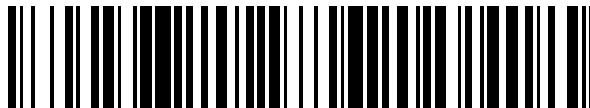


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 352**

51 Int. Cl.:

G01N 27/447 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2007 PCT/EP2007/056167**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2007 WO07147862**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2007 E 07786779 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2038643**

54 Título: **Método y dispositivo para separación y eliminación de ciertas proteínas y partículas utilizando electroforesis**

30 Prioridad:

20.06.2006 US 805248 P
04.08.2006 US 821491 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.01.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

WEBER, DR., GERHARD

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 651 352 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 dispositivo para separación y eliminación de ciertas proteínas y partículas utilizando electroforesis

Campo de la invención

5 La invención se relaciona con métodos y un aparato para electroforesis por deflexión libre de portador, continua, que involucra condiciones de separación y medios que permiten la separación y posible eliminación de ciertos analitos que tengan un pl distinto.

Antecedentes de la invención

10 La electroforesis es una tecnología bien establecida para separar partículas con base en la migración de las partículas cargadas bajo la influencia de una corriente eléctrica directa. Se han desarrollado varios modos de operación diferentes tales como enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis de zona (ZE) e isotocoforesis (ITP) como variantes del principio de separación anterior y son conocidos en general para los experimentados en la técnica.

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

20 En el campo de la proteómica, la FFE es la tecnología de selección para la preseparación definida de muestras complejas de proteínas en términos de sus valores de punto isoeléctrico variables (pl). Utilizando la FFE, puede separarse una gran variedad de analitos, incluyendo moléculas orgánicas e inorgánicas, biopartículas, biopolímeros y biomoléculas sobre la base de su movilidad electroforética. Los principios correspondientes ya han sido descritos, [por ejemplo, Bondy B. et al. (1995), "Sodium chloride in separation medium enhances cell compatibility of free-flow electrophoresis", *Electrophoresis* 16: 92-97].

25 El proceso de la FFE ha sido mejorado, por ejemplo, mediante medios de estabilización y medios de contraflujo. Esto se refleja, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos 5,275,706. De acuerdo con esta patente, se introduce un medio de contraflujo en el contenedor del espacio de separación a la dirección de flujo continuo del medio de separación global y la muestra que viaja entre los electrodos. Ambos medios (el medio de separación y el medio de contraflujo) son descargados o eluidos a través de salidas de fraccionamiento, típicamente en una placa de microtitulación, dando como resultado un proceso de fraccionamiento que tiene un volumen muerto bajo. Adicionalmente, se mantiene un flujo laminar del medio en la región de las salidas de fraccionamiento (esto es, con muy baja o ninguna turbulencia).

30 Una técnica de FFE particular denominada como FFE de intervalo, se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos 6,328,868. En esta patente, la muestra y el medio de separación son introducidos ambos en una cámara de electroforesis, y los analitos en la muestra son separados utilizando un modo de electroforesis tal como ZE, IEF o ITP, y finalmente son expedidos de la cámara a través de salidas de fraccionamiento. Las realizaciones de la Patente '868 describen el movimiento de los medios de separación y la muestra como unidireccionales, desplazándose desde el extremo de entrada hacia el extremo de salida de la cámara, con un voltaje efectivo aplicado que hace que la migración electroforética ocurra mientras la muestra y el medio no están siendo impulsados como fluidos desde el extremo de la entrada hacia el extremo de salida, en contraste con la técnica utilizada comúnmente en el arte en la que la muestra y el medio pasan a través del aparato a la vez que están siendo separados en un campo eléctrico (denominada comúnmente como FFE continua).

35 La solicitud internacional de patente WO 02/50524 divulga un método de electroforesis que emplea un aparato con una cámara de separación a través de la cual el medio de separación fluye y que provee un espacio de separación definido por un suelo y una cubierta y espaciadores que separan estos dos uno de otro. Además, este aparato de FFE abarca una bomba para proveer el medio de separación, el cual entra a la cámara de separación a través de líneas de alimentación de medio, y sale de la cámara a través de salidas. El aparato de FFE también incluye electrodos para aplicar un campo eléctrico dentro del medio de separación y puntos de inyección de muestra para agregar la mezcla de partículas o analitos y puntos de fraccionamiento para retirar las partículas separadas por FFE en el medio de separación. Las partículas separadas pueden ser utilizadas para propósitos analíticos o para procesamiento preparativo posterior. En cualquier caso, la solicitud no divulga la composición de ningún medio de separación.

40 50 La solicitud de Patente de los Estados Unidos 2004/050698 también divulga un aparato de electroforesis de flujo libre el cual abarca al menos una cámara de separación a través de la cual puede fluir un medio de separación. Adicionalmente, dicho aparato para FFE abarca una bomba de dosificación para transportar un medio de separación el cual entra a la cámara de separación a través de líneas de alimentación de medio y sale de dicha cámara a través de salidas, electrodos para aplicar un campo eléctrico en el medio de separación y puntos de inyección de muestra

para agregar una mezcla de partículas que van a hacer separadas y puntos de fraccionamiento para retirar las partículas en el medio de separación separadas por medio de la FFE.

5 En la técnica se conoce una variedad de medios de separación para la separación de analitos tales como biopartículas y biopolímeros. Por ejemplo, el libro "Free-flow Electrophoresis", publicado por K. Hannig y K. H. Heidrich, (ISBN 3-921956-88-9) informa de una lista de medios de separación adecuados para FFE y en particular para ZE de flujo libre (FF-ZE).

10 La Patente de los Estados Unidos 5,447,612 (de Bier et al.) divulga otro medio de separación que es un sistema regulador de pH para separar analitos por enfoque isoeléctrico formando gradientes de zona de pH predefinidos estrechos funcionalmente estables en solución libre. Emplea componentes de regulación en pares de reguladores complementarios. Los componentes de reguladores se seleccionan entre anfólitos químicamente definidos simples, ácidos débiles y bases débiles, y se emparejan entre si sobre la base de sus características de disociación de manera que se provea un gradiente de pH más bien plano de entre 0.4 a 1.25 unidades de pH.

15 El IEF(enfoque isoeléctrico), uno de los modos de operación generales anteriores de la electroforesis, incluyendo la electroforesis de flujo libre, es una técnica empleada comúnmente, por ejemplo, en la caracterización de proteínas como mecanismo para determinar el punto isoeléctrico de una proteína (véase, por ejemplo, Analytical Biochemistry, Addison Wesley Longman Limited-Third Edition, 1998). La electroforesis en zona (ZE) es otro modo de operación alternativo basado en la diferencia entre el valor de movilidad electroforética de las partículas que van a ser separadas y las especies cargadas en el medio de separación empleado.

20 El IEF involucra pasar una mezcla a través de un medio de separación que contiene, o que puede estar hecho para contener, un gradiente de pH. Una cámara de separación tiene un pH relativamente bajo en un extremo, mientras que en el otro extremo tiene un pH relativamente más alto. Entre estos dos lados, se forma un gradiente de pH desarrollado que gobierna el movimiento electroforético de las partículas cargadas. El IEF está discutido en diversos textos tales como Isoelectric Focusing by P. G. Righetti and J. W. Drysdale (North Holland Publ., Amsterdam, and American Elsevier Publ., New York, 1976).

25 La investigación en proteómica combina técnicas de separación de alta resolución aplicadas a mezclas de proteínas complejas con métodos de identificación de última tecnología tales como espectrometría de masas (MS). En general se concuerda en que ninguna de las metodologías de separación e identificación existentes por si misma puede dar cuenta completa de la composición proteínica o de la expresión proteínica en mezclas complejas, (por ejemplo, fluidos biológicos tales como suero, plasma, fluido sinovial, fluido cerebrospinal, orina, células enteras, fracciones celulares, o extractos de tejidos). Esta limitación, sin embargo, no ha evitado el uso de los métodos existentes (o la combinación
30 de varias tecnologías existentes) para proveer información valiosa sobre un amplio rango de proteínas, especialmente cuando su ausencia o presencia, o su nivel de expresión puede correlacionarse con un estado de enfermedad. Una estrategia para la búsqueda de biomarcadores de proteínas incluye la búsqueda directa de los fluidos periféricos del cuerpo donde la concentración de marcadores se espera que sea relativamente baja y los métodos de detección
35 actuales hacen que su identificación sea difícil de lograr.

40 El obstáculo mayor para superar en la fase de descubrimiento de biomarcadores de proteína es el hecho de que las herramientas analíticas utilizadas al final de la cadena de proceso tales como espectrometría de masas (MS) o electroforesis en gel tienen un límite de detección definido para cantidades finitas de proteínas (o péptidos derivados de las mismas). Para explotar completamente los límites de sensibilidad para la identificación de péptidos por MS o electroforesis en gel, es necesario enriquecer la mezcla de proteína para el candidato marcador potencial. Con este fin, la concentración de proteínas abundantes presentes en los fluidos periféricos complejos tales como suero o plasma debe ser reducida tanto como sea posible.

45 Tanto el suero como el plasma contienen altos niveles de proteínas que pueden entorpecer la detección de proteínas con menor abundancia. Las proteínas de mayor abundancia que van a ser separadas a partir de analitos posteriores de una muestra que tengan un pI diferente, por ejemplo, albúmina, transferrina, alfa-macroglobulina, antitripsina, haptoglobulina. Otras proteínas de alta abundancia presentes en muestras de origen biológico pueden incluir actina, caseína o miosina.

50 En el suero, por ejemplo, las siete proteínas más abundantes incluyen albúmina, inmunoglobulinas (tanto IgGs como IgAs), transferrina, alfa-macroglobulina, antitripsina y haptoglobulina. Juntas estas siete proteínas comprenden casi el 97% de las proteínas totales del suero. Si se agrega hasta el 30% de las proteínas más abundantes presentes en una concentración de >100 µg/ml de suero y asumiendo que el contenido promedio de proteína total es de más o menos 80 mg/ml, entonces estas proteínas o analitos "no diana" se elevan hasta aproximadamente 99% de las proteínas totales en suero, dejando solamente 1% de todas las proteínas presentes como dianas primarias para la identificación de marcadores en suero novedosos. Asumiendo que los marcadores de interés no están enlazados o complejados a una de esas proteínas principales, entonces las proteínas no diana deben ser retiradas tempranamente en el proceso
55 con el fin de reducir la complejidad del análisis tal como MS.

5 La albúmina sola puede abarcar 60% de la proteína total presente en las muestras de suero. La alta concentración de albúmina entorpece la detección de proteínas de suero de baja abundancia. La albúmina en muestras de suero distorsiona las líneas en los geles de poliacrilamida si la cantidad de proteína agregada al pozo de muestra se incrementa para permitir la detección de proteínas de baja abundancia. La albúmina, una proteína de 66 kDa, también tiende a enmascarar otras proteínas que migran alrededor de 50-70 kDa porque corre como una banda pesada que obstaculiza las proteínas menos abundantes.

10 Con referencia a albúmina que tiene una concentración típica de aproximadamente 50 mg/ml, ejemplo, si cualquier metodología de purificación fuera capaz de eliminar 99.9% de la albúmina del suero, la concentración remanente (contaminante) de albúmina sería todavía 50 µg/ml o un factor de 50,000 más alto que los marcadores tumorales bien conocidos tales como el antígeno específico de próstata presente en aproximadamente 1 ng/ml.

15 El interés en el análisis proteómico del suero humano se ha elevado enormemente durante los últimos años. En algunas áreas de investigación, el análisis proteómico de suero humano representa un reto extremo debido al rango dinámico de las proteínas o analitos de interés. En el suero, las cantidades de proteínas y péptidos de interés varían desde las consideradas como de "alta abundancia", presentes en 2-60% en peso de la proteína total, hasta aquellas presentes a 10⁻¹²% o menos. Este rango de moléculas diana analítica en muchos casos excede el realismo de las tecnologías disponibles para un análisis proteómico eficiente y efectivo.

20 Se han hecho recientemente inversiones mayores en la investigación de proteínas, más específicamente por ejemplo, del proteoma del plasma humano. Esencialmente, la complejidad de la proteína del plasma humano se muestra a continuación. Hay aproximadamente 300 proteínas en plasma con esencialmente 30,000 isoformas, aproximadamente 10,000 isoformas de inmunoglobulinas, aproximadamente 40,000 genes con 500,000 isoformas de proteínas derivadas de tejidos y más de 5,000 péptidos. Otros analitos de interés incluyen hormonas peptídicas y productos de degradación de proteínas. Entre 6-8% de la sangre humana es proteína, de la cual las proteínas de alta abundancia abarcan más del 60% de la composición de proteínas totales.

25 Una manera de abordar la complejidad de estas muestras es la aplicación de técnicas de eliminación electroforética que permiten la separación y fraccionamiento mejoradas de las muestras, incluyendo muestras de plasma, antes del análisis. Los métodos históricos para eliminación de ciertas proteínas consistían del uso de adsorbentes de afinidad común con base en colorantes tales como Sepharose Blue® o adsorbentes de afinidad unidos a anticuerpos para eliminación de albúmina. Por ejemplo, se han desarrollado en la técnica columnas especiales que comprenden anticuerpos monoclonales inmovilizados para la eliminación de albúmina (por ejemplo, un kit disponible bajo el nombre "Qproteome albumin depletion kit" de Qiagen, Alemania).

30 A la vez que algunas de estas técnicas pueden ser exitosas para eliminar albúmina u otras proteínas de alta abundancia, la aplicabilidad amplia de estos métodos, en particular los métodos cromatográficos de afinidad basados en anticuerpos, han sido limitados por los costos más bien altos, y la pérdida de muestra potencial observada en estos métodos. Además, por ejemplo, los kits y columnas disponibles en la técnica, desarrollados para la eliminación de proteínas de plasma humano, no trabajan en el caso de proteínas de plasma de otros mamíferos porque están adaptados típicamente a especies de proteínas individuales que van a ser eliminadas.

35 A la vista de lo anterior, se mantiene una necesidad en la técnica por otros métodos de eliminación altamente eficientes al igual que económicos de, por ejemplo, proteínas de alta abundancia tales como albúmina, particularmente de aplicaciones de alto rendimiento, por ejemplo en el ambiente clínico para la detección de un biomarcador deseado a partir de un gran número de pacientes.

40 La electroforesis de flujo libre es una técnica bien conocida que es capaz principalmente de evitar muchas de las desventajas experimentadas con otros métodos de eliminación en la técnica. Sin embargo, en el mejor entendimiento del inventor, no se han divulgado en la técnica métodos de eliminación selectiva exitosos y reproducibles que empleen esta técnica, no solo por la carencia de información con respecto a las condiciones que deben ser provistas con la cámara de separación de un aparato de FFE, sino de las dificultades involucradas en mantener condiciones suficientemente estables durante la separación/eliminación electroforética de analitos a partir de una muestra.

45 En este contexto, se resalta que, mientras que las solicitudes Estadounidenses U.S. 2004/050697 y U.S 2004/050698 de Eckerskorn et al mencionan brevemente que los métodos electroforéticos de flujo libre pueden ser utilizados también para la eliminación selectiva de analitos, no se dice nada en estas solicitudes acerca de como alcanzar tal eliminación exitosa y reproducible de una proteína dada de alta abundancia tal como la albúmina, ni se da ninguna guía en cuanto a la selección de sistemas de reguladores de separación apropiados, las condiciones o perfiles de pH usados o los medios de estabilización requeridos para mantener condiciones estables dentro de un aparato de FFE.

50 De acuerdo con lo anterior, es un objetivo de la presente invención proveer métodos, kits y dispositivos adecuados para eliminar analitos y evitar las desventajas de la técnica anterior.

55 Resumen de la invención

Los presentes inventores han encontrado que los métodos, kits y dispositivos provistos aquí pueden ser utilizados exitosamente para la eliminación selectiva de analitos de alta abundancia y ofrecen muchas ventajas en comparación con los métodos disponibles en la técnica. Ventajas y mejoras adicionales que son provistas por la presente invención, incluyendo mejoras a algunos problemas típicos experimentados cuando se opera en aplicaciones de electroforesis de flujo libre en modo IEF, se ilustrará con más detalle en la descripción de la invención que sigue a continuación.

Por lo tanto, en un primer aspecto la presente invención provee un método para separar un analito que va a ser separado de una composición de analitos por electroforesis de flujo libre que comprende:

10 formar dentro de una cámara de electroforesis de flujo libre (FFE) un perfil de función de pH entre un ánodo y un cátodo, que comprende una meseta de separación por pH cuyo promedio de pH corresponde esencialmente al punto isoelectrónico (pI) de un analito que va a ser separado y que tiene un rango de pH delimitado por un límite superior de pH y un límite inferior de pH, y que comprende adicionalmente una función de pH entre el ánodo y la meseta de separación por pH que tiene un promedio de pH inferior que el pH de la meseta de separación por pH y/o una conductividad eléctrica superior a la meseta de separación por pH, y una función de pH entre el cátodo y la meseta de separación por pH que tiene un pH promedio mayor que el pH de la meseta de separación por pH y/o una conductividad eléctrica más alta que la meseta de separación por pH; en el que los perfiles de la meseta de separación por pH y la función de pH entre el cátodo y el ánodo se forman mediante sistemas reguladores respectivos;

introducir una muestra que comprende un analito que tiene un pI definido para ser separado a partir de una mezcla de analitos en la cámara de FFE en la que la muestra puede ser introducida en la meseta de separación por pH en una zona en el lado anódico o en una zona en el lado catódico de dicha meseta de separación por pH; y

20 eluir los analitos de la cámara FFE, y opcionalmente recuperar todo o una porción de los analitos en uno o una pluralidad de fracciones; opcionalmente en el que el método comprende adicionalmente identificar el pI de un analito que va a ser separado de una composición de analitos antes de la separación electroforética en el caso de que el pI de dicho analito no sea conocido.

25 A la vista de los resultados excelentes logrados por los métodos de eliminación/separación por FFE de la presente invención, todos o porciones de los analitos recuperados pueden ser utilizados en aplicaciones preparativas y/o analíticas subsecuentes corriente abajo.

Así, otro aspecto de la presente invención se relaciona con un método para analizar los analitos de una muestra fraccionada que comprende electroforesis de flujo libre antes del análisis, en el que la electroforesis de flujo libre comprende:

30 separar una muestra que comprende analitos mediante electroforesis de flujo libre de acuerdo con el método tal como se describe más arriba y produciendo por lo tanto al menos una porción de muestra no eliminada y una porción de muestra que comprende el analito separado en la meseta de separación por pH a partir de la porción de muestra no eliminada; y

analizar subsecuentemente una o más fracciones eluidas de la cámara de FFE.

35 En aún otro aspecto de la presente invención, los analitos que tienen un pI distinto pueden ser separados/eliminados simultáneamente a partir de dos, o incluso más de dos muestras introducidas en un aparato de FFE sencillo. Tal método para separar simultáneamente uno o más analitos que van a ser separados a partir de una composición de analitos a partir de dos o más muestras por electroforesis de flujo libre comprende:

40 formar un perfil de función de pH entre un ánodo individual y un cátodo individual dentro de una cámara de electroforesis de flujo libre (FFE), en la que el perfil de función de pH entre el ánodo y el cátodo de la cámara de FFE comprende N zonas de separación y N-1 medios de estabilización interelectrodos que separan cada zona de separación de cada zona de separación adyacente;

45 en el que cada zona de separación comprende un perfil de función de pH como se define aquí y adicionalmente en el que cada zona de separación comprende una meseta de separación por pH adecuada para separar el analito que va a ser separado desde la composición de analitos en dicha zona de separación;

introducir individualmente cada muestra que comprende un analito que va a ser separado de una composición de analitos en una zona de separación de la cámara de FFE, y

50 eluir los analitos de la cámara de FFE, y opcionalmente recuperar todos o una porción de los analitos en uno o una pluralidad de fracciones. En el caso del que el pI de dicho analito que va a ser separado de una composición de analitos no sea conocido, el método puede comprender adicionalmente identificar el pI de dicho analito antes de la separación electroforética.

5 N será un entero de 2 o más, y está limitado esencialmente sólo por el diseño del aparato de FFE, particularmente por el número de entradas de medios distintos. El número de separaciones en paralelo estará típicamente entre 2 y 5, pero al menos en principio puede ser mayor incluso de forma que en ciertas realizaciones hasta 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 separaciones en paralelo pueden llevarse a cabo simultáneamente entre un ánodo y cátodo individuales en el aparato de FFE.

La presente invención también describe kits que comprende los medios de separación, y, opcionalmente, otros medios tales como medios de enfoque, medios de estabilización interelectrodos y/o medios de estabilización para llevar a cabo los métodos de acuerdo con la presente invención.

Breve descripción de las figuras

10 La Figura 1A es una vista esquemática de la cámara de separación de FFE de acuerdo con una realización de la invención, más específicamente la realización de eliminación y fraccionamiento de una proteína abundante (protocolo DFE).

La Figura 1B es un perfil de conductividad y gradiente de pH de una realización de la presente invención mostrada en la Figura 1A.

15 La Figura 2 demuestra un ferograma de resultados experimentales de un protocolo de acuerdo con las Figuras 1A y 1B. La meseta de separación por pH, denominada la reserva de albúmina aquí, comprende analitos que tienen esencialmente el mismo pI que el pH de la meseta de separación por pH. La reserva ácida y la reserva neutra/alcalina son situadas en las interfaces de la meseta de separación por pH a las funciones de pH adyacentes.

20 La Figura 3 demuestra resultados experimentales de un protocolo de acuerdo con las Figuras 1A, 1B y 2. La figura muestra dos geles de ID que documentan la separación de albúmina (alrededor de 66 kDa) y proteínas que tienen esencialmente el mismo pI de proteínas recuperadas en las interfaces de la función de pH anódica y catódica. La línea S muestra la composición de la muestra antes de la etapa de separación electroforética.

La Figura 4A es una vista esquemática de la cámara de separación de FFE de acuerdo con una realización de la invención, más específicamente la realización de eliminación y separación de una proteína abundante (protocolo DSE).

25 La Figura 4B es un perfil de conductividad y gradiente de pH de una realización de la presente invención mostrada en la Figura 4A.

La Figura 5 representa un ferograma de resultados experimentales de un protocolo DSE de acuerdo con las Figuras 4A y 4B que muestra los valores de pH de las fracciones eluidas y la distribución de los marcadores de pI.

30 La Figura 6 demuestra un análisis de SDS-PAGE de un protocolo DSE de acuerdo con una realización de las Figuras 4A y 4B en el que la muestra fue derivada de plasma humano. Se muestra la eliminación de albúmina a partir de las proteínas que se acumulan sobre los gradientes de pH adyacentes a la meseta de separación por pH.

La Figura 7 muestra un perfil de conductividad y gradiente de pH de una realización de la presente invención utilizando un modo paralelo de operación en el que se dispone un medio de estabilización interelectrodos entre las dos zonas de separación.

35 La Figura 8 muestra un ferograma de resultados experimentales para un protocolo de DFE paralelo modificado para separar simultáneamente dos muestras diferentes en una cámara de FFE que muestra los valores de pH de las fracciones eluidas y la distribución de marcadores de pI en las dos zonas de separación.

40 La Figura 9 demuestra un análisis de SDS-PAGE de las fracciones de la primera zona de separación de un protocolo de DFE paralelo modificado de acuerdo con la Figura 8 en el que las muestras fueron derivadas de plasma humano mostrando la separación de la primera zona de separación.

La Figura 10 representa un análisis de SDS-PAGE de las fracciones de la segunda zona de separación del protocolo de DFE paralelo modificado de acuerdo con la Figura 8 en el que las muestras fueron derivadas de plasma humano mostrando la separación de la segunda zona de separación.

45 Descripción Detallada

50 La presente invención se relaciona con métodos y dispositivos para llevar a cabo separaciones electroforéticas de flujo libre que involucran condiciones de medios y separación que permiten la separación eficiente, selectiva y reproducible de ciertos analitos. Los métodos y dispositivos provistos aquí permiten la separación de, por ejemplo, péptidos, proteínas, complejos de proteínas, polinucleótidos y complejos de polinucleótidos, particularmente, pero no limitándose a, bajo condiciones naturales. Alternativamente, los métodos también pueden ser llevados a cabo bajo

condiciones de desnaturalización. La invención puede ser utilizada, por ejemplo, para mejorar el descubrimiento de biomarcadores, especialmente para proteínas o analitos que son ya difíciles de detectar en vista de su baja abundancia y concentración, y cuya detección es obstaculizada adicionalmente por la existencia de proteínas no marcadoras abundantes tales como albúmina. Por ejemplo, la presencia de albúmina en muchos extractos celulares frecuentemente hace que la detección de las proteínas que están presentes en baja concentración y abundancia sea difícil o casi imposible.

En tales aplicaciones, la invención presente puede ser utilizada para separar/aislar selectivamente proteínas de alta abundancia, permitiendo por lo tanto el análisis de las proteínas no eliminadas en su estado natural que históricamente han sido enmascaradas por proteínas de alta abundancia cuando se analizan, por ejemplo, por geles de gradiente de pH inmovilizados (IPG), SDS-PAGE1D o 2D.

