo ofrece generalmente tres ventajas principales: (i) la muestra se mantiene en un medio líquido/en solución que se puede utilizar directamente para procesamiento adicional, (ii) la separación se puede realizar continuamente y permite que uno obtenga a lo sumo cientos de miligramos o incluso cantidades de gramos de sustancias puras por hora y (iii) la separación es gentil y conserva la actividad biológica de los componentes separados.

35 La tecnología de FFE es particularmente útil en la separación y fraccionamiento de proteínas complejas, y de esta manera se puede aplicar al campo emergente de los proteómicos, que es cada vez más importante en la investigación académica y farmacéutica, así como los mercados generales de biotecnología y diagnóstico clínico. Por ejemplo, como a medida que ha crecido la investigación proteómica, ha habido un aumento de la demanda en la mejora del rendimiento o resolución de la separación de proteínas, especialmente en términos de confiabilidad del proceso de resolución. También ha habido demanda por un método y sistema de separación "front-end" universal que ocurre antes de un análisis posterior o etapa de separación/ fraccionamiento adicional.

40 Se han producido mejoras en el campo de la FFE. Por ejemplo, el proceso de electroforesis de desviación continua (o electroforesis de flujo libre continuo) se ha mejorado por vía de estabilización de medios y medios de contraflujo. Esto se refleja, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 5,275,706. De acuerdo con esta patente, se introduce en el espacio de separación en contra de la dirección de flujo continuo del medio de separación por volumen y la muestra que viaja entre los electrodos. Ambos medios (medio de separación y medio de contraflujo) se descargados o eluyen a través de salidas de fraccionamiento normalmente en una placa de micro-valoración, que resulta en un proceso de fraccionamiento que tiene un volumen vacío reducido. Adicionalmente, se mantiene un flujo laminar del medio en la región de las salidas de fraccionamiento (es decir, con turbulencia muy baja o nula).

50 Adicionalmente, se ha implementado la electroforesis de desviación de flujo libre en un proceso no continuo o de intervalos. Por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 6,328,868 se muestra un proceso de electroforesis de desviación no continua. En esta patente, la muestra y el medio de separación se introducen en una cámara de electroforesis, y luego se separan utilizando un modo de electroforesis tal como electroforesis en zona, isotacoforesis o enfoque isoeléctrico, y finalmente se expelen de la cámara a través de salidas de fraccionamiento. Las realizaciones de la Patente '868 describen el medio de separación y el movimiento de muestra que es unidireccional, que viaja del extremo de entrada hacia el extremo de salida de la cámara, con un voltaje efectivo aplicado provocando que ocurra migración electroforética mientras que la muestra y el medio no se accionan fluidamente del extremo de entrada hacia el extremo de salida. En la figura 1 se muestran ejemplos de realizaciones de la Patente '868.

60 Ambos ejemplos anteriores de FFE (es decir, modo continuo y no continuo o de intervalo) se pueden utilizar en determinadas situaciones, con cada meta experimental que tiene factores y requisitos o especificaciones que le dan a uno a preferir un proceso que el otro. Dichos factores incluyen la elección de muestra destinada a estar separada que incluye el tiempo de separación requerido o deseado, el tamaño de muestra, resolución de separación deseada, tamaño en cámara, etcétera. Estos y otros factores influyen el modo de separación, así como el aparato, métodos específicos, técnicas y composiciones que se van a utilizar. Uno o más de estos factores anteriores pueden o no

influenciar qué modo de separación (continuo o no continuo) se selecciona cuando ambos están disponibles al usuario dada una determinada situación y meta experimental o de separación. Debe tenerse en cuenta que mientras se utiliza electroforesis de flujo libre tanto en modo continuo como modo no continuo (o intervalo) de operación, cada uno puede tener beneficios cuando se compara con otras técnicas y metodologías de separación o fraccionamiento. No obstante, siempre se desean mejoras.

Numerosas publicaciones describen los efectos físicos o electroquímicos que contribuyen a la denominada "ampliación de banda" de los analitos durante la separación en electroforesis de desviación de flujo libre continuo J. A. Giannovario, R. Griffin, E. L. Gray: A mathematical model of free-flow electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 153, 329-352 (1978); F. G. Boese: Contribution to a mathematical theory of free flow electrophoresis, *J. Chromat.* 483, 145-170 (1988); K. Hannig and H. G. Heidrich: *Free-Flow Electrophoresis*, 1990 by GIT Verlag Darmstadt ISBN 3-921956-88-9).

El más importante de estos efectos inherentes en el FFE continuo es:

1. Ensanchamiento de banda debido al perfil de flujo laminar;
2. Ensanchamiento de banda debido a convección térmica;
3. Ensanchamiento de banda debido a osmosis eléctrica;
4. Ensanchamiento de banda debido a efectos electro cinéticos.

La influencia negativa de todos los efectos electro cinéticos descritos hasta ahora se pueden minimizar o eliminar al utilizar medios de separación con constituyentes iónicos adecuados con resistencia iónica altamente suficiente, y al mismo tiempo no aumenta excesivamente la concentración de la muestra.

Existen numerosas formas de minimizar la influencia negativa de la osmosis eléctrica, por ejemplo, a través de la selección de un material de pared adecuado (plásticos en lugar de vidrio o cuarzo), o más preferiblemente al agregar químicos de superficie activa al medio de separación que precluye la ósmosis eléctrica. Este método se denomina como "recubrimiento dinámico" en la literatura.

La influencia negativa de la convección térmica se puede reducir muy fácilmente al disponer y operar la cámara de electroforesis horizontalmente en lugar de verticalmente. Adicionalmente, se pueden minimizar los efectos térmicos mediante enfriamiento adecuado y manteniendo la cámara de electroforesis en una temperatura constante a través del proceso de separación.

No se observa influencia negativa del perfil de flujo laminar para foco isoeléctrico continuo (IEF) mientras que se selecciona un tiempo de separación suficientemente largo que también permite el enfoque de los analitos, que se transportan a la más alta velocidad lineal en el centro del espacio de la cámara de electroforesis.

En contraste, la influencia negativa es muy significativa en el caso de los procesos de electromigración. Los analitos que migran cerca o en la superficie límite de las paredes de la cámara de electroforesis pasan a través de la cámara de electroforesis en un tiempo considerablemente mayor que los analitos en el centro del espacio de la cámara de electroforesis, y por lo tanto se desvían a un grado claramente mayor debido a su mayor tiempo de residencia. Este efecto resulta en un ensanchamiento de la banda detectable como una adaptación en la dirección de electromigración.

Dado un proceso de electromigración ejecutado continuamente bajo condiciones límite de electroforesis libre de portador, la influencia negativa del perfil de flujo laminar no se puede evitar para los analitos de bajo peso molecular. El valor absoluto del ensanchamiento de banda aumenta cuando lo hace la distancia de migración de los analitos. Reducir los índices de difusión para los analitos que tienen su migración impactada al utilizar el medio de separación con aumento de viscosidad tampoco ayuda, en razón a que esto magnifica la naturaleza desfavorable del perfil de flujo laminar.

En el caso de separación de biopartículas, una carga de muestra cuantitativamente reducida al centro del espacio de la cámara de electroforesis puede resultar en una resolución mejorada, en razón a que las partículas no pueden estar en el área de las paredes de la cámara de electroforesis durante un tiempo de retención de <10 minutos debido a la extremadamente baja difusión. Sin embargo, la influencia del perfil de flujo laminar solo se puede minimizar de esta forma al reducir claramente el índice de carga de la muestra (por ejemplo, para un índice de flujo de muestra que es solo un 0.1% a 0.5% del índice de flujo del medio de separación).

En comparación con los modos de operación FFE continuos conocidos en la técnica, el modo FFE de intervalo como se describe en el documento US 6,328,868 es capaz de evitar la influencia negativa de un perfil de flujo laminar observado en procesos de electromigración.

Sin embargo, subsiste la necesidad en la técnica de mejoras adicionales de métodos de electroforesis de flujo libre.

Resumen de la invención

De acuerdo con lo anterior, el objeto de la invención es proporcionar un método para electroforesis de desviación libre de portador, que elimina la influencia de un perfil de flujo laminar típico de separaciones electroforéticas de flujo libre continuo y aumenta adicionalmente la calidad de separación y/o reduce el tiempo de giro o el tiempo de reducción en fraccionamiento para obtener alta calidad de resolución para separaciones electroforéticas. El método y el dispositivo de la presente invención se pueden utilizar tanto para separaciones preparativas como analíticas.

De acuerdo con lo anterior, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para separar partículas, en el que el método comprende disponer un medio de separación y muestra en una cámara de electroforesis que tiene una placa superior, una placa inferior, un primer extremo de cámara, un segundo extremo de cámara, y una pluralidad de electrodos generalmente paralelos entre sí con un espacio de separación dispuesto entre ellos (en el que los electrodos se extienden longitudinalmente hacia cada uno de los extremos de dicha cámara de electroforesis), y un sistema de desplazamiento de fluidos para transportar partículas de muestra y de medios de separación entre los electrodos, aplicar un voltaje entre los electrodos efectivo para manipular electroforéticamente partículas, y en el que por lo menos una parte del medio de separación y la muestra se desplazan hacia una primera dirección generalmente en paralelo a la dirección de los electrodos, y posteriormente en una segunda dirección generalmente opuesta a la primera dirección, reversando por lo tanto el flujo de volumen del medio de separación y la muestra.

En determinadas realizaciones, el método de partículas de separación comprende disponer un medio de separación y muestra en una cámara de electroforesis que tiene una placa superior, una placa inferior, un primer extremo de cámara, un segundo extremo de cámara y una pluralidad de electrodos generalmente en paralelo entre sí con un espacio de separación dispuesto entre ellos, los electrodos se extiende longitudinalmente hacia cada uno de los extremos, y un sistema de desplazamiento de fluido para transportar un medio de separación entre los primeros y segundos extremos de cámara, aplicar un voltaje entre los electrodos efectivo para manipular electroforéticamente partículas, desplazar por lo menos una parte del medio de separación y la muestra hacia el primer extremo de cámara, desplazar por lo menos una parte del medio de separación y muestra hacia el segundo extremo de cámara (es decir, reversión del flujo de volumen), y opcionalmente, desplazar por los menos una parte del medio de separación y muestra hacia el primer extremo de cámara, por ejemplo con el fin de disipar o eluir por lo menos una parte de la muestra y/o medio de separación a través de una o más salidas que se ubican en el extremo de cámara opuesto a las entradas. "Generalmente en paralelo" en el contexto de la presente invención significa que la dirección de flujo de volumen por lo menos las partículas no cargadas en el medio de separación (por ejemplo, agua) es esencialmente paralelo a los electrodos alargados. Sin embargo, aquellos expertos en la técnica apreciarán que las especies cargadas (es decir, muestras o iones en el medio de separación) dentro de la cámara de electroforesis puede también al mismo tiempo ser desviada por el campo eléctrico entre los electrodos, moviéndose por lo tanto hacia el cátodo o el ánodo al mismo tiempo paralelo a los electrodos hacia el extremo de entrada o salida de la cámara de electroforesis. El movimiento de partículas durante una separación dentro de un aparato FFE se describen en detalle adicionalmente adelante.

La presente invención ofrece una mejora distinta en la calidad de la separación electroforética, y en estabilidad a largo plazo y velocidad mejorada para alcanzar alta resolución para separación electroforética cuando se compara con otras técnicas de separación. Adicionalmente, el método de la presente invención también ofrece aumento de flexibilidad con respecto al diseño de los dispositivos FFE utilizados para separaciones electroforéticas. Las realizaciones divulgadas aquí se pueden aplicar a la mayoría de protocolos de separación que normalmente se han realizado utilizando aplicaciones de electroforesis de flujo libre de intervalo estático o continuo conocidas en general en la técnica y descritas en adelante, que incluyen electroforesis de zona, enfoque isoeléctrico e isotacoforesis.

Normalmente, existen discontinuidades físicas y químicas en las cámaras electroforéticas a través del área de separación y son recursos bien conocidos de turbulencias para líquidos en las áreas adyacentes a los límites de migración del medio, mientras que no migran los límites (como límites entre el medio de estabilización y el medio de separación) darán aumento a turbulencias en caso de sobrecargar solamente el proceso de separación (debido a alta resistencia de campo o alta corriente). Se ha encontrado ahora que las turbulencias en los límites de migración se pueden reducir sustancialmente mediante fuerzas de corte, dadas por el vector de un movimiento lineal del medio de separación hacia delante y hacia atrás dentro de la celda de separación con respecto a las paredes de la cámara de electroforesis generalmente fijas. El ciclo atrás y adelante, hacia atrás y hacia adelante dentro de la celda de separación con respecto a las paredes de la cámara de electroforesis generalmente fija se denomina aquí electroforesis de flujo libre cíclico o, alternativamente, electroforesis de flujo libre de intervalo cíclico.

Para los propósitos de la presente invención, el FFE cíclico incluye por lo menos un ciclo completo (es decir, mover la muestra y el medio de separación lejos de las entradas de muestra y medio hacia el extremo opuesto del aparato FFE, luego mover el medio de muestra y separación en una segunda dirección (normalmente opuesta), es decir, hacia el extremo de entrada del aparato FFE. Adicionalmente a los ciclos durante los cuales la separación electroforética de las partículas de muestra se alcanza, el FFE cíclico puede comprender adicionalmente una etapa en la que la dirección se cambia de nuevo hacia el extremo de salida del aparato FFE con el fin de eluir la muestra y el medio de separación de volumen. Del mismo modo, cuando las salidas se colocan en o cerca de las entradas del aparato, se caracteriza

un ciclo completo mediante una única reversión de la dirección del flujo, es decir, mover el medio de separación y la muestra hacia una primera dirección del aparato FFE, luego mover el medio de separación y la muestra en una segunda dirección (normalmente opuesta) hacia la entrada, y en este caso también el extremo de salida del aparato FFE. El ciclo descrito anteriormente se puede repetir múltiples veces como se describe más adelante adicionalmente, o puede llevarse a cabo solo una vez. Preferiblemente, el método se complementa mediante disipación/elución de la muestra y medio de volumen a través de una o más salidas.

En realizaciones preferidas, el número de ciclos es mayor de uno, tal como por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 ciclos, y se selecciona con el fin de alcanzar la suficiente separación de la muestra antes que la muestra o por lo menos fracciones de la misma se recolecten en el extremo de salida del aparato de FFE. El experto en la técnica entenderá que el número de ciclos que desplazan la muestra y el medio de separación de volumen posterior y delantero depende de un número de factores, que incluyen tamaño de la muestra, calidad de separación, movilidad electroforética de la muestra, entre otros.

La movilidad electroforética (EM), como se utiliza aquí, significa el índice de migración de aniones y cationes en un campo eléctrico a una resistencia de campo dada por unidad de tiempo en un medio acuoso. La movilidad electroforética u se puede calcular como sigue:

$$u = s / H \times t$$

en el que s representa la distancia de migración (m), H representa la resistencia campo eléctrico (V/m) y t representa el tiempo (sec.).

Una calidad de separación mejorada se alcanza utilizando el método novedoso y aparato de acuerdo con las realizaciones de la presente invención en combinación con cualquiera de los modos de separación conocidos de electroforesis libre de flujo, por ejemplo, isotacoforesis (ITP), electroforesis de zona (ZE) y enfoque isoelectrico (IEF). Específicamente, los experimentos han demostrado que los beneficios del intervalo FFE cíclico son más valiosos y sorprendentemente en los casos de isotacoforesis FF-cíclica y de electroforesis en zona FF-cíclica (para ZE, véase figuras 5 y 6).