Los métodos, dispositivos y composiciones/kits de acuerdo con los aspectos de la presente invención incluyen al menos una o más de las siguientes ventajas principales sobre otros métodos conocidos en la técnica:

- (i) recuperación más alta de la muestra de compuestos de interés directamente en solución;
- (ii) un nivel más alto de resolución de las separaciones;
- 15 (iii) un rango dinámico incrementado de proteínas detectadas;
- (iv) rata de separación de alta resolución más rápida debido a que las moléculas cargadas migran en solución en vez de hacerlo a través de materiales más densos tales como geles;
- (v) un enriquecimiento incrementado de proteínas de baja abundancia;
- (vi) ninguna o limitada pérdida de muestra;
- 20 (vii) uso repetido del dispositivo de separación;
- (viii) una reducción de enlace no específico de analitos a proteínas de alta abundancia;
- (ix) una mayor flexibilidad y aplicabilidad a una variedad de diferentes analitos; y
- (x) compatibilidad directa con técnicas analíticas corriente abajo, incluyendo pero no limitándose a electroforesis en gel (tales como PAGE 1 D o 2D), espectroscopía de masas (MS) (tales como ESI, MALDI o SELDI), LC-MS(/MS), MALDI-ToF-MS(/MS), quimioluminiscencia, HPLC, secuenciación de Edman, espectroscopía de RMN, difracción de rayos x, secuenciación de ácidos nucleicos, electroprecipitación, secuenciación de aminoácidos, citometría de flujo, dicroísmo circular y combinaciones de los mismos.

La presente invención provee métodos, dispositivos (aparatos), y composiciones para eliminar toda o una porción de cierta proteína con el fin de permitir un mejor acceso a proteínas o analitos de baja abundancia en una muestra de espécimen. En ciertas realizaciones de la invención, la albúmina es la proteína seleccionada para ser eliminada o excluida del análisis con el fin de medir o identificar mejor proteínas de abundancia más baja.

Cuando se retiran o eliminan proteínas de alta abundancia, la concentración relativa de las otras proteínas se incrementa. Esto puede ser evidente como se presenta en las imágenes similares a gel, y como electroferogramas para cada muestra en un formato tabular.

Los analitos típicos que pueden ser separados bien sea como analitos que van a ser eliminados o analitos no eliminados, por un método y un dispositivo de FFE de acuerdo con realizaciones de la presente invención incluyen moléculas inorgánicas y orgánicas, y preferiblemente biopartículas, biopolímeros, biomoléculas, incluyendo biomarcadores tales como proteínas, agregados de proteínas, péptidos, complejos ADN-proteína, ADN, membranas, fragmentos de membrana, lípidos, sacáridos, polisacáridos, hormonas, liposomas, células, organelos celulares, virus, partículas de virus, anticuerpos, cromatina, y similares. Moléculas inorgánicas u orgánicas que pueden ser separadas de acuerdo con ciertas realizaciones de la invención son polímeros y partículas modificadas en su carga de superficie tales como resinas de melamina, partículas de pintura de látex, poliestirenos, polimetilmetacrilatos, dextranos, derivados de celulosa, poliácidos, fármacos ilícitos, explosivos, toxinas, agentes farmacéuticos, cancerígenos, venenos, alérgenos, agentes infecciosos y similares.

Tal como se utiliza aquí, "biomarcador" se refiere a compuestos de origen natural o sintéticos, los cuales son un marcador de un estado de enfermedad o de un proceso normal o patológico que ocurre en un organismo (por ejemplo, metabolismo de un fármaco).

El término "proteína", tal como se utiliza aquí, significa cualquier proteína, que incluye, pero no se limita a péptidos, enzimas, glicoproteínas, hormonas, receptores, antígenos, anticuerpos, factores de crecimiento, etc., sin limitación,

con aproximadamente 20 o más aminoácidos. Las proteínas incluyen aquellas comprendidas más grandes de aproximadamente 20 aminoácidos, más grandes de aproximadamente 50 residuos de aminoácidos, o más grandes de aproximadamente 100 residuos de aminoácidos.

5 En el contexto de la presente solicitud, los términos "separar" y "separación" pretenden indicar cualquier partición espacial de una mezcla de dos o más analitos con base en su diferente comportamiento en un campo eléctrico (causado, por ejemplo, por su diferente pI). La separación por lo tanto incluye, pero no se limita a fraccionamiento así como un enriquecimiento específico y selectivo o, preferiblemente, eliminación, concentración y/o aislamiento de ciertas fracciones o analitos contenidos en una muestra. Así, cada vez que la solicitud se refiera a los términos "separar" o "separación", pretenden incluir al menos uno de los significados anteriores.

10 Independientemente de la definición anterior del término "separar" o "separación", ciertos protocolos de separación por FFE descritos aquí se referirán específicamente a fraccionamiento (protocolo DFE), mientras que otros se referirán a separación (protocolo DSE). En este contexto, será evidente que separación significa que se alcanza una separación espacial adicional de los analitos en la muestra, mientras que el término fraccionamiento indica que un conjunto de analitos (no eliminado) puede ser recolectado a partir de la etapa de separación por FFE. La separación por FFE
15 puede ser llevada a cabo principalmente de manera preparativa de tal forma que ciertas fracciones sean recolectadas subsecuentemente, o puede simplemente ser llevado a cabo analíticamente, en donde el analito de interés o su presencia en cierta fracción es meramente detectado por medios adecuados, pero no recolectados, por ejemplo, para uso posterior.

20 La eliminación de al menos un analito de una muestra que comprende una pluralidad de analitos es una de las realizaciones preferidas de la presente invención. Debido a que una etapa de separación por FFE en un aparato adecuado para FFE, proteínas/analitos de baja concentración pueden ser acumulados en el sistema de regulación química en una forma tal que las proteínas/analitos de abundancia más alta se acumulan o aíslan en una localización diferente a donde se acumulan las proteínas/analitos de baja concentración. El término "eliminación" se relaciona con el hecho de al menos un analito que tiene un pI definido puede ser separado de otros analitos "no eliminado" por una
25 etapa de separación por FFE de acuerdo con realizaciones de la presente invención. En otras palabras, un analito o analitos que van a ser separados (analito eliminado) se acumulan sobre la meseta de separación por pH la cual tiene un pH correspondiente a su pI, mientras que los analitos no eliminados se acumulan en la interfaz entre la función de separación por pH y las funciones de pH adyacentes o se acumula sobre un gradiente de pH de la función de pH adyacente. Así, estos analitos eliminados, típicamente proteínas de alta abundancia, no pueden interferir más con, por
30 ejemplo, la medición o análisis de proteínas/analitos de baja concentración, facilitando por lo tanto su detección e identificación.

El término "no eliminado" se refiere a cualquier analito o porción de muestra que no contiene más el analito eliminado del analito/muestra original. En otras palabras, una muestra o porción de muestra "no eliminada" acumulada en una posición dentro del perfil de función de pH en un aparato de FFE otro valor diferente a cuando el analito (o analitos)
35 que van a ser separados se acumulan. Un analito no eliminado o una porción de muestra no eliminada que contiene una mezcla de analitos debería entenderse por lo tanto con el sentido de que el analito o porción de muestra no eliminado es separado esencialmente, por lo tanto eliminado de un analito dado para ser separado de la mezcla de analito/muestra (por ejemplo una proteína/analito de alta abundancia).

El término "analito que va a ser separado" se refiere a un analito o analitos múltiples que deberían ser sometidos a
40 partición espacialmente por FFE a partir de analitos adicionales contenidos en la muestra. El pH promedio de una meseta de separación por pH de acuerdo con la presente invención corresponde esencialmente al pI de un analito que va a ser separado. Tales analitos se acumularán sobre la meseta de separación por pH, mientras que los analitos con un pI por fuera del rango de la meseta de separación por pH se acumularán bien sea en límite entre la meseta de separación por pH y una función de pH adyacente y/o una función de pH que comprenda una etapa de
45 conductividad.

Alternativamente, la porción de muestra no eliminada es impulsada electroforéticamente lejos de la primera meseta de separación por pH y es sometida a partición espacialmente y adicional en un gradiente de pH adyacente. Los analitos que tienen un pI por fuera del rango de pH de una meseta de separación por pH se consideran representantes esencialmente de porciones de muestra "no eliminada" debido al hecho de que se acumulan en una localización de
50 un perfil de función de pH diferente a donde el analito que va a ser separado (por ejemplo, una proteína/analito de abundancia más alta) se acumula. Por lo tanto, estas porciones de muestra son enriquecidas en una o más fracciones después de la electroforesis de flujo libre.

El término "muestra" tal como se utiliza aquí comprende al menos dos compuestos, los cuales son suficientemente solubles en un medio de separación por FFE de acuerdo con realizaciones de la presente invención. Las muestras
55 empleadas en los métodos y dispositivos de la presente invención pueden ser derivadas, a partir de, pero no se limitándose a mezclas de proteínas, otras mezclas de reacción, o de fuentes naturales tales como fluidos biológicos.

Una "muestra fraccionada" en el contexto de la presente invención significa una muestra en la cual los diversos analitos en la muestra son separados durante una etapa de FFE en el que la muestra puede ser dividida así en varias fracciones

- después de la etapa de separación por FFE. Los experimentados en la técnica entenderán cómo recolectar fracciones individuales que salen de la cámara de separación de un aparato adecuado para FFE a través de múltiples salidas de recolección y en general son guiadas a través de tubuladuras individuales a recipientes de recolección individual de cualquier tipo adecuado (por ejemplo, placas de 96 pozos, y a veces placas de diferentes tamaños, por ejemplo, 144, 288, 576 o aún más pozos).
- 5
- Tal como se utiliza aquí, un "fluido biológico" incluye, pero no se limita a, sangre, plasma, suero, esputo, orina, lágrimas, saliva, esputo, fluido cerebroespinal, lavativas, muestras de leucoforesis, leche, orina, fluido ductal, transpiración, linfa, semen, fluido del cordón umbilical y fluido amniótico, así como fluido obtenido por cultivo de células, tales como caldo de fermentación y medio de cultivo celular y similares.
- 10
- Tal como se utiliza aquí, una muestra de una "mezcla de proteína" es típicamente cualquier mezcla compleja de proteínas que incluyen sus formas modificadas, no modificadas, procesadas o no procesadas, que pueden ser obtenidas a partir de fuentes, que incluyen, sin limitación: una muestra de células (por ejemplo, un lisado, una suspensión, una recolección de células adherentes sobre una placa de cultivo, un raspado, un fragmento o sección de tejido, un tumor, una muestra de biopsia, una célula conservada o muestra de tejido, una captura por láser de células diseccionadas, etcétera), un organismo (por ejemplo, un microorganismo tal como una bacteria o levadura), una fracción subcelular (por ejemplo, que comprende organelos tales como núcleos o mitocondrias, complejos proteínicos grandes tales como ribosomas o golgi, y similares), un óvulo, esperma, embrión, un fluido biológico, virus y similares.
- 15
- Tal como se utiliza aquí, el término "mezcla de reacción" se relaciona con cualquier mezcla de al menos dos compuestos, en las que al menos un compuesto es un producto de una reacción química y es derivado de un compuesto que está o estaba presente en la mezcla de reacción.
- 20
- Tal como se utiliza aquí, una muestra de "mezclas proteínicas complejas" puede contener más de aproximadamente 2, 10, 20, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 20000, 30000, 100000 o aún más diferentes proteínas o péptidos. Tales muestras pueden ser derivadas de una fuente biológica natural (por ejemplo, células, tejidos, fluidos corporales, muestras de suelo o agua, y similares) o pueden ser generadas artificialmente (por ejemplo, combinando una o más muestras de fuentes naturales y/o sintéticas o recombinantes de proteínas).
- 25
- El término "péptido" tal como se utiliza aquí se refiere a cualquier entidad que comprende al menos un enlace peptídico, y puede comprender tanto aminoácidos D y/o L. Un péptido puede tener aproximadamente 2 hasta aproximadamente 150, de manera preferible aproximadamente 2 hasta aproximadamente 100, de manera más preferible aproximadamente 2 hasta aproximadamente 50 y de la manera más preferible aproximadamente 2 hasta aproximadamente 20 aminoácidos.
- 30
- Tal como se utiliza aquí, una "mezcla de péptidos" es típicamente una mezcla compleja de péptidos obtenida como resultado de la escisión proteolítica de una muestra que comprende proteínas.
- "Sistemas reguladores" tal como se utiliza aquí se refiere a una mezcla de compuestos mono, di o tripróticos/básicos, los cuales son capaces de mantener una solución a un valor de pH esencialmente constante por adición de pequeñas cantidades de ácido o base, o por dilución.
- 35
- Un "compuesto regulador" tal como se utiliza aquí significa un compuesto que forma solo o junto con un segundo o más compuestos un sistema regulador.
- Tal como se utiliza aquí, el término "perfil de función de pH" se relaciona a la distribución de pH a lo largo del espacio de separación completo entre el ánodo y el cátodo de un aparato de FFE. El perfil de función de pH de la presente invención puede ser formado por una pluralidad de medios de separación y/o medios de enfoque que forman una "zona de separación" y, preferible pero no necesariamente, también por un medio de estabilización. En ciertas realizaciones de la presente invención, un medio de enfoque puede actuar como un medio de estabilización. En otras realizaciones preferidas de la presente invención, el perfil de función de pH puede comprender más de una zona de separación.
- 40
- 45
- Una "zona de separación" tal como se utiliza aquí debería entenderse por comprender una meseta de separación por pH y comprender adicionalmente una función de pH o un gradiente de pH del lado anódico de dicha meseta de separación por pH y una función de pH o gradiente de pH en el lado catódico de dicha meseta de separación por pH. En algunas realizaciones, una zona de separación comprende una meseta de separación por pH y una función de pH o gradiente de pH en el lado de la meseta de separación por pH. Adyacente al otro lado de la meseta de separación por pH se forma una zona de enfoque mediante un medio de enfoque o un medio de estabilización que actúa como medio de enfoque. En otras palabras, cada meseta de separación está flanqueada por una función de pH, un gradiente de pH o una zona de enfoque en el lado anódico y el catódico, respectivamente. Estas funciones de pH, gradientes de pH o zonas de enfoque pueden ser adicionalmente adyacente a un medio de enfoque y/o medio de estabilización.
- 50

Además, una función de pH puede comprender o consistir de un medio de enfoque. Una meseta de separación por pH, una función de pH y un gradiente de pH pueden ser formados cada uno por un medio de separación o, en el caso de una función de pH, por un medio de separación o un medio de enfoque o una combinación de los mismos. Una meseta de separación por pH, una función de pH y un gradiente de pH pueden ser formados individualmente por un medio de separación introducido en una entrada en un aparato de FFE o pueden ser formados individualmente por una multiplicidad de medios de separación, igual uno a otro o diferentes, introducidos en varias entradas adyacentes de un aparato adecuado para FFE.

De acuerdo con el uso común en la técnica, el término "gradiente de pH" implica que no hay fronteras abruptas observadas con respecto al pH. Bajo esa definición, una gráfica de un gradiente de pH en un dispositivo de IEF sería mostrada como una curva relativamente suave sin transiciones agudas para la porción de interés. Un gradiente de pH puede formarse mediante un medio individual introducido en una entrada de un aparato de FFE, pero también puede ser formado por una multiplicidad de medios introducidos en el aparato a través de una multiplicidad de entradas en el que los medios introducidos en las entradas pueden ser los mismos o diferentes. Un gradiente de pH es típicamente adyacente a una meseta de eliminación por pH por un lado y adyacente a un medio de enfoque o medio de estabilización en el otro lado.

En contraste, el término "función de pH" utilizado aquí pretende tener un significado más amplio: incluye "gradientes de pH", pero también incluye transiciones de pH, esto es, etapas de pH más o menos abruptas que pueden llevar a cambios marcados en pH en el límite entre las dos zonas de pH. El cambio en los límites entre las dos zonas de pH, por ejemplo, la etapa de pH entre dos mesetas de pH, preferiblemente debería ser mayor de 0.5 unidades de pH, preferiblemente mayor de 1 unidad de pH, y más preferiblemente mayor de 2 unidades de pH. Es posible crear funciones de pH con cambios de límites agudos en dispositivos de IEF mediante la selección apropiada de químicas de regulación de separación utilizando las explicaciones y guías dadas aquí.

La función de pH tal como se utiliza en relación con realizaciones de la presente invención puede comprender un gradiente de pH, una transición de pH, una mezcla de gradientes de pH, una mezcla de transiciones de pH, o una mezcla de gradientes de pH y transiciones de pH. Una función de pH puede ser formada por un medio introducido en una entrada de un aparato adecuado para FFE pero también puede ser formada por una multiplicidad de medios insertados en una multiplicidad de entradas en las que los medios introducidos en las entradas pueden ser los mismos o diferentes. Una función de pH es adyacente a una meseta de eliminación por pH a cada lado de la misma y adicionalmente es adyacente a un medio de enfoque y/o un medio de estabilización del lado hacia el ánodo y el cátodo, respectivamente.

Adicionalmente, una función de pH puede comprender o consistir de un medio de enfoque que lleva a una etapa de conductividad, opcionalmente en concierto con una etapa de pH. La función de pH puede comprender una etapa de conductividad aguda, la cual implica que una función de pH puede actuar adicionalmente como un medio de enfoque.

El término "meseta de separación por pH" usado aquí está formado esencialmente por un medio introducido en una entrada de un aparato adecuado para FFE, aunque se entenderá por los experimentados en la técnica que puede utilizarse más de una entrada de un aparato de FFE para crear dicha meseta. Aunque el rango de pH de la meseta de separación mostrada en la Figura 1B esquemática tiene idealmente un rango de cero (esto es, es esencialmente plano con un pH constante que corresponde esencialmente al pI del analito que va a ser eliminado), un rango típico puede ser tal que la zona incluya un límite de pH superior e inferior dependiendo de, por ejemplo, los medios de separación/enfoque circundantes (esto es, que forman un gradiente de pH en esencia extremadamente plano).

El analito que va a ser separado tendrá un pI que resulta en la ausencia de cualquier carga neta en el pH promedio de dicha meseta de separación por pH, no produciendo por lo tanto migración en el campo eléctrico. En general, el pI de cierto analito debe ser o conocido o debe ser identificado por medios conocidos por los experimentados en la técnica. Una forma posible de determinar el pI de un analito dado desde luego incluye la determinación mediante cualquier técnica de FF-IEF adecuada.

Se observará, usual, pero no necesariamente, un ligero desplazamiento a valores de pH más altos en el lado catódico de la meseta de separación por pH y un desplazamiento a valores de pH más bajos en el lado anódico (dependiendo del medio circundante). Así, las fracciones recuperadas a partir del lado anódico de la meseta de separación por pH se denominarán frecuentemente como reserva ácida y las fracciones recuperadas desde el lado catódico de la meseta de separación por pH se denominará frecuentemente como reserva alcalina.

En general, la meseta de separación por pH abarca un rango de pH de un máximo de 0.4 unidades de pH o menos, preferiblemente 0.3 unidades de pH o menos y más preferiblemente un rango de pH de 0.1 unidades de pH o menos. En realizaciones en las que el analito es una proteína, la separación se lleva a cabo preferiblemente en su estado natural. Para, por ejemplo, albúmina de suero humana natural (HSA), es deseable un rango de pH de 4.7 a 5.0, y un rango de pH de 4.8 a 4.9 es incluso más deseable con el fin de separar la proteína de otros analitos en una muestra que tiene un pI diferente de la HSA, el cual está entre 4.8 y 4.9.

En otras realizaciones preferidas, las muestras que contienen proteína pueden ser separadas bajo condiciones de desnaturalización (por ejemplo, mediante la adición de urea o detergentes adecuados conocidos en la técnica). Será evidente para los experimentados en la técnica que el pI de un analito dado tal como una proteína puede ser diferente del pI en su estado natural. De acuerdo con lo anterior, los rangos de pH preferidos para la meseta de separación por pH, por ejemplo, para albúmina de suero humana, diferirán de las separaciones por FFE bajo condiciones naturales como se describió más arriba.

Por ejemplo, bajo condiciones de desnaturalización el pI de HSA está normalmente entre pH 6.3 y 6.4. Por lo tanto, es deseable formar una meseta de separación por pH con un rango de pH entre aproximadamente 6.2 y aproximadamente 6.5, aunque es incluso más deseable un rango de pH de entre aproximadamente 6.3 hasta aproximadamente 6.4. La reducción y alquilación de HSA bajo condiciones de desnaturalización lleva típicamente a un pI observado de alrededor de 6.0 para la proteína. Por lo tanto, el rango de pH de una meseta de separación por pH para separar este último HSA modificado se seleccionará preferiblemente para estar entre aproximadamente 5.9 y aproximadamente 6.2 y más preferiblemente entre aproximadamente 5.9 y aproximadamente 6.1, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 5.9 y aproximadamente 6.0. Es fácilmente evidente que para otras proteínas de alta abundancia, los rangos de pH tendrán que ser adaptados de manera similar al pI de dicha proteína.

El término "medio de separación" se refiere a un medio adecuado para formar una meseta de pH según se requiere para una meseta de separación por pH o una función de pH, o adecuado para formar un gradiente de pH. La conductividad de un medio de separación que forma un gradiente de pH debería ser menor de 2 veces más alta que la conductividad de un medio de separación que forma una meseta de separación por pH adyacente, y preferiblemente, la conductividad debería ser similar a la conductividad en la meseta de separación por pH. Lo más preferiblemente, no debería haber esencialmente ninguna diferencia en la conductividad. La conductividad de un medio de separación que forma una función de pH adyacente a la meseta de separación por pH debería ser igual a 2 veces o más, 3 veces o más o 5 veces o más que la conductividad de un medio de separación que forma dicha meseta de separación por pH. Un medio de separación de acuerdo con realizaciones de la presente invención puede seleccionarse a partir de, pero no se limita al grupo consistente de sistemas reguladores binarios (medios A/B), anfolitos comerciales tales como Servalyt® de Serva, Alemania, sistemas reguladores multipar complementarios tales como reguladores de separación BD FFE I y II de BD GmbH, Alemania, y sistemas reguladores volátiles. Los sistemas reguladores y sus componentes están explicados en mayor detalle aquí a continuación.

Aunque se describe aquí una amplia variedad de sistemas reguladores adecuados, el sistema regulador MES/glicilglicina es un sistema regulador preferido para la separación natural de, por ejemplo, albúmina de suero humana. Puesto que el pI del analito que va a ser separado, por ejemplo albúmina, diferirá usualmente dependiendo de si la proteína está presente en su forma natural o desnaturalizada, pueden utilizarse otros sistemas reguladores tales como HEPES/EACA(ácido ϵ -aminocaproico). Por ejemplo, el HEPES/EACA es un sistema regulador preferido para separar albúmina bajo condiciones de desnaturalización. Otros sistemas reguladores posibles incluyen pero no se limitan a MES/ácido piperidin-3-carbónico y MOPSO/ácido piperidin-4-carbónico, y similares.

Las proteínas del medio de separación seleccionadas para el proceso de electroforesis que se va a llevar a cabo pueden estar, por ejemplo, adaptadas para alcanzar aislamiento selectivo de ciertas proteínas, permitiendo por lo tanto una eliminación efectiva de especies proteínicas mientras que en algunos casos, el enriquecimiento de otras especies proteínicas. El uso posible de una variedad de diferentes sistemas reguladores (y aditivos) provee adicionalmente la ventaja de que puede separarse una multitud de diferentes analitos de acuerdo con los métodos de la presente invención sin comprometer la estabilidad y/o integridad de los analitos de interés.

En ciertas realizaciones de la presente invención, la separación puede ser llevada a cabo en modo paralelo. Para esto último, se requiere separar físicamente las zonas de separación en virtud de un medio de estabilización interelectrodos. El término "medio de estabilización interelectrodos" tal como se utiliza aquí se refiere a un medio compuesto de dos componentes mandatorios: un medio de estabilización interelectrodos catódico y un medio de estabilización interelectrodos anódico. Es fácilmente evidente que el uso de los términos anódico y catódico se refiere a la posición relativa de los medios de estabilización interelectrodos citados entre una zona de separación y el ánodo y el cátodo, respectivamente. Por ejemplo, un orden típico (desde el ánodo al cátodo del aparato de FFE) será un medio de estabilización, un medio formador de una primera función de pH o gradiente, un medio formador de una primera meseta de separación por pH, un medio formador de una segunda función de pH, y luego un medio de estabilización interelectrodos catódicos seguido por un medio de estabilización interelectrodos anódico, un medio que forma la tercera función de pH o gradiente, un medio que forma una segunda meseta de separación por pH, un medio que forma una cuarta función de pH, etcétera, y finalmente por un medio de estabilización (catódicos). En la configuración de ejemplo descrita anteriormente, el medio de estabilización interelectrodos catódico está así más cercano el ánodo físico del aparato de FFE que el medio de estabilización interelectrodos anódico.

El medio de estabilización interelectrodos anódico y catódico puede comprender un ácido monoprótico y/o una base monobásica. Los experimentados en la técnica entenderán que los iones formados en los medios de estabilización interelectrodos deberían tener movilidades electroforéticas suficientemente bajas.

Cada medio componente comprende preferiblemente aniones y cationes con movilidades electroforéticas menores que o iguales a aproximadamente $40 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{V}/\text{seg}$, y más preferiblemente incluso menos de 30, 25 o incluso $20 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{V}/\text{seg}$. Ejemplo de componentes para el componente del medio de estabilización anódico comprenden un ácido seleccionado del grupo consistente de ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido acetilsalicílico, ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico, y ciertos ácidos anfotéricos (conocidos como reguladores de Good). Ejemplos de componentes para el componente del medio de estabilización catódico comprende una base seleccionada del grupo consistente de N-metil-D-glucosamina, tri-isopropanolamina y 2-[bis(2-hidroxiethyl)amino]-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol.

En realizaciones de la presente invención, la zona de estabilización interelectrodos es establecida introduciendo los dos componentes del medio de estabilización interelectrodos en el aparato de FFE entre la pluralidad de las zonas de separación. La Figura 7 muestra una realización en la cual una zona de estabilización interelectrodos es interpuesta entre las dos zonas de separación de un aparato de FFE, que tiene un ánodo y un cátodo, con lo cual se forman dos zonas de separación distintas. Como es evidente a partir de la Figura 7, la meseta de separación por pH de la primera zona de separación DSE puede tener el mismo o diferente valor de pH en comparación con la meseta de separación por pH de la segunda zona de separación. Por lo tanto es posible tener muestras independientes desplazándose a través de entradas de muestra independientes, introducida cada muestra en una de las dos (o más) zonas de separación, y por lo tanto llevar a cabo protocolos de fraccionamiento o separación múltiples simultáneamente con solamente un par de electrodos. Las entradas de muestra pueden ser posicionadas independientemente de las entradas de medio del aparato FFE y frecuentemente están localizadas corriente abajo de las entradas de medio (véase, por ejemplo, las Figuras 1A y 4A). Además, pueden estar posicionadas en cualquier posición deseada entre el ánodo y el cátodo del aparato de FFE.

Típicamente, el medio de estabilización interelectrodos tendrá una conductividad más alta que la de la primera y segunda zonas de separación o fraccionamiento adyacentes a dicho medio de estabilización interelectrodos, evitando por lo tanto el cruzamiento de especies iónicas entre las zonas de separación así como el cruzamiento de las especies catiónicas en la zona aniónica del medio de estabilización interelectrodos anódico y catódico en las zonas de separación adyacentes.

El término "medio de enfoque", utilizado aquí se refiere a un medio que comprende un ácido para un medio de enfoque anódico o una base para un medio de enfoque catódico el cual forma una etapa de conductividad con respecto a la función de pH adyacente, gradiente de pH o meseta de separación por pH, formando una zona de enfoque en la cual el movimiento de los analitos hacia el ánodo o el cátodo se reduce esencialmente a cero debido a una etapa de conductividad. La concentración del ácido y la base se seleccionará de tal manera que sea suficiente para incrementar la conductividad de dicho medio de enfoque, preferiblemente por un factor de al menos 2, y más preferiblemente de al menos 3, al menos 5,0 incluso más con respecto a una meseta de separación por pH adyacente, gradiente de pH o función de pH. Este incremento abrupto en la conductividad eléctrica del medio es útil para acumular analitos con un pl diferente al pl de un analito que va a ser separado sobre una meseta de separación por pH en la frontera de los dos medios que tienen diferentes valores de conductividad puesto que la movilidad de los analitos que se mueven al ánodo o cátodo respectivamente se reduce a esencialmente cero.

El valor de pKa del ácido en el medio de enfoque anódico será seleccionado para que sea más bajo que el valor de pKa del ácido empleado en la función de pH adyacente, gradiente de pH o meseta de separación por pH (esto es, un ácido más fuerte seleccionado para el medio de enfoque anódico). En ciertas realizaciones de la presente invención, la diferencia en pKa es mayor de aproximadamente 1 unidad de pH, preferiblemente mayor de aproximadamente 2 unidades de pH, y lo más preferiblemente incluso mayor de aproximadamente 3 unidades de pH. Ejemplos adecuados para un ácido utilizado para incrementar la conductividad se seleccionan de, pero no se limitan al grupo consistente de ácido sulfúrico, ácido piridin-etanosulfónico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido trifluoroacético, ácido tricloroacético y ácido fórmico. Un medio de enfoque anódico puede comprender el ácido responsable para la conductividad incrementada y adicionalmente los compuestos reguladores que forman una función de pH adyacente, gradiente de pH o meseta de separación por pH, y/o una base débil para regular el pH del medio de enfoque. Debería entenderse que una base débil tiene un pka que es inferior al pKa de la base utilizada en la función de pH adyacente, gradiente de pH o meseta de separación por pH. Ejemplos de bases débiles adecuadas son, por ejemplo, taurina, glicina, ácido 2-aminobutírico, glicilglicina, β -alanina, GABA, EACA, creatinina, piridinetanol, piridinpropanol, histidina, BISTRIS, morfolinoetanol, trietanolamina, TRIS, amediol, bencilamina, dietilaminoetanol, trialquilaminas, y similares, con la condición de que sean seleccionadas de acuerdo con los criterios de pka explicados aquí anteriormente.

Los mismos principios se aplican *mutatis mutandis* a los criterios de selección para la base en el medio de enfoque catódico. De acuerdo con lo anterior, el valor de pKa de la base en el medio de enfoque catódico será seleccionado para mayor que el valor de pKa de la base empleada en la función de pH adyacente, gradiente de pH o meseta de separación por pH (esto es, se selecciona a una base más fuerte para el medio de enfoque catódico). En ciertas realizaciones de la presente invención, la diferencia de pKa es mayor de aproximadamente 1 unidad de pH, preferiblemente mayor de aproximadamente 2 unidades de pH, y lo más preferiblemente incluso mayor de aproximadamente 3 unidades de pH. Ejemplos adecuados para una base utilizada para incrementar la conductividad se seleccionan de, pero no se limitan al grupo consistente de hidróxidos alcalinos o alcalinotérreos, tales como hidróxido de sodio, ácido-3-morfolino-2-hidroxi-propanosulfónico, Tris, y similares. Un medio de enfoque catódico

- puede comprender la base responsable para la conductividad incrementada y adicionalmente los compuestos reguladores que forman una función de pH adyacente, gradiente de pH o meseta de separación por pH, y/o un ácido débil para regular el pH del medio de enfoque. Debe entenderse que un ácido débil tiene un pKa que es más alto que el pKa del ácido utilizado en la función de pH adyacente, gradiente de pH o meseta de separación por pH. Ejemplos de ácidos débiles adecuados son, por ejemplo, HIBA, ácido acético, ácido picolínico, PES, MES, ACES, MOPS, MOPSO, HEPES, EPPS, TAPS, taurina, AMPSO, CAPSO, α -alanina, β -alanina, GABA, EACA, 4 hidroxipiridina, 2-hidroxipiridina y similares, con la condición de que se seleccionen de acuerdo con los criterios de pKa explicados aquí más arriba.
- En virtud de su conductividad eléctrica y su composición, un medio de enfoque de las realizaciones de la presente invención puede actuar también como un medio de estabilización.
- "Medio de estabilización" utilizado para los métodos de la presente invención ha sido descrito en la solicitud provisional pendiente de los Estados Unidos USSN 60/885,792. Los medios de estabilización son útiles y adecuados para estabilizar las condiciones dentro de la zona de separación formada por, por ejemplo, sistemas de regulador binarios adecuados (aquí denominados como "medios A/B"). Un medio de estabilización adecuado actúa así también como un "reservorio" que suministra o reemplaza los iones en la zona de separación.
- De acuerdo con realizaciones de la presente invención, los medios de estabilización se diseñan preferiblemente adhiriéndose a los siguientes criterios de selección. El pKa del ácido regulador en un medio de estabilización catódico (CSM) debería ser más alto que el valor pI del analito más básico en la muestra (esto es, el analito que tiene el pI más alto). De manera similar, el pKa de la base reguladora en un medio de estabilización anódico (ASM) debería ser inferior al pI del analito más ácido en la muestra.
- Medios de estabilización adecuados pueden diseñarse con solamente un ácido regulador (CSM) o solamente una base reguladora (ASM), aunque se contempla que los medios de estabilización también pueden comprender más de un ácido regulador (CSM) y una base reguladora (ASM), respectivamente. En ciertas realizaciones, dos, y a veces incluso tres o más compuestos reguladores pueden estar presentes en CSM y ASM, respectivamente, aunque desde luego se prefiere generalmente mantener la composición del medio tan simple como sea posible.
- En ciertas realizaciones, el pKa de cada ácido regulador en CSM debería estar dentro del rango, $(pI + 0.3) < pKa < (pI + 3)$, preferiblemente dentro del rango $(pI + 0.5) < pKa < (pI + 2)$, y lo más preferiblemente dentro del rango $(pI + 0.5) < pKa < (pI + 1.3)$. De manera similar, el pKa de cada base reguladora en el ASM debería estar dentro del rango $(pI - 3) < pKa < (pI - 0.3)$, preferiblemente dentro del rango $(pI - 2) < pKa < (pI - 0.5)$, y lo más preferiblemente dentro del rango $(pI - 1.3) < pKa < (pI - 0.5)$.
- Alternativamente, los valores de pKa de los ácidos reguladores en el CSM y las bases reguladoras en el ASM también pueden ser definidas con relación en el rango de pH (esto es, pH mínimo y pH máximo) del medio de separación. La definición basada en el rango de pH del medio de separación puede ser alternativa a la que se refiere al pI de los analitos, o puede ser aditiva a dicho requerimiento. De acuerdo con esto, en ciertas realizaciones que se relacionan con el medio de estabilización de la presente invención, el valor de pKa de cada uno de los ácidos reguladores en el CSM será más alto que el valor de pH máximo del medio de separación. De la misma forma, el valor de pKa de cada una de las bases reguladoras en la ASM será inferior que el valor de pH mínimo del medio de separación de IEF.
- En ciertas realizaciones preferidas, el valor del pKa de cada ácido regulador en el CSM está en el rango de $(pH_{max} + 0.3) < pKa < (pH_{max} + 3)$, preferiblemente dentro del rango $(pH_{max} + 0.5) < pKa < (pH_{max} + 2)$, y lo más preferiblemente dentro del rango $(pH_{max} + 0.5) < pKa < (pH_{max} + 1.3)$, y el valor de pKa de cada base reguladora en el ASM está en el rango de $(pH_{min} - 3) < pKa < (pH_{min} - 0.3)$, preferiblemente dentro del rango $(pH_{min} - 2) < pKa < (pH_{min} - 0.5)$, y lo más preferiblemente dentro del rango $(pH_{min} - 1.3) < pKa < (pH_{min} - 0.5)$.
- Si está presente más de un ácido regulador (CSM) o una base reguladora (ASM), los compuestos reguladores adicionales deberían ser seleccionados de manera que tengan valores de pKa a diferentes dentro del rango anteriormente prescrito. En realizaciones preferidas, la concentración de los ácidos reguladores más débiles en el CSM y las bases reguladoras más débiles en el ASM deberían ser más altas que la concentración de los ácidos reguladores (CSM) y las bases reguladoras (ASM) más fuertes respectivos, esto es, el ácido regulador que tenga un pKa más cercano al pI del analito más básico para el CSM y la base reguladora que tenga un pKa más cercano al pI del analito más ácido para la ASM, respectivamente.
- Una concentración más alta en este aspecto significa que la concentración de los ácidos y bases más débiles se incrementan un factor de al menos 1.1 y preferiblemente al menos 2, de forma más preferible aproximadamente 3, y algunas veces por un factor de aproximadamente 4, 5 o incluso 10 por encima de la concentración del ácido/base regulador más fuerte en CSM y ASM, respectivamente.
- Además, los medios de estabilización también pueden comprender una o más bases reguladoras (CSM) y ácidos reguladores (ASM), con la condición de que la concentración combinada de todas las bases en el CSM sea inferior a

la concentración total de los ácidos reguladores respectivos, y que la concentración de todos los ácidos en la ASM sea inferior a la concentración total de las bases reguladoras respectivas, respectivamente.

5 El pH de CSM normalmente será más alto que el pH máximo (el punto final del gradiente de pH hacia el cátodo) del medio de separación. Preferiblemente, el pH de CSM no debería ser mayor de aproximadamente 3, y más preferiblemente no más de aproximadamente 2 unidades de pH por encima del pH máximo del medio de separación. Específicamente para gradientes de pH planos y ultraplanos, se prefiere particularmente que la diferencia de pH se mantenga en un mínimo, esto es, el pH puede estar solamente 1.5 unidades de pH o solamente 1 unidad de pH por encima del pH máximo del medio de separación. De la misma manera, el pH de ASM no debería ser inferior a aproximadamente 3, y más preferiblemente no más de aproximadamente 2 unidades de pH por debajo del pH máximo del medio de separación de IEF. Para gradientes de pH plano y ultraplanos, se prefiere particularmente que la diferencia de pH se mantenga en el mínimo, esto es, el pH puede ser solamente 1.5 unidades de pH o solamente 1 unidad de pH inferior al pH mínimo del medio de separación de IEF.

15 Los experimentados en la técnica apreciarán que los valores de pH observados en el medio de estabilización pueden no ser constantes a lo largo del rango completo (particularmente cuando se aproximan a los electrodos), de manera que cualquier referencia al pH del medio de estabilización debe entenderse como el pH en o cerca de la frontera entre el medio de estabilización y el de separación. Además, será evidente que la identidad de los compuestos reguladores en el medio de estabilización tendrá una influencia en las condiciones de pH en el medio de separación. En efecto, la selección de los ingredientes y su concentración determinará el gradiente de pH que se alcanza cuando se aplica un campo eléctrico durante la electroforesis. Por lo tanto se entenderá que la referencia a valores de pH se referirá generalmente a pH en condiciones de equilibrio (esto es, después de que se ha formado el gradiente), y bajo ciertas circunstancias puede desviarse de los valores preferidos anteriormente descritos sin apartarse del espíritu de la presente invención.

Aparatos y elementos de los mismos

25 Las Figuras 1A y 4A representan un aparato útil para separar especies que pueden ser separadas por carga neta y/o punto isoeléctrico en un medio de separación que fluye en una cámara de separación entre dos electrodos. El dispositivo de electroforesis comprende una cámara de separación rectangular que tiene una primera pared (inferior) y una segunda pared (superior), dos paredes laterales y dos placas planas paralelas superpuestas (no mostradas). Juntos, estos elementos forman la cámara de separación sellada. Dos electrodos capaces de y diseñados para generar un campo eléctrico de alto voltaje están localizados en la cámara y ayudan a definir un espacio de separación el cual generalmente es una porción de una zona dispuesta entre los electrodos. Los electrodos están incorporados preferiblemente como las cámaras de electrodo, a través de las cuales fluye un regulador de electrodos contactado por medio de una línea de suministro de corriente eléctrica, y que preferiblemente tiene una membrana semipermeable yuxtapuesta con la cámara de separación. Los reguladores de electrodos son alimentados hacia las cámaras de electrodo por medio de líneas de alimentación separadas (mostradas solo parcialmente en la Figura 1A y 4A) y también salen de estas cámaras a través de salidas separadas. Preferiblemente, se emplea un aparato de bombeo adicional (no mostrado) para hacer circular el regulador de electrodo y para enfriarlo si se requiere con un termostato.

40 La cámara de separación en o cerca (esto es, en la proximidad de) del primer extremo, contiene al menos una entrada para muestra para la inyección de la muestra y al menos una entrada de medio de separación para la inyección del medio de separación. En el caso de entradas múltiples, puede proveerse más de un medio de separación. En proximidad al segundo extremo se localiza una pluralidad de salidas de recolección de muestra y, opcionalmente, una o más entradas de medio de contraflujo. Tanto las salidas de recolección como las entradas para medio de contraflujo (si más de una están presentes) están dispuestas típicamente a lo largo de una línea perpendicular a la dirección de flujo. En algunas realizaciones de la invención, solamente las salidas de recolección existen en el segundo extremo; mientras que en otras realizaciones, tanto las salidas de recolección como las entradas de contraflujo existen en el segundo extremo.

50 Los analitos individuales salen de la cámara de separación a través de las salidas de recolección múltiple y son guiados generalmente a través de tuberías individuales hacia recipientes de recolección individuales de cualquier tipo adecuado. En los recipientes de recolección, el analito es recolectado junto con el medio de separación y el medio de contraflujo. La distancia entre las salidas de recolección individuales de la disposición de salidas de recolección generalmente debería ser tan pequeña como sea posible con el fin de proveer un fraccionamiento/separación adecuados. La distancia entre las salidas de recolección individuales, medidas desde los centros de las salidas de recolección, puede ser desde aproximadamente 0.1 mm hasta aproximadamente 2 mm, más típicamente desde aproximadamente 0.3 mm hasta aproximadamente 1.5 mm.

55 En diversas realizaciones, el número de entradas de medio de separación está limitado por el diseño del aparato y prácticamente varía, por ejemplo, desde 1 a 7, desde 1 a 9, desde 1 a 15, desde 1 a 40 o incluso más dependiendo del número de entradas de medio escogidas. El número de entradas de muestra varía, por ejemplo, de 1 a 36, de 1 a 11, de 1 a 5, de 1 a 4, o incluso de 1 a 3, mientras que el número de salidas de recolección varía, por ejemplo, de 3 a 384, o de 3 a 96, aunque puede escogerse cualquier número conveniente dependiendo del dispositivo de separación. El número de entradas de medio de contraflujo varía típicamente, por ejemplo, de 2 a 9, o de 3 a 7. El número de

entradas y salidas provistas depende en general de la forma y dimensiones del dispositivo de separación y del espacio de separación. Por lo tanto, será evidente que también son posibles diferentes números de entradas y salidas del medio de separación.

- 5 En las Figuras 1A y 4A, un medio de separación fluye en forma laminar (preferiblemente desde la parte inferior hacia arriba en una cámara de separación inclinada o plana) entre y a lo largo de la longitud de ambos electrodos (flecha grande). En algunas realizaciones, el medio de separación es desacelerado por el contraflujo del medio de separación (flecha pequeña) en la vecindad de las salidas, y así sale de la cámara de separación de fracciones a través de las salidas. Una muestra de, por ejemplo, proteínas que van a ser separadas es introducida en el medio de separación a través de la entrada de muestra y transportada por el flujo laminar del medio de separación. Cuando se opera bajo condiciones de operación continua, la mezcla de proteína es separada de manera continua electroforéticamente, y recolectada en distintas fracciones de acuerdo con las propiedades del regulador de separación y de la muestra resultante del campo eléctrico generado entre los electrodos en el medio de separación. Cuando se opera bajo modos por lotes o discontinuos de operación, la muestra puede ser recolectada en distintas fracciones con un tamaño de cámara variable que puede ser ajustado atendiendo de las características y necesidades del proceso de electroforesis.
- 10
- 15 Antes de ser introducida a través de una entrada de muestra en el área de separación de un aparato de FFE de acuerdo con realizaciones de la presente invención, puede ser necesario diluir la muestra con el fin de evitar diferencias de conductividad grandes entre la muestra y el medio de separación dentro del aparato de FFE. Una muestra puede ser diluida convenientemente con agua o con el medio de separación, el cual es preferiblemente el mismo o al menos similar al medio de separación en el cual se introduce la muestra a través de una entrada de muestra del aparato FFE.
- 20 Diluciones típicas que pueden ser usadas en la práctica de realización de la presente invención pueden ser aproximadamente 1:10. Opcionalmente, el factor de dilución puede ser mayor de 1:10 (por ejemplo, 1:15, 1:20, etc.), dependiendo de la capacidad o espacio disponibles permitidos para la acumulación de proteínas de alta abundancia en una zona de aislamiento para evitar el derrame de proteínas de alta abundancia por fuera de la zona de separación prevista. Si no hay presentes proteínas de alta abundancia en la muestra sometida a la técnica de DFE o de DSE (descritas más adelante en más detalle), es posible una dilución de menos de 1:10, tal como 1:5, 1:2, 1:1, 2:1, etc. Este puede ser el caso, por ejemplo, cuando se utiliza una columna de eliminación para eliminar proteínas de alta abundancia antes de someter la muestra a los métodos de separación electroforéticos de la presente invención. En general, sin embargo, será evidente que la muestra debería ser inyectada en el aparato de FFE tan concentrada como sea posible bajo las circunstancias específicas del problema de separación.
- 25
- 30 La dilución puede ser afectada bien inyectando la muestra en una de las entradas de medio del aparato de FFE. Alternativamente, la dilución puede ser llevada a cabo introduciendo la muestra en una entrada de muestra diferente a la entrada de medio, tal como una entrada de muestra que está dispuesta corriente abajo desde el acceso a las entradas de medio, hacia la dirección de las salidas de muestra o la dilución puede llevarse a cabo antes de introducir la muestra en la entrada de muestra mezclando la muestra con un medio adecuado.
- 35 A la vista de lo anterior, otro aspecto de la presente invención se relaciona con un aparato de FFE como se describió aquí y es que está adaptado para llevar a cabo los métodos de separación por FFE descritos aquí.

Sistemas reguladores adecuados

- Varios sistemas reguladores son útiles para formar un perfil de función de pH de acuerdo con los métodos de la presente invención. Los sistemas reguladores pueden ser seleccionados de, pero no se limitan a, el grupo consistente de anfólitos comercialmente disponibles (por ejemplo vendidos bajo el nombre Servalyt® por Serva Electrophoresis GmbH, Alemania), sistemas reguladores de par múltiples complementarios (por ejemplo, reguladores de separación BD FFE 1 y 2 vendidos por BD GmbH, Alemania), sistemas reguladores volátiles y sistemas reguladores binarios conocidos como medios A/B.
- 40

Sistemas reguladores de par múltiples complementarios

- 45 En ciertas realizaciones de la invención, una mezcla usada para generar el gradiente de pH puede comprender ácidos y bases cuidadosamente pareados de tal manera que la mezcla pueda proveer un gradiente de pH suave cuando la corriente fluye a través de la mezcla. Una mezcla de ácidos y bases orgánicos de bajo peso molecular se selecciona de manera que permita una capacidad de regulación incrementada en comparación con anfólitos de alto peso molecular comercialmente disponibles. Estas mezclas de ácidos y bases cuidadosamente pareados están extremadamente bien caracterizadas en términos de peso molecular, pl, pureza y toxicidad. En general, los ácidos y bases tienen un peso molecular inferior que los de los anfólitos comerciales. Los sistemas reguladores de par múltiple complementarios adecuados son conocidos en la técnica. Específicamente, una mezcla con un rango de pH de 3 a 5 se vende como regulador de separación BD FFE 1 mientras que una mezcla con un rango de pH de 5 a 8 es comercializado como regulador de separación BD FFE 2 por BD GmbH Alemania. Estos sistemas reguladores, por ejemplo, han sido descritos en forma general en la solicitud de patente de los Estados Unidos U.S. 2004/0101973. Los sistemas reguladores de par múltiple complementarios tal como han sido descritos arriba se citan aquí como "CMPBS" o medios "CMPBS".
- 50
- 55

Sistemas reguladores volátiles

En otras realizaciones de la presente invención, pueden utilizarse sistemas reguladores volátiles para formar mesetas de separación por pH, y mesetas de pH con una función de pH y gradientes de pH utilizando varias entradas para formar un gradiente de pH de acuerdo con realizaciones de la presente invención. Estos sistemas reguladores ofrecen la ventaja particular de que pueden ser retirados libres de residuos de la muestra fraccionada recuperada después de una etapa de separación por FFE.

Un medio de separación volátil de acuerdo con realizaciones de la presente invención debe entenderse que representa, en su forma lista para el uso, una composición, preferiblemente una composición acuosa, que incluye un sistema regulador que comprende al menos un ácido regulador y al menos una base reguladora, en la que todos los compuestos reguladores son volátiles. Opcionalmente, al menos uno de los compuestos reguladores puede ser capaz de funcionar como una matriz (volátil) para espectrometría de masas, particularmente para aplicaciones MALDI.

El término "volátil" utilizado en relación con los compuestos reguladores aquí debería entenderse como referencia a la capacidad de los compuestos del regulador para ser completamente retirables de una muestra acuosa bajo condiciones adecuadas, esto es, el compuesto regulador puede ser evaporado sin dejar tras de sí ningún compuesto residual (por ejemplo, una sal), esto es, libre de residuos. En su significado más amplio, un compuesto regulador volátil de acuerdo con realizaciones de la presente invención puede ser retirado libre de residuos bajo condiciones seleccionadas de, pero no limitadas a, el grupo de presión atmosférica reducida, a temperatura incrementada, suministro de energía por irradiación (por ejemplo luz UV, o por aplicación de luz láser), o cualquier combinación de los mismos, aunque será evidente que un compuesto regulador volátil esencialmente debe ser no volátil bajo condiciones de trabajo en FFE (esto es, presión atmosférica y temperatura que varía típicamente entre 0 y 40 °C como se explicó más arriba).

En este contexto, la persona experimentada entenderá que, en una realización de la invención, los analitos que están presentes en una muestra que comprende compuestos reguladores volátiles serán no volátiles bajo las condiciones antes mencionadas, esto es, los analitos esencialmente no son modificados (por ejemplo, por fragmentación u oxidación) y permanecen en solución o en su estado sólido. En ciertas realizaciones, particularmente bajo condiciones de trabajo de espectrometría de masas, los analitos también serán volátiles y serán ionizables (requerido para la detección por MS).

El término "no volátil bajo condiciones de trabajo de FFE" tal como se utiliza aquí significa una volatilidad de un compuesto regulador que lleva a una reducción en la concentración del respectivo compuesto regulador en el medio de separación de menos de 5%p/v o, preferiblemente menos de 2% p/v bajo condiciones de trabajo durante el período de separación de FFE. Lo más preferiblemente, no se observará reducción en la concentración a todas las condiciones de trabajo y el período de separación de FFE.

El término "libre de residuos" en el sentido de la presente invención se entiende como que el compuesto volátil se evapora por sí mismo completamente, pero que los residuos causados, por ejemplo, por una impureza de las sustancias usadas, pueden ser no volátiles. Sin embargo, es bien sabido por los experimentados en la técnica que solamente los compuestos que tengan el grado de pureza más alto deberían ser utilizados para propósitos analíticos, y particularmente así para análisis por espectrometría de masas.