Como se mencionó anteriormente, la Patente US 6,328,868 otorgada a Weber describe un método para llevar a cabo electroforesis libre de matriz o de solución libre entre electrodos en una forma de intervalo general. El modo de intervalo descrito en la patente de la invención "868" generalmente introduce y eluye la muestra y el medio de separación en una dirección. Esta dirección, a diferencia de la electroforesis capilar tradicional (libre de matriz y gel) en el que la muestra se mueve en la misma dirección que el campo eléctrico a través de capilar, se comparte mediante la orientación de electrodos alargados. Como un ejemplo de cinco etapas (etapas 0 a etapa 4) que demuestra una realización de ejemplo de la invención "868" se muestra en la figura 1, como representada por las figuras 1a-1e respectivamente. Como se muestra en la figura 1a, la etapa 0 comprende introducir una muestra y medio de separación en la cámara de electroforesis con el flujo encendido y el voltaje apagado. Como se muestra en la figura 1b, en la etapa 1 permanece el voltaje apagado y el flujo de volumen de muestra y medio de separación se detienen (se apaga el flujo). Como se muestra en la figura 1c, la etapa 2 mantiene apagado el flujo de volumen, pero aplica voltaje entre los electrodos provocando separación electroforética. Como se muestra en la figura 1d, la etapa 3 apaga el voltaje pero obliga al flujo de volumen de la muestra y el medio de separación hacia las salidas opuestas en las entradas en donde el medio de separación se introduce. Finalmente, como se muestra en la figura 1e, la etapa 4 apaga el flujo de fluidos de volumen y voltaje. Las etapas 0-4 se pueden repetir luego si así se desea.

En el caso de la invención "868", el desplazamiento o aceleración de la muestra p por una bomba o algún otro elemento fluídico de desplazamiento de fluido en la cámara de electroforesis entre los electrodos sólo tiene lugar cuando el voltaje se apaga o por lo menos cuando el voltaje no es efectivo para migración electroforética, es decir, cuando ninguna parte de la muestra está siendo sometida a una fuerza campo electroforética efectiva. Adicionalmente, el desplazamiento absoluto de la muestra de volumen y el medio en la invención "868" solo ocurre en la dirección a partir de las entradas de muestra y la finalización en las salidas de muestra. Estas dos características, así como otros elementos del método y aparato de la invención "868" se mejoran en la presente invención.

Muchas ventajas del nuevo proceso FFE en el modo de intervalos cíclico de acuerdo con la realización de la presente invención se han observado a través de una serie de experimentos.

Primero, en razón a que la muestra y los medios de separación están en movimiento durante la etapa de separación electroforética, es posible aplicar mayores fuerzas de campo. En vista de otras fuerzas de campo mayores el nuevo proceso FFE de intervalo cíclico proporcionará un desempeño mejorado, que se puede utilizar para una mejor discriminación de los analitos dada la misma duración del tiempo de proceso que sería típico del método descrito en el documento US 6,328,868 otorgado a Weber. Alternativamente, el nuevo método ofrece igual calidad de discriminación de los analitos pero se puede realizar en una duración reducida de tiempo de procesamiento cuando se compara con métodos de electroforesis de flujo libre de intervalos estándar o continuos. La ventaja del último permitiría mayor rendimiento de distintas separaciones que se pueden aplicar a procesos de electroforesis utilizados, como por ejemplo, en proteómicos clínicos.

Segundo, todas las técnicas de separación FFE continuas convencionales y protocolos se pueden adoptar fácilmente para uso en procesos de electroforesis de flujo libre de intervalo cíclico.

Tercero, el método y el aparato de acuerdo con la realización de la presente invención permite extender la duración de la separación electroforética de una muestra en una cámara debido a la reversión periódica del flujo de muestra de volumen. Por ejemplo, una máquina de electroforesis de flujo libre continuo con un índice de flujo medio de separación y muestra de volumen, controlado por una bomba, tiene una duración mínima de viaje que es una función de la viscosidad, índice de fluidez de bomba, forma de la cámara, y la longitud desde la entrada hasta la salida. A diferencia del método electroforesis de flujo libre continuo, el método de intervalo cíclico de acuerdo con la realización de la presente invención, con el mismo índice de fluidez mínimo, viscosidad, forma de cámara, y capacidad para reversar el flujo de fluido, pueden prolongar la duración de viaje entre las entradas y salidas de muestra. Esto proporciona una oportunidad para un tiempo de separación prolongado, por ejemplo, en el caso de enfoque FF isoelectrico es especialmente poderoso y útil. En razón a que la muestra en el modo de intervalo cíclico puede mover repetidamente e una dirección hacia adelante e inversa, la longitud de viaje efectiva de la muestra entre los electrodos se puede extender indefinidamente. El tiempo prolongado o la distancia extendida de viaje para partículas separadas resultarán en un mejor enfoque de analitos, especialmente para aquellos con una movilidad electroforética relativamente baja.

Cuarto, el nuevo proceso de electroforesis de flujo libre de intervalo cíclico se puede utilizar en cámaras de separación con muchas opciones diferentes de configuración geométrica y sección transversal. Esto permite por lo tanto flexibilidad para cómo uno puede implementar el FFE en cámaras de electroforesis miniaturizadas, cuyas formas y tamaños se pueden alterar dependiendo del número deseado de salidas de muestra para elución interpuesta entre el par o pares de electrodos. Adicionalmente, la longitud de los electrodos se puede controlar o diseñar de tal manera que la cantidad de muestra y el medio de separación se puedan ajustar para representar el tamaño de muestra o concentración de analito y muestra que se necesita fraccionar y/o detectar.

El nuevo modo FFE de intervalo cíclico de acuerdo con las realizaciones de la presente invención se pueden utilizar para aplicaciones específicas aquí inaccesibles a la nueva tecnología de separación electroforética libre de flujo. Por ejemplo, la separación y el aislamiento de las isoformas de proteína con bastante baja velocidad de migración electroforética que es difícil de alcanzar. Con el método descrito aquí, el aislamiento, por ejemplo, dichas isoformas se pueden lograr utilizando el modo de electroforesis de flujo libre de intervalo cíclico descrita aquí, que históricamente no se pudo realizar utilizando el proceso FFE continuo existentes la técnica. Adicionalmente, muchos otros problemas de separación emplean una variedad de diferentes muestras que han sido exitosamente logradas utilizando el nuevo modo FFE de intervalo cíclico de la presente invención.

La descripción adelante, así como las figuras adjuntas ejemplifican diversas realizaciones de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 describe etapas para llevar a cabo electroforesis de flujo libre de intervalo de la técnica anterior.

La figura 2 describe etapas para llevar a cabo una realización de la presente invención.

La figura 3 describe un aparato FFE adecuado para llevar a cabo electroforesis de flujo libre de acuerdo con una realización de la presente invención.

Las figuras 4a y 4b describen otra realización de la configuración adecuada para llevar a cabo electroforesis libre de flujo de acuerdo con una realización de la presente invención.

La figura 5 demuestra resultados de desempeño del FFE continuo de la técnica anterior.

La figura 6 demuestra resultados de desempeño del método FFE cíclico de acuerdo con una realización de la presente invención.

La figura 7 ilustra una migración de anión y catión para el modo de electroforesis de zona de una realización de la presente invención.

La figura 8 ilustra migración de partículas de diversos puntos isoelectricos (PI) para el modo de enfoque isoelectrico de una realización de la presente invención.

La figura 9 describe diversos perfiles de una realización de la presente invención, en el que las figuras 9A, 9B y 9C describen voltaje, velocidad de flujo medio, y desplazamiento medio, respectivamente.

La figura 10 describe diversos perfiles de otra realización de la presente invención, en el que las figuras 10A, 10B y 10C describen voltaje, velocidad de flujo medio, y desplazamiento medio, respectivamente.

La figura 11 describe diversos perfiles de aún otra realización de la presente invención, en el que figuras 11A, 11B, y 11C describen voltaje, velocidad de flujo medio y desplazamiento medio, respectivamente.

Descripción detallada

La presente invención y sus ventajas se ilustran adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes. En los dibujos, caracteres de referencia similares se refieren en general a las mismas partes a lo largo de las diferentes vistas. También, los dibujos no son necesariamente a escala, en cambio se hace énfasis en ilustrar los principios de la invención.

El método general de la presente invención se refleja en la figura 2 (específicamente figura 2a-2e) mientras que los elementos requeridos normalmente para llevar a cabo la invención se describen colectivamente en las figuras 3, 4, 7a y 8a. En las figuras 3 y 4 se reflejan esquemáticamente dos realizaciones de un aparato 10 de electroforesis que incluye una cámara 12 de electroforesis, así como elementos que se relacionan con y/o se conectan a la cámara 12 de electroforesis, mientras que las figuras 7a y 8a reflejan específicamente la cámara 12 de electroforesis así como el comportamiento electroforético de las partículas como se representa esquemáticamente en la cámara 12 de electroforesis.

Un aparato 10 que puede llevar a cabo aspectos de la invención comprende todo o una parte de los siguientes elementos:

una cámara 12 de electroforesis,

entradas 36 de medios de separación,

entradas 38 de muestra,

electrodos (cátodo 24 y ánodo 26),

una fuente de energía (no mostrada),

un primer sistema 60 de desplazamiento de fluido,

un segundo sistema 61 de desplazamiento de fluido,

controladores para controlar la fuente de alimentación y/o los sistemas de desplazamiento de fluido.

Adicionalmente, los siguientes elementos normalmente deseados optimizan el control, la flexibilidad y el desempeño de las realizaciones de la invención:

medios 170 de cátodo,

medios 172 de ánodo,

barrera o separador de electrodo/media,

separador 22 de cámara,

controlador 174 de temperatura,

elemento 178 de refrigeración,

salidas 52 de muestra.

Los anteriores componentes y cómo se interrelacionan con un sistema se describirá específicamente aquí adelante, pero primero el método general de acuerdo con las realizaciones de la presente invención se ilustra con referencia a la figura 2.

En el estado inicial mostrado en la figura 2a, etapa 0 comienza una muestra y medio de separación introducido en el espacio de separación de la cámara de electroforesis. Ningún voltaje, opcionalmente, un voltaje no efectivo se aplica entre los electrodos. En la etapa 0, existe un entorno no efectivo para que ocurra migración electroforética exitosa. Esto puede ser el resultado de una cantidad de fuerza del campo electroforética inefectiva cero o de otra forma entre los electrodos, u opcionalmente debido a introducir rápidamente la muestra y medio de separación en la cámara no proporcionando por lo tanto suficiente tiempo de residencia para que ocurra migración electroforética efectiva.

La etapa 1, mostrada en la figura 2b empieza a reversar el índice de flujo del medio de separación y muestra combinado en ciclos de movimiento hacia atrás y hacia adelante en ningún orden particular. Preferiblemente, durante una parte de la etapa 1, un campo electroforético no está provocando que ocurra migración electroforética. El desplazamiento de las partículas de interés de muestra es generalmente menor que la longitud de los electrodos. El voltaje se incrementa o aplica entre los electrodos para producir por lo tanto una fuerza de campo efectiva para que tenga lugar la migración electroforética. La fuerza de campo típica aplicada está en el rango de aproximadamente 250 V/cm, aunque la resistencia del campo específica utilizada en un experimento de separación será dependiente de una serie de factores. Seleccionar un voltaje óptimo para operación FFE cíclica en un aparato FFE dado así como es dentro de las habilidades del experto en la técnica.

Las siguientes etapas 2 y 3 se muestran en la figura 2c. Un campo electroforético efectivo provoca que las partículas migren electroforéticamente debido al voltaje aplicado entre los electrodos. Se debe tener en cuenta que en las etapas 2 y 3, las partículas de muestra de interés siempre están entre y se someten al campo electroforético entre los electrodos en razón a que el desplazamiento de la muestra y el medio de separación mantienen suficientemente las partículas de muestra de interés para que permanezcan dentro de la longitud de los electrodos.

Se debe tener en cuenta que durante las etapas 2 y 3, la capacidad para que la muestra migre electroforéticamente depende del tipo de proceso electroforético empleado por el usuario (es decir, isotacoforesis, enfoque isoelectrico y electroforesis de zona), así como la movilidad electroforética de la muestra en el medios de separación que está pesadamente influenciado por las características de los medios de separación seleccionado así como la capacidad para que la corriente a fluya entre los electrodos. También se debe tener en cuenta que la etapa 2 y etapa 3 solamente diferencian en dirección del flujo de muestra y medio de separación durante la migración electroforética y se pueden repetir múltiples veces con características de flujo diferentes o similares. Un ejemplo sería mover la muestra y el medio de separación durante la etapa 2 con una determinada velocidad de fluido promedio y durante la etapa 3, para moverlas hacia atrás con una velocidad de fluido promedio que es una fracción de o un múltiplo de la velocidad de fluido promedio de la etapa 2.

Cuando las etapas 2 y 3 no se realizan más, la etapa 4 puede tener lugar como se muestra en la figura 2d. Esencialmente, la etapa 4 implica desplazar la muestra que se va a eluir hacia las salidas de muestra. Mientras que en las figuras 2, 7a y 8a las salidas de muestra se disponen en los lados opuestos de la cámara de electroforesis, en otras realizaciones, las salidas de la muestra pueden estar en el mismo lado que las entradas de la muestra y las entradas del medio de separación.

En la figura 2d, la etapa 4 implica migración preferiblemente no electroforética, esencialmente mínima, de la muestra durante elución de las salidas de muestra. Esto se puede lograr al reducir o eliminar el campo eléctrico entre los electrodos o al reducir o retirar el voltaje entre los electrodos. Opcionalmente, esto se puede lograr al forzar rápidamente la muestra y el medio de separación hacia las salidas de muestra a una velocidad de fluido promedio que minimice la duración y por lo tanto el impacto del campo electroforético sobre la migración de las partículas o muestra antes de alcanzar las salidas de muestra. Se debe reconocer que la etapa 4 se realiza más fácil al no tener voltaje aplicado durante la elución o extracción de la muestra separada electroforéticamente de la cámara 12 de electroforesis. Se apreciará que lo anterior es particularmente útil para electroforesis FFE de zona o aplicaciones de electroforesis FFE. Sin embargo, eliminar o reducir el voltaje no es importante cuando se realiza FFE en el modo de foco isoelectrico (IEF) en razón a que la carga total o la carga de superficie neta de las partículas es cero en su posición final entre los electrodos con la consecuencia que no se observa migración adicional luego de una aplicación continuada de un campo eléctrico.

La etapa 4 mostrada en la figura 2d demuestra elución de la muestra y medio de separación, permitiendo por lo tanto análisis adicional o procesamiento de la muestra eluída. La etapa 5, mostrada en la figura 2e, que puede ocurrir en realizaciones adicionales simultáneamente con la etapa 4 (figura 2d) o en al mismo tiempo después de que termina la etapa 4, permite por lo tanto que ocurra separación electroforética adicional para muestras adicionales o entornos electroforéticos. Mientras que la figura 2 demuestra los principios básicos de realizaciones de la presente invención, se mostrarán otros aspectos de la invención a lo largo de la solicitud.

Finalmente, la etapa 5 se lleva a cabo como se muestra en la figura 2e, esencialmente una repetición de la etapa 0 mostrada en la figura 2a. Opcionalmente, la figura 2e se puede evitar o abandonar si solamente se necesita un proceso de electroforesis por el usuario. Alternativamente, la etapa 5 puede combinarse con la etapa 4 siempre que se evite la mezcla de la nueva muestra con la muestra separada de la serie anterior.

Como se muestra en las figuras 9, 10 y 11, diferente voltaje, velocidad de flujo de partículas y perfiles de desplazamiento de partícula pueden existir y que corresponden a una muestra que se somete a las etapas 0 a 4 de la realización como se refleja en la figura 2. Para los propósitos de las figuras 9 y 11, la dirección Y puede corresponder a la dirección de la pared del extremo de entrada hacia la pared del extremo de salida. Las figuras 9 y 11 son similares en muchos aspectos, con excepción de que la aceleración y desaceleración de la velocidad de flujo del medio. En la figura 9b, es evidente que el método de la invención se puede llevar a cabo mediante la aplicación del voltaje necesario para que ocurra migración electroforética mientras que la muestra se mueve hacia adelante (en este caso, a lo largo de la dirección de Y), mientras que en la figura 10b, la muestra se lleva a detención antes de aplicar el voltaje necesario

para migración electroforética. En la figura 11, la reversión de la muestra y del flujo de medio de separación es instantánea (por ejemplo cuando se utilizan bombas peristálticas en el que la dirección de la bomba se conmuta muy rápido, véase figura 11b), aunque también una reversión más gentil y más lenta del flujo es ciertamente deseable para evitar cualquier turbulencia que afecte la calidad de la separación.

Se debe tener en cuenta que mientras las figuras 9 a 11 son representativas de determinadas realizaciones de la invención, son posibles muchas otras condiciones de voltaje, medio e índice de flujo de muestra, y desplazamiento de muestra que puede ser apreciado por un experto en la técnica. Adicionalmente, el número de ciclos capaz de ser alcanzado para otras realizaciones de la invención se puede alterar, ya sea aumentar o reducir, y puede por lo tanto, proporcionar al usuario flexibilidad para llevar a cabo electroforesis de flujo libre en un modo de operación de intervalo cíclico.

Aunque la figura 2 destaca el modo general de una realización de la invención y la figura 2c destaca la etapa de separación electroforética general de las realizaciones de la invención, se debe tenerse en cuenta que cada uno de los tres procesos electroforesis primario se pueden emplear (por ejemplo, isotacoforesis, electroforesis de zona y enfoque isoelectrico) como la etapa de la separación electroforética. Esto se muestra en más detalle esquemáticamente en las figuras 7a y 8a para electroforesis de zona e enfoque isoelectrica, respectivamente.

Durante la operación continua, el ensanchamiento de banda, se produce debido a la sección transversal de flujo laminar que resulta en mayores tiempos de retención para el analito en el campo eléctrico, y por lo tanto, una migración lateral más fuerte en el área de las paredes de la cámara de electroforesis. Esto activa un ensanchamiento de banda con forma de hoz adicional que se sobrepone al ensanchamiento de banda a través de difusión.

En contraste a lo anterior, durante la operación de intervalo cíclico en donde el campo eléctrico actúa sobre un analito, se provoca ensanchamiento de banda únicamente a través de difusión y por lo tanto es menor que en casos de operación continua. El ensanchamiento de banda inferior conduce a una mayor resolución. En otras palabras, la resolución es mejor en operación de intervalo cíclico que en operación continua (CFFE). De esta manera, la electroforesis de flujo libre de intervalo cíclico produce resolución mejorada de separación, en comparación con electroforesis de flujo libre continuo. Más aún, la operación de intervalos cíclico puede alcanzar el mismo nivel o un mejor nivel de resolución cuando se compara con electroforesis de flujo libre de intervalo estático, aún en un marco de tiempo mucho más corto. Esto se debe a la mayor fuerza de campo que se puede aplicar si la muestra y el medio de separación está en movimiento en comparación con el FFE de intervalo de la técnica anterior en donde ocurre electro migración estáticamente (apagado de flujos).

En otras realizaciones de la invención, el método se puede combinar con otras variaciones de dispositivos y procesos de electrolisis de flujo libre. Por ejemplo, se pueden utilizar configuraciones o dispositivos múltiples, que se disponen luego en paralelo y/o en serie, por ejemplo, como se describe en la solicitud copendiente US 2004/045826 otorgada a Weber. En dichas combinaciones, los otros procesos de electroforesis también se pueden llevar a cabo en el intervalo cíclico, modo de intervalo estático o modo continuo o como se describe aquí. Al seleccionar los modos de operación adecuado (intervalo cíclico, o intervalo continuo) y modos de separación (ZE, IEF y/o ITP), se pueden alcanzar separaciones poderosas de una variedad de partículas diferentes.

Como se muestra en las figuras 3, 4, 7a y 8a, un aparato 10 de electroforesis que puede llevar a cabo aspectos de la invención comprende una cámara 12 de electroforesis definida por una placa 16 de fondo o piso, una placa 14 superior cubierta, paredes 18, 20 de extremo y paredes 56, 58 laterales. Las paredes 18, 20 de extremo y las paredes 56, 58 laterales forman preferiblemente una cámara 12 de electroforesis substancialmente rectangular de estructura interpuesta y que soporta la placa inferior y superior paralelas opuestas (14 y 16).

Una pluralidad de electrodos ubicados en los espacios de electrodos, es decir, espacio 28 de cátodo y espacio 30 de ánodo, se disponen próximas y paralelos a las primeras y segundas paredes (56 y 58) laterales dentro de la cámara 12 de electroforesis de tal manera que los electrodos están generalmente paralelos entre sí. Aunque no es absolutamente necesario que los electrodos estén exactamente paralelos entre sí, se prefiere el paralelismo exacto de los electrodos alargados con el fin de proporcionar un campo eléctrico homogéneo a través del espacio de separación dentro de la cámara 12 de electroforesis. En general, se dispone un ánodo 26 en el espacio 30 de ánodo y un cátodo 24 se dispone en el espacio 28 de cátodo. Los electrodos (24 y 26) se separan normalmente de la cámara 12 de electroforesis mediante los separadores 32 de electrodo que mantienen una barrera para que las partículas separadas electroforéticamente eviten ser alcanzadas, ensuciadas o interferidas otra forma con electrodos durante operación. Normalmente, los separadores 32 de electrodo se construyen en la forma de separadores 48 de electrodo de membrana que son esencialmente membranas de filtro que evitan el intercambio de medios provocado por el flujo hidrodinámico. Las membranas normalmente se ubican muy cerca a los electrodos, pero para claridad los dibujos muestran las membranas separadas de los electrodos. Se puede encontrar una descripción más detallada de lo anterior en las figuras 7a y 8a. Las vistas de sección transversal mostradas en las figuras 3 y 4 describen un corte transversal a través de la cámara 12 de electroforesis en una dirección compartida por los electrodos, en general normales a la placa 14 superior y placa 16 inferior, así como a la pared 18 de extremo de entrada cerca de las entradas 36 de medios de separación que se describen adelante.

Una zona 34 o espacio de separación o se define o delimita en general como el espacio entre los espacios (28 y 30) de electrodos y placa (14 y 16) superior e inferior no incluyen los separadores 32 de electrodos. El espacio 34 de separación se flanquea por el ánodo 26 y el cátodo 24 que generan un campo eléctrico cuando se conecta a una fuente de energía (no mostrada). Preferiblemente, la dirección del campo eléctrico es sustancialmente paralela a la placa superior e inferior (14 y 16) y preferiblemente también es sustancialmente perpendicular a la dirección del desplazamiento del medio de separación de volumen dentro de la cámara 12 de electroforesis.

Preferiblemente, la placa superior e inferior (14 y 16) son estáticas con respecto a los electrodos y entre sí, por lo menos cuando se aplica voltaje a los electrodos de tal manera que las fuerzas causadas por el flujo de desplazamiento y el campo eléctrico actúan sobre la muestra y los iones solamente en el medio de separación.

Normalmente, la fuente de potencia en una fuente de potencia de corriente continua (CC) con un convertidor CA a CC que suministra corriente entre los electrodos en una forma generalmente controlada. Adicionalmente, puede existir un controlador para controlar el flujo de corriente entre el cátodo 24 y el ánodo 26.

Los electrodos (cátodo 24 y ánodo 26) se componen normalmente de un metal como platino que no se oxidará fácilmente en el campo eléctrico. Los electrodos (24 y 26) se lavan opcionalmente constantemente mediante una solución de sal o regulador para retirar los productos de electrólisis que se crean durante el proceso. La solución o medios allí se denominan en general como un medio 170 de cátodo y medio 172 de ánodo.

La placa 16 inferior y la placa 14 superior de la cámara 12 de electroforesis se pueden fabricar independientemente de vidrio (preferiblemente vidrio recubierto con polímeros) o plásticos adecuados, tal como PVC, policarbonato, plexiglás, polihalohidrocarburos, o Lucite® (una resina acrílica que consiste esencialmente de metil metacrilato polimerizado).

La placa superior e inferior (14 y 16) típicamente se separan por separadores 22 de cámara (no mostrado) que actúan como sellos o empaques. Los separadores 22 de cámara usualmente delimitan el espacio 34 de separación dentro de la cámara 12 de electroforesis. El espacio 34 de separación (espacio entre las placas) usualmente tiene un espesor de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1.5 mm, preferiblemente de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 1 mm y más preferiblemente de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.5 mm. Se apreciará que el espesor del espacio de separación depende de muchos factores, que incluyen el tamaño de la cámara 12 de electroforesis y el volumen de muestra que se va a separar o detectar y se puede adaptar de acuerdo con lo anterior para aquellos expertos en la técnica.

Un aparato 10 de acuerdo con las realizaciones de la presente invención comprende elementos para ayudar a introducir y extraer la muestra y medio de separación en y desde la cámara 12 de electroforesis. Integral a la cámara 12 de electroforesis en su pared de extremo inferior se encuentra, por ejemplo, una pluralidad de entradas de medio de separación 36, normalmente tiene puertos (no mostrados) que se mediante conductos como tubos 74 de entrada de medio de separación 74, tal como tubos de teflón flexibles. Los tubos están en comunicación de fluido con canales de alimentación de un sistema 60 de desplazamiento de fluidos (por ejemplo, una bomba multicanal tal como una bomba peristáltica). Las entradas de medios de separación se disponen en general colineales en el extremo inferior de la cámara 12 de electroforesis y equidistante con respecto a las salidas correspondientes, como se ilustra, por ejemplo, en la figura 7a y 8a. Los conductos de tubos 72 de entrada de muestra para introducir y eludir o expeler la muestra y los medios relacionados y reguladores dentro y fuera de la cámara 12 de electroforesis se muestran en las figuras 7a y 8a y se muestran esquemáticamente en las figuras 3 y 4. Las entradas 36 de medios de separación se suministran con un medio de separación, mientras que las entradas (40 y 44) de electrodos se conectan fluidicamente con los espacios (28 y 30) de electrodos y se suministran con el medio de estabilización de electrodos para el ánodo 26 y el cátodo 24. La muestra que contiene los analitos se inyecta en una posición predeterminada dentro de un espacio 34 de separación a través de una entrada 38 de muestra. En el que las múltiples separaciones son capaces de ser realizadas simultáneamente y en paralelo entre sí entre uno o más pares de electrodos o paredes de conductividad, se contempla que se pueden utilizar múltiples entradas 38 de muestra simultáneamente para introducir la muestra o muestras correctas dentro del espacio 34 de separación. En este caso, las múltiples entradas de muestra también se posicionan colineales y equidistantes al extremo de salida como se describió anteriormente para las realizaciones que comprenden múltiples entradas de medios de separación.

Alternativamente, las entradas 36 de medio de separación y las entradas 38 de muestra se pueden combinar. En esta realización, la muestra se puede introducir a través de las entradas de separación, inyectando, por ejemplo, la muestra a través de un puerto de entrada en la parte de la tubería 74 externa a la cámara 12 de electroforesis.

Un aparato 10 de acuerdo con las realizaciones de la presente invención puede comprender tanto como tres sistemas de desplazamiento fluidicos. Un primer sistema de desplazamiento fluido controla el desplazamiento de la muestra y el medio de separación en el espacio 34 de separación como se describirá en detalle adelante. Normalmente, el primer sistema de desplazamiento fluido es una bomba peristáltica multicanal pero puede tomar la forma de otras bombas suficientes para desplazar el fluido en forma controlada dentro del espacio 34 de separación.

Un segundo sistema de desplazamiento fluido sirve para dos propósitos, a saber, la introducción de la muestra en el espacio 34 de separación y la introducción y desplazamiento del medio de separación dentro y en el espacio 34 de separación. El segundo sistema de desplazamiento fluido comprende de dos bombas peristálticas multicanal, una para la introducción de la muestra en el espacio 34 de separación y una para la introducción y desplazamiento del medio de separación y la muestra. Sin embargo, es posible tener una bomba peristáltica multicanal que realice ambas tareas. Se prefiere el uso de bombas peristálticas multicanal, pero el segundo sistema de desplazamiento fluido puede tomar la forma de otras bombas suficientes para desplazar fluido en una forma controlada dentro del espacio 34 de separación.

El segundo sistema de desplazamiento fluido también puede realizar la tarea de introducir y el desplazar un medio de contraflujo dentro y en el espacio 34 de separación como se describirá adelante en detalle. Sin embargo también se contempla utilizar una bomba adicional multicanal para este propósito.

Finalmente, se puede utilizar un tercer sistema de desplazamiento fluido (no mostrado) para hacer circular el medio de electrodos dentro de los espacios del electrodo.

Los sistemas de desplazamiento de fluido están en interfaz con diversos tipos de medios en una forma controlada. Un controlador (no mostrado en las figuras) se utiliza normalmente para manejar los índices de flujos y presión de los fluidos anteriores para llevar a cabo la separación deseada o protocolo de fraccionamiento seleccionado por el usuario.

En una realización de un aparato capaz de llevar a cabo la invención mostrada en la figura 3, se utilizan dos sistemas 60 y 61 de desplazamiento de fluidos o bombas. Se utiliza un primer sistema 60 de desplazamiento de fluidos para proporcionar desplazamiento de fluido por volumen de la muestra y medio de separación entre los electrodos a lo largo de la dirección de los electrodos. Se utiliza un segundo sistema 61 de desplazamiento de fluidos para introducir la muestra y el medio de separación en el espacio 34 de separación, ya sean juntos o por separado, y para desplazar inicialmente dentro del espacio 34 de separación. En una realización preferida, el segundo sistema 61 de desplazamiento de fluidos comprende dos unidades de desplazamiento de fluidos, una para la introducción de la muestra dentro del espacio de separación y la otra para la introducción y desplazamiento del medio de separación. Este segundo sistema 61 de desplazamiento de fluidos también se utiliza para retirar o eluir la muestra después de la separación electroforética del espacio 34 de separación a través de las salidas 52 de muestra. Se puede utilizar separación de válvulas para permitir o evitar la introducción de la muestra a través de la entrada 38 de muestra dentro del espacio de separación de acuerdo con de desea mediante la operación pretendida de las realizaciones de la invención.

Un conducto 86 de ciclo de extremo de entrada y un conducto 88 de ciclo de extremo de salida se conectan operativamente al primer sistema 60 de desplazamiento de fluido y se acoplan adicionalmente fluidicamente al espacio 34 de separación de la cámara 12 de electroforesis. Su uso se relaciona con el ciclo del medio de separación y las muestras hacia atrás y adelante a lo largo de la dirección de los electrodos a diferencia de la introducción de la separación y medio de muestra en el espacio 34 de separación.

El primer sistema 60 de desplazamiento fluido proporciona una fuerza de desplazamiento o presión para controlar el flujo de fluidos en volumen de la muestra y el medio de separación después de que se han introducido en el espacio 34 de separación. Por ejemplo, una vez el espacio 34 de separación y los tubos de ciclo de salida y entrada se cargan con medio o una solución reguladora, la operación del primer sistema 60 de desplazamiento fluido (en este caso, una bomba peristáltica), transfiere la muestra y el medio de separación hacia un extremo de la cámara 12 de electroforesis, e invierte la operación del primer sistema 60 de desplazamiento fluido que provoca que la muestra y el medio de separación se muevan hacia el otro extremo de la cámara 12 de electroforesis. En forma deseable, la operación del primer sistema 60 de desplazamiento fluido se revertirá antes que la muestra alcance el extremo del espacio 34 de separación. Aún más deseable, la operación del primer sistema 60 de desplazamiento fluido asegurará que la muestra no deje esa porción del espacio 34 de separación que está entre los electrodos.