La eliminación del solvente y los compuestos reguladores por "evaporación" tal como se utiliza aquí debe entenderse como referencia a un retiro de los analitos de interés a través de la transferencia de los compuestos a la fase gaseosa y subsecuente eliminación de la fase gaseosa por medios adecuados. Así, la evaporación como se define aquí es diferente de la eliminación de los compuestos reguladores por técnicas comúnmente citadas como intercambio de reguladores (algunas veces también denominada como "desalado"), incluyendo métodos de cromatografía de columna, diálisis o filtración con corte, o técnicas conocidas como extracción de fase sólida o precipitación de analitos. Alternativamente, en ciertas aplicaciones que no están incluidas bajo el término evaporación, los compuestos reguladores presentes en forma de sal simplemente son lavados con agua, aunque esto obviamente lleva a una pérdida indeseable de material de muestra y, además, a la eliminación no cuantitativa de los compuestos reguladores. Las personas experimentadas en la técnica apreciarán que los compuestos reguladores volátiles tal como se definen aquí, al menos en principio, podrían ser retirados probablemente por tales técnicas de intercambio de regulador o extracción en fase sólida, aunque esto desde luego rechazaría la ventaja distintiva ofrecida por la volatilidad de los reguladores (y no tiene sentido a la vista de los problemas potenciales relacionados con las técnicas de intercambios de reguladores, por ejemplo, la dificultad de manipular y recuperar la muestra).

Técnicas de ejemplo adecuadas para eliminar el solvente y los compuestos reguladores volátiles de una muestra recolectada de una etapa de separación por FFE por evaporación incluyen, pero no se limitan a, centrifugación al vacío utilizando dispositivos adecuados tales como un evaporador centrífugo o una centrífuga de vacío conocida por ejemplo bajo el nombre SpeedVac®, por liofilización o por un calentamiento (suave) de la muestra acuosa. Otras posibilidades para evaporar el solvente y los compuestos reguladores incluyen la evaporación sometiendo la muestra a condiciones de presión reducida, por ejemplo, aplicando un vacío a la muestra colocada sobre una placa objetivo utilizada en análisis por espectrometría de masas. Los experimentados en la técnica apreciarán que la mayoría de los

métodos espectrométricos de masas operan bajo condiciones de vacío (por ejemplo MALDI al vacío) de tal manera que los compuestos reguladores volátiles son eliminados convenientemente después de la introducción de la muestra en el instrumento de MS, pero antes de la ionización.

- 5 Preferiblemente, los compuestos reguladores volátiles son retirables bajo condiciones de presión reducida y/o temperatura incrementada. Además, en otras realizaciones, los compuestos reguladores volátiles pueden incluso ser evaporados bajo condiciones de temperatura ambiente y presión atmosférica, particularmente si la muestra que contiene el regulador volátil está presente en un volumen pequeño (por ejemplo, para análisis por espectrometría de masas). Sin embargo, en la mayoría de los casos al menos algunas soluciones reguladoras no se evaporarán fácilmente bajo estas condiciones. En aún otras realizaciones, los compuestos reguladores volátiles pueden ser
10 eliminados solamente bajo condiciones más agresivas (por ejemplo, al vacío y/o altas temperaturas, opcionalmente con irradiación, por ejemplo bajo condiciones de trabajo de espectrometría de masas).

- En ciertas realizaciones de la presente invención, los medios de separación por FFE comprenden compuestos reguladores volátiles en los que al menos uno de los compuestos reguladores volátiles puede actuar como una matriz (volátil) para análisis de espectrometría de masas, esto es, el compuesto solamente puede ser retirado bajo
15 condiciones de trabajo de espectrometría de masas.

Ejemplos de sistemas reguladores volátiles incluyen, pero no se limitan a combinaciones de TRIS/ácido acético, dietalonamina/ácido picolínico, dimetilamino-propionitrilo/ácido acético, 2piridin-etanol/ácido picolínico, bencilamina/2-hidroxipiridina, Tri-n-propilamina/trifluoroetanol, y similares.

Sistemas reguladores binarios (medios A/B)

- 20 Los sistemas reguladores binarios como se definen más adelante se denominan aquí como medios "A/B". En general son útiles para cada realización de la presente invención. El medio de separación comprende al menos un ácido regulador y al menos una base reguladora, con la condición de que el valor de pKa del ácido regulador sea más alto que el pH del medio de separación y el pKa de la base reguladora sea inferior al pH del medio de separación. Puesto de otra manera, el pKa del ácido regulador será más alto que el pKa de la base reguladora.

- 25 El perfil de pH exhibido por el medio de separación puede ser esencialmente lineal (esto es, sin ningunas etapas de pH mayores durante la separación electroforética). Dependiendo de los medios de estabilización empleados así como de las diferencias de pKa entre el ácido regulador y la base reguladora, los medios de separación A/B de acuerdo con este aspecto de la invención ofrecerán un perfil de pH esencialmente constante (esto es, plano), o más bien un gradiente de pH suave/plano dentro de la cámara de separación. Será evidente que dichos medios de separación que
30 proveen una zona con un pH esencialmente constante en la cámara de separación entre los electrodos son particularmente útiles para la creación de mesetas de separación por pH de acuerdo con los métodos descritos aquí. Sin embargo, puesto que los medios A/B también pueden formar gradientes de pH planos o ultraplano, también pueden ser utilizados para la creación de funciones de pH o gradientes de pH como se definen aquí.

- 35 Preferiblemente, los medios A/B que emplean al menos un ácido regulador y una base reguladora en el aspecto anterior de la presente invención están caracterizados por una diferencia en pKa entre el al menos un ácido regulador y la al menos una base reguladora de entre aproximadamente 0.5 y 4 unidades de pH, en donde el pKa del ácido debe ser más alto que el pKa de la base como se explicó anteriormente. En realizaciones preferidas, el ΔpK_a está entre 1.2 y 1.8, lo cual es particularmente útil para las mesetas de separación por pH que tengan un pH constante dentro de la cámara de separación de un aparato FFE. En otras realizaciones preferidas, el ΔpK_a estará entre aproximadamente
40 2.5 y 3.3, siendo este último particularmente útil para gradientes de pH planos.

- Una característica de los medios A/B es que la conductividad eléctrica del medio es relativamente baja, aunque será evidente que la conductividad debe ser lo suficientemente alta como para alcanzar la separación aceptable de los analitos en una cantidad de tiempo razonable. Así, la conductividad de los medios A/B está típicamente entre 50 y
45 1000 $\mu S/cm$ y más preferentemente entre 50 y 500 $\mu S/cm$, aunque los expertos en la técnica advertirán que la conductividad exacta en el medio de separación dependerá desde luego de las especificaciones del problema de separación/fraccionamiento, la presencia de otras especies cargadas en el medio (por ejemplo, iones requeridos para estabilidad de muestra/analitos) y las propiedades electroquímicas del analito.

- Preferiblemente, los medios A/B comprenden solamente un ácido regulador y una base reguladora. En otras palabras, tales medios de separación representan medios binarios en los que una función ácida de un compuesto y una función
50 básica del mismo u otro compuesto sirven esencialmente para establecer un medio de separación con el pH y el perfil de conductividad deseados. A la vez que pueden alcanzarse también buenos resultados con dos o más ácidos reguladores y bases reguladoras en el medio de separación, típicamente es ventajoso utilizar tan pocos componentes como sea posible, no solamente porque es más fácil prepararlos y posiblemente más fácil de usar, sino también porque las propiedades electroquímicas del medio serán más complejas si el número de especies cargadas presentes en la
55 cámara de separación se incrementa.

El concepto de medios A/B está descrito en detalle en la solicitud provisional de patente copendiente de los Estados Unidos USSN 60/885,792. Bases reguladoras adecuadas en este contexto son, por ejemplo, taurina, glicina, ácido 2-amino-butírico, glicilglicina, β -alanina, GABA, EACA, creatinina, piridina etanol, piridinpropanol, histidina, BISTRIS, morfolinoetanol, trietanolamina, TRIS, amediol, bencilamina, dimetilaminoetanol, trialkilaminas y similares. Ácidos reguladores adecuados son, por ejemplo, HIBA, ácido acético, ácido picolínico, PES, MES, ACES, MOPS, HEPES, EPPS, TAPS, AMPPO, CAPSO, α -alanina, GABA, EACA, 4-hidroxipiridina, 2-hidroxipiridina y similares, con la condición de que se satisfagan las relaciones de pKa entre el ácido regulador y la base reguladora tales como se describieron.

Adicionalmente, los métodos de la presente invención los sistemas reguladores binarios tal como se divulgan, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos 5,447,612 también pueden emplearse para la separación de analitos por FFE. Estos medios binarios son adecuados para formar gradientes de pH más bien planos de entre 0.4 y 1.25 unidades de pH.

Aditivos

Los medios de separación de la presente invención pueden comprender adicionalmente uno o más aditivos. Los aditivos de acuerdo con realizaciones de la presente invención son compuestos o iones que no contribuyen (o al menos no significativamente) a la capacidad reguladora provista por los ácidos reguladores y las bases reguladoras. En general, el número y concentración de los aditivos deben mantenerse en un mínimo, aunque será evidente que ciertos analitos o problemas de separación requieren la presencia de compuestos adicionales bien sea para mantener la integridad del analito o para alcanzar las propiedades deseadas del medio (por ejemplo, condiciones de desnaturalización, adaptación de viscosidad entre diversos medios de separación, etcétera).

Los aditivos posibles son seleccionados preferiblemente de otros ácidos y/o bases, así llamados aniones y cationes mono y divalentes "esenciales", potenciadores de la viscosidad, detergentes, agentes solubilizadores de proteína, ligandos de afinidad, agentes reductores, y similares.

Como es evidente a partir de las explicaciones anteriores, pueden estar presentes otros ácidos o bases en los medios de separación de la invención, con la condición de que el pKa de su función ácida o básica esté suficientemente retirado del pH o rango de pH del medio de separación para evitar contribuciones a la capacidad reguladora de la solución (aunque desde luego pueden contribuir a la conductividad eléctrica en el medio). Ejemplos de posibles ácidos y bases incluyen cantidades pequeñas de ácidos o bases fuertes (por ejemplo, NaOH, HCl, etc.) que son disociados completamente en solución, o ácidos o bases muy débiles que están presentes como especies esencialmente no disociadas en el medio (esto es, que tienen un pKa que está separado por más de aproximadamente 4 unidades del pH del medio).

Aniones y cationes mono y divalentes esenciales en el sentido de la presente solicitud son iones que pueden ser necesarios para mantener la integridad estructural y/o funcional de los analitos en la muestra. Ejemplos de tales aniones y cationes esenciales incluyen, pero no se limitan a iones magnesio, iones calcio, iones zinc, iones Fe (II), iones cloruro, iones sulfato, iones fosfato y agentes complejantes tales como EDTA o EGTA, o iones de azida (por ejemplo, para evitar contaminación bacteriana), y similares.

Los potenciadores de viscosidad usados comúnmente en los medios de separación pueden incluir polialcoholes tales como glicerol o diversos PEG, polímeros hidrófilos tales como HPMC y similares, carbohidratos tales como sacarosa, ácido hialurónico y similares. Los potenciadores de viscosidad pueden requerirse para adaptar la viscosidad del medio de separación a la viscosidad de la muestra introducida en el espacio de separación, o a la viscosidad de otros medios de separación y/o estabilización dentro de la cámara de separación con el fin de evitar turbulencias creadas por la diferencia de densidad o viscosidad entre muestra y medio o entre diferentes medios adyacentes.

Aditivos adicionales que pueden estar presentes incluyen selectores quirales tales como ciertas dextrinas que incluyen ciclodextrinas, o ligandos de afinidad tales como lectinas y similares. Adicionalmente, se conocen muchos detergentes adecuados por parte de los experimentados en la técnica, incluyendo SDS, surfactantes como alcoholes grasos, octil glucósido, polisorbatos conocidos como Tween[®], y similares. Ejemplos de agentes solubilizadores de proteína incluyen urea o tiourea, pero también pueden incluir surfactantes y detergentes.

En otras realizaciones preferidas, la separación de un analito tal como albúmina se lleva bajo condiciones de desnaturalización. Agentes desnaturalizantes preferidos son urea o tiourea, u otros detergentes adecuados conocidos en la técnica. La concentración de urea es típicamente de forma aproximada 5 M, más preferiblemente 6 M y lo más preferiblemente 8M o más alta.

En ciertos casos, puede requerirse agregar agentes reductores para evitar la oxidación de un analito en la solución. Agentes reductores adecuados que pueden ser agregados a la muestra y/o el medio de separación incluyen mercaptoetanol, mercaptopropanol, ditiotreit (DTT), ácido ascórbico, metabisulfito de sodio o potasio, y similares.

En cualquier caso, puesto que muchos de los aditivos antes mencionados están cargados eléctricamente, su concentración debe mantenerse tan alta como sea necesario pero al mismo tiempo tan baja como sea posible con el fin de mantener la conductividad eléctrica del medio de separación dentro del rango deseado (bajo).

- 5 Debe anotarse que los aditivos en cualquier proporción deben evitarse en el caso de que los medios volátiles tales como los descritos aquí sean empleados, por ejemplo, en relación con métodos de análisis corriente abajo tales como MALDI(/MS) puesto que la mayoría los aditivos no son volátiles y por lo tanto permanecerían en la muestra, interfiriendo por lo tanto potencialmente con el análisis de MS subsecuente.

Enfoque isoelectrónico de flujo libre (FF-IEF)

- 10 El enfoque isoelectrónico (IEF), también conocido como electroenfoque es una técnica para separar diferentes moléculas en virtud de sus diferencias de carga eléctrica neta. Esta técnica puede ser ejecutada convenientemente bajo condiciones de electroforesis de flujo libre. Es un tipo de electroforesis que toma ventaja del hecho de que la carga de una molécula cambia con el pH de su entorno. La IEF involucra el paso de una mezcla a través de un medio de separación que contiene, o que se pueda hacer que contenga, un gradiente de pH o una función de pH. Una cámara de separación tiene un pH relativamente bajo en el lado anódico, mientras que en el lado catódico tiene un pH relativamente más alto. Entre estos dos lados, se forma un perfil de gradiente de pH o de función de pH desarrollada que gobierna el movimiento electroforético de los analitos en cuestión. En el punto isoelectrónico (pI) para cierta molécula, la carga neta de esa molécula es cero y no se observa movimiento adicional dentro de la cámara de separación.

- 20 Cada analito cargado que tiene una carga neta positiva bajo las condiciones ácidas cerca del ánodo será alejado del ánodo. A medida que se mueve a través de la cámara del sistema IEF, entrará a zonas que tienen un pH más alto, y su carga positiva disminuirá. Cada analito detendrá su movimiento cuando alcance su punto isoelectrónico particular, puesto que no tiene más ninguna carga neta a ese pH particular. De acuerdo con lo anterior, los analitos que tengan una carga negativa neta bajo las condiciones básicas cerca al cátodo serán alejados desde el cátodo. A medida que se mueven a través de la cámara del sistema IEF, entrarán a zonas que tienen un pH más bajo, y su carga negativa disminuirá. Cada analito detendrá su movimiento cuando alcance su punto isoelectrónico particular puesto que no tiene ya ninguna carga neta a ese pH particular. Esto separa efectivamente los diversos analitos en virtud de sus diferentes pls. Las moléculas aisladas de interés pueden ser retiradas del dispositivo de IEF por diversos medios, o pueden ser teñidas o caracterizadas de alguna otra forma.

- 30 Los métodos FFE de la presente invención para separar, aislar o eliminar analitos de una muestra que comprende una mezcla de analitos puede llevarse a cabo de diversas maneras, incluyendo por ejemplo un modo continuo, de intervalos o de intervalos cíclico.

En las aplicaciones de "modo continuo", la solución de muestra se aplica de manera continua en la cámara, con lo cual los analitos, especialmente las proteínas, se separan bajo el flujo continuo del medio de separación y la aplicación ininterrumpida de campo eléctrico durante el proceso de separación completo. Algunos o todos los analitos pueden ser recolectados entonces continuamente después de la separación electroforética.

- 35 El modo continuo en el contexto de FFE debe entenderse con en el sentido de que la etapa de inyección así como la etapa de separación ocurren continua y simultáneamente. La separación electroforética ocurre mientras que el medio y los analitos pasan a través de la cámara de electroforesis donde las diferentes especies están siendo separadas de acuerdo con su pI (IEF), densidad de carga neta (ZE) o movilidad electroforética (ITP). El modo FFE continuo permite la inyección y recuperación continua de los analitos sin la necesidad de llevar a cabo varios "análisis" independiente (entendiéndose un análisis como una secuencia de inyección de muestra, separación y subsecuente recolección y/o detección).

- 45 Será evidente que la FFE en modo continuo incluye técnicas de separación en las que la rata de flujo global se reduce (pero no se detiene) en comparación con la rata de flujo global mientras que los analitos pasan a través del espacio de separación entre los electrodos con el fin de incrementar el tiempo de separación. En este último caso, sin embargo, no se puede hablar mas de un modo continuo verdadero puesto que la reducción de la rata de flujo global solamente tendrá sentido para una cantidad limitada de una muestra.

- 50 Otro modo de operación en FFE conocido como el llamado "modo intervalo" en conexión con las aplicaciones de FFE también ha sido descrito en la técnica. Por ejemplo, un proceso de electroforesis por deflexión no continua (esto es, con intervalo) está mostrado en la patente de los Estados Unidos 6,328,868, cuya divulgación se incorpora aquí como referencia. En esta patente, la muestra y el medio de separación son introducidos juntos en una cámara de electroforesis, y luego separados utilizando un modo de electroforesis tal como una zona de electroforesis, isotacoforesis, o enfoque isoelectrónico, y finalmente son expelidos de la cámara a través de salidas de fraccionamiento. Las realizaciones de la patente '868 describen los medios de separación y el movimiento de la muestra para que sea unidireccional, desplazándose desde el extremo de entrada hacia el extremo de salida de la cámara. La dirección, a diferencia de la electroforesis capilar tradicional, es compartida por la orientación de los electrodos alargados. En el modo de intervalo estático descrito, por ejemplo, en la invención '868, la aceleración de la muestra entre los electrodos causada por una bomba o algún otro elemento de desplazamiento de fluidos tiene lugar solamente cuando el campo

eléctrico está desconectado o al menos cuando el voltaje es inefectivo para la migración electroforética, esto es, cuando ninguna parte de la muestra está sometida a un campo eléctrico efectivo.

5 En otras palabras, el proceso de intervalo está caracterizado por una fase de carga en el que la muestra y los medios son introducidos en la cámara de separación del aparato de electroforesis, (seguidos por un proceso de separación en el que el volumen global del medio incluyendo la muestra es detenido a la vez que se aplica un campo eléctrico para alcanzar la separación. Después de la separación/fraccionamiento de la muestra, el campo eléctrico es desconectado o reducido para ser inefectivo y el flujo global de nuevo se eleva de tal forma que la muestra fraccionada es impulsada hacia la salida y subsecuentemente recolectada/detectada en un contenedor adecuado, por ejemplo, en una placa de microtitulación.

10 El modo llamado cíclico o de intervalo cíclico en el contexto de FFE como se usa aquí ha sido descrito en la solicitud de provisional copendiente de Estados Unidos USSN 60/823,833 presentada el 29 de agosto de 2006 y USSN 60/883 260. En resumen el modo de intervalo cíclico está caracterizado por al menos uno y posibles múltiples reversiones de la dirección del flujo global mientras que la muestra se mantiene en el campo electroforético entre los electrodos alargados. En contraste con el modo de intervalos la muestra se mantiene constantemente en movimiento permitiendo así una fuerza de campo mayor y por lo tanto mejor (o más rápida) separación. Adicionalmente, revirtiendo el flujo global de la muestra entre los electrodos alargados, el tiempo de residencia de los analitos en el campo eléctrico puede ser incrementado considerablemente, ofreciendo por lo tanto tiempo de separación incrementado y/o eficiencia de separación más alta y mejor resolución. La inversión del flujo global en una dirección paralela a los electrodos alargados (denominado un ciclo) puede repetirse tan frecuentemente como sea necesario en la situación específica, aunque razones prácticas y el deseo de obtener una separación en un tiempo corto típicamente limitarán el número de ciclos llevados a cabo en este modo.

15 En el caso de aplicaciones en modo de intervalo, el medio de separación fluye en una manera de estado no continuo o de no equilibrio. Por ejemplo, la muestra puede ser inyectada o introducida con la potencia de alto voltaje desconectada. Alternativamente, una reducción de la fuerza del campo eléctrico durante la elución desde la cámara de separación puede ser ventajosa.

20 Después de que la muestra ha sido introducida el transporte del medio de separación es desconectado u opcionalmente, reciclado de tal manera que el flujo global del medio entre los electrodos se mantenga entre los electrodos. Una vez que la muestra es introducida hasta el grado deseado, la corriente de alto voltaje es encendida entonces, o elevada, hasta que la muestra ha sido separada electroforéticamente. Después de un período de tiempo el voltaje es desconectado, o disminuido y reducido en magnitud, y la muestra de separada es eluida desde la cámara de separación incrementando el flujo de medio, o al menos desplazando el medio hacia las salidas de recolección para ser recolectado. También puede hacerse provisión de un medio auxiliar para ser introducido en la cámara de separación a través de líneas de alimentación de medio auxiliar (preferiblemente al final del aparato FFE directamente opuesto a las líneas de alimentación de medio) y extraído junto con el medio de separación a través de salidas de fraccionamiento. Aquí, este medio auxiliar se denominará como medio de contraflujo y el punto en el cual las líneas de alimentación de medio auxiliar interceptan la cámara se denominarán como entradas de contraflujo.

30 Debido a una etapa de aislamiento, los compuestos de baja concentración pueden acumularse en el sistema de regulación química de una manera tal que las proteínas de mayor abundancia son acumuladas o aisladas en una localización diferente a aquella donde se acumulan las proteínas de baja concentración. Si las proteínas de abundancia más alta aisladas no son analizadas mientras que las proteínas de baja abundancia lo son, las proteínas de alta abundancia son esencialmente eliminadas y así no interfieren con la medición de las proteínas, compuestos o analitos de baja concentración, facilitando por lo tanto su detección e identificación. Adicionalmente, para propósitos de identificación, también puede ser ventajoso que el sistema de regulación química esté asociado con medios para identificar específicamente un compuesto o una clase de compuestos.

45 **Protocolos de separación**

Pueden utilizarse una o múltiples mesetas de pH para las realizaciones de la invención con el fin de asistir en la eliminación o el aislamiento de proteínas en o alrededor de una meseta de separación por pH, a la vez que permite que otras proteínas sean enriquecidas adyacentes a o lejos de dicha meseta de pH. El valor de pH de la meseta puede ser modificado para influir en cuáles proteínas se mantienen aisladas o son eliminadas del resto de la muestra.

50 Se describen aquí dos modos de operación de FFE-IEF en más detalle los cuales permiten que el usuario mejore las técnicas preparativas o analíticas de tal manera que aisle y/o elimine selectivamente analitos de una muestra. En una realización, puede alcanzarse la eliminación, fraccionamiento y enriquecimiento (protocolo DFE) de ciertos analitos. En la segunda realización, puede alcanzarse la eliminación, separación y enriquecimiento (protocolo DSE) de ciertos analitos. Ejemplos de analitos que deben ser eliminados son, por ejemplo, proteínas de alta abundancia que se seleccionan de pero no se limitan al grupo consistente de albúmina, alfa-1-antitripsina, transferrina, haptoglobulina, caseína, miosina, actina y similares.

Como se describió aquí más arriba, el método para separar un analito que va a ser separado de una composición de analitos por electroforesis de flujo libre comprende las etapas de formar dentro de una cámara de electroforesis de flujo libre (FFE) un perfil de función de pH entre un ánodo y un cátodo, que comprende una meseta de separación por pH cuyo pH promedio corresponde esencialmente al punto isoelectrico (pI) de un analito que va a ser separado y que
 5 tiene un rango de pH delimitado por un límite de pH superior y un límite de pH inferior, y que comprende adicionalmente una función de pH entre el ánodo y la meseta de separación por pH que tiene un pH promedio inferior al pH de la meseta de separación por pH y/o una conductividad eléctrica más alta que la meseta de separación por pH, y una función de pH entre el cátodo y la meseta de separación por pH que tiene un pH promedio mayor al pH de la meseta de separación por pH y/o una conductividad eléctrica mayor que la meseta de separación por pH, introduciendo una
 10 mezcla que comprende un analito que va a ser separado de una mezcla de analitos en la cámara de FFE en la que la muestra puede ser introducida en la meseta de separación por pH, en una zona en el lado anódico o en una zona en el lado catódico de dicha meseta de separación por pH; y eluir los analitos de la cámara de FFE. En el caso de que el pI de dicho analito que va a ser separado de una composición de analitos no sea conocido, el método puede comprender adicionalmente identificar el pI de dicho analito antes de la separación electroforética. Opcionalmente, todos o una porción de los analitos pueden ser recuperados en una o una pluralidad de fracciones.

Protocolo DFE

El protocolo DFE de acuerdo con realizaciones de la presente invención es útil para separar analitos, por ejemplo, proteínas particulares de una mezcla de analitos por IEF de flujo libre.

El perfil de función de pH adecuado para un protocolo de DFE comprende una meseta de separación por pH, la cual abarca el pI del analito que va a ser separado de otros analitos de una mezcla, y una función de pH entre el ánodo y la meseta de separación por pH, que tiene un pH inferior al pH de la meseta de separación así como una función de pH entre la meseta de separación y el cátodo que tiene un pH mayor que el pH de la meseta de la separación por pH. En DFE, hay una etapa de pH distinta entre las dos funciones de pH y la meseta de separación por pH de al menos 0.5 unidades de pH, preferiblemente 1 unidad de pH y más preferiblemente 2 o más unidades de pH. Alternativa y/o
 20 adicionalmente, las funciones de pH adyacentes a la meseta de separación por pH pueden exhibir una conductividad eléctrica mayor. En otras palabras, el medio que forma la función de pH será un "medio de enfoque" como se describe aquí más arriba en más detalle.

Después de introducir la muestra compuesta de una mezcla de analitos que comprenden los analitos que van a ser separados en la meseta de separación por pH dentro de la cámara de separación de un aparato de FFE, la mezcla de los analitos será separada aplicando un campo electroforético, y los analitos que van a ser separados de la muestra son recuperados subsecuentemente de la zona de separación del aparato por medios adecuados a través de una pluralidad de salidas de recolección.

La persona experimentada sabe cómo identificar el pI de un analito utilizando técnicas conocidas para los experimentados en el arte. Alternativamente, la persona experimentada puede utilizar la presente técnica de enfoque isoelectrico en combinación con, por ejemplo, una electroforesis en gel e inmunodetección subsecuentes para identificar el pI de una proteína. Durante el protocolo de separación por DFE, se aplica un voltaje entre el ánodo y el cátodo de un aparato de FFE el cual hace que fluya corriente eléctrica a través de los reguladores de separación y el medio, produciendo de esta manera una cortina electroforética que se establece a través de y entre los electrodos, formando un perfil de función de pH y un perfil de conductividad como se muestra esquemáticamente en la Figuras 1,
 35 2, 4, 5, 7 y 8.

Un aparato adecuado para FFE, así como los perfiles de pH y conductividad de un experimento de DFE de ejemplo se muestra en la Figura 1A y 1B. Los medios se introducen a través de entradas desde zonas de composición respectivas una vez que el medio ha tenido la oportunidad de estabilizarse y formarse con base en la migración electroforética y propiedades de estabilización del medio y zonas medias adyacentes. En otras palabras, un medio introducido a través de la entrada 1 forma una Zona 1 y un medio introducido a través de la entrada N, forma una Zona N, donde N es un entero, como se ejemplifica en las realizaciones de la presente invención de 1 hasta incluyendo 7, pero puede incluir en otras realizaciones un rango de 1 a 8, 9, 10, 12, 15, 20, 30, 40 o incluso mayor, dependiendo del número de entradas para medio provistas en el aparato de FFE. Adicionalmente, es fácilmente evidente que puede utilizarse más de una entrada para formar una zona de composición individual (esto es, un medio idéntico es
 45 introducido en el aparato FFE a través de varias entradas de medio adyacentes).

Los límites entre las zonas pueden ser distinguibles, u opcionalmente superpuestos y no distinguibles dependiendo de las propiedades electroquímicas del medio en cada zona. Puesto que las composiciones de entrada y las zonas de composición varían en pH, puede tener lugar un modo de enfoque isoelectrico de electroforesis dentro de la cámara de electroforesis durante y después de la formación del gradiente de perfil de pH.

Las zonas dispuestas entre la meseta de separación por pH (esta última formada por entrada 4 en la Figura 1B) y uno de los electrodos tendrá usualmente un pH diferente que el de la meseta de separación por pH, y por lo tanto, permite el movimiento de analitos anfotéricos inyectados o introducidos en la meseta de separación por pH que tengan un pI que sea diferente del pI necesario para permanecer en la meseta de separación por pH. Los analitos por lo tanto

migrarán desde la meseta de separación por pH hacia uno de los electrodos. Más específicamente, los analitos anfotéricos dentro de la muestra que tengan un pI inferior al pH de la meseta de separación por pH tendrán una carga neta negativa cuando sean dispuestos en la meseta de separación por pH, y por lo tanto migran hacia el ánodo. Adicionalmente, los analitos anfotéricos o proteínas dentro de la muestra que tengan un pI mayor que el pH de la meseta de separación por pH tendrán una carga neta positiva cuando sean dispuestos en la meseta de separación por pH, y por lo tanto migran hacia el cátodo. Dependiendo de la naturaleza y composición de la muestra, la muestra puede ser en general inyectada o introducida en un aparato de FFE en la meseta de separación por pH, en una zona entre la meseta de separación por pH y el ánodo o en una zona entre la meseta de separación por pH y el cátodo. Preferiblemente, sin embargo, la muestra será inyectada en la meseta de separación por pH.

En algunas realizaciones de la invención, ambas zonas adyacentes a la meseta de separación por pH creadas por el medio de separación introducido en la cámara harán que se forme una meseta de pH ácida o alcalina dependiendo de los medios de separación y reguladores inyectados o introducidos en el espacio de separación (entradas 3 y 5 en la Figura 1B). La zona entre el ánodo y la meseta de separación por pH formará esencialmente una meseta de pH ácida y la zona entre el cátodo y la meseta de separación por pH formará una meseta de pH alcalina. El protocolo DFE tal como se describe aquí llevará a concentrar las reservas ácida y alcalina de los analitos anfotéricos, esencialmente flanqueando la reserva de eliminación que permanecerá en la meseta de separación por pH.

En el ejemplo 1 descrito aquí, el pH de la meseta de separación por pH fue escogido para corresponder con el pI del estado natural de la albúmina de suero humana de proteína de alta abundancia. En otras realizaciones, se contempla que el pH de la meseta de separación por pH pueda ser escogido de tal manera que las proteínas que van a ser eliminadas permanecerán en la meseta de separación por pH mientras que otros analitos que tengan un pI diferente no permanecerán en la meseta de separación por pH y más bien migren desde la meseta de la separación por pH debido a su carga neta impulsadas por la diferencia entre pI y el pH del medio circundante.

Las zonas de meseta de pH ácidas y alcalinas pueden tener un barrido generalmente extendido, y el usuario puede desear tener reservas ácidas o alcalinas de proteínas fraccionadas recolectadas o concentradas en cierta localización a lo largo del barrido de las mesetas de pH. Desde el punto en el cual los analitos anfotéricos pueden permanecer en reposo puede presentarse de manera natural más allá de las porciones de extremo de las mesetas de pH ácida y alcalina lejos de la meseta de separación por pH, en ciertas realizaciones de la invención el usuario puede desear recolectar analitos en una localización específica deteniendo o alterando la migración electroforética de partículas o proteínas con la ayuda de "muros" de conductividad logrados, por ejemplo, mediante un medio de enfoque como se describe aquí.

En virtud de la conductividad eléctrica significativamente más alta de ciertos medios dispuestos dentro de o adyacentes a las mesetas de pH ácidas y alcalinas, puede evitarse que los analitos migren más allá de las mesetas y en vez de ello se concentren en reservas más que continuar posteriormente hacia el ánodo y el cátodo. Adicionalmente, seleccionando zonas que inmediatamente flanqueen la meseta de separación por pH con una conductividad más alta que la de la meseta de separación por pH, los analitos anfotéricos que migren desde la meseta de separación por pH, se acumularán inmediatamente en la así llamada "interfaz" entre la zona ácida y la meseta de separación por pH, o entre la meseta de separación por pH y la zona alcalina, respectivamente. La etapa de pH entre la meseta de separación por pH y el pH de la zona adyacente ácida o alcalina es usualmente mayor de 0.5, preferiblemente mayor de 1.0, o incluso mayor de 2 unidades de pH. Debe anotarse que el comportamiento electroforético exacto de los analitos sometidos a esta técnica depende de la naturaleza y cantidad de la muestra que va a ser separada así como los medios de separación utilizados para separar la muestra.

Por lo tanto, en realizaciones de la presente invención, los medios de separación, estabilización y/o de enfoque son escogidos apropiadamente para establecer un "muro" de alta conductividad dentro de uno si no de ambas mesetas ácida y alcalina (zona 3 y zona 5 respectivamente en la Figura 1B). Las reservas resultantes ácida y alcalina bajo las circunstancias anteriores mostrarán un efecto de acumulación o concentración para ciertos analitos.

La separación mostrada, por ejemplo, en la Figura 2, fue permitida mediante el uso de mesetas de pH y medios de alta conductividad en relación con una técnica de enfoque isoeléctrico de flujo libre. Una vez que las tres fracciones (fracción de zona de eliminación de pH o reserva de eliminación, reserva ácida y reserva alcalina) han sido recolectadas, el investigador puede llevar a cabo operaciones preparativas o analíticas adicionales a todas, una porción de o una combinación de las fracciones en una variedad de maneras que comprenden, pero no se limitan a: electroforesis tales como geles naturales, 1D- o 2D-PAGE, técnicas cromatográficas, MS, RMN, difracción de rayos X, espectroscopía IR, espectroscopía UV, o ensayos bioquímicos tales como ensayos de actividad.

En una realización de la invención, las reservas ácida y alcalina son agrupadas entre si o recombinadas de tal manera que solamente la reserva de proteína de abundancia alta falta o es eliminada de la mezcla. Las reservas combinadas ácida y alcalina pueden ser entonces procesadas o analizadas posteriormente. Por ejemplo, las reservas combinadas pueden ser separadas subsecuentemente usando, por ejemplo, una técnica electroforética tal como una electroforesis en zona, enfoque isoeléctrico o isotacoforesis. Opcionalmente, las reservas combinadas pueden ser procesadas de nuevo utilizando el protocolo DFE ajustado para las mismas u opcionalmente una proteína de alta abundancia diferente que va a ser eventualmente eliminada. Por lo tanto, las partículas, analitos o proteínas se separarán

electroforéticamente o migrarán sin la influencia de las proteínas que fueron eliminadas en la primera etapa de fraccionamiento descrita más arriba. Esto reduce la complejidad de la muestra y así permite desenmascarar proteínas de abundancia más baja. Por lo tanto, un análisis de la muestra utilizando un análisis 1D- o 2D-PAGE se beneficiará de no haber mostrado la existencia o concentración normal de la proteína de alta abundancia, permitiendo por lo tanto una mejor resolución o visualización de las proteínas de abundancia baja. En otras palabras, la resolución mejorada mediante el uso de las técnicas anteriores permite desenmascarar proteínas de baja abundancia, por ejemplo, para identificaciones mejoradas por LC-MS/MS. Adicionalmente, puesto que las proteínas no eliminadas pueden haber sido sometidas originalmente a uniones no específicas a la proteína de alta abundancia, el uso de ciertos elementos de la presente invención puede permitir la medición, procesamiento o análisis de proteínas que tradicionalmente estarían enlazadas a la proteína de alta abundancia.

En otra realización, las reservas ácidas o alcalinas pueden ser descartadas y la zona de eliminación recolectada que contiene la proteína de alta abundancia es separada o fraccionada adicionalmente utilizando, por ejemplo, una técnica electroforética tal como electroforesis de zona, enfoque isoeléctrico o isotacoforesis. Las partículas, analitos o proteínas que eventualmente estuvieron enlazados a la proteína de alta abundancia o que de alguna otra manera pueden haber permanecido aislados colectivamente con la proteína de alta abundancia debido a características de movilidad electroforética similares de la proteína de alta abundancia se separarán electroforéticamente o migrarán sin la influencia de las proteínas que no fueron eliminadas en la primera etapa de fraccionamiento descrita más arriba.

Protocolos DSE

El protocolo anterior para eliminación, fraccionamiento y enriquecimiento electroforético (DFE) de una muestra (que comprende típicamente proteínas) es exitoso en la producción de al menos dos, más preferiblemente tres fracciones de proteínas en su estado natural o desnaturalizado, comprendiendo una de las fracciones el analito que va a ser eliminado (esto es, que va a ser separado para análisis posteriores en una muestra), y la fracción o fracciones remanentes que comprenden analitos adicionales que pueden ser utilizados para procesamiento y/o análisis subsecuentes.

En lugar de seleccionar la recombinación de las reservas ácidas y alcalinas del protocolo DFE descrito anteriormente antes de separar electroforéticamente la muestra en una etapa opcional, incluso adicional de IEF con el fin de resolver la muestra de proteínas totales excluyendo la proteína eliminada, el protocolo DSE de acuerdo con realizaciones de la presente invención permite que se lleve a cabo tanto la separación de, por ejemplo, proteínas de abundancia baja, y la eliminación de, por ejemplo, proteínas de abundancia alta, en una técnica electroforética de etapa sencilla. Al igual que al primer protocolo descrito más arriba, el protocolo DSE descrito aquí permite, por ejemplo, la eliminación de proteínas de alta abundancia a partir de una muestra utilizando un método y aparato de electroforesis de flujo libre, pero provee la ventaja adicional de separar adicionalmente la porción de muestra "no eliminada", todo en un análisis de separación por FFE individual.

El protocolo DSE es particularmente útil para separar analitos de baja concentración a partir de, por ejemplo, analitos abundantes, tales como proteínas abundantes, por IEF de flujo libre. En general, el protocolo es equivalente al protocolo DFE: el pI de un analito abundante que va a ser eliminado debe ser conocido o debe ser identificado. Además, el perfil de función de pH creado para un protocolo DSE dentro de un aparato FFE comprende una meseta de separación por pH, la cual abarca el pI del analito que va a ser separado de otros analitos de una mezcla.

Sin embargo, en contraste con el protocolo DFE, el perfil de función de pH adecuado para DSE comprende adicionalmente un gradiente de pH que tiene un pH promedio inferior al pH de la meseta de separación por pH adyacente entre el ánodo y la meseta de separación por pH y/o un gradiente de pH que tiene un pH promedio mayor que el pH de la meseta de separación por pH adyacente entre la meseta de separación por pH y el cátodo.

Los gradientes de pH útiles para las aplicaciones de DSE usualmente cubren 0.5 o más, a veces 1 o más y en ciertas realizaciones 2 o 3 o más unidades de pH. Después de introducir la muestra compuesta de una mezcla de analitos que comprende los analitos que van a ser separados en la meseta de separación por pH dentro de la cámara de separación de un aparato FFE, la mezcla de analitos será eliminada y separada aplicando un campo electroforético, y los analitos que van a ser separados de la muestra son eluidos subsecuentemente y recuperados opcionalmente de la zona de separación del aparato por medios adecuados a través de una pluralidad de salidas de recolección.

Se dispone una pluralidad de entradas de medio en el extremo de entrada de una cámara de electroforesis. En una realización de la invención, se utilizan al menos 5 entradas para suministrar una variedad de soluciones dentro de la cámara para producir la función de pH y el perfil de conductividad deseados que ayudan en llevar a cabo el método de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

Particularmente para equipos de FFE existentes tales como aquellos, se utilizarán preferiblemente 7 o 9 entradas para suministrar los diversos medios de separación, estabilización y enfoque dentro de la cámara de separación. Aunque el uso de las 7 o 9 entradas se prefiere actualmente a la vista del diseño de los aparatos de FFE utilizados para llevar a cabo los experimentos en relación con realizaciones de la presente invención, será evidente que el número de

entradas no está limitado a 7 o 9 entradas, sino que también puede comprender 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más entradas que pueden ser usadas para formar un perfil de función de pH deseado.

5 Se aplica un voltaje entre el ánodo y el cátodo el cual hace que fluya corriente eléctrica a través de los reguladores y medios de separación, produciendo por lo tanto una cortina electroforética que será establecida a través y entre los electrodos, formando un perfil de pH y conductividad como se refleja en la Figuras 4B y Figura 6.

10 Los diversos medios introducidos a través de las entradas a partir de zonas de composición respectivas, una vez que los medios han tenido la oportunidad de estabilizarse y formar una función de pH o un gradiente de pH con base en las propiedades de migración y estabilización electroforética de los medios y las zonas de medios adyacentes. En otras palabras, un medio introducido a través de la entrada 1 forma una zona 1, y un medio introducido a través de la entrada N forma una zona N, en donde N es un entero, como se ejemplifica en realizaciones de la presente invención desde 1 hasta e incluyendo 7, pero puede incluir en otras realizaciones un rango de 1 a 8, 9, 10, 12, 15, 20, 30, 40 o incluso mayor, dependiendo del número de entradas de medios provistos en el aparato FFE. Adicionalmente, es fácilmente evidente que no más de una entrada puede ser utilizada para formar una zona de composición individual (esto es, un medio idéntico es introducido en el aparato FFE a través de varias entradas de medio adyacentes).

15 Para los protocolos de DSE, es fácilmente evidente que al menos tres medios de separación diferentes (introducidos a través de tres entradas de medios distinguibles), correspondientes a tres zonas distinguibles, serán requeridos con el fin de alcanzar el perfil de pH deseado para DSE. Lo mismo es en general válido para los protocolos de DFE, aunque las dos funciones de pH adyacentes a la meseta de pH también se formarán estabilizando o por estabilización interelectrodos de los medios (lo cual reduce el número de medios distinguibles requeridos para un protocolo de DFE cuando se opera en modo paralelo con múltiples zonas de separación).

20 Los límites entre las zonas pueden ser distinguibles o no distinguibles dependiendo de las propiedades electroquímicas de los medios en cada zona y a cualquier nivel de superposición que sea capaz de presentarse con base en sus propiedades de los medios. Puesto que las composiciones de entrada y las zonas de composición varían en pH, puede tener lugar un modo de electroforesis de enfoque isoeléctrico dentro de la cámara de electroforesis durante y después de la formación del perfil de función de pH adecuado para DFE y DSE, respectivamente.

Una realización de la presente invención que ilustra el protocolo DSE se muestra en la Figura 4. En esta realización de ejemplo de la invención, se forma una meseta de separación por pH, por ejemplo, esencialmente en la Zona 4 como se muestra en la Figura 4B. La composición de los medios de separación y soluciones reguladoras que constituyen la meseta de separación por pH se selecciona de acuerdo con el pI del analito que va a ser eliminado, aunque la "meseta" exhibirá típicamente un cierto rango de pH pequeño para abarcar el punto isoeléctrico del analito, por ejemplo, una proteína que se desea eliminar (por ejemplo, una proteína de alta abundancia). Aunque la pendiente de pH de la zona de eliminación (Zona 4) mostrada en la Figura 4B tiene una pendiente de cero, la pendiente real puede ser aquella mediante la cual la zona incluya un límite de pH superior e inferior, en el que la proteína que va a ser eliminada tendrá un punto isoeléctrico (pI) natural para mantener carga neta cero dentro de ese rango de pH seleccionado. Por lo tanto, la pendiente de gradiente de pH puede ser modificada a partir de un valor de cero hasta la pendiente de un gradiente de pH con un barrido de pH corto, dependiendo de la concentración y el número de agentes químicos utilizados para el sistema regulador.

40 Las zonas adicionales dispuestas entre la meseta de separación por pH y uno los electrodos tendrán un perfil de pH diferente que el de la meseta de separación por pH, y por lo tanto, permiten el movimiento de analitos anfotéricos inyectados o introducidos dentro de la meseta de separación por pH que tienen un pI diferente del necesario para permanecer en la meseta de separación por pH. Las partículas migrarán por lo tanto desde la meseta de separación por pH hacia uno de los electrodos. Más específicamente, los analitos anfotéricos que tengan un pI inferior al pH de la meseta de separación por pH tendrán una carga neta negativa cuando se disponen en una meseta de separación por pH, y por lo tanto migran hacia el ánodo así como todos los aniones no anfotéricos. Adicionalmente, los analitos anfotéricos que tengan un pI mayor que el pH de la meseta de separación por pH tendrán una carga neta positiva cuando se disponen en la meseta de separación por pH, y por lo tanto migran hacia el cátodo así como también todos los aniones no anfotéricos.

50 En ciertas realizaciones de DSE de la invención, ambas zonas adyacentes a la meseta de separación por pH tendrán un perfil de gradiente de pH diferente al de la meseta de separación por pH y formarán un gradiente de pH bien sea ácido o alcalino, preferiblemente gradientes lineales, dependiendo de los medios de separación y reguladores inyectados o introducidos adyacentes a los medios de separación que forman la meseta de separación por pH. Los medios introducidos en el espacio entre la meseta de separación por pH y el ánodo formarán esencialmente un gradiente de pH más ácido que se eleva desde el ánodo hacia la meseta de separación por pH y los medios introducidos entre la meseta de separación por pH y el cátodo formarán un gradiente de pH más alcalino que se eleva desde la meseta de separación por pH y se incrementa hacia el cátodo. El gradiente más ácido debería tener un rango de pH y una capacidad de regulación para acomodar todas las proteínas deseadas que van a ser separadas con un pI menor que el del rango de pI de la proteína eliminada seleccionada para la meseta de separación por pH, y el gradiente alcalino debería tener un rango de pH y capacidad de regulación para acomodar todas las proteínas

deseadas que se van a separar mayor que el rango de pI de la proteína eliminada escogido para la meseta de separación por pH.

5 El protocolo de DSE descrito aquí permite que se formen zonas de gradiente ácidas y alcalinas y esencialmente flanquean la reserva de eliminación establecida por la meseta de separación por pH. En el ejemplo 2 descrito aquí, el pH de la meseta de separación por pH fue seleccionado de manera que fuera el de la albúmina (pI alrededor de 4.8), una de las proteínas más abundantes en el plasma humano. Puesto que el pH de la meseta de separación por pH se selecciona para corresponder con el pI de la albúmina, la albúmina se mantiene en una reserva de eliminación mientras que las proteínas que tienen un pI por fuera del rango de pH de la meseta de separación por pH son conducidas electroforéticamente hacia el ánodo o el cátodo, dependiendo del pI de la proteína específica.

10 En otras realizaciones en las que se contempla la eliminación de otra proteína de alta abundancia, el pH de la meseta de separación por pH puede ser seleccionado de tal manera que la mezcla de proteínas previstas para ser eliminadas eventualmente permanecerá en la meseta de separación por pH mientras que los analitos que tienen un pI diferente no permanecerán en la meseta de separación por pH y más bien migrarán desde la meseta de separación por pH debido a su carga neta generada por la diferencia entre su pI y el pH de los medios circundantes.

15 Puesto que no es probable que las partículas o proteínas dentro de la muestra una vez inyectadas o introducidas en la meseta de separación por pH después de que el gradiente de pH haya sido establecido, continuarán naturalmente migrando hasta alcanzar su punto isoeléctrico donde su carga neta sea esencialmente cero, puede haber necesidad de detener o retrasar la migración electroforética de especies iónicas no anfotéricas así como de partículas o proteínas que tengan puntos isoeléctricos inferiores a los del área de pH inferior de la zona reguladora en general ácida y más
20 altos que los de la zona de regulador en general alcalina. Por lo tanto, en ciertas realizaciones de la presente invención, los medios de separación, estabilización y/o medios de enfoque serán seleccionados apropiadamente para establecer un "muro" de alta conductividad dentro del perfil de función de pH, bien sea dentro o adyacentes a los gradientes de pH. Por razones prácticas, puede ser deseable proveer medios de enfoque y/o estabilización entre la zona de gradiente de pH y el ánodo, y entre el gradiente de pH y el cátodo, respectivamente. Tal configuración está descrita, por ejemplo,
25 en la Figura 4B.

En virtud de la significativa conductividad eléctrica de ciertos reguladores dispuestos dentro de o adyacentes a las regiones ácida y alcalina, la migración de partículas o proteínas puede ser evitada, controlando por lo tanto una movilidad indeseada adicional hacia el ánodo y el cátodo.

30 Por lo tanto, los medios citados aquí como medios de enfoque pueden ser diseñados para establecer un "muro" de alta conductividad dentro de o adyacente a una o a ambas de las funciones de pH ácida y alcalina o gradientes de pH en la zona anódica y catódica, respectivamente. El uso de tal medio de enfoque que forma un muro de alta conductividad influirá por lo tanto en la concentración de la muestra de proteínas que tienen un pI que es inferior al del gradiente ácido y mayor que el del gradiente alcalino dependiendo de cuando se desea que la conductividad sea establecida por el usuario.

35 Uso de Fracciones después de DFE/DSE

Una vez que todas las fracciones separadas han sido recolectadas, el investigador puede llevar a cabo operaciones preparativas adicionales a todas o a una porción de las fracciones, u opcionalmente puede llevar a cabo un análisis de las fracciones en una variedad de formas.

40 En realizaciones de la invención, el investigador puede separar electroforéticamente de forma adicional la muestra recolectada en los gradientes ácido y alcalino, teniendo por lo tanto una separación electroforética de todas las proteínas recolectadas excepto aquellas eliminadas en la primera etapa de DSE.

45 En otra realización de la invención, el investigador puede ajustar cuáles proteínas serán eliminadas seleccionando múltiples mesetas de pH asociadas a las proteínas de eliminación deseada. Por ejemplo, al seleccionar el aislamiento de la albúmina para una eliminación potencial de albúmina (con un pI natural de alrededor de 4.8) y una de las isoformas más abundante de la transferrina, cuya isoforma más abundante tiene un pI de 5.4, el investigador puede diseñar un medio y un sistema de regulación para crear dos mesetas de pH de eliminación en 4.8 y 5.4 respectivamente, mientras que las zonas entre el ánodo y la meseta de 4.8, entre las mesetas de 4.8 y 5.4, y entre la meseta de 5.4 y el cátodo serán gradientes de pH creciente. En tal configuración, las mezclas de proteína introducidas en o adyacentes a las mesetas de separación migrarán de acuerdo con sus pI, migrando la albúmina hacia y
50 permaneciendo en la meseta de pH 4.8 y migrando las isoformas de transferrina y permaneciendo en la meseta de 5.4.

55 Al recolectar todas las fracciones y descartar las proteínas recolectadas en las mesetas de pH 4.8 y de separación de 5.4, el investigador puede analizar la mezcla de proteínas a partir de la muestra enfocada y separada isoeléctricamente con una reducción en las proteínas abundantes múltiples determinadas por las mesetas de separación no utilizadas en el análisis. En otras palabras, ambas zonas de mesetas de pH que no son utilizadas durante este último análisis

permiten un análisis de la mezcla de proteínas en ausencia de proteínas de alta abundancia múltiples eliminadas de las muestras de proteínas.