El segundo sistema 61 de desplazamiento fluido (por ejemplo, en la forma de dos bombas peristálticas) se conecta a través de la tubería 72 a la entrada 38 de muestra. También se conecta al segundo sistema 61 de desplazamiento fluido se encuentra el tubo 74 de entrada de medio de separación que se acopla fluidicamente a la entrada 36 de medio de separación. El segundo sistema 61 de desplazamiento fluido controla el suministro de medio de separación de muestra en el espacio 34 de separación así como controla la extracción de muestra fraccionada de la cámara 12 de electroforesis en pozos de recolección individual, vasos o cavidades 82 en por ejemplo una placa 80 de microvaloración.

Se debe observar que es deseable, cuando el segundo sistema 61 de desplazamiento de fluido está en operación, que el primer sistema 60 de desplazamiento de fluido no esté en operación y viceversa.

En operación, la realización reflejada en la figura 3 funciona como sigue. El segundo sistema 61 de desplazamiento fluido provoca la introducción de la muestra y la introducción del medio de separación en el espacio 34 de separación, así como el avance tanto de la muestra como del medio de separación dentro de la región central del espacio 34 de desplazamiento. Preferiblemente, la migración electroforética no ocurre durante esta etapa. Luego, el primer sistema

60 de desplazamiento fluido mueve la muestra y el medio de separación hacia delante y hacia atrás a lo largo de la dirección de los electrodos al desplazar el fluido a través del conducto 86 de ciclo de extremo de entrada y el conducto 88 de ciclo de extremo de salida. Durante una parte de este movimiento o ciclo, fluye una corriente eléctrica entre los electrodos provocando por lo tanto o permitiendo migración electroforética. Después suficiente y migración electroforética y de ciclo, el primer sistema 60 de desplazamiento fluido preferible no se utiliza más o se apaga, y el segundo sistema 61 de desplazamiento fluido provoca el medio de separación adicional se introduzca en el espacio de separación, desplazando por lo tanto la muestra separada del espacio de separación, a través de salidas de muestra y dentro de vasos de recolección preferiblemente, tal como aquellas encontradas en placas micro valoración. Puede ser posible durante esta etapa de elución para también introducir muestras adicionales en el espacio de separación.

También puede ser posible introducir medio de contraflujo en la pared 20 del extremo de salida a través de las entradas 54 de contraflujo, en el que las salidas 52 de muestra se interponen generalmente entre las entradas 38 de medios de muestra y las entradas 54 de contraflujo. Durante la etapa o fase de elución, es deseable que el alto voltaje se apague o por lo menos sea inefectivo en provocar migración electroforética, particularmente para los modos de operación ITP y ZE. Por obvias razones, no es necesario apagar el voltaje cuando se lleva a cabo la separación en el modo IEF (véase más adelante). Cabe notar que colocar válvulas en las entradas, salidas, o conductos de tuberías involucrados en esta realización pueden facilitar las etapas de procesos como se describió anteriormente.

En una realización adicional de un aparato capaz de llevar a cabo la invención, se utiliza un sistema 62 de desplazamiento fluido para controlar el movimiento de fluidos para llevar a cabo la separación electroforética en una forma de intervalo cíclico. Se conecta una primera bomba del sistema 62 de desplazamiento fluido a través de la tubería 72 de entrada de muestra a la entrada 38 de muestra. Se conecta una segunda bomba del sistema 62 de desplazamiento fluido al tubo 74 de entrada de medio de separación que se acopla fluidicamente a la entrada 36 de medio de separación. El sistema 62 de desplazamiento fluido controla el suministro de la muestra y medio de separación dentro del espacio 34 de separación, así como el movimiento de fluidos al proporcionar una fuerza de desplazamiento o presión para controlar el flujo de fluido en volumen de la muestra y medio de separación después de que se han introducido en el espacio 34 de separación. Por ejemplo, una vez el espacio 34 de separación y los tubos de ciclo de entrada y salida se cargan con medio o una solución reguladora, la operación del sistema 62 de desplazamiento fluido (en este caso, una bomba peristáltica), transfiere la muestra y medio de separación hacia un extremo de la cámara 12 de electroforesis, y reversa la operación del sistema 62 de desplazamiento fluido que provoca que la muestra y el medio de separación se muevan comunicación hacia el otro extremo de la cámara 12 de electroforesis. En forma deseable, la operación del sistema 62 de desplazamiento fluido se reversará antes que la muestra alcance el extremo del espacio 34 de separación. Aún más deseable, la operación del sistema 62 de desplazamiento fluido asegurará que la muestra no deje esa parte del espacio 34 de separación que está entre los electrodos.

Después que ha ocurrido separación electroforética, el flujo de muestra neto dentro y fuera del espacio 34 de separación se mantiene constante al mantener el flujo volumétrico del medio introducido mediante las entradas 54 de contraflujo y las entradas 36 de medio de separación para que cada una sea cero o positiva, en el que cuando la suma de ambos flujos sea positiva, la muestra fraccionada es capaz de eluir a través de las salidas 52 de muestra, a través de la tubería 76 de salida y preferiblemente dentro de vasos de recolección individual o cavidades 82 dispuestas en, por ejemplo, una placa 80 de microvaloración.

Opcionalmente también se puede conectar la segunda bomba del sistema 62 de desplazamiento fluido a una tubería 78 de contraflujo acoplada fluidicamente a través de una entrada 54 de contraflujo en el espacio 34 de separación.

Adicionalmente a la tubería 74 de entrada de medio de separación, se pueden utilizar válvulas de separación para permitir o evitar la introducción de la muestra a través de la entrada 38 de muestra dentro del espacio 34 de separación como se desea mediante la operación pretendida de las realizaciones de la invención.

La realización descrita en las figuras 4a y 4b funciona como sigue. El sistema 62 de desplazamiento fluido provoca la introducción de la muestra y el medio de separación dentro del espacio 34 de separación. En una realización preferida, el sistema 62 de desplazamiento fluido comprende dos sistemas de desplazamiento fluidos, uno para la introducción de la muestra dentro del espacio de separación y el otro para la introducción y desplazamiento del medio de separación. Preferiblemente, no ocurre migración electroforética durante esta etapa. Luego, el sistema 62 de desplazamiento fluido mueve la muestra y el medio de separación hacia atrás y hacia adelante a lo largo de la dirección de los electrodos. Esto se realiza de tal manera que la operación del sistema 62 de desplazamiento fluido provoca que el medio de separación y la muestra cambie hacia atrás y hacia adelante, y hacia y lejos de la pared 18 de extremo de entrada en un movimiento cíclico. En variaciones de la realización descritas en las figuras 4a y 4b, tanto la tubería 78 de contraflujo como la tubería 74 de entrada de medio de separación se conectan con el sistema 62 de desplazamiento fluido para provocar diferenciales de presión entre las entradas 54 de contraflujo y las entradas 36 de medio de separación.

Durante una parte del movimiento o ciclo, una corriente eléctrica que fluye entre los electrodos provoca o permite una migración electroforética. Después suficientes ciclos, migración electroforética o ambos, el sistema 62 de

desplazamiento fluídico se utiliza para eluir la muestra separada del espacio 34 de separación a través de salidas 52 de muestra y dentro de preferiblemente los vasos de recolección o cavidades 82 tal como aquellas encontradas en la placa 80 de valoración. Puede ser posible durante esta fase de elución también introducir muestras adicionales dentro del espacio de separación. También, puede ser posible introducir medios de contraflujos cerca a la pared 20 de extremo de salida, en el que las salidas 52 de muestra generalmente se interponen entre las entradas 38 de medios de muestra y las entradas 54 de contraflujo. Durante la etapa o fase de elución, es deseable que se apague el alto voltaje o por lo menos sea inefectivo para provocar migración electroforética en este punto. Cabe observar que las válvulas en las entradas, salidas, o conductos de tubería implicadas en esta y en otras realizaciones pueden facilitar las etapas de proceso como se describió anteriormente.

Durante los ciclos del flujo de muestra es esencial mediante cualquier medio evitar la entrada de la muestra o medio dentro de la salida de muestra, así como la entrada de aire dentro de cualquier tubo de entrada. Por ejemplo, en la realización descritas en las figuras 4a y 4b, es deseable tener salidas de muestra que resistan o eviten la entrada de la muestra o medio dentro de las salidas durante los ciclos del flujo de muestra al cerrar una válvula, provocando una presión que se desarrolla en las salidas al elevar la tubería 76 de salida con respecto al espacio 34 de separación, o restringe el tubo de salida de tal manera que existe una resistencia más fluida para que el medio de separación entre a la tubería 76 de salida que aquella de la tubería 78 de contraflujo, tubería 72 de entrada de muestra, o tubería 74 de medio de separación. Otros medios para lograr lo mismo son los que entiende el experto en la técnica.

Un aparato 10 de acuerdo con las realizaciones de la presente invención puede contener adicionalmente una salida de colector de fracción o salida 52 de muestra y tubería 76 de salida. En la mayoría de los casos de operación, normalmente después de separación electroforética de acuerdo con por lo menos uno de los modos de electroforesis mencionados anteriormente, las fracciones separadas, es decir, analitos de interés, se recolectan a través de la salida 52 de muestra espacialmente distintas dispuestas en una línea y en proximidad a una pared 20 de extremo de salida, normalmente opuestas en una pared 18 de extremo de entrada adyacente a las entradas de medios 36 de separación. Los analitos o fracciones se dejan a través de la tubería 76 de salida o conductos para vasos de recolección individual de cualquier tipo adecuado, preferiblemente cavidades 82 o pozos en la placa 80 de microvaloración (véase figuras 3 y 4). En los vasos de recolección, los analitos se recolectan junto con el medio de separación y, opcionalmente, el medio de contraflujo. La distancia entre las salidas 52 de muestra individual de la matriz de salidas de venta recolección debe ser generalmente tan pequeña como sea posible con el fin de proporcionar un fraccionamiento/separación adecuado. La distancia entre las salidas 52 de muestras individuales, medidas desde los centros de salidas de recolección, normalmente es de aproximadamente 0.1 mm a aproximadamente 2 mm, normalmente más de aproximadamente 0.3 mm a aproximadamente 1.5 mm y es casi siempre dependiente del diámetro máximo de la tubería 76 de salida. Esta serie de aberturas de tubería con la distancia más pequeña posible entre las aberturas se refiere a un dispositivo de fraccionamiento, y el número de estos tubos de salida se dispone en rangos paralelo que están entre 2 y un máximo de 1000, preferiblemente entre 30 y 200, y más preferiblemente entre 20 y 100. El número, forma, y ubicación de estas salidas se puede modificar en diferentes modos para fraccionar a de manera útil o aislar una porción particular de la muestra separada de acuerdo con un gradiente de separación.

[Los componentes de muestra seleccionados o fracciones recolectadas se pueden utilizar para propósitos preparativos o analíticos. Alternativamente, las fracciones se pueden introducir directamente o indirectamente dentro del mismo dispositivo u opcionalmente dentro de un dispositivo electroforético remoto para llevar a cabo procesamiento adicional. Dicho procesamiento puede ocurrir en el evento de realizar un fraccionamiento grueso, seguido por uno fino (mayor resolución), o en uno o múltiples modos electroforéticos (ZE, IEF, ITP o combinaciones de los mismos).

Los componentes de muestra extraños que no se recolectan a través de las salidas de recolección a través de los cuales se extrae la muestra deseada o que se recolecta a través de diferentes salidas de recolección también se pueden desechar.

En diversas realizaciones de la invención, la muestra separada se puede diluir intencionalmente durante la etapa de fraccionamiento o alternativamente, se puede extraer de la cámara mediante el uso de un proceso de contraflujo. En el proceso de contraflujo, se puede introducir un medio 176 de contraflujo a través de entradas 54 de contraflujo que se oponen en general a la dirección del flujo de volumen de la muestra durante elución, para la muestra y separación de medio en el espacio 34 de separación que se va a extraer selectivamente del espacio 34 de separación. La muestra y el medio de separación se unen con un medio de contraflujo en las salidas 52 de muestra o extracción y se extraen a través de estos. El contraflujo sirve para mejorar la resolución de separación al permitir el ajuste y control de las condiciones de flujo y presión en las salidas de recolección, manteniendo por lo tanto el control para que la fracción deseada alcance y se extraiga a través de la salida 52 de muestra deseada. Detalles del proceso de contraflujo se describen, por ejemplo, en la Patente Estadounidense 5,275,706 otorgada a Weber. En vista de las ventajas mencionadas anteriormente, que utilizan un contraflujo se prefieren en general, aunque en determinadas situaciones, puede no desearse dicho contraflujo, por ejemplo, debido al efecto de dilución inherente.

Además del uso del contraflujo descrito en la figura 4a y la figura 4b descritos anteriormente, es posible utilizar una técnica de contraflujo en la cámara 12 de electroforesis de acuerdo con una realización de la invención durante la elución de muestra. Por ejemplo, en las figuras 7a y 8a, se puede introducir un medio de contraflujo durante una etapa de elución en donde la muestra se ha sometido a migración electroforética en la cámara 12 de electroforesis a través

de tubería 78 de contraflujo hacia y a través de las entradas 54 de contraflujo. El medio de contraflujo se introduce en una dirección opuesta a la dirección en la que la muestra y el medio de separación se eluyen desde la cámara 12 de electroforesis. El contraflujo mejora la separación al permitir ajuste y control de las condiciones de flujo y presión de las salidas 52 de muestra y reduce la ocurrencia de cualquier vacío que pueda impactar la resolución de la muestra durante elución. Para detalles de cómo utilizar el contraflujo, se hace referencia de nuevo al documento US 5, 275,706.

Si se utiliza, el medio de contraflujo se selecciona normalmente para que sea capaz de modificar o sobrepasar la capacidad de regulación del medio de separación que se aproxima a la salida 52 de muestra, y puede por lo tanto ser un material que tiene las mismas propiedades físicas tal como viscosidad y densidad pero que difiere en conductividad y/o valor de pH y/o sus ingredientes químicos. El contraflujo típico y el medio de separación se seleccionan del mismo grupo de medios, y pueden contener componentes tales como urea, glicerol, carbohidratos, y compuestos similares.

Una relación útil del índice de flujo del medio de separación para el índice de flujo del medio de contraflujo es aproximadamente 1:10 a aproximadamente 10:1, normalmente más de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 3:1. Los índices de flujo actuales para el medio de separación y el medio de contraflujo dependen de una variedad de consideraciones, que incluyen las dimensiones geométricas del aparato 10, el modo de separación particular utilizado (que puede variar en el tiempo de tránsito requerido), la muestra que se va a separar, el medio de separación utilizado y el medio de contraflujo o medio utilizado con el fin de obtener una separación óptima de los analitos. Los índices de flujo típico de todos los medios en el sistema (estabilización y contraflujo) pueden por lo tanto variar ampliamente desde 0,3 mil/hora a 3000 mil/hora, dependiendo de las circunstancias y la geometría de la cámara electroforética. La velocidad lineal de la muestra y el medio de separación esta, sin embargo, generalmente entre 0,01 y 50 mm/sec y preferiblemente entre 0,1 y 10 mm/sec.

El control de temperatura también es útil en las realizaciones de la presente invención. Cuando pasa corriente a través de una solución de electrolíticos, la temperatura del medio de conducción aumenta, de acuerdo con el fenómeno conocido como efecto Joule que puede influir en la viscosidad y/o flujo de fluidos a través de la cámara, causando por lo tanto alternaciones del flujo. Para reducir las alteraciones que afectan el perfil del flujo laminar del medio de fluido provocado por dicho calentamiento, esto es generalmente deseable para disipar el calor del efecto Joule al entorno. Muchas formas de alcanzar prácticamente la refrigeración deseada serán evidentes para el experto en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un elemento 178 de refrigeración (no mostrado) para llevar a cabo dicho efecto. La cámara 12 de electroforesis se puede disponer con su placa 16 inferior sobre el soporte de metal que contiene canales de flujo de fluido conectados al elemento 178 de refrigeración. El elemento 178 de refrigeración puede ser un dispositivo 174 de control de temperatura, tal como un módulo termoelectrico (TE) o Peltier. Un sistema de termostato de control de circuito cerrado para medir y controlar la temperatura de la cámara 12 de electroforesis es útil para mantener las temperaturas deseadas para el espacio 34 de separación. Las temperaturas útiles varían de aproximadamente 2°C a aproximadamente 35°C, más comúnmente de aproximadamente 5°C a temperatura ambiente (aproximadamente 20-25°C).