5 Las muestras eluidas recolectadas de acuerdo con un protocolo bien DFE o bien DSE, en su totalidad o en partes, puede ser procesadas, fraccionadas o combinadas adicionalmente y utilizadas para la separación adicional en una variedad de técnicas de separación, incluyendo técnicas electroforéticas tales como, por ejemplo, electroforesis en zona, enfoque isoelectrico o isotacoforesis.

10 Al igual que el protocolo DFE, el protocolo DSE permite que las partículas o proteínas se separen o migren electroforéticamente sin la influencia de las proteínas que fueron aisladas durante la etapa de separación por DSE descrita más arriba. Este protocolo por tanto reduce la complejidad de la muestra y puede desenmascarar proteínas de baja abundancia que históricamente estarían impedidas de ser visualizadas con base en la existencia de proteínas de abundancia alta. Por lo tanto, un análisis de la muestra utilizando un análisis 1D- o 2D-PAGE será mejorado y tendrá mejor resolución o visualización de las proteínas de abundancia baja. En resumen, las técnicas anteriores permiten una resolución mejorada a través del desenmascaramiento de proteínas de baja abundancia, especialmente para LC-MS/MS potenciada así como para análisis por electroforesis en gel 1D o 2D corriente abajo.

15 Es fácilmente evidente de lo anterior, que los métodos de la presente invención, y particularmente los diversos medios empleados para alcanzar cualquier perfil de pH deseado dentro de la cámara de separación de un aparato de FFE pueden ser combinados libremente a la vista de la enorme flexibilidad de la tecnología de electroforesis de flujo libre. Por ejemplo, es posible crear un perfil de función de pH, en el que el perfil de función de pH comprende una meseta de separación por pH flanqueada en el lado anódico por un gradiente de pH y en el lado catódico por una meseta de pH, o viceversa (tales protocolos se citarán como protocolos combinados DFE/DSE).

20 Además, los diversos protocolos tales como DFE o DSE puede ser combinados secuencialmente en varias etapas de separación por FFE. Por ejemplo, las separaciones por FFE pueden ser ejecutadas utilizando el protocolo DFE, y las fracciones recuperadas de las mismas pueden ser sometidas adicionalmente a otra separación por FFE utilizando el mismo o un protocolo diferente (esto es, los mismos o diferentes sistemas reguladores, funciones de pH, mesetas de pH y similares). Así, las siguientes combinaciones de protocolos subsecuentes también están contempladas específicamente aquí: DSE/DSE, DFE/DSE, DSE/DFE, DFE/DFE o cualquiera de los protocolos o combinaciones de protocolos anteriores combinados con aún otro protocolo FFE descrito aquí o en la técnica anterior.

Modo de separación paralelo

30 En una realización adicional de la presente invención, se contemplan métodos y protocolos para separar simultáneamente uno o más analitos que van a ser separados a partir de una composición de analitos a partir de dos o más muestras por electroforesis en flujo libre que comprenden:

35 formar un perfil de función de pH entre un ánodo individual y un cátodo individual con una cámara de electroforesis de flujo libre (FFE), en donde el perfil de función de pH entre el ánodo y el cátodo de la cámara de FFE comprende N zonas de separación y N-1 medios de estabilización interelectrodos que separan cada zona de separación de cada zona de separación adyacente;

40 en donde cada zona de separación comprende una meseta de separación por pH que tiene un pH que corresponde esencialmente al punto isoelectrico (pI) de cada analito que va a ser separado y que tiene un rango de pH limitado por un límite de pH superior y un límite de pH inferior, y que comprende adicionalmente una función de pH adyacente al lado anódico de la meseta de separación por pH que tiene un pH promedio inferior al pH de la meseta de separación por pH y/o una conductividad eléctrica más alta que la meseta de separación por pH, y una función de pH adyacente al lado catódico de la meseta de separación por pH que tiene un pH promedio mayor que el pH de la primera meseta de separación por pH y/o una conductividad eléctrica superior a la de la meseta de separación por pH; en donde la meseta de separación por pH y los perfiles de función de pH entre el cátodo y el ánodo están formados por sistemas reguladores respectivos;

45 introducir individualmente cada muestra que comprende un analito que va a ser separado de una composición de analitos en una zona de separación de la cámara de FFE, en donde la muestra puede ser introducida en la meseta de separación por pH, en una zona en el lado anódico o en una zona en el lado catódico de dicha meseta de separación por pH dentro de dicha zona de separación, y en donde cada zona de separación comprende una meseta de separación por pH adecuada para separar el analito que va a ser separado de la composición de analitos en dicha zona de separación; y

50 eluir los analitos de la cámara de FFE, y opcionalmente recuperar todo o una porción de los analitos en una o una pluralidad de fracciones.

Opcionalmente, el método comprende adicionalmente identificar el pI de un analito que va a ser separado de una composición de analitos antes de la separación electroforética en caso de que el pI de dicho analito no sea conocido.

En un ejemplo de esta realización, dos zonas de separación de un protocolo de DFE o DSE paralelos se forman comprendiendo cada uno una meseta de separación por pH, una función de pH anódica y catódica adyacente a dicha meseta de separación por pH. Es fácilmente evidente que el uso de los términos anódico y catódico se refiere a la posición relativa de la zona función o meseta correspondientemente denominada entre una zona dada, función o meseta y el ánodo y cátodo, respectivamente. Por ejemplo, un orden típico de medios introducidos en una cámara de FFE (desde al ánodo al cátodo de un aparato FFE) será un medio de estabilización anódico, opcionalmente un medio de enfoque, un medio que forma una primera función o gradiente de pH, un medio que forma una primera meseta de separación por pH, un medio que forma una segunda función o gradiente de pH, opcionalmente un medio que forma un medio de enfoque, un medio de estabilización catódico interelectrodos seguido por un medio de estabilización anódico interelectrodos, opcionalmente un medio de enfoque, un medio que forma la tercera función o gradiente de pH, un medio que forma la segunda meseta de separación por pH, un medio que forma una cuarta función o gradiente de pH, opcionalmente un medio de enfoque y un medio de estabilización catódico. Este orden puede ser extendido para protocolos con más de 2 zonas de separación. En algunas realizaciones de la presente invención, a saber para protocolos de DFE, el medio de estabilización interelectrodos puede actuar como un medio de enfoque y por lo tanto la función de pH entre una meseta de separación por pH y dicho medio de estabilización interelectrodos puede ser retirada como se muestra en la Figura 3. Las zonas de separación de un método de separación por FFE en paralelo son separadas por un medio de estabilización interelectrodos que tiene una conductividad más alta en comparación con las funciones de pH o mesetas de pH adyacentes. El método de separación por FFE en paralelo es adecuado así para separar simultáneamente analitos de dos o más muestras. Cada muestra es introducida preferiblemente en la meseta de separación por pH formada dentro de una zona de separación dada. Opcionalmente, sin embargo, una muestra puede ser introducida también en la función de pH anódica o catódica de dicha zona de separación.

N es el número de zonas de separación dentro de una cámara de FFE y será un entero de 2 o mayor, y está limitado solo esencialmente por el diseño del aparato de FFE, particularmente por el número de entradas de medios distinguibles. El número de separaciones paralelas típicamente estará por lo tanto entre 2 y 5, pero al menos en principio puede ser incluso mayor de manera que en ciertas realizaciones pueden llevarse a cabo incluso 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 separaciones en paralelo simultáneamente entre un cátodo y ánodo individual en el aparato de FFE. En otras palabras, N es típicamente un entero entre 2 y 9, preferiblemente entre 2 y 7 y lo más preferiblemente entre 2 y 5.

Las zonas de separación utilizan la metodología de separación bien por DFE o DSE o una combinación de las mismas. Los mismos medios tal como se describió más arriba puede ser utilizados para los métodos de separación en paralelo de acuerdo con la presente invención. Así, será evidente para los experimentados en el arte que las diversas zonas de separación pueden incorporar funciones de pH para 1. DFE y DFE, 2. DFE y DSE, 3. DSE y DFE y 4. DSE y DSE. También son posibles y se contemplan aquí combinaciones adicionales tales como una primera zona de separación que comprende una función de pH (DFE) en un lado de la primera meseta de separación por pH y un gradiente de pH (DSE) sobre el otro lado de la primera meseta de separación por pH (o viceversa), y la segunda zona de separación comprende una función de pH DFE en un lado de la segunda meseta de separación por pH y un gradiente de pH de DSE en el otro lado de la segunda meseta de separación por pH (o viceversa), y así sucesivamente.

Además, dependiendo del número de entradas de medios provistas en el aparato de FFE empleado para esta realización de la presente invención, será posible incrementar el número de zonas de separación distinguibles dentro de la cámara de separación hasta 3, 4, 5 o incluso más. Como se explicó más arriba, para zonas de separación tipo DSE, se requieren típicamente 3 entradas de medios. En otras palabras, el número de entradas de medios para proveer dos zonas de separación de DSE distinguible será de 10. Cada zona de separación comprende 3 entradas. Se utilizan dos entradas para el medio de estabilización interelectrodos (el cual comprende un medio de estabilización interelectrodos anódico y uno catódico), y una entrada a cada lado se utiliza para formar un medio de estabilización anódico entre la primera zona de separación y el ánodo, y un medio de estabilización catódico entre la segunda zona de separación y el cátodo, respectivamente. Aplicando los mismos principios, al proveer 3 zonas de separación por DSE distinguibles, se requerirá un aparato de FFE que tenga en total al menos 15 entradas para todos los medios, incluyendo medios de separación, medios interelectrodos y el medio de estabilización.

Como se explicó más arriba, el número de zonas de separación por DFE distinguibles por número dado de entradas de medio puede ser ligeramente superior puesto que el medio de estabilización interelectrodos puede al mismo tiempo funcionar como medio de enfoque en virtud de su alta conductividad eléctrica. Por ejemplo, un aparato de FFE que tiene 15 entradas de medios distinguibles puede comprender 5 mesetas de separación por pH separadas por 4 medios de estabilización interelectrodos (2 entradas de medio para cada una) y un medio de estabilización anódico y uno catódico.

Con estas explicaciones, otras posibilidades serán evidentes para los experimentados en la técnica. En cualquier caso, el modo de separación en paralelo tal como se explica aquí no evita el uso de dos o más electrodos, sino que más bien describe realizaciones en las que se disponen múltiples zonas de separación o fraccionamiento y se establecen entre un par de electrodos.

Una realización de ejemplo del modo de separación en paralelo se ilustra en la Figura 7, en la que se disponen dos zonas de separación distinguibles en una cámara de separación de un aparato de FFE (la Figura 7 muestra el perfil

de pH y conductividad de los medios durante la electroforesis). Como es evidente a partir de la Figura 7 los reguladores empleados para esta realización son capaces de formar un gradiente de pH en las zonas adyacentes a cada meseta de separación. En otras palabras, la Figura 7 ilustra una separación en modo en paralelo que tiene dos zonas de separación tipo DSE.

- 5 Será evidente que el modo en paralelo puede ser útil particularmente en una variedad de situaciones, incluyendo el análisis y preparación de la muestra de un gran número de muestras de especímenes, por ejemplo, en las clínicas. Alternativamente, la misma o diferentes muestras pueden ser liberadas de diferentes analitos de alta abundancia. Para este último método, el pH de las dos o más mesetas de separación se seleccionará típicamente de tal manera que sea diferente de las otras mesetas de separación dentro del aparato de FFE.

10 Kits y composiciones de medios electroforéticos

Será evidente para los experimentados en la técnica que los medios de separación contemplados aquí pueden ser seleccionados, preparados y utilizados solos, o alternativamente, junto con otros medios de estabilización, medios de enfoque y medios de separación, respectivamente.

- 15 De acuerdo con lo anterior, la presente divulgación también incluye un kit para llevar a cabo los métodos de FFE tales como DFE o DSE de acuerdo con realizaciones de la presente invención, en las que el kit comprende los medios de separación electroforética para llevar a cabo el método deseado. Se entenderá que normalmente se requieren al menos tres diferentes medios de separación para las aplicaciones de DFE y DSE. En este contexto, hay que anotar que los dos medios adyacentes a la meseta de separación por pH también pueden tener propiedades como medios de estabilización y/o enfoque.

- 20 Además de tres o más medios de separación, un kit para llevar a cabo un método de separación por FFE de la presente invención puede comprender adicionalmente al menos un medio de estabilización como se definió aquí más arriba. El medio de estabilización puede ser un medio de estabilización catódico o un medio de estabilización anódico. Generalmente se localizan entre el ánodo/cátodo y el medio de separación, respectivamente.

- 25 En una realización de la presente invención, el medio de estabilización está localizado entre dos perfiles de función de pH. Los medios de estabilización están caracterizados generalmente por tener una conductividad eléctrica que es mayor a la conductividad en el medio de separación. La conductividad puede ser incrementada por un factor de 2, preferiblemente un factor de 3 y lo más preferiblemente un factor mayor a 3. Las diferencias en conductividad entre los medios de separación de los medios de estabilización se logran en una variedad de formas, por ejemplo agregando iones eléctricamente conductivos adicionales a los medios de estabilización o incrementando la concentración de los compuestos reguladores en los medios de estabilización, como se describe en mayor detalle aquí más arriba.

- 30 Aunque la conductividad eléctrica de los medios de estabilización será mayor que la conductividad del medio de separación adyacente, el pH de los medios de estabilización será mayor, casi o igual o incluso inferior a el pH del medio de separación que se adiciona, dependiendo de las circunstancias del problema de separación. Los compuestos reguladores de los medios de estabilización pueden ser idénticos a los compuestos reguladores de los medios de separación o pueden ser diferentes.

- 35 Puesto que las estabilizaciones anódica y catódica son particularmente útiles para aplicaciones electroforéticas exitosas, particularmente en FFE, el kit, además de los medios de separación, comprenderá preferiblemente un medio de estabilización anódico y uno catódico como se definen aquí.

- 40 En aún otros casos, el kit incluirá todos los medios requeridos para una separación electroforética dada, esto es, un medio de estabilización anódico y uno catódico así como un medio de separación (el cual consiste de varias subfracciones como se explicó más arriba). En tales casos, los medios de separación y medios de estabilización desde luego serán seleccionados de tal manera que sean útiles para el protocolo previsto.

- 45 El kit puede comprender los diversos medios como una o más soluciones acuosas que están listas para ser utilizadas (esto es, todos los componentes están presentes en la concentración deseada para el problema de separación electroforética), o puede contener uno o varios de los medios en la forma de una solución concentrada que se debe diluir con una cantidad predeterminada de solvente antes de su uso. Alternativamente, el kit puede comprender uno o varios medios en forma seca o forma liofilizada que comprenden los diversos ingredientes de un medio en varios, pero preferiblemente en un contenedor el cual es luego reconstituido con una cantidad predeterminada de solvente antes de su uso en un proceso de separación electroforética.

- 50 Se entenderá que todos los medios de separación preferidos descritos aquí, así como los medios de estabilización catódica y/o anódica preferidos y medios de enfoque serán incluidos en los kits descritos aquí.

Se prefiere generalmente que cada medio (medio de separación, medio de estabilización catódica, medio de estabilización anódica, medio de contraflujo) estarán presentes en un contenedor separado, aunque será evidente para los experimentados en la técnica que pueden ser posibles y útiles otras combinaciones y opciones de empaque

en ciertas situaciones. Por ejemplo, se ha mencionado más arriba que los medios de separación para aplicaciones de IEF pueden consistir de un número distinguible de "subfracciones" que tienen diferentes concentraciones de los ingredientes (y por lo tanto un pH diferente) con el fin de crear un gradiente de pH preformado dentro del aparato de electroforesis. En una realización, el pH de cada medio de separación utilizado para formar el gradiente es diferente.

5 El número de subfracciones empleadas en aplicaciones de IEF dependerá del problema de separación, el barrido de pH deseado alcanzado con el medio de separación y el aparato de electroforesis usado para la separación. En aplicaciones de FFE, el aparato comprenderá típicamente varias entradas de medios (por ejemplo, N = 7, 8 o 9 entradas), de tal manera que los submedios que crean el espacio de separación dentro del aparato serán introducidos en al menos uno hasta un máximo de N-2 entradas (al menos una entrada a cada uno lado se reserva usualmente para medio de estabilización, si está presente). El número de medios de separación, el cual puede ser insertado en un aparato adecuado para FFE, está típicamente entonces entre 2 y 15, o entre 3 y 12 o entre 4 y 9.

15 Los medios de separación en el kit en algunos casos formarán una meseta de separación por pH y dos funciones de pH que flanquean dicha meseta de separación por pH. En otros casos, los medios de separación formarán una meseta de separación por pH y dos gradientes de pH que flanquean dicha meseta de separación por pH. En aún otros casos, son posibles combinaciones de estos dos métodos tales como tener una meseta de separación por pH y una función de pH (por ejemplo, una etapa de pH) sobre el lado anódico de la meseta y un gradiente de pH sobre el lado catódico de la meseta o viceversa. En otros casos, los medios de separación forman múltiples perfiles de función de pH, esto es, n mesetas de separación por pH flanqueados en cada lado por una función de pH o gradiente de pH, respectivamente, y en donde los diversos perfiles de función de pH están separados mediante un medio o zona de estabilización interelectrodos (la cual está en sí misma compuesta de una porción catódica y una porción anódica como se explica en más detalle aquí más arriba).

Los medios de separación en el kit estarán formados preferiblemente por sistemas reguladores binarios que comprenden solamente un ácido regulador y una base reguladora. Se contempla que todos los medios de separación descritos aquí, sean preferidos o no, pueden estar incluidos en los kits como se describió aquí.

25 La presente invención y sus ventajas se ilustran aquí en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Separación de plasma humano de acuerdo con un protocolo de DFE

30 El ejemplo demuestra la separación de una proteína de alta abundancia (albúmina de suero humano, HSA) a partir de una muestra de plasma humano utilizando el método de electroforesis FFE libre de gel, libre de matriz de soporte o libre de portador usando un protocolo DFE y un aparato adecuado para llevar a cabo dicho método. El plasma humano natural es diluido 1:10 con el medio de entrada de medio 4 de un aparato mostrado en la Figura 1A e inyectado o introducido en la entrada 4 de muestra en el área de separación a una tasa de carga de muestra de 5 ml/h.

Se introdujeron los siguientes medios en el aparato:

Entradas de medio 2: ácido sulfúrico 100 mM + glicerol al 10% (pH 1,30)

35 Entrada de medio 3: ácido 2-amino-butírico 200 mM, ácido glucónico 100 mM, ácido piridinetanosulfónico 50 mM (PESS), glicilglicina 30 mM, glicerol al 10% (pH 3,39)

Entrada de medio 4: MES 30 mM, glicilglicina 100 mM y glicerol al 10% (pH 4.92)

Entrada de medio 5: MOPSO 200 mM, MES 20 Mn, β-alanina 100 mM, BISTRIS 50 mM y glicerol al 10%, (pH 6.06)

Entradas de medio 6 y 7: NaOH 100 Mn+ glicerol al 10%, (pH 11,80)

40 Opcionalmente, puede inyectarse una composición de glicerol al 10% en agua destilada o introducirse en contraflujo a las entradas a través de una pluralidad de entradas de contraflujo, especialmente durante un modo preparativo continuo de operación. Esta etapa opcional puede potenciar el flujo de muestra y los medios de separación a sus salidas previstas, especialmente cuando se requiere una salida exacta o una exactitud de manejo de muestra exacta en la salida.

45 La meseta de separación por pH se forma por el medio de separación introducida a través de la entrada de medio 4 de un aparato de acuerdo con la Figura 1A. La muestra puede ser introducida a través de una entrada de muestra dedicada en la meseta de separación por pH formada. Opcionalmente, puede ser introducida en la función de pH anódica o catódica adyacente a la zona de separación definida por los medios de separación introducidos a través de las entradas de medio 3 a 5. Las funciones de pH adyacentes a la meseta de separación por pH se forman por medios de separación introducidos a través de entradas de medio 3 y 5. Los medios de enfoque y/o estabilización pueden ser introducidos a través de medio 1, 2, 6 y 7. Aunque la composición reguladora y por lo tanto la conductividad y el perfil de pH entre zona 1 y 2 y 6 y 7 no varían en este experimento, pueden variar, por ejemplo, si se introduce un medio de enfoque en la zona 6 y se introduce un medio de estabilización en la zona 7.

La Figura 2 muestra el resultado efectivo del proceso de enfoque isoeléctrico DFE, en el que tres reservas o fracciones de pH han sido acumuladas midiendo o analizando las muestras eluidas recolectadas en las salidas de la cámara de fraccionamiento. El pH de cada salida de muestra recolectada ha sido medido, y se muestra en la Figura 2, así como las concentraciones medidas de los marcadores de pI que demuestran la prueba de principio del impacto de los "muros" de conductividad.

5

La separación mostrada en la Figura 2 fue alcanzada mediante el uso de propiedades de alta conductividad de los medios adyacentes a la zona de eliminación y mediante la provisión de un perfil de pH como se ilustra en las Figuras 1B y 2.

La Figura 3 muestra un análisis de SDS-PAGE de la muestra fraccionada de acuerdo con el protocolo de DFE descrito más arriba. Se muestran los números de fracción y los marcadores MW. Puede verse fácilmente que la albúmina (alrededor de 66 kDa) fue eliminada exitosamente de las fracciones correspondientes a la zona de eliminación (la meseta de separación por pH, reserva de albúmina citada en la Figura 2). Adicionalmente, dentro de las fracciones en gel que incluyen el rango de pH de la albúmina, se puede observar la existencia de una parte menor de proteínas de peso molecular diferente al de la albúmina, que no pudieron salir de la zona de eliminación en total debido a su valor muy bajo de movilidad electroforética dentro de la zona de eliminación.

10
15

Puesto que el pI de la meseta de separación por pH fue seleccionado para corresponder a la albúmina, la albúmina se mantuvo en la reserva de eliminación mientras que las proteínas de un pI por fuera del pH de la meseta de separación por pH fueron recolectadas en la interfase entre la zona ácida y alcalina y la meseta de separación por pH, respectivamente (fracciones alrededor de 40 y alrededor de 60).

El método permite la separación esencial de cualquier proteína que tenga un pI que le permita permanecer en la meseta de separación por pH entre el pH superior e inferior de la meseta. Una vez que las tres fracciones (fracción de la zona de eliminación por pH o reserva de eliminación, reserva ácida y reserva alcalina), han sido recolectadas, el investigador puede llevar a cabo operaciones preparativas o analíticas posteriores a todas, una porción de o una combinación de las fracciones en una variedad de maneras que comprenden pero no se limitan a: electroforesis tales como otra separación FFE, o electroforesis en gel natural, 1D- o 2D-PAGE, técnicas cromatográficas, MS o MS acoplada, RMN, dicroísmo circular, espectroscopía IR, espectroscopía UV, o ensayos bioquímicos tales como ensayos de actividad, o cualquier combinación de los mismos.

20
25

Ejemplo 2: Separación de Plasma Humano de acuerdo con un Protocolo DSE

El ejemplo demuestra la separación de una proteína de alta abundancia (albúmina de suero humano, HSA) a partir de una muestra de plasma humano, utilizando un método de electroforesis FFE libre de gel, libre de matriz de soporte o libre de portador, utilizando un protocolo de DSE y un aparato adecuado para llevar a cabo dicho método. Se diluye plasma humano natural 1:10 con el medio de la entrada de medio 4 de un aparato mostrado en la figura 4 y se inyecta o introduce a través de la entrada de muestra 4 en el área de separación a una tasa de carga de muestra de 5 ml/h.

30

Se introdujeron los siguientes medios en el aparato:

35 Entrada de medio 1: ácido sulfúrico 100 mM; glicerol al 10%

Entrada de medio 2: ácido sulfúrico 100 mM; glicerol al 10%

Entrada de medio 3: regulador de separación 1 BD FFE al 25 % + glicerol al 10%

Entrada de medio 4: MES 30 mM; glicli 100 mM; regulador de separación 2 BD FFE al 14%; glicerol al 10%

Entrada de medio 5: regulador de separación 2 BD FFE al 25 % + glicerol al 10%, (pH 6.94)

40 Entrada de medio 6: NaOH 150 mM + etanolamina 50 mM, glicerol al 10%

Entrada de medio 7: NaOH 150 mM + etanolamina 50mM, glicerol al 10%

Opcionalmente, puede inyectarse o introducirse una composición de glicerol al 10% en agua destilada en contraflujo a las entradas a través de una pluralidad de entradas de contraflujo, especialmente durante un modo de operación preparativo continuo. Esta etapa opcional puede potenciar el flujo de muestra y los medios de separación hacia a sus salidas previstas, especialmente cuando se requiere una salida precisa para el manejo exacto de la muestra de salida.

45

La meseta de separación por pH es formada por el medio de separación e introducido a través de la entrada de medio 4 de un aparato de acuerdo con la Figura 4A. Las funciones de pH adyacentes a la meseta de separación por pH se forman por medios de separación introducidas a través de las entradas de medio 3 y 5. La muestra puede ser introducida a través de una entrada de muestra dedicada en la meseta de separación por pH formada. Opcionalmente, puede ser introducida en la función de pH anódica o catódica adyacente a la meseta de separación por pH (la zona

50

de separación) definida por medios de separación introducidos a través de las entradas de medio 3 a 5. Los medios de enfoque y/o estabilización pueden ser introducidos a través de entradas de medios 1, 2, 6 y 7. Aunque la composición reguladora y por lo tanto la conductividad y el perfil de pH entre la zona 1 y 2 y 6 y 7 no varían en este experimento, pueden variar, por ejemplo, si se introduce un medio de enfoque en la zona 6 y se introduce un medio de estabilización en la zona 7.

La separación mostrada en la Figura 5 fue lograda utilizando técnicas de enfoque isoelectricos generales con incremento específico de la capacidad reguladora en el rango de pH de eliminación deseado. El pH y el perfil de conductividad se muestra en la Figura 4B y el pH de las fracciones recolectadas, así como una distribución de los marcadores de pl (control) se ilustra en la Figura 6. Además como la Figura 6 también indica las posiciones aproximadas de las entradas de medios 1 a 7 con respecto a las fracciones recolectadas. Como puede verse en el ferograma mostrado en la Figura 5, los perfiles de pH lineales de pH 3.5 a pH 4.7 y pH 5 a 9 fueron logrados mediante la disposición y medios descritos en este ejemplo. La albúmina permaneció en la zona 4, mientras que la migración de especies cargadas que tenían un pl diferente al de la zona 4 migrarán hacia las zonas 3 y 5, dependiendo de su pl específico.

La Figura 6 muestra un análisis por SDS-PAGE de la muestra fraccionada de acuerdo con el protocolo DSE descrito más arriba. Se muestran también los números de fracción y los marcadores de MW. Es evidente que la albúmina fue eliminada exitosamente de las fracciones correspondientes a la zona de eliminación (entre aproximadamente fracciones de 39 a 50). Además, puede observarse una separación sustancial de las proteínas en la reserva alcalina aplicando el protocolo DSE descrito en este ejemplo.

Como se muestra en la Figura 6, las líneas de SDS-PAGE de las fracciones recolectadas demuestran cómo el aislamiento de la albúmina a ciertos pozos permite una discriminación de las proteínas de concentración más baja que caen por fuera del rango de pH correspondiente al pl de la albúmina de suero humano. Adicionalmente, dentro de las fracciones de gel que incluyen el rango de pH de la albúmina, se puede observar la existencia de una parte menor de proteínas de diferente peso molecular al de la albúmina, que no pueden salir de la zona de eliminación en total debido a su bajo valor de movilidad electroforética dentro de la zona de eliminación.

Una vez que todas las fracciones separadas han sido recolectadas, el investigador puede llevar a cabo operaciones preparativas adicionales a todas o a una fracción de las porciones, u opcionalmente puede llevar a cabo un análisis analítico de las muestras en una variedad de maneras que comprenden pero no se limitan a: electroforesis tales como otra separación de FFE, electroforesis en gel natural, 1D- o 2D-PAGE, técnicas cromatográficas, MS o MS acoplada, RMN, dicroísmo circular, espectroscopía IR, espectroscopía UV, o ensayos bioquímicos tales como ensayos de actividad, o cualquier combinación de los mismos.

Ejemplo 3: Separación por DFE en paralelo de analitos de dos muestras

El ejemplo demuestra la separación simultánea de proteína de alta abundancia (albúmina de suero humano, HSA) a partir de dos muestras de plasma humano utilizando el método de electroforesis de FFE de la presente invención utilizando un protocolo de DFE en paralelo modificado y un aparato adecuado para llevar a cabo dicho método. El protocolo empleó para este ejemplo empleado, partiendo desde el ánodo hasta el cátodo, los siguientes medios: un medio de estabilización anódico, una primera zona de separación que comprende una primera función de pH y una primera meseta de separación por pH, un medio de estabilización interelectrodos que actúa también como un medio de enfoque adyacente a las mesetas de separación por pH de las zonas de separación 1 y 2, una segunda zona de separación que comprende una meseta de separación por pH y una segunda función de pH y un medio de estabilización catódico.

La primera muestra de plasma humano natural fue diluida 1:10 con el medio del medio de entrada 2 e inyectado o introducido a través de la entrada de muestra posicionada cerca a la entrada de medios 2 en el área de separación a una rata de carga de muestra de 5 ml/h, mientras que la segunda muestra de plasma humano natural fue diluida 1:10 con el medio de la entrada de medio 6 y simultáneamente inyectada o introducida a través de la entrada de muestra posicionada cerca a la entrada de medio 6 en el área de separación a una rata de carga de muestra de 5 ml/h.

Se introdujeron los siguientes medios en el aparato:

Solución de ánodo: H₂SO₄ 100 mM

Entrada de medio 1: 2-aminobutilo 200 mM, ácido glucónico 100mM, ácido piridinaetanosulfónico 50 mM (PESS), glicli 30mM; glicerol al 10%

Entrada de medio 2: MES 30 mM, glicli 100 mM; glicerol al 10%

Entrada de medio 3: MOPSO 200 Mn, BISTRIS 50 mM, MES 20 mM, β-alanina 100 mM; glicerol al 10%

Entrada de medio 4: vacía

ES 2 651 352 T3

Entrada de medio 5: 2-aminobutilo 200 mM, ácido glucónico 100mM, PESS 50 mM, glicli 30mM; glicerol al 10%

Entrada de medio 6: MES 30 mM, glicli 100 mM; glicerol al 10%

Entrada de medio 7: MOPSO 200 mM, BISTRIS 50 mM, MES 20 mM, β -alanina 100 mM; glicerol al 10%

Solución de cátodo: NaOH 100 mM.

- 5 La zona de estabilización interelectrodos fue formada por los medios de las entradas de medios 3 y 5 en las que BISTRIS y β -alanina son las bases y ácido glucónico y PESS son los ácidos con una movilidad electroforética suficientemente baja para formar una zona de estabilización interelectrodos adecuada. Como puede verse en la Figura 8, el medio de estabilización interelectrodo del presente protocolo de DFE en paralelo modificado actúa también como un medio de enfoque para las mesetas de separación por pH de las zonas 1 y 2. Opcionalmente, las funciones de pH pueden colocarse entre el medio de estabilización interelectrodos y las mesetas de separación por pH. Para un protocolo de DSE en paralelo como se muestra en la Figura 7 son necesarios medios que forman gradientes de pH adecuados entre las mesetas de separación por pH y su medio de separación interelectrodos.

- 10 Opcionalmente, puede inyectarse o introducirse una composición de glicerol al 10% en agua destilada en contraflujo a las entradas a través de una pluralidad de entradas de contraflujo, especialmente durante un modo de operación preparativo continuo. Esta etapa opcional puede potenciar el flujo de muestra y los medios de separación a sus salidas previstas, especialmente cuando se requiere una salida exacta para el manejo preciso de la muestra de salida.

- 15 La separación mostrada en la Figura 8 fue lograda utilizando el protocolo de DFE en paralelo modificado. El pH de las fracciones recolectadas, así como una distribución de los marcadores pl (control) se ilustra en la Figura 8. La albúmina permaneció en la zona 2 y la zona 6 respectivamente mientras que la migración de especies cargadas que tenían un pl diferente al de la zona 2 o 6 migrarán hacia las zonas 1 y 3, o zonas 5 y 7 respectivamente, dependiendo de su pl específico.

- 20 Las Figuras 9 y 10 muestran los análisis por SDS-PAGE de la muestra fraccionada de acuerdo con el protocolo de DFE modificado descrito más arriba. También se muestran los números de fracción y los marcadores MW. Puesto que el pl de las mesetas de separación por pH fue escogido para corresponder con la albúmina, la albúmina se mantuvo en una reserva de eliminación (la meseta de separación por pH). Es evidente que la albúmina fue eliminada exitosamente de las proteínas de un pl por fuera del pH de la meseta de separación por pH, las cuales fueron recolectadas en reservas ácidas (fracciones 13 a 16 (zona de separación 1) y las fracciones 68 a 71 (zona de separación 2)) y reservas alcalinas (fracciones 30 a 33) (zona de separación1) y fracciones 84 a 87 (zona de separación 2)) en la interfaz entre las mesetas de separación por pH y la función de pH adyacente o el medio de estabilización interelectrodos, que también actuó como medio de enfoque en esta configuración.

- 25 Como lo evidencian los geles de SDS-PAGE mostrados en las Figuras 9 y 10, dentro de las fracciones en gel que incluyen el rango de pH de la albúmina, puede observarse la existencia de una parte menor de proteínas de diferente peso molecular al de la albúmina, que no pueden salir de la zona de eliminación en total debido a su valor muy bajo de movilidad electroforética dentro de la zona de eliminación.

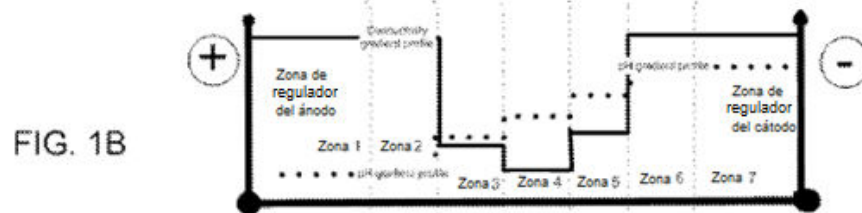
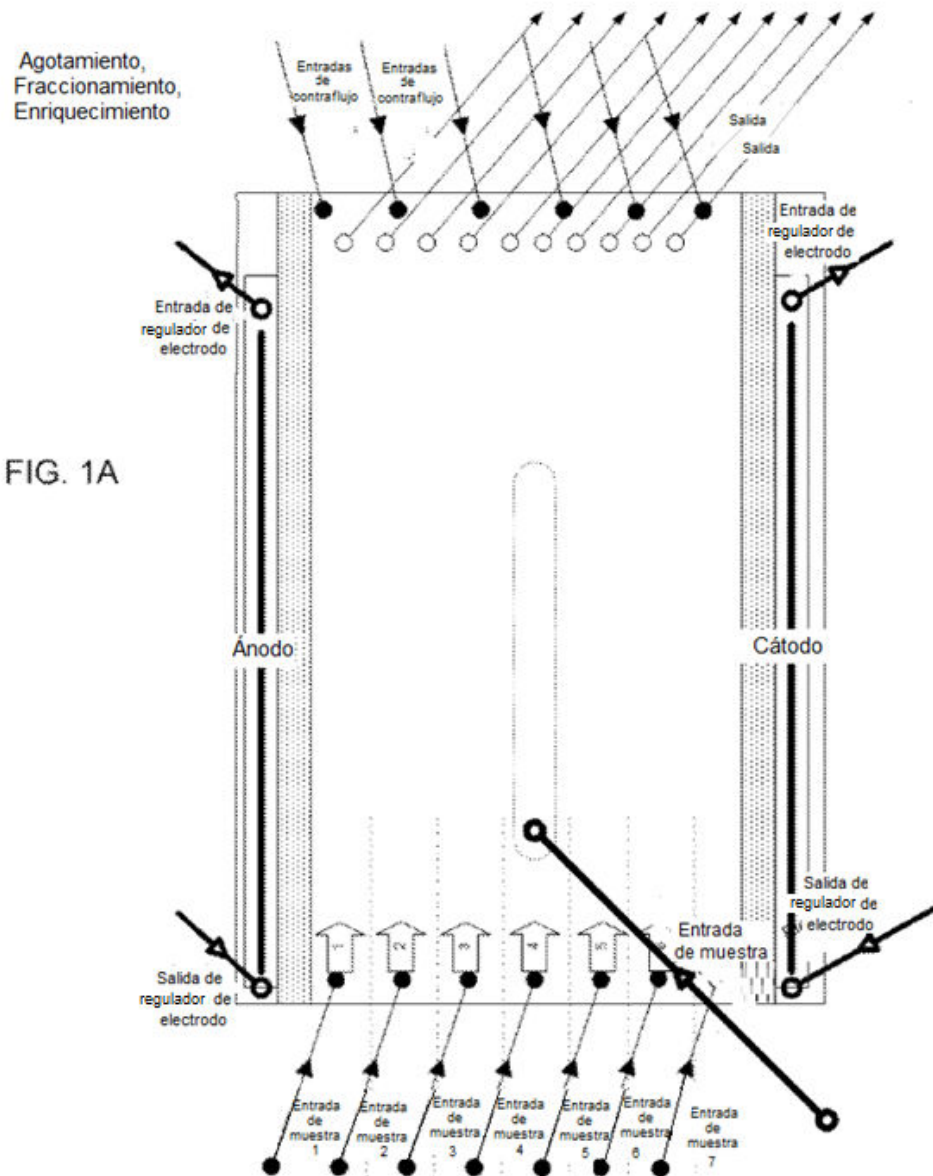
- 30 Una vez que las fracciones han sido recolectadas (fracciones de la meseta de separación por pH (zona de eliminación), fracciones de reserva ácida, y fracciones de reserva alcalina), el investigador puede llevar a cabo operaciones preparativas o analíticas adicionales para todas, una porción de o una combinación de las fracciones en variedad de maneras que comprenden pero no se limitan a: electroforesis tales como otra separación por FFE, o electroforesis en gel natural, 1D- o 2D-PAGE, técnicas cromatográficas, MS o MS acoplada, RMN, dicroísmo circular, espectroscopía IR, espectroscopía UV, o ensayos bioquímicos tales como ensayos de actividad, o cualquier combinación de los mismos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para separar un analito que va a ser separado de una composición de analitos por enfoque isoeléctrico de flujo libre que comprende:
- 5 formar con una cámara de electroforesis de flujo libre (FFE) un perfil de función de pH entre un ánodo y un cátodo, que comprende
- una meseta de separación por pH cuyo pH promedio corresponde esencialmente al punto isoeléctrico (pI) de un analito que va a ser separado y que tiene un rango de pH delimitado por un límite de pH superior y un límite de pH inferior;
- 10 una función de pH entre el ánodo y la meseta de separación por pH que tiene un promedio inferior al pH de la meseta de separación por pH o una conductividad eléctrica mayor que la meseta de separación por pH, o tanto un pH promedio inferior como una conductividad eléctrica superior que la meseta de separación por pH; y
- 15 una función de pH entre el cátodo y la meseta de separación por pH que tiene un pH promedio mayor que el pH de la meseta de separación por pH o una conductividad eléctrica superior a la de la meseta de separación por pH, o tanto un pH promedio superior y una mayor conductividad eléctrica superior que la meseta de separación por pH;
- 20 en el que la meseta de separación por pH y los perfiles de función de pH entre el cátodo y el ánodo son formados por sistemas reguladores respectivos;
- introducir una muestra que comprende un analito que tiene un pI definido para ser separado de una muestra de analitos en la cámara de FFE en el que la muestra puede ser introducida en la meseta de separación por pH, en una zona en el lado anódico o en una zona en el lado catódico de dicha meseta de separación por pH; y
- 25 eluir los analitos de la cámara de FFE, y opcionalmente recuperar todos o una porción de los analitos en una o una pluralidad de fracciones;
- 30 opcionalmente en el que el método comprende adicionalmente identificar el pI de un analito que va a ser separado de una composición de analitos antes de la separación electroforética en el caso de que el pI de dicho analito no sea conocido.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método produce al menos una porción de muestra no eliminada y una porción de muestra que comprende el analito separado sobre la meseta de separación por pH de la porción de muestra no eliminada; y en el que dicho método comprende subsecuentemente analizar una o más fracciones eluidas de la cámara FFE.
- 35 3. El método de la reivindicación 2, en el que la fracción que va a ser analizada contiene al menos un analito de al menos una porción de muestra no eliminada.
- 40 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el perfil de función de pH comprende
- un gradiente de pH adyacente al lado anódico de la meseta de separación por pH que barre al menos 0.5 unidades de pH; o
- 45 un gradiente de pH adyacente al lado catódico de la meseta de separación por pH que barre al menos 0.5 unidades de pH; o
- 50 un gradiente de pH adyacente al lado anódico de la meseta de separación por pH que barre al menos 0.5 unidades de pH y un gradiente de pH adyacente al lado catódico de la meseta de separación por pH que barre al menos 0.5 unidades de pH.
- 55 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el perfil de función de pH comprende una meseta de separación por pH, flanqueada en el lado anódico por un gradiente de pH y en el lado catódico por una meseta de pH; o
- en el que el perfil de la función de pH comprende una meseta de separación por pH, flanqueada en el lado anódico por una meseta de pH y en el lado catódico por un gradiente de pH.
- 60 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el perfil de función de pH comprende al menos un medio de enfoque y en el que la conductividad de dicho medio de enfoque es al menos aproximadamente 2 veces más alta, preferiblemente aproximadamente 3 veces más alta y más preferiblemente al menos 5 veces más alta que la conductividad de un medio que forma una función de pH o una meseta de separación por pH.

7. El método de la reivindicación 6, en el que al menos un medio de enfoque está dispuesto adyacente a un medio que forma una función de pH, en el que la función de pH es adyacente a una meseta de separación por pH.
- 5 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que el análisis subsecuente incluye una técnica seleccionada del grupo de electroforesis de flujo libre, electroforesis en gel, 1D- y 2D-PAGE, MS, MALDI, ESI, SELDI, LC-MS(/MS), MALDI-TOF-MS(/MS), quimioluminiscencia, HPLC, secuenciación Edman, espectroscopía RMN, difracción de rayos x, secuenciación de ácidos nucleicos, electrodeposición, secuenciación de aminoácidos, citometría de flujo, dicroísmo circular o cualquier combinación de los mismos.
- 10 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que uno o más analitos eluidos de la cámara de FFE después de la separación por enfoque isoeléctrico, menos el analito eluido de la meseta de separación por pH son recuperados y al menos sometidos parcialmente a electroforesis en gel, espectrometría de masas o una combinación de los mismos.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos un analito de la porción de muestra no eliminado es un biomarcador.
- 15 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el analito que va a ser separado es una proteína seleccionada del grupo consistente de albúmina, alfa-1-antitripsina, transferrina, haptoglobulina, caseína, miosina y actina, preferiblemente en el que la proteína es albúmina.
- 20 12. El método de la reivindicación 11, en el que la separación por enfoque isoeléctrico de flujo libre se lleva a cabo bajo condiciones naturales y en el que el pH de la meseta de separación por pH varía entre pH 4.7 y pH 5.0, más preferiblemente entre pH 4.8 y pH 4.9; o
- en el que la separación por enfoque isoeléctrico de flujo libre se lleva a cabo bajo condiciones de desnaturalización y en el que el pH de la meseta de separación por pH varía entre pH 6.2 y pH 6.5, más preferiblemente entre pH 6.3 y pH 6.4; o
- 25 en el que la separación por enfoque isoeléctrico de flujo libre se lleva a cabo bajo condiciones de desnaturalización y en el que el analito de interés es reducido y alquilado y en el que el pH de la meseta de separación por pH varía entre pH 5.9 y pH 6.2, más preferiblemente entre pH 5.9 y pH 6.1.
13. El método de la reivindicación 1, en el que el método permite la separación simultánea de uno o más analitos para ser separados de una composición de analitos de dos o más muestras por enfoque isoeléctrico de flujo libre que comprende:
- 30 formar un perfil de función de pH entre un ánodo individual y un cátodo individual dentro de una cámara de electroforesis de flujo libre (FFE), en el que el perfil de función de pH entre el ánodo y el cátodo de la cámara de FFE comprende N zonas de separación y N-1 medios de estabilización interelectrodos que separan cada zona de separación de cada zona de separación adyacente;
- 35 en el que cada zona de separación comprende un perfil de función de pH como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o 12;
- y en el que adicionalmente cada zona de separación comprende una meseta de separación por pH adecuada para separar el analito que va a ser separado de la composición de analitos en dicha zona de separación;
- introducir individualmente cada muestra que comprende un analito que va a ser separado de una composición de analitos en una zona de separación de la cámara de FFE,
- 40 y
- eluir los analitos de la cámara de FFE;
- comprendiendo de forma opcional adicionalmente la recuperación de todos o una porción de los analitos en una o una pluralidad de fracciones.
14. El método de la reivindicación 13, en el que N es un entero entre 2 y 9.
- 45 15. El método de reivindicación 13 o reivindicación 14, en el que
- el medio de estabilización interelectrodos anódico comprende un ácido monoprótico; o
- el medio de estabilización interelectrodos catódico comprende una base monobásica; o

el medio de estabilización interelectrodos anódico comprende un ácido monoprótico y el medio de estabilización interelectrodos catódico comprende una base monobásica.