En las realizaciones de la invención en el que un separador 48 de electrodo de membrana aísla los espacios (28 y 30) de ánodo y cátodo del espacio 34 de separación, se pueden purgar los espacios (28 y 30) de electrodos al hacer circular un flujo de medio 170 de cátodo y medio 172 ánodo (denominados juntos como medios de electrodo) en un alto índice de flujo utilizando una bomba. El medio de electrodos se puede enfriar y reintroducir en los espacios (28 o 30) del electrodo en una forma continua. Cómo se refrigera el medio de electrodo se refleja en las figuras 7a y 8a, en el que el medio de cátodos ingresa en la entrada 44 de medio de cátodos y sale a través de la salida 46 de medios de cátodos. Antes que el medio de cátodo y el medio de ánodo reingresen a la cámara 12 de electroforesis, se pueden someter a un elemento 178 de refrigeración tal que el elemento de transferencia de calor retira la energía térmica del medio de ánodo y cátodo antes de reintroducción.

Específicamente, como se refleja en las figuras 7a y 8a, el medio 172 de ánodo ingresa en la entrada 40 de medio de ánodo y sale a través de la salida 42 de medio de ánodo. En las realizaciones en que el separador 32 de electrodo es una barrera física tal como un separador 48 de electrodo de membrana, el índice de fluidez del medio (170 y 172) de ánodo y cátodo puede variar del índice de fluidez de la muestra de volumen y el medio de separación.

Es fácilmente evidente que existen otras formas adecuadas para refrigerar el medio de electrodos y pueden ser aplicadas por el experto en la técnica.

Los controladores mencionados anteriormente para el suministro de energía y control de fluidos pueden funcionar como una unidad, u opcionalmente como unidades independientes. Cada una se puede controlar por el usuario independientemente de la otra. La configuración de los parámetros de protocolos procesados en los controladores, tal como el modo de electroforesis, número de ciclos, tiempo de retención de un ciclo, etcétera, se hace preferiblemente por medio de un programa de software que proporciona una interfaz gráfica de usuario para ingresar los valores de parámetro.

De acuerdo con lo anterior, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un código de software ejecutable por ordenador almacenado en un medio legible por ordenador, en el que el código es adecuado para efectuar la separación de partículas en una cámara 12 de electroforesis, en el que la cámara de electroforesis tiene una placa superior, una

placa inferior, y una pluralidad de electrodos generalmente paralelos entre si con un espacio de separación dispuesto entre ellos, y uno o más sistemas de desplazamiento fluídicos para transportar un medio de separación entre los electrodos, en el que el software comprende códigos para habilitar la selección y aplicación de voltaje entre los electrodos efectivo para manipular partículas mediante electroforesis, los códigos permiten el desplazamiento de por lo menos una parte del medio de separación y muestra hacia una primera dirección paralela a la dirección de los electrodos, y el código para permitir el desplazamiento de por lo menos una parte del medio de separación y muestra hacia una segunda dirección opuesta a la primera dirección; y un código para permitir el desplazamiento de por lo menos una parte del medio de separación y muestra hacia la primera dirección. En otras palabras, el programa de software soporta un usuario en seleccionar los valores de parámetros adecuados para los procesos de separación pretendidos, que incluyen voltaje, corriente, índice de fluidez del medio de separación, muestra y opcionalmente medio de contraflujo así como el número de ciclos. Esto se logra normalmente al proporcionar al usuario forma para ser llenadas, que se adaptan a su diseño, por ejemplo, la información y campos de entrada mostrados, para los valores de parámetro ingresados hasta ahora, es decir, el modo seleccionado de electroforesis, etcétera. Adicionalmente, el programa de software puede verificar los valores de parámetros ingresados e informar al usuario acerca de los valores de parámetros que son incorrectos o están fuera de rango. Adicionalmente, el programa de software puede soportar el usuario al proporcionar automáticamente valores de parámetros, que se pueden derivar de los valores de parámetros ya establecidos, por ejemplo, tiempo de total de retención después de haber ingresado el número de ciclos y el tiempo de retención para cada ciclo.

En forma deseable, todos los flujos de medio a través del espacio de separación se hacen bajo condiciones de flujo laminar. Como se muestra en las figuras 3, 4, 7a y 8a, la dirección del flujo de las diversas entradas (36 y 38) mientras que se llena la cámara 12 de electroforesis con la muestra o con el medio de separación se muestra mediante flechas de diversas realizaciones de esta invención.

Se pueden emplear diferentes modos de electroforesis para influir en la migración de partículas basada en, por ejemplo, el punto isoeléctrico de la partícula (es decir, el enfoque isoeléctrico de iones bipolares (IEF)), u opcionalmente basado en la carga neta de partículas (es decir, zona de electroforesis (ZE) para partículas con cargas netas variables o diferentes). Las partículas también se pueden separar basadas en sus movilidades electroforéticas cuando se interponen entre sistemas líderes (movimiento rápido) y cola (movimiento lento) (es decir, isotacoforesis (ITP) para partículas aniónicas o catiónicas).

En un primer modo de separación electroforética, se lleva a cabo una técnica de separación FFE de electroforesis de zona (ZE). La electroforesis de zona se basa en la diferencia entre el valor de movilidad electroforética de las partículas que se van a separar y aquella del medio de separación empleado. La electroforesis de zona FFE hace posible aislar los analitos y partículas sobre la base de tamaño diferente, y/o forma y/o carga de superficie neta.

El método FFE ZE es particularmente adecuado para separar biopartículas "sensibles" y complejas cuando las demandas específicas se tienen que colocar luego de separación del medio durante de separación. Éste es típicamente el caso cuando la función biológica y la integridad de las partículas se tienen que mantener luego de separación. Los requisitos especiales en los casos son, por ejemplo, un rango de pH muy restringido para el medio de separación, buena capacidad de regulación del medio de separación, compatibilidad fisiológica de las sustancias de regulación utilizadas y un contenido mínimo de diversos aniones y cationes "esenciales", etcétera.

La figura 7b muestra un aparato de electroforesis de zona con un perfil plano de pH. Un flujo de medio de separación en una forma laminar entre ambos electrodos como se demuestra dentro de la etapa 2 y 3 de la figura 2c. Una muestra con tres grupos de partículas (90a, 104a y 118a) que se van a separar se introducen en el medio de separación a través de la entrada 38 de muestra y transportada mediante el flujo laminar del medio de separación. Los tres grupos de partículas se separan durante la etapa 2 y 3 de la etapa, como se refleja en la figura 2c y por lo tanto se permite migrar y recolectar en distintas fracciones en el gradiente de pH que resulta del campo eléctrico generado entre los electrodos en el medio de separación, como se indica en la figura 2d. Específicamente, las partes de la primera partícula 90a, segunda partícula 104a y tercera partícula 118a se reflejan en la figura 7a. Cada partícula (90a, 104a, 118a) sigue una ruta especial o movimiento dentro de las etapas 2 y 3 de la migración electroforética. Las partículas tienen una carga neta que influencia su movimiento dentro del espacio de separación bajo condiciones que permiten la migración electroforética dentro del medio de separación. La tercera partícula 118a tiene una carga neta ligeramente positiva y por lo tanto bajo condiciones de electroforesis de zona, se desvía ligeramente hacia el cátodo mientras que el flujo de fluido en volumen del medio de separación influencia el movimiento de partículas neto de la tercera partícula 118a con respecto a los extremos de entrada y salida de la cámara. La segunda partícula 104a en la otra parte tiene una carga positiva relativamente fuerte, y por lo tanto, durante la ruta de movimiento bajo condiciones de electroforesis de zona, se desvía en gran medida hacia el cátodo mientras que el flujo de fluidos en volumen del medio de separación influencia el movimiento neto de partículas de la segunda partícula 104a con respecto a los extremos de entrada y salida de la cámara. La primera partícula 90a, de otra parte, tiene una carga negativa relativamente fuerte y por lo tanto, durante la ruta de movimiento bajo condiciones de electroforesis de zona, se desvía en gran medida hacia el ánodo mientras que el flujo de fluidos en volumen del medio de separación influencia el movimiento de partículas neto de la primera partícula 90a con respecto a los extremos de entrada y salida de la cámara. Se debe tener en cuenta que la figura 7a refleja una separación de electroforesis de zona (ZE) en el que las partículas continuaran migrando hacia el electrodo que tiene una carga positiva que la carga neta de cada partícula

respectiva en la presencia de un campo electroforético. Si ocurren más ciclos de movimiento hacia atrás y hacia adelante, o si se permite que tenga lugar un período más largo de duración de migración electroforética, las partículas continuarían migrando hasta que alcancen el electrodo o algún otro separador 32 electrodo tal como un separador 48 de electrodo de membrana u opcionalmente un separador electrodo 50 no membrana tal como un regulador o pared de alta conductividad. En todos los casos de la primera, segunda y tercera partículas (90a, 104a, 118a), la cuarta ruta reflejada en la figura 7a se representa mediante la etapa de elución en el que la migración electroforética no es muy influenciada o incluso no existe como un componente de cada dirección neta partícula.

La figura 7a muestra dicho aparato ZE en el que las muestras se separan sobre la base de su carga y en un menor grado sobre la base de su tamaño y forma. Como se indica en la figura 7b, el perfil 136 de conductividad eléctrica del medio de separación entre los dos electrodos incluye una región 138 de alta conductividad en el espacio 28 de cátodo y en el espacio 30 de ánodo, los cuales están en la vecindad de los electrodos. Estas se muestran en la figura 7b como regiones 138 de alta conductividad, mientras que el medio de separación se represe como una región 140 de baja conductividad. El valor de pH es igual a través del medio de separación completo. El perfil 134 de pH plano se genera en el medio de separación los reguladores 170 y 172 de medio de cátodo y el ánodo, respectivamente. Mientras las regiones 144 de pH alto existen dentro de los reguladores de medio de cátodo y el ánodo, existe una región de bajo pH entre ellos.

En un segundo modo de separación electroforética, la separación se basa en diferentes valores p_i de partículas que se van a separar, con su valor p_i que equivalente al valor de pH del medio no homogéneo, circundante, contra el que las partículas parecen neutrales. El FFE de partículas sobre la base de diferentes puntos isoeléctricos permite analitos o partículas sólo con disparidades mínimas en sus valores p_i que se van a aislar. Esto se denomina enfoque isoeléctrico (IEF) llevado a cabo en electroforesis de flujo libre (FFE). En el punto isoeléctrico p_i (es decir, en el punto en el medio de separación que visualiza el valor pH en el que el número de cargas positivas y negativas es igual para una partícula dada, por ejemplo, una molécula de proteína) la carga total o carga neta de superficie de esta partícula es cero. El efecto de foco inherente en el medio de separación de un aparato provoca que una partícula se difunda lejos del p_i para recibir automáticamente una carga de superficie neta (positiva o negativa) y ser transportada en la dirección del p_i de nuevo por el campo eléctrico.

Como resultado de la transferencia de carga (es decir, interacción eléctrica) entre analitos o partículas con moléculas iónicas (preferiblemente iones monovalentes) del medio de separación, se debe esperar que exista un mayor cambio en el valor de p_i y por lo tanto una separación rápida y total del complejo que consiste de la partícula y la molécula iónica del resto de las especies de muestra. La técnica de enfoque isoeléctrica cíclica es especialmente adecuada para aislamiento preparativo de biopolímeros en general, así como de biopartículas, cuya función o integridad biológica esta seguramente dentro del intervalo de gradientes de pH en el medio de separación. Al agregar "expansores osmóticos" es posible asegurar que se mantiene la presión osmótica ideal. Por ejemplo, al agregar sustancias no cargadas (por ejemplo sacarosa o manitol, etcétera, como un expansor osmótico no iónico) y/o sales (por ejemplo NaCl como un expansor osmótico iónico), se puede alcanzar la presión osmótica óptima (es decir, condiciones isomolales) para un tipo de célula dada (por ejemplo, 250-310 mosmol para células de mamífero).

La figura 8b muestra un aparato 10 de electroforesis IEF con un gradiente 142 de perfil de pH lineal. Un medio de separación fluye en una forma laminar entre ambos los electrodos como se demuestra dentro de la etapa 2 y 3 de la figura 2c. Una muestra con tres grupos de partículas (90b 104b y 118b) que se van a separar se introduce en el medio de separación a través de la entrada 38 de muestra y se transportan por el flujo laminar del medio de separación. Los tres grupos de partículas se separan durante la etapa 2 y 3 de la etapa en la figura 2c y se permite por lo tanto enfocar y ser recolectado en distintas fracciones en el gradiente de pH que resulta del campo eléctrico generado entre los electrodos en el medio de separación representado como etapa 4 de la figura 2d. Específicamente, las rutas de la primera partícula 90b, segunda partícula 104b y tercera partícula 118b se reflejan en la figura 8a. Cada partícula (90b, 104b, 118b) sigue una ruta o movimiento especial dentro de las etapas 2 y 3 de la migración electroforética. Las partículas tienen un p_i que influencia su movimiento dentro del espacio de separación bajo condiciones que permitan la migración electroforética dentro del medio de separación IEF. La tercera partícula 118b tiene un p_i ligeramente mayor que el p_i del medio cercano a su posición original y por lo tanto, durante la ruta del movimiento bajo las condiciones de electroforesis IEF, que se desvía ligeramente hacia el cátodo mientras que el flujo de fluido de volumen del medio de separación influencia el movimiento de partícula neto de la tercera partícula 118b con respecto a los extremos de entrada y salida de la cámara. La segunda partícula 104b, de otra parte tiene un p_i mucho mayor que el p_i del medio cerca de su posición original, y por lo tanto, durante la ruta del movimiento bajo condiciones de electroforesis IEF, que se desvía en gran medida hacia el cátodo mientras que el flujo de fluido en volumen del medio de separación influencia el movimiento de partícula neto de la segunda partícula 104b con respecto a los extremos de entrada y salida de la cámara. La primera partícula 90b, de otra parte, tiene un p_i mucho menor que el p_i del medio cerca de su posición original, y por lo tanto, durante la ruta de movimiento bajo condiciones de electroforesis IEF, se desvía en gran medida hacia el ánodo mientras que el flujo de fluido en volumen del medio de separación influencia el movimiento neto de partículas de la primera partícula 90b con respecto a los extremos de entrada y salida de la cámara. Se debe tener en cuenta que la figura 8a refleja una separación IEF en el que las partículas nunca alcanzan su p_i . Si ocurren más ciclos de movimiento hacia adelante y hacia atrás, o si se permite que tenga lugar una duración o periodo mayor de migración electroforética, las partículas eventualmente alcanzarían su p_i y solo experimentarían movimiento hacia adelante y hacia atrás como lo haría el flujo de fluido de volumen de la muestra y el medio de

separación. En todos los casos de la primera, segunda, y tercera partículas (90b, 104b, 118b) la cuarta ruta reflejada en la figura 8a se representa mediante la etapa elución en el que la migración electroforética no es muy influenciada o incluso no existe como un componente de cada dirección neta de partícula.

La figura 8b indica el perfil 136 de conductividad eléctrica del medio de separación entre dos electrodos con alta conductividad eléctrica en el espacio 28 de cátodo y el espacio 30 de ánodo en la vecindad de los electrodos. Estos se muestran en la figura 8b como regiones 138 de alta conductividad, mientras que el medio de separación se representa como una región 140 de baja conductividad. Se genera el gradiente 142 de perfil de pH en el medio de separación entre los reguladores 170 y 172 de medio de cátodo y ánodo, respectivamente.

Adicionalmente, un aparato 10 de acuerdo con realizaciones de la presente invención se puede llevar a cabo en el modo de isotacoforesis (ITP). La técnica de separación ITP FFE se basa en la diferencia en el valor de movilidad electroforética de las partículas que se van a separar. En contraste al ZE FFE, la separación se alcanza en el medio de separación no homogéneo y ofrece mejor disolución debido al "efecto de enfoque" inherente. Cuando se difunden partículas individuales de una banda de partículas separadas (por ejemplo, proteínas) durante ITP estas partículas ingresan a un medio con una fuerza de campo eléctrico variable, que resulta en que se aceleran o desaceleran partículas. El efecto de enfoque inherente significa que las partículas que se mueven más rápido o más lento encuentran su forma en la fracción dominante de nuevo. Mientras que no se muestra esquemáticamente como se hizo anteriormente para las técnicas de electroforesis IEF y de zona, la presente invención muestra resultados y valores destacados cuando se utiliza en un modo de operación ITP.

Los expertos en la técnica apreciarán que son posibles diversas combinaciones de estas técnicas de separación (IEF y ZE FFE o IEF e ITP). Por ejemplo, es posible utilizar diferentes medios de separación al mismo tiempo dentro de la cámara de electroforesis del aparato FFE, permitiendo por lo tanto emplear diferentes parámetros de separación simultáneamente.

En otras realizaciones de la invención, se contempla que el modo de intervalo cíclico se puede llevar a cabo en múltiples subespacios de separación dentro del espacio 34 de separación entre un único par de electrodos. Los límites de baja movilidad (con alta conductividad) entre subespacios adyacentes se define por los flujos adyacentes del medio estabilización catódico y el medio de estabilización anódica que se disponen entre los subespacios. Todos los medios se introducen normalmente a través de sus respectivas entradas a través de una bomba tal como una bomba peristáltica multicanal. Para detalles de este método, refiérase a la solicitud internacional No. US06/PCT/016175.

Preferiblemente, el medio de separación es un medio acuoso, libre de matriz. La elección de los componentes de regulador depende del modo de aplicación (ZE, IEF o ITP) y la naturaleza de la muestra o el problema de separación. Los sistemas de regulador adecuados se conocen en general en la técnica, y están en algunos casos disponibles comercialmente (por ejemplo, de BD GmbH, Planegg, Alemania). Los sistemas de regulador preferidos para llevar a cabo las realizaciones de la presente invención, por ejemplo, se describen en la solicitud copendiente US2004/101973, solicitud presentada provisionalmente USSN 60/885,792, y USSN 60/945,246. Se prefiere particularmente el FFE de intervalo cíclico como se describe aquí que son sistemas de regulador simples que comprende un ácido regulador y una base reguladora, específicamente si la separación se lleva a cabo en el modo IEF de gradiente plano o ZE.

En algunas realizaciones de la invención, el medio de estabilización anódico, que normalmente es acuoso, puede por ejemplo comprender un ácido seleccionado del grupo que consiste de ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido acetilsalicílico, ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) y reguladores de ion bipolar (también denominados reguladores de Goods— véase Good et. al., Biochemistry 5, 467 (1966)). En algunas realizaciones de la invención, el medio de estabilización catódico, que es normalmente acuoso, puede comprender una base seleccionada del grupo que consiste de N-metil-D-glucosamina, trisopropanolamina y 2-[bis(2-hidroxietil) amino] -2-(hidroximetil) propano-1, 3-diol (BISTRIS).

Una posibilidad de mejorar la separación electroforética es maximizar el periodo de tiempo de una muestra que se mueve y se interpone entre un ánodo y cátodo. Para lograr esto, se puede ajustar la velocidad de fluido promedio, duración y distancia de desplazamiento para el flujo de volumen del medio y la muestra que se pueden ajustar para maximizar el desempeño electroforético de la aplicación. En algunos casos, por ejemplo, el tiempo de residencia puede ser una preocupación importante y por lo tanto el número de ciclos, así como la duración, distancia y velocidad de partícula lineal para el flujo de volumen del medio de separación con el fin de optimizar la salida y el desempeño. En otras aplicaciones, el ampliamiento de banda debido al perfil de flujo laminar puede ser de interés para control. La flexibilidad para controlar los parámetros del sistema permite al usuario maximizar la salida y calidad de fraccionamiento basado en el tipo de aplicación que está utilizando. El método de intervalo cíclico de acuerdo con la presente invención proporciona la oportunidad de realizar cualquier técnica de separación FFE dentro de una única cámara 12 de electroforesis. Más aun, la cámara puede incluso tener dimensiones más cortas aunque en tiempo prolongados de electroforesis cuando se compara con las dimensiones de la cámara requeridas por máquinas de electroforesis de flujo libre continuas.

Como se mencionó anteriormente, la presente invención es particularmente adecuada para, pero no limitada a, análisis y separación preparativa de iones, péptidos, biopolímeros, biopartículas tales como vesículas, membranas celulares,

organelos celulares, virus, etcétera, así como polímeros sintéticos y en general cualesquier partículas que puedan ser influenciadas por un campo electroforético.

- 5 Aquellos expertos en la técnica apreciarán que son posibles muchas modificaciones y variaciones de las realizaciones descritas aquí sin apartarse del alcance de la presente invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para separar partículas que comprende:

- 5 disponer un medio de separación y muestra en una cámara (12) de electroforesis que tiene una placa superior(14), una placa inferior(16), un primer extremo de cámara, un segundo extremo de cámara y una pluralidad de electrodos generalmente en paralelo entre sí con un espacio (34) de separación dispuesto entre ellos, un sistema de desplazamiento de fluidos para el transporte de un medio de separación entre los electrodos; en el que los electrodos se extienden longitudinalmente hacia cada uno de los extremos de dicha cámara de electroforesis;
- 10 aplicar un voltaje entre los electrodos efectivo para manipular electroforéticamente partículas; en el que el método comprende
- 15 desplazar el medio de separación y muestra hacia una primera dirección generalmente paralela hacia la dirección de los electrodos;
- caracterizado porque el método comprende adicionalmente
- 20 desplazar medio de separación y muestra en una segunda dirección generalmente opuesta a la primera dirección, reversando por lo tanto el flujo de volumen del medio de separación y muestra.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente: eluir el medio de separación y muestra de la cámara de electroforesis a través de una o más salidas.
- 25 3. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que antes de eluir el medio de separación y muestra de la cámara de electroforesis, el método comprende retirar el voltaje entre los electrodos efectivos para manipular electroforéticamente partículas.
- 30 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente introducir y desplazar un medio de contraflujo dentro del espacio de separación generalmente opuesto a la dirección de flujo de volumen de la muestra durante elución.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que por lo menos una parte de medio de separación y la muestra se eluye del espacio de separación dentro de las cavidades de recolección individual tal como vasos o pozos en placas de micro valoración.
- 35 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que por lo menos una parte del medio de separación y muestra se eluye hacia las salidas al desplazar el medio de separación y muestra en generalmente la misma dirección que la primera o segunda dirección.
- 40 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende un número de ciclos, en el que un ciclo comprende
- 45 desplazar el medio de separación y la muestra hacia una primera dirección generalmente en paralelo hacia la dirección de los electrodos, y
- desplazar el medio de separación y muestra en una segunda dirección generalmente opuesta a la primera dirección, reversando por lo tanto el flujo de volumen del medio de separación y muestra;
- 50 y en el que el número de ciclos es mayor de uno, preferiblemente de 2 o aproximadamente 10 ciclos.
8. El método de la reivindicación 7, en el que el número de ciclos se selecciona con el fin de alcanzar suficiente separación de la muestra.
- 55 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la dirección del campo eléctrico es sustancialmente perpendicular a la dirección del desplazamiento del medio de separación.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la dirección del campo eléctrico es sustancialmente paralela a la parte superior e inferior de la placa.
- 60 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el medio de estabilización anódico se dispone entre el ánodo y el medio de separación y en el que un medio de estabilización catódico se dispone entre el cátodo y el medio de separación dentro de la cámara de electroforesis.
- 65 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el medio de separación es un medio acuoso, libre de matriz, que comprende por lo menos un regulador de ácido y un regulador de base.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que se disponen múltiples muestras en la cámara de electroforesis y se separan simultáneamente mediante electroforesis.

5 14. Un aparato para la separación de partículas (10) que comprende:

una cámara (12) de electroforesis que tiene una placa superior (14), una placa inferior (16), un primer extremo de cámara, un segundo extremo de cámara, y una pluralidad de electrodos generalmente en paralelo entre sí con un espacio (34) de separación dispuesto entre ellos, en el que los electrodos se extienden longitudinalmente hacia cada uno de los extremos de dicha cámara de electroforesis;

un sistema (61) de desplazamiento de fluidos se configura para introducir un medio de separación y para introducir una muestra entre los electrodos;

15 caracterizado porque el aparato comprende adicionalmente

un segundo sistema (60) de desplazamiento de fluido configurado para desplazar cíclicamente el medio de separación y muestra entre una primera dirección generalmente paralela a la dirección de los electrodos y una segunda dirección generalmente opuesta a la primera dirección, reversando por lo tanto el flujo de volumen del medio de separación y muestra.

15. Un aparato para separar partículas que comprende:

una cámara (12) de electroforesis que tiene una placa (14) superior, una placa (16) inferior, un primer extremo de cámara, un segundo extremo de cámara, y una pluralidad de electrodos generalmente en paralelo entre sí con un espacio (34) de separación dispuesto entre ellos, en el que los electrodos se extienden longitudinalmente hacia cada uno de los extremos de dicha cámara de electroforesis;

caracterizado porque el aparato comprende

un sistema (62) de desplazamiento de fluido configurado para introducir un medio de separación y una muestra entre los electrodos y configurado adicionalmente para desplazar cíclicamente el medio de separación y la muestra entre una primera dirección generalmente paralela a la dirección de los electrodos y una segunda dirección generalmente opuesta a la primera dirección, reversando por lo tanto el flujo de volumen del medio de separación y muestra.

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o el aparato de reivindicación 14 o reivindicación 15, en el que la placa superior y la placa inferior son estacionarias con respecto a los electrodos y entre sí.

17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o el aparato de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el espacio de separación entre la placa superior y la placa inferior comprende un espesor de aproximadamente 0.01 a 1.5 mm, preferiblemente aproximadamente 0.05 a aproximadamente 1 mm y más preferiblemente de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.5 mm.

18. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que el primer sistema de desplazamiento de fluido del aparato de las reivindicaciones 14 o el sistema de desplazamiento de fluido de la reivindicación 15 comprende una bomba multicanal tal como una bomba peristáltica.

19. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en el que el primer sistema de desplazamiento de fluido del aparato de la reivindicación 14 o el sistema de desplazamiento de fluido de la reivindicación 15 se utiliza adicionalmente para remover la muestra después de separación del espacio de separación.

20. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 14 y 16 a 19, en el que el segundo sistema de desplazamiento de fluido comprende una bomba multicanal tal como una bomba peristáltica.

21. El aparato de la reivindicación 20, en el que los dos sistemas de desplazamiento de fluido se proporcionan mediante una bomba de medio multicanal única, tal como una bomba peristáltica.

22. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, que comprende adicionalmente

un controlador configurado para controlar los sistemas de desplazamiento de fluido;

un controlador configurado para controlar el flujo de corriente entre los electrodos;

separadores de electrodos configurados para aislar los electrodos del espacio de separación;

un elemento de refrigeración y un regulador de temperatura configurado para controlar la temperatura de la cámara mediante el elemento de refrigeración;

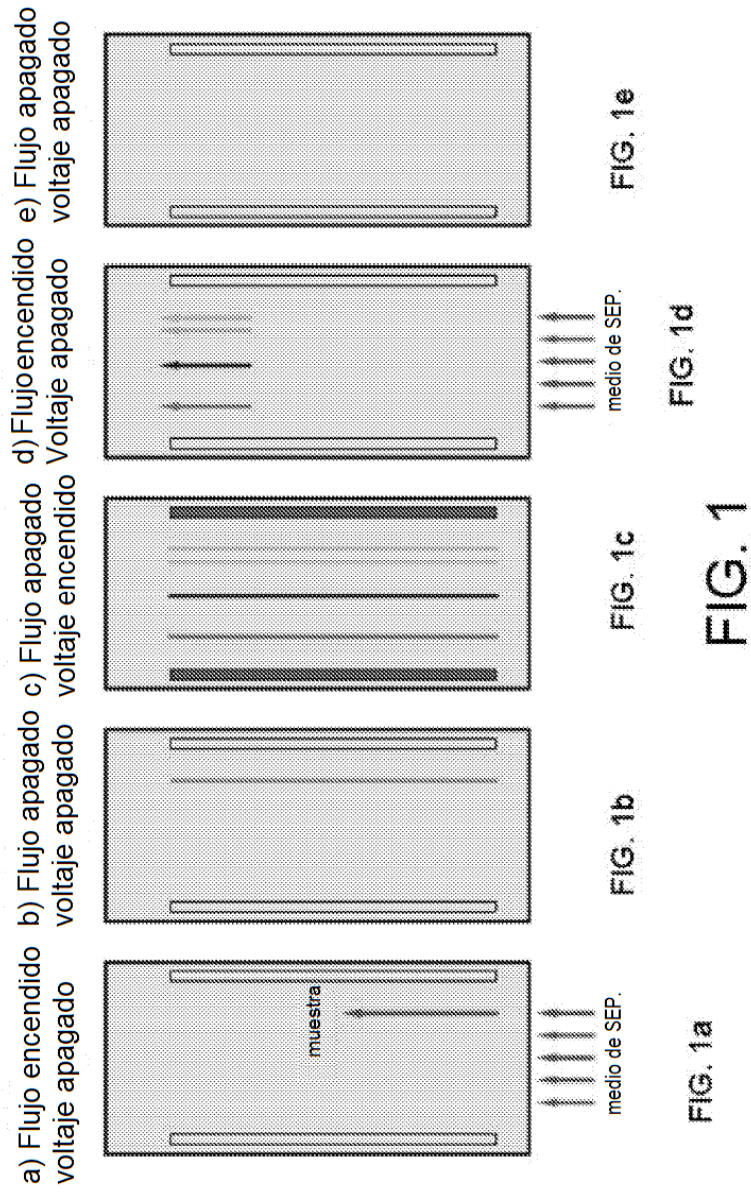
5 una salida de recolector de fracción configurada para desplazar las fracciones separadas de la muestra del espacio de separación dentro de las cavidades de recolección individuales tal como vasos o pozos en placas de microvaloración; y/o

10 un sistema de desplazamiento de fluido configurado para hacer circular medios de electrodo dentro de los espacios de electrodos.