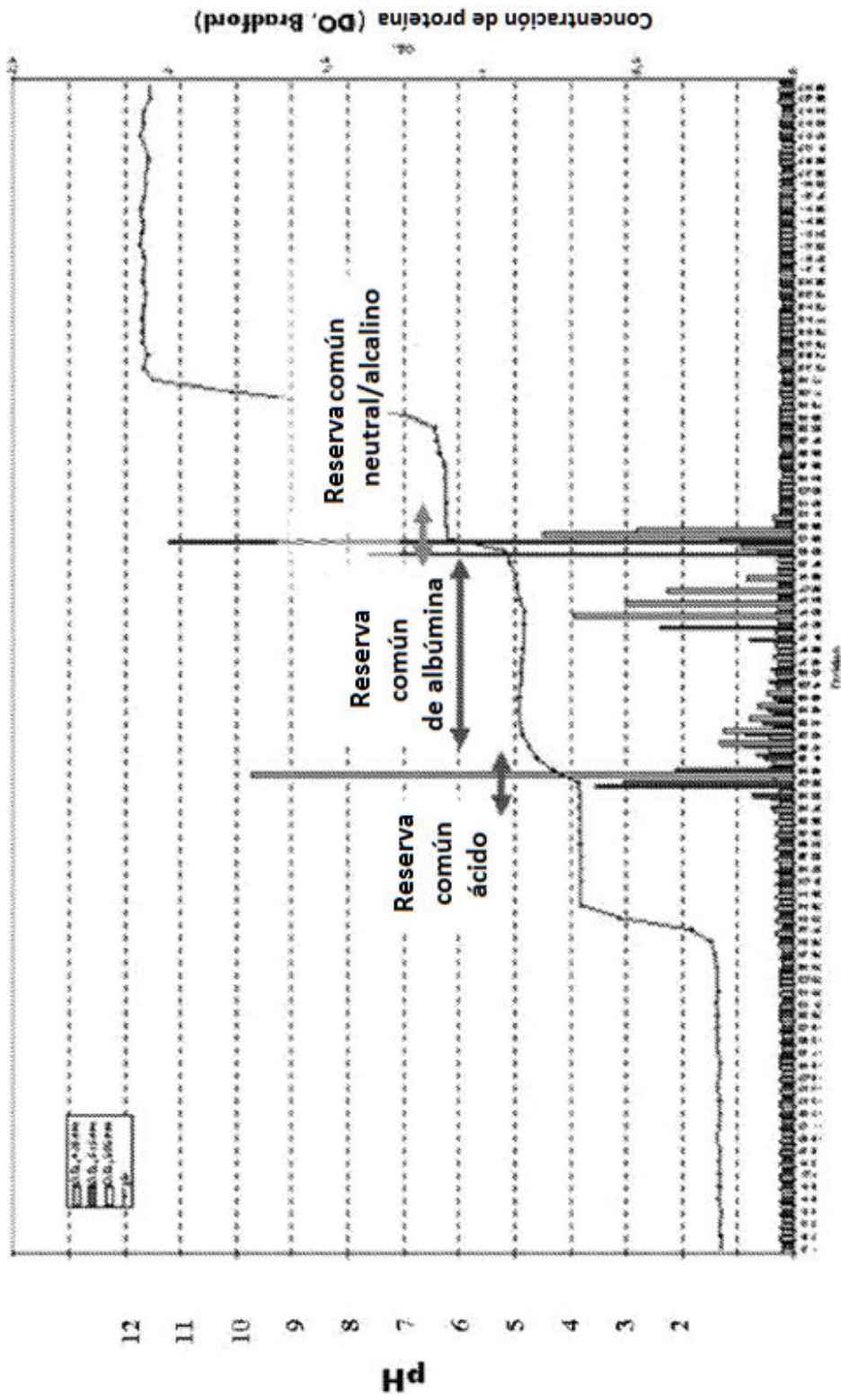


FIG. 2

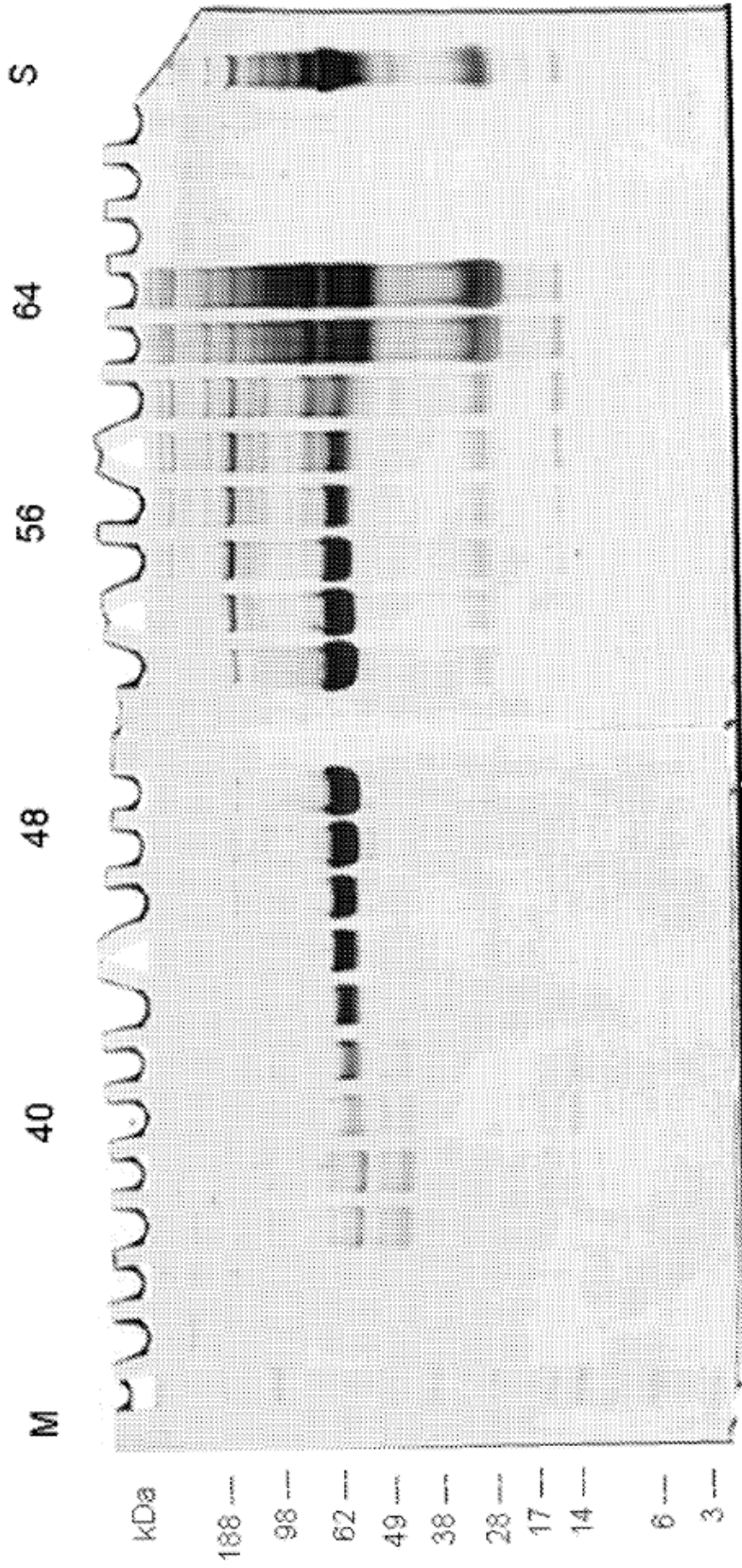
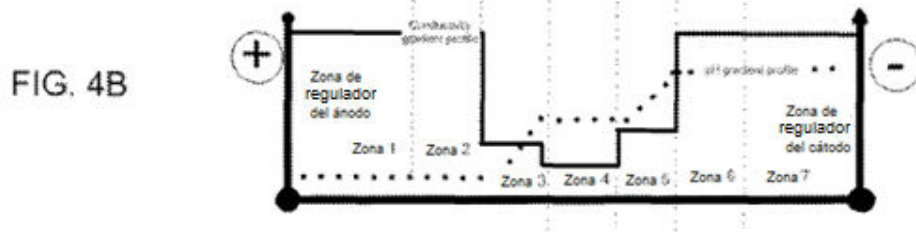
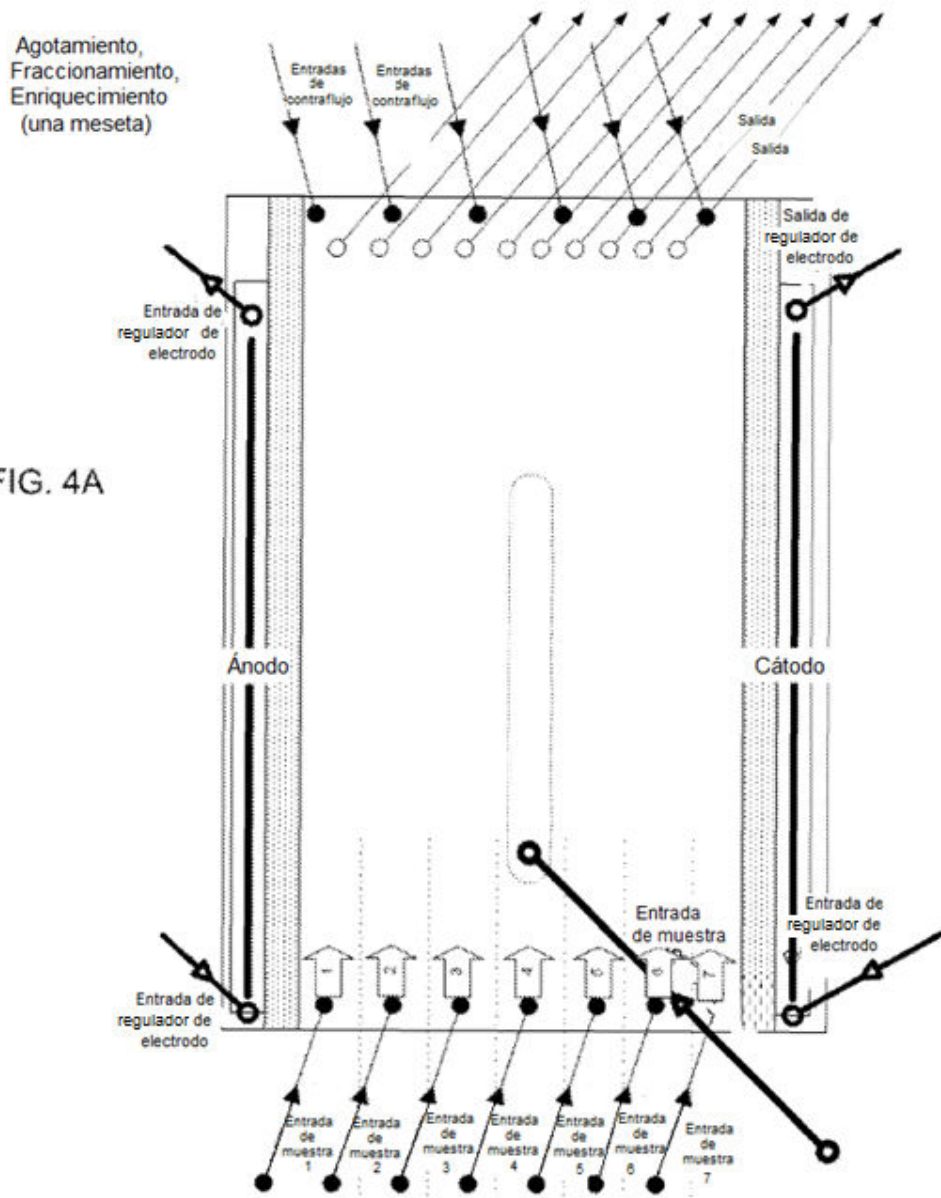


FIG. 3



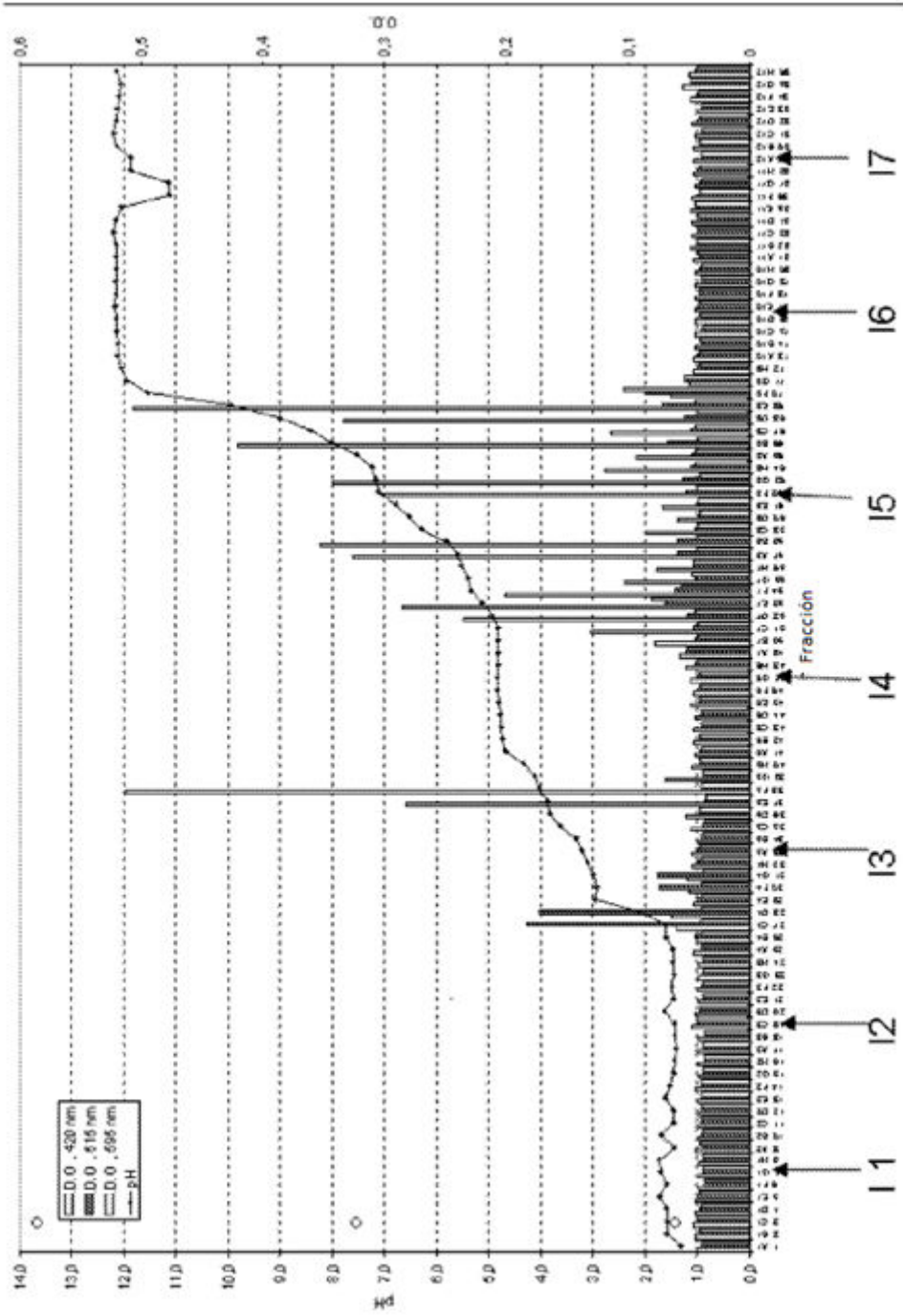


FIG. 5

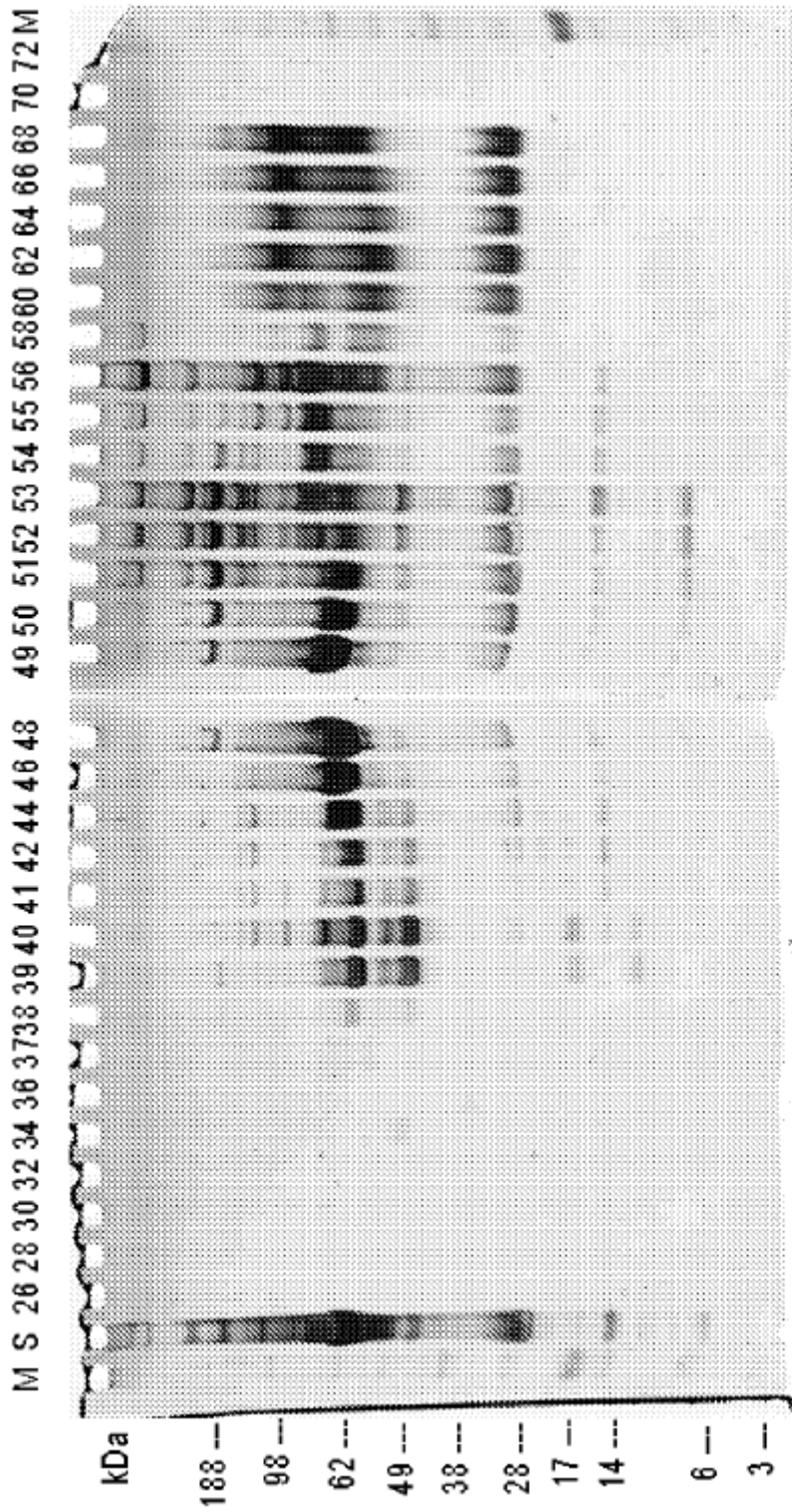
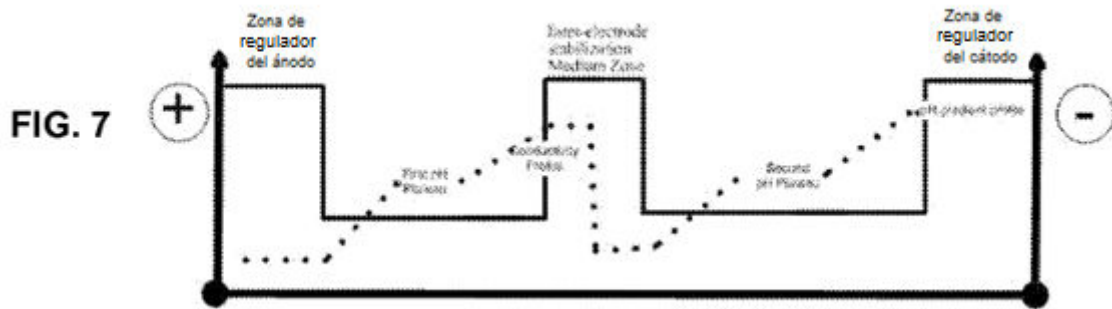


FIG. 6



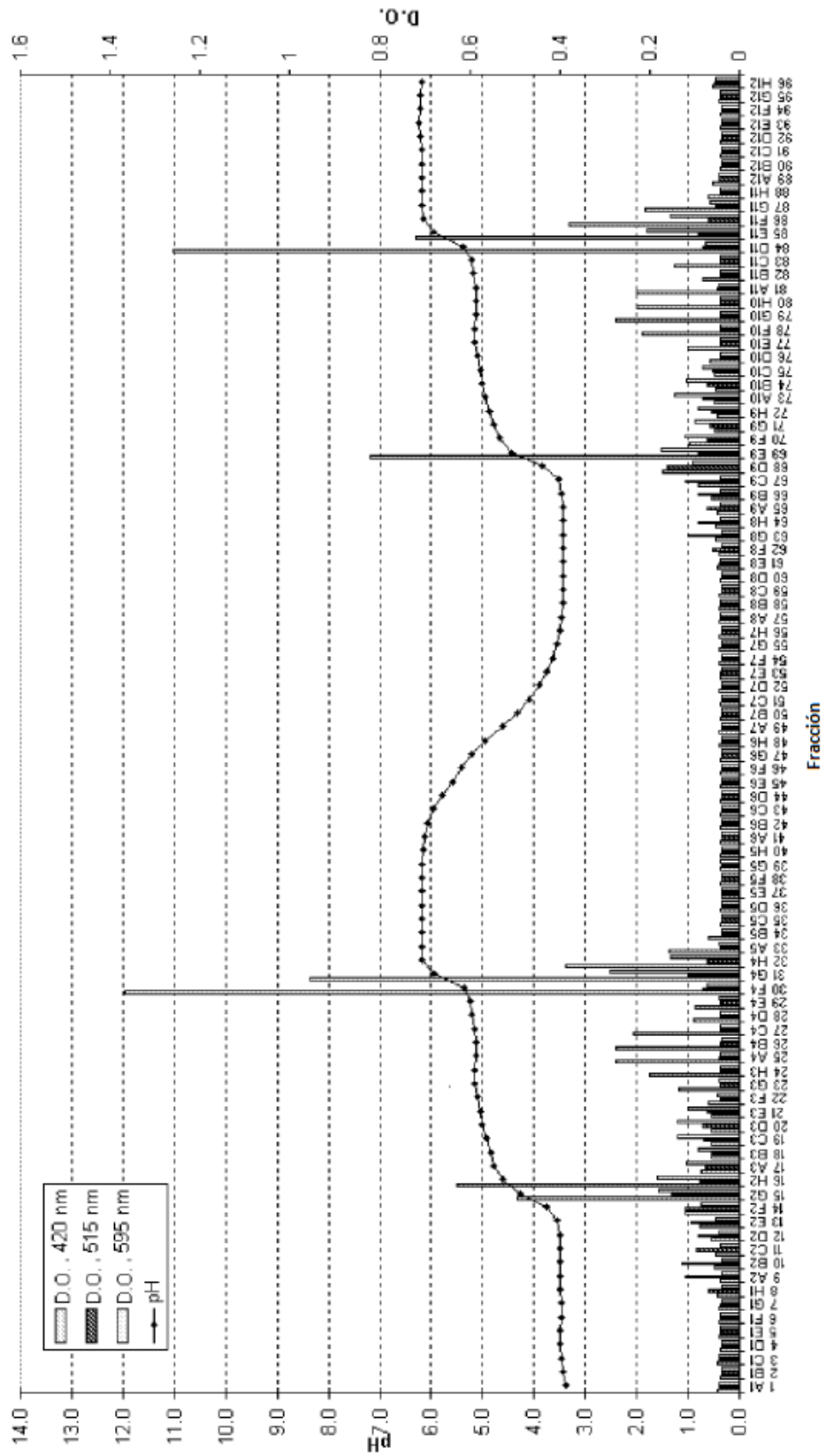


FIG.8

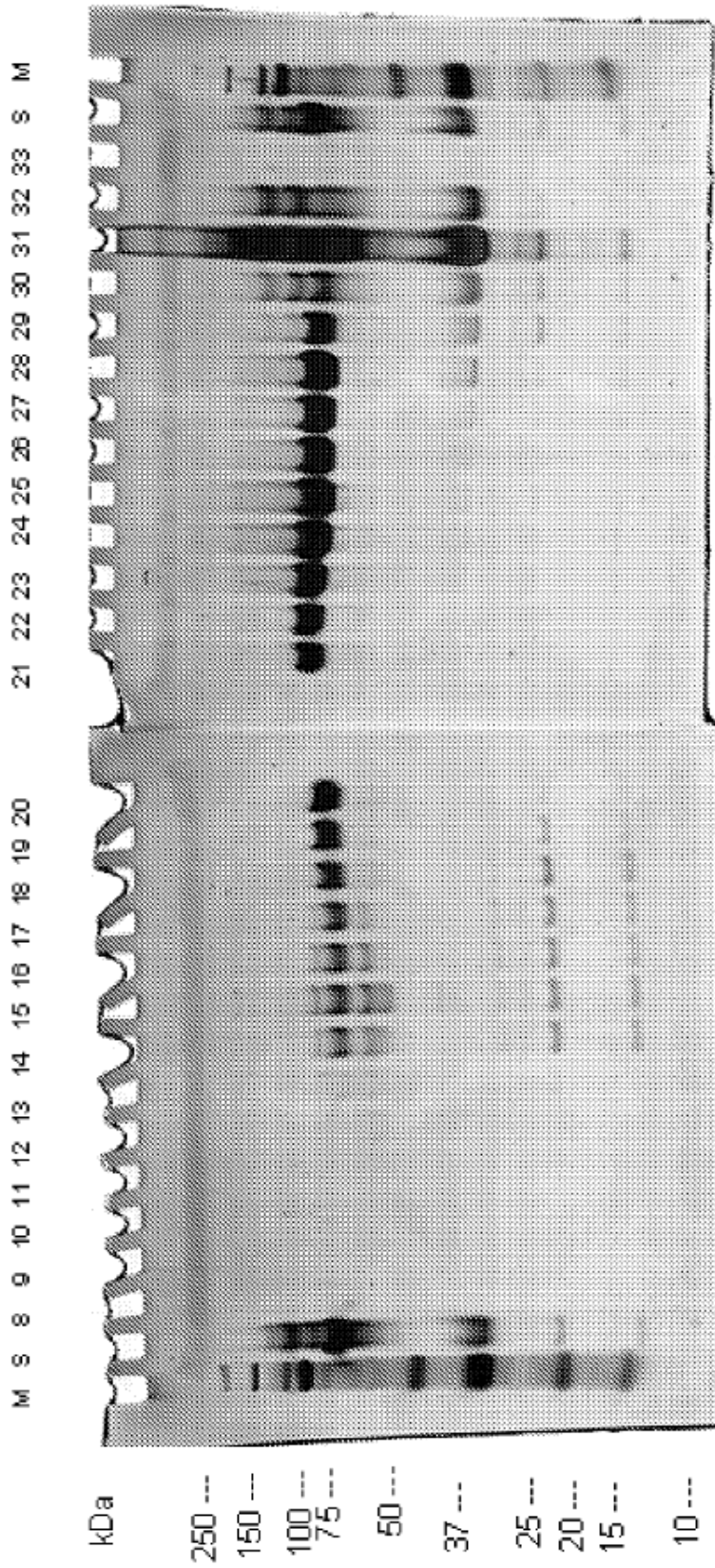


Fig. 9

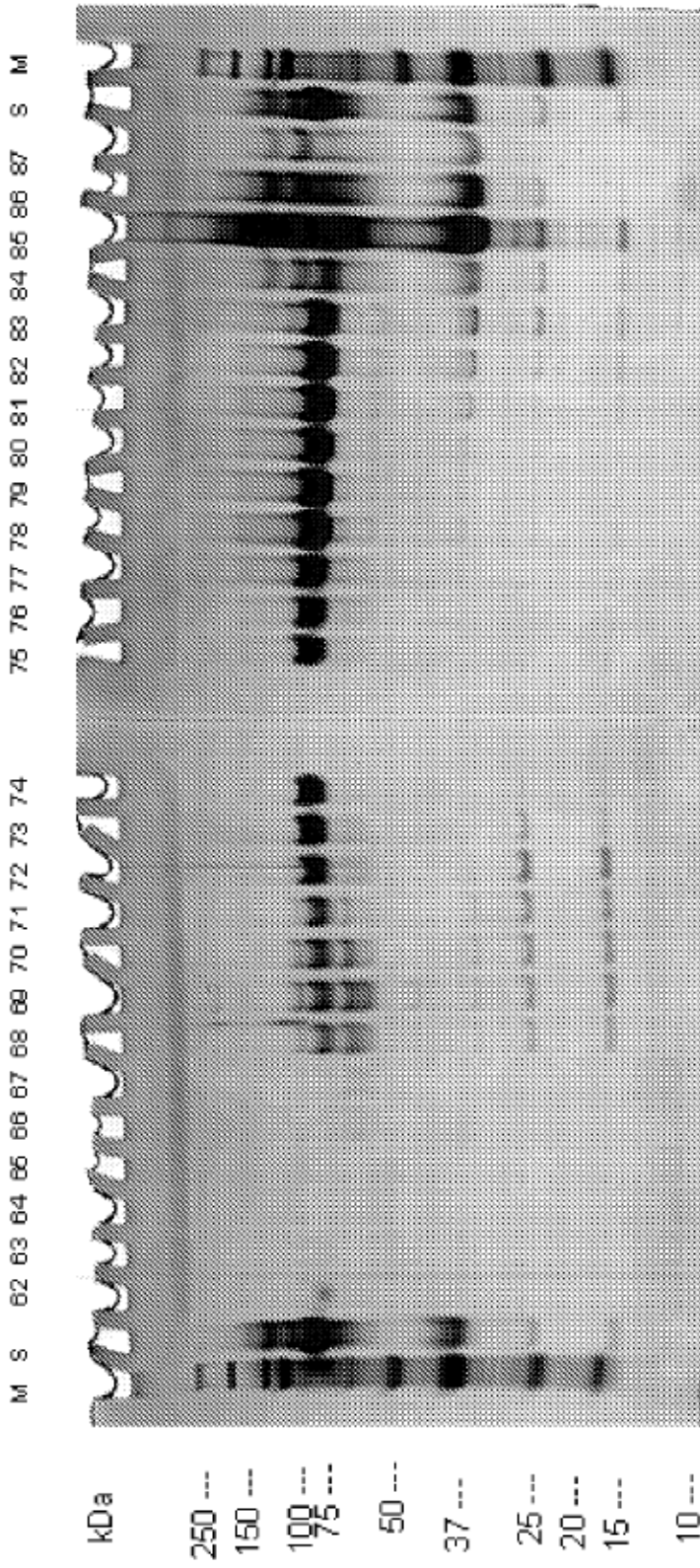


Fig. 10