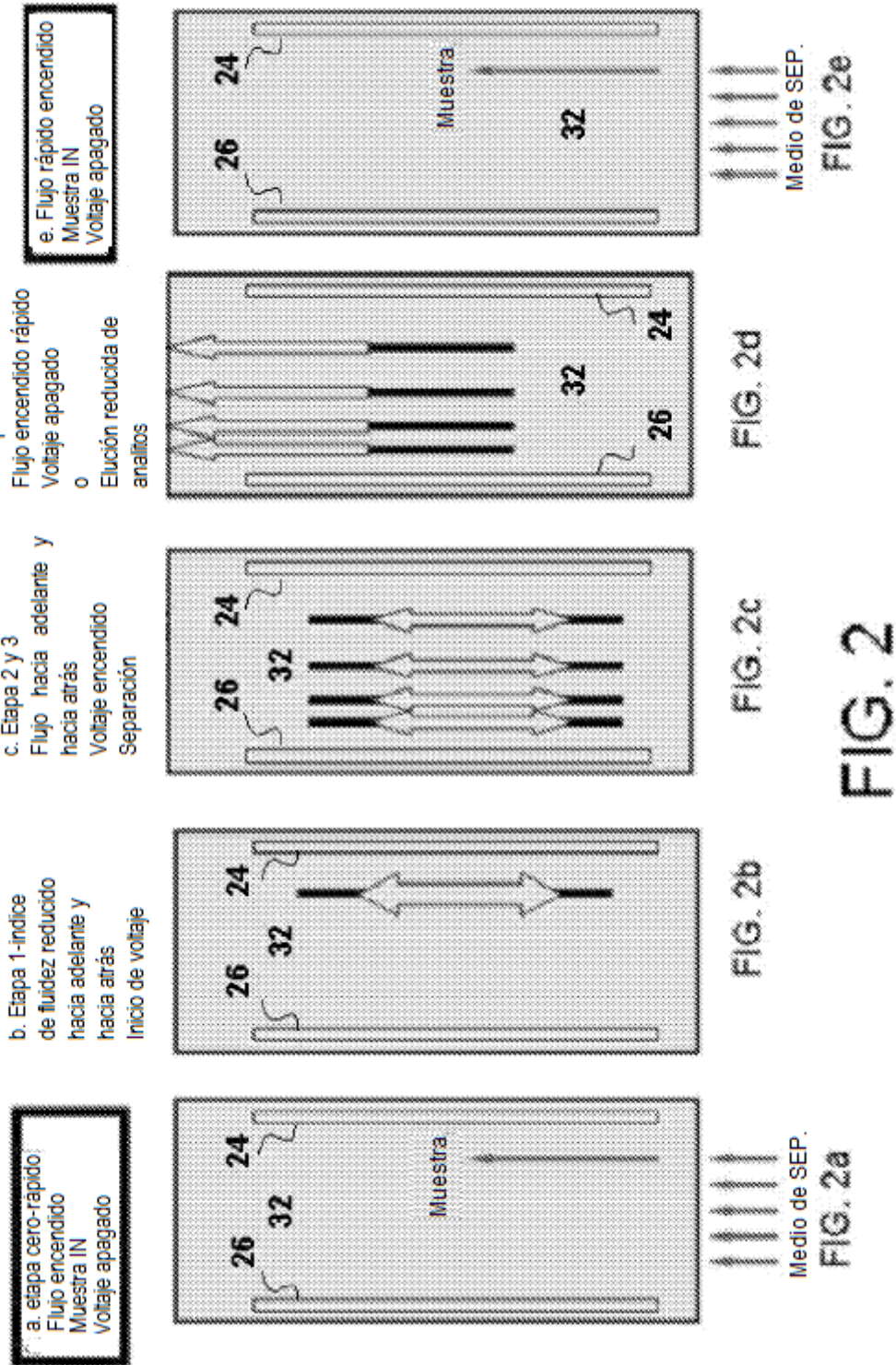
23. Un medio legible por ordenador que comprende códigos de software ejecutables por ordenador que, cuando se ejecutan por un ordenador, provocan que dicho ordenador controle un aparato para realizar un método para separar partículas en una cámara (12) de electroforesis como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

15

Técnica anterior- intervalo estático FFE entre electrodos



Proceso FFE en modo de intervalo cíclico



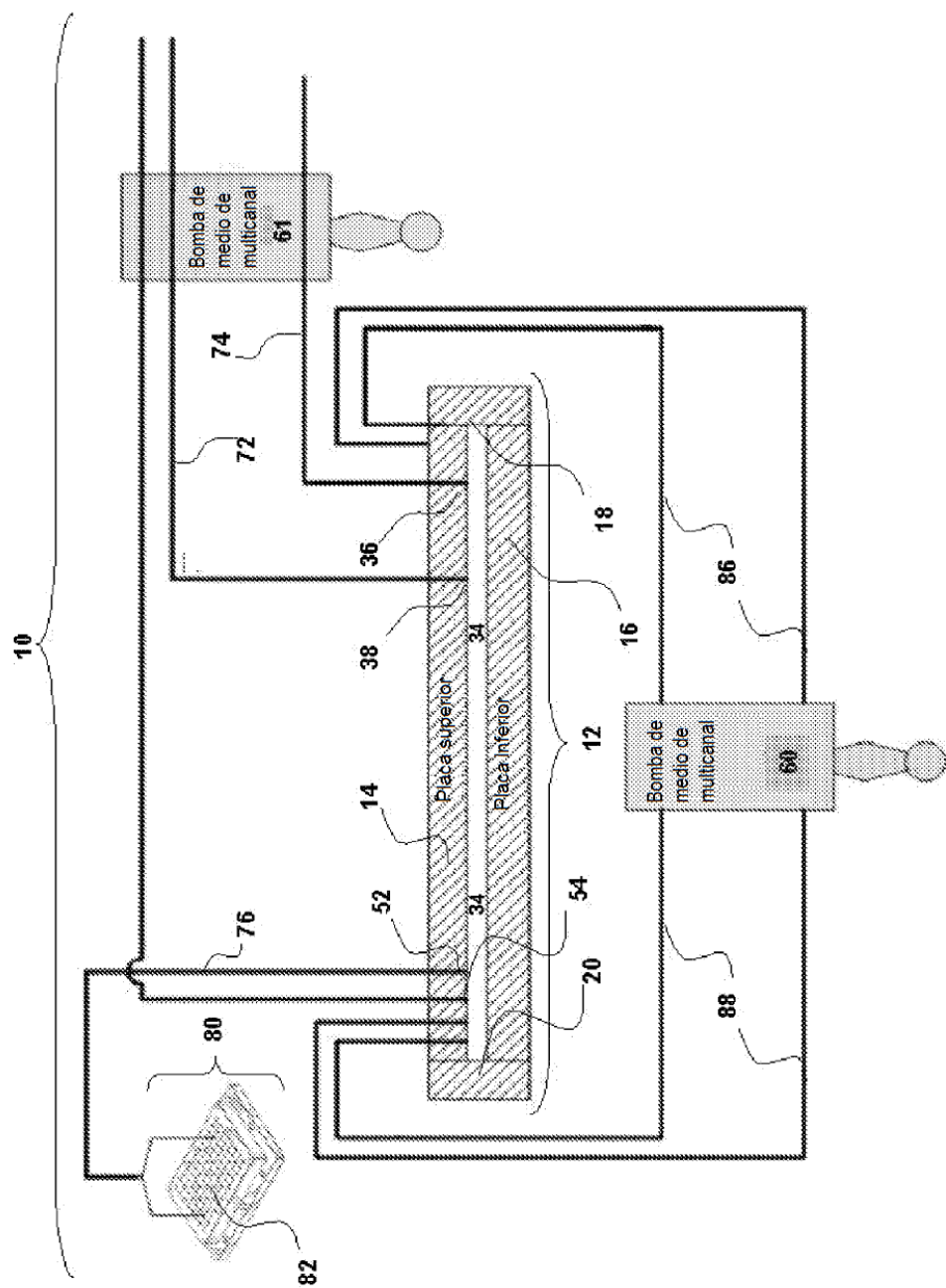


FIG. 3

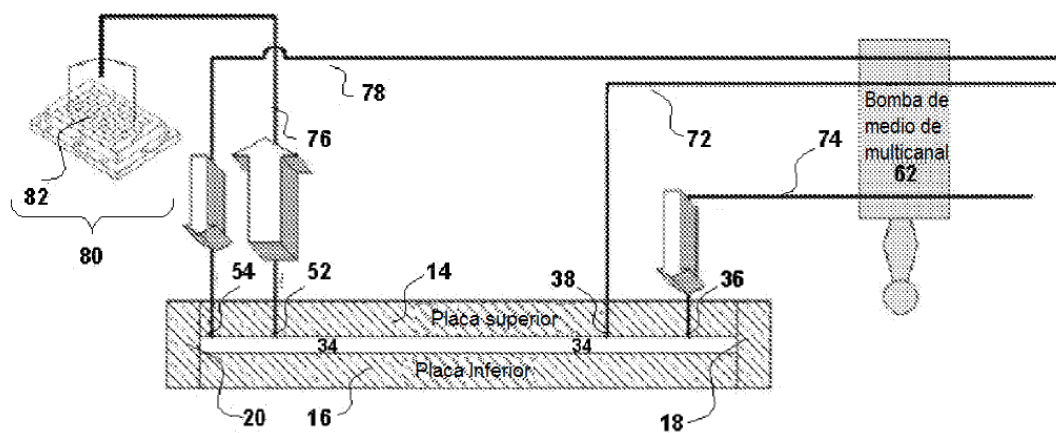


FIG. 4a

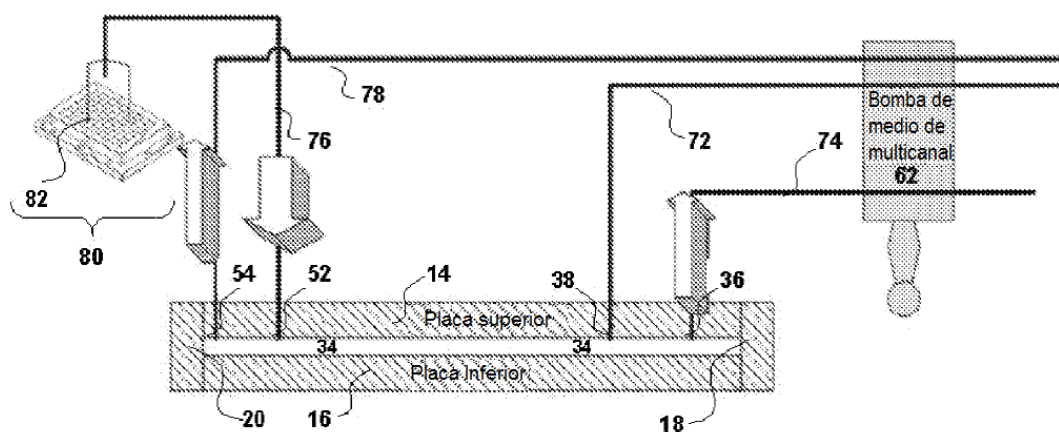


FIG. 4b

Experimento de prueba, que utiliza el proceso FFE en modo continuo

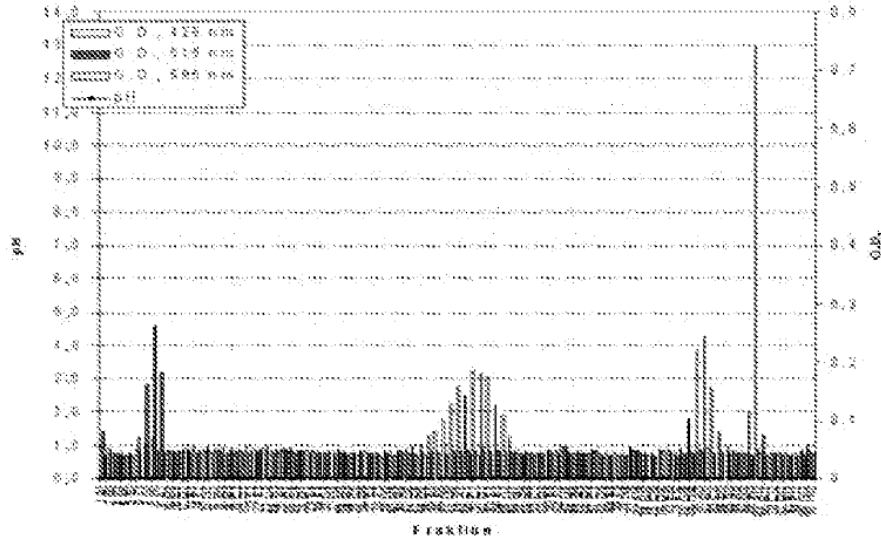


FIG. 5

Experimento de prueba que utiliza nuevos procesos de modo de intervalo

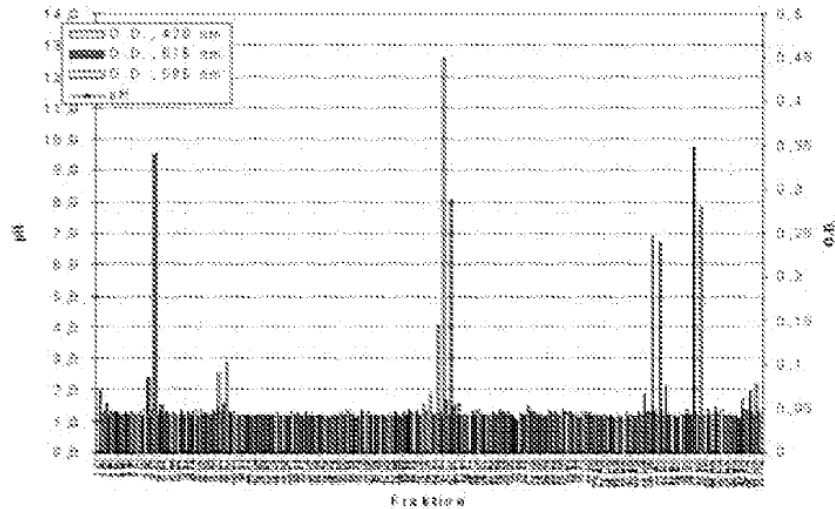
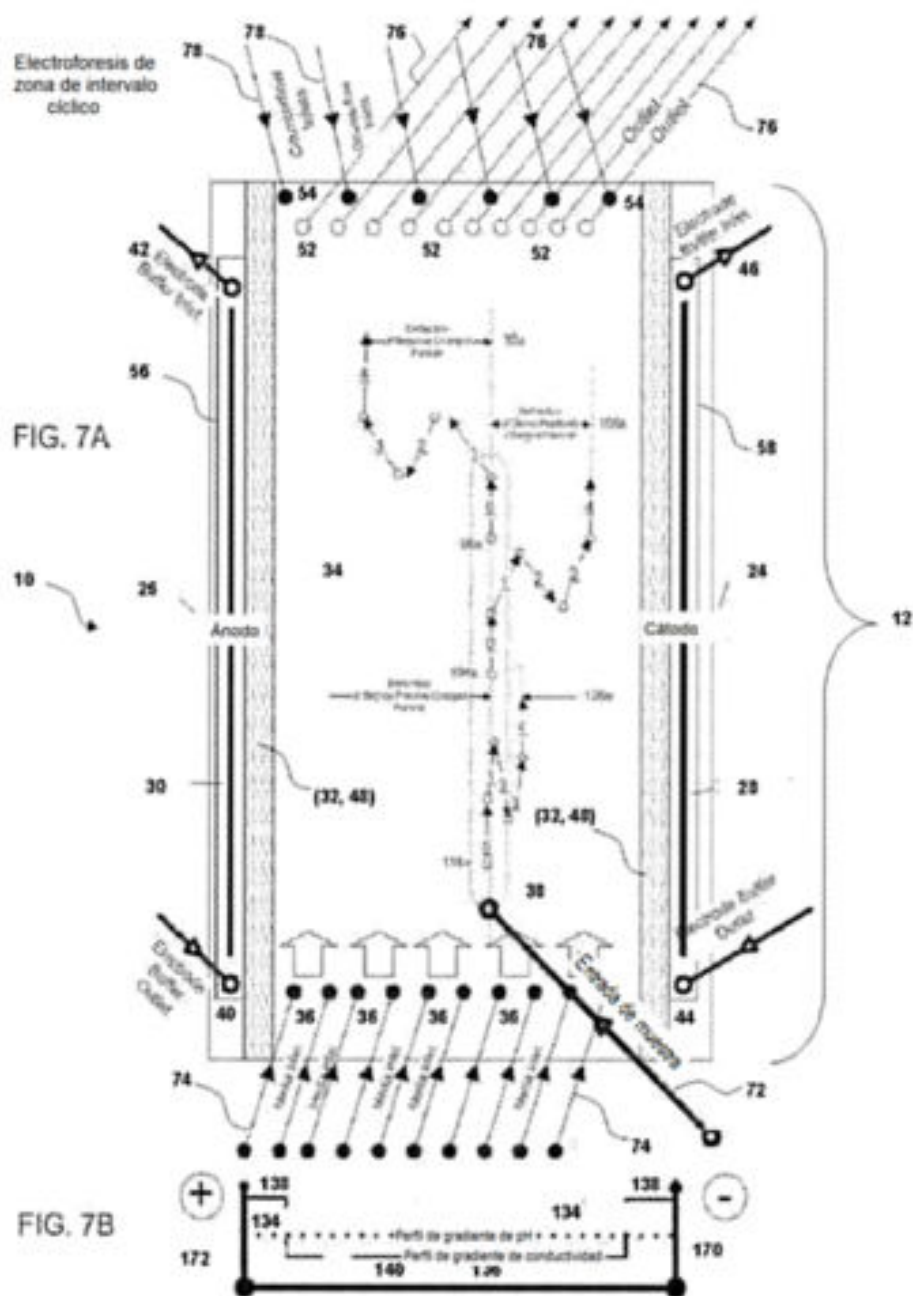
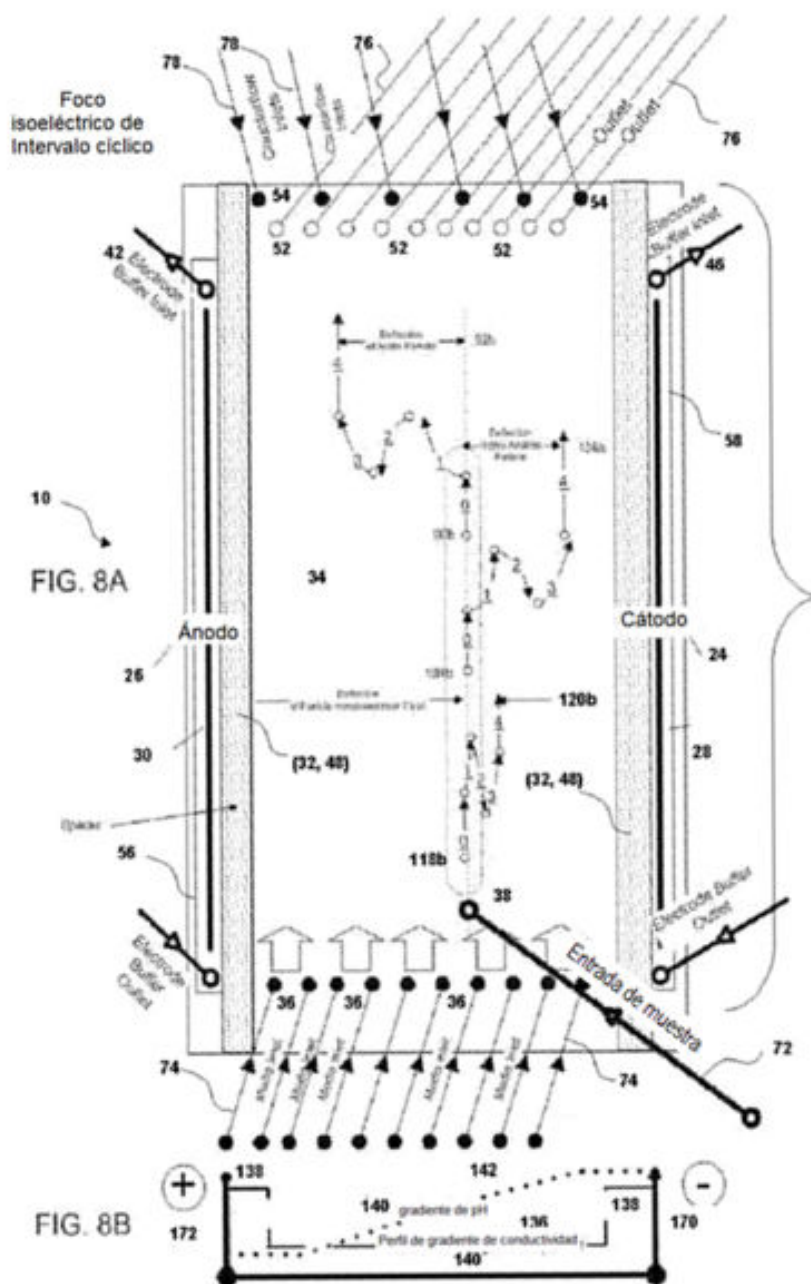


FIG. 6





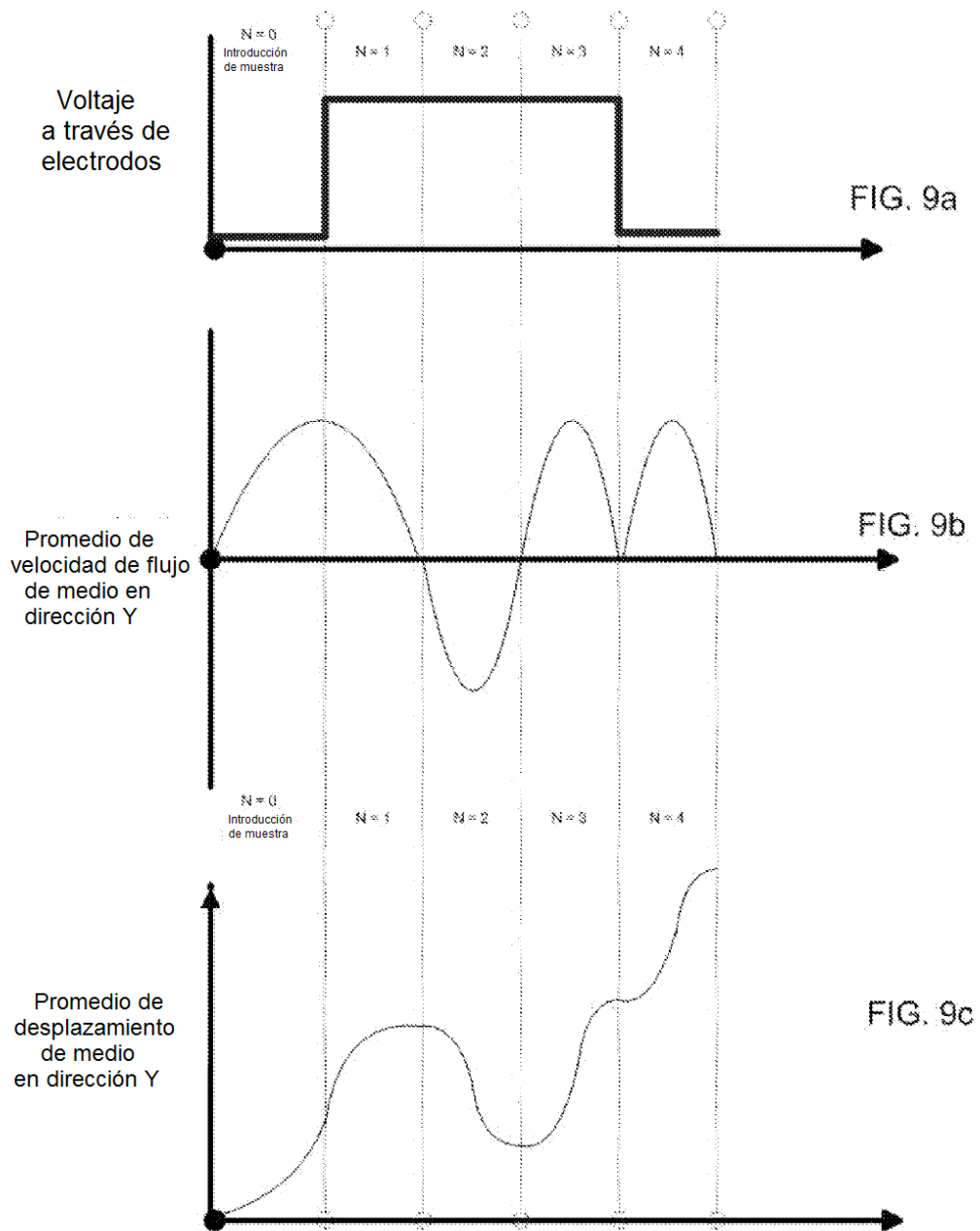


FIG. 9

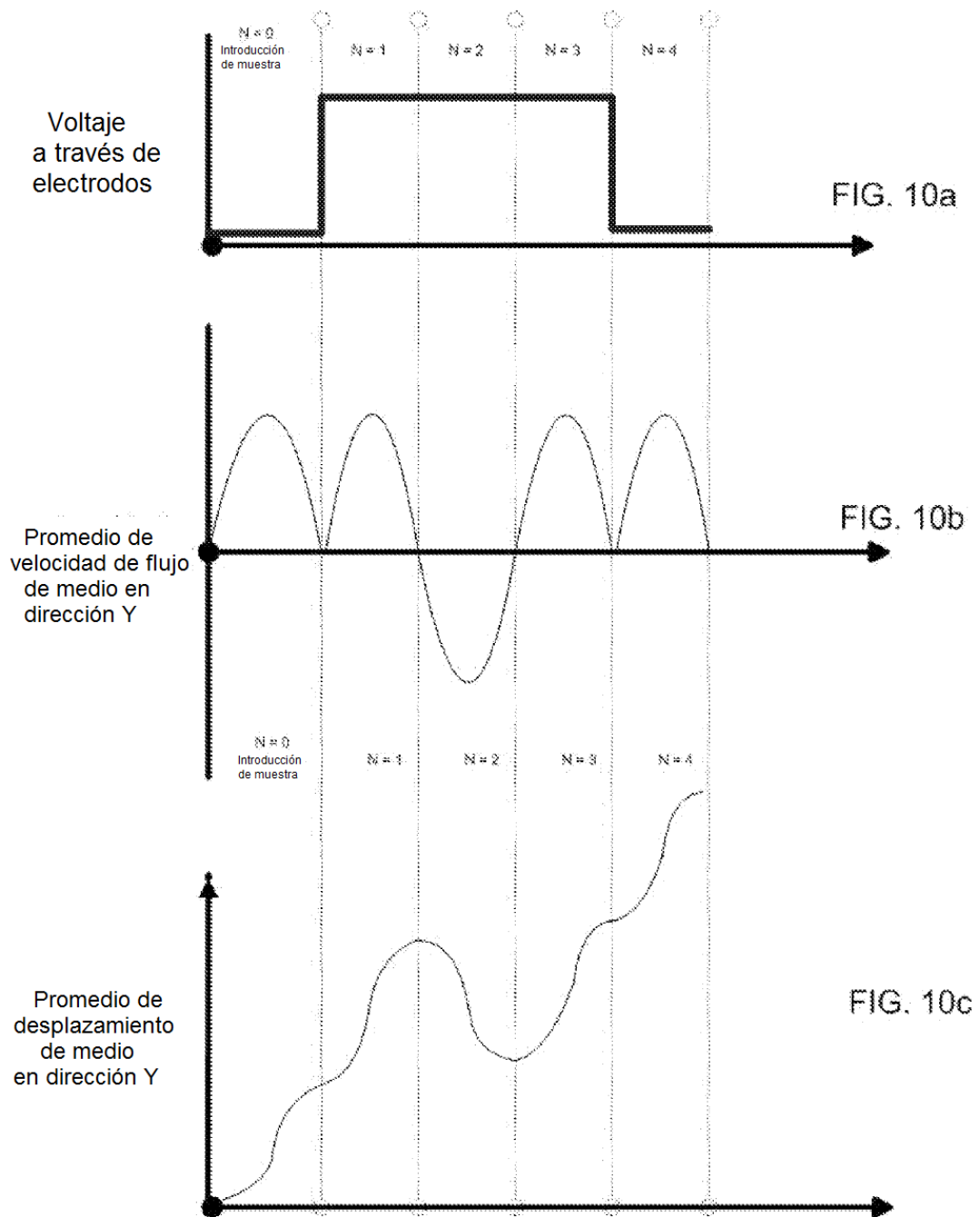


FIG. 10

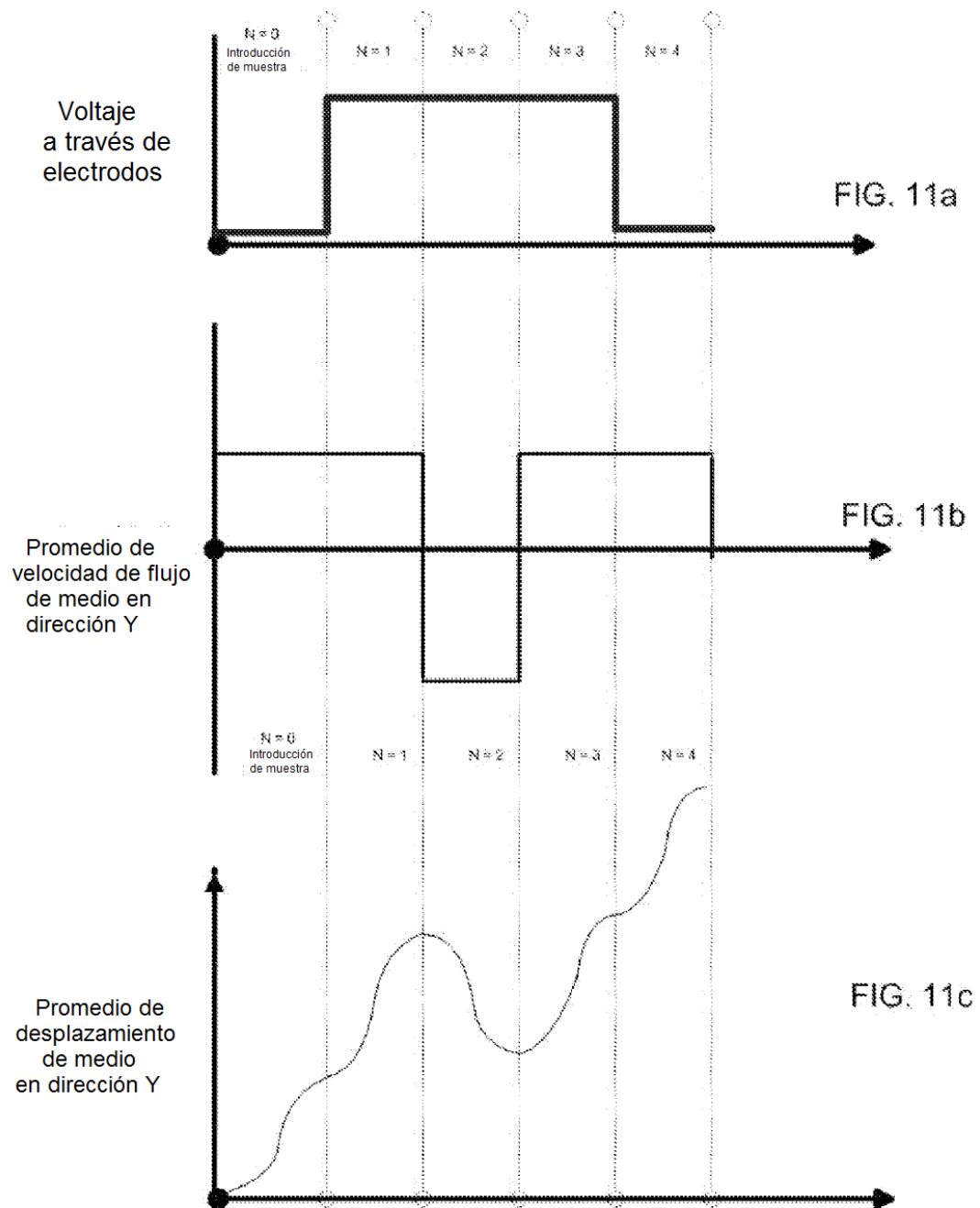


FIG. 11