



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ N.º de publicación: **ES 2 078 878**

⑫ Número de solicitud: 9400890

⑤① Int. Cl.⁶: C12Q 1/68

B01D 57/02

G01N 27/26

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **27.04.94**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.95**

⑫④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.12.95

⑦① Solicitante/s:
**Universidad de Alcalá de Henares, en su
representación El Rector Manuel Gala Muñoz
Plaza de San Diego s/n
Alcalá de Henares, Madrid, ES**

⑦② Inventor/es: **Domingo Galán, Alberto**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Dispositivo de termostatización para soportes de electroforesis capilar capaz de generar gradientes de temperatura estables o variables en el tiempo.**

⑤⑦ Resumen:

Dispositivo formado por un tubo o canal por el que circula un flujo de líquido y en cuyo interior se sitúa el soporte capilar, estando el conjunto dentro de o en contacto con un compartimento térmico. Un sistema de control ajusta la temperatura del compartimento térmico, la temperatura inicial del fluido que entra en el tubo y su velocidad de flujo, manteniéndolos constantes o variándolos durante la electroforesis. La técnica resultante de la utilización de este dispositivo, denominada electroforesis capilar en gradiente de temperatura, permite separar moléculas muy similares cuya movilidad electroforética varíe con la temperatura, como polinucleótidos, polipéptidos, polisacáridos, derivados de estos, u otras moléculas o complejos poliméricos o no poliméricos.

DESCRIPCION

Dispositivo de termostatación para soportes de electroforesis capilar capaz de generar gradientes de temperatura estables o variables en el tiempo.

Se describe un dispositivo de termostatación para soportes de electroforesis capilar capaz de generar gradientes de temperatura estables o variables en el tiempo.

Por gradiente de temperatura se entiende una distribución espacial no homogénea de temperatura a lo largo del soporte capilar de electroforesis, en la dirección de migración de las moléculas a separar.

Cuando este dispositivo está incorporado a un equipo de electroforesis capilar, permite realizar un procedimiento de separación de moléculas que se denomina en lo sucesivo electroforesis capilar en gradiente de temperatura. Este procedimiento permite la separación analítica o preparativa de moléculas muy similares pero no idénticas de cualquier naturaleza, siempre que su movilidad electroforética pueda variar dependiendo de la temperatura, como polinucleótidos, polipéptidos, polisacáridos, derivados de cualquiera de estos, u otras moléculas o complejos orgánicos poliméricos o no poliméricos.

Campo de aplicación-Sector de la técnica al que se refiere la invención.

La utilidad industrial directa del dispositivo de termostatación que se describe en esta patente consiste en su inclusión como parte integrante de equipos de electroforesis capilar, o bien como accesorio adaptable a dicho tipo de equipos.

Los equipos de electroforesis capilar dotados de este dispositivo permiten la realización de una nueva técnica que puede ser denominada como electroforesis capilar en gradiente de temperatura.

Separación analítica o preparativa de moléculas en general.

Esta técnica o procedimiento tiene un campo de aplicación muy amplio. Se trata de un procedimiento general de separación de moléculas a partir de una mezcla. Como cualquier otro procedimiento de separación, este se puede utilizar con fines analíticos o preparativos.

Análisis o finalidad analítica se refiere a la obtención de información sobre la presencia o ausencia, o sobre la cantidad absoluta o relativa, de una o varias moléculas en una muestra determinada. Purificación o finalidad preparativa se refiere al aislamiento o enriquecimiento relativo de una o varias moléculas a partir de una mezcla inicial.

Este procedimiento permite la separación analítica o preparativa de moléculas cuya movilidad electroforética pueda variar dependiendo de la temperatura. Los efectos de la temperatura pueden ser directos o indirectos. Efectos directos de la temperatura, en este contexto, son cambios en la estructura química, estado de ionización, carga neta o local, o cambios en la conformación espacial de las moléculas a separar. Efectos indirectos son cambios en alguna propiedad físico-química del soporte o el tampón en el que se realiza la electroforesis, como la fluidez, viscosidad, porosidad, pH, polaridad, estructura tridimensio-

nal, estado de ionización, carga neta o local.

Separación analítica o preparativa de macromoléculas biológicas.

El campo de aplicación principal de este procedimiento es la separación de macromoléculas biológicas muy similares pero no idénticas. Este tipo de moléculas son particularmente difíciles de separar por otras técnicas. Este procedimiento permite resolver problemas específicos de este tipo. Este procedimiento es además de rápida ejecución, fácilmente controlable y reproducible. *Separación analítica o preparativa de polinucleótidos o derivados. Detección de mutaciones en materia genético humano.*

Una aplicación específica de este procedimiento es la separación analítica o preparativa de polinucleótidos o derivados no idénticos. La detección de mutaciones en el material genético humano es un caso concreto de esta aplicación con interés clínico.

Otras aplicaciones.

Otras aplicaciones específicas del procedimiento son la separación analítica o preparativa de polipéptidos, polisacáridos o derivados de cualquiera de ellos no idénticos. Estas aplicaciones también tienen un interés clínico inmediato.

Estado de la técnica

El procedimiento de electroforesis en gel con gradiente de temperatura (temperature gradient gel electrophoresis, TGGE) para la separación analítica de moléculas de ácido deoxirribonucleico de doble cadena (dsDNA) ha sido descrita con anterioridad y tanto la técnica como instrumentos para su realización han sido publicados (Henco K, Heibey M. Nucleic Acids Res. 1990, 18:6733-6734) y pueden estar cubiertos por otras patentes (Lifecodes Corp.: 5/5/89 89US-348350, 15/11/90 WO9013668 A) (Massachusetts Institute of Technology: 13/7/89 89US-379087, 24/1/91 WO9100925).

No se ha encontrado ninguna descripción publicada o patentada de aplicación de un procedimiento de TGGE o equivalente para la separación de otro tipo de moléculas distinto de los ácidos nucleicos, y dentro de estos, las descripciones encontradas solo hacen referencia a fragmentos de ácido deoxirribonucleico de doble cadena.

Todas las descripciones de esta técnica se refieren a electroforesis convencional, no existiendo ningún procedimiento descrito para su adaptación a electroforesis capilar. No existe ninguna descripción de un procedimiento de TGGE o cualquier otro posible equivalente que utilice un gradiente espacial estable de temperatura aplicado a electroforesis capilar ni descripciones de instrumentación adecuada para generar dichos gradientes espaciales estables de temperatura en los capilares donde se realiza la separación. No existe por tanto ninguna descripción de aplicaciones de la técnica de electroforesis capilar para la separación analítica o preparativa de moléculas que aproveche o se fundamente en un cambio de temperaturas espacial (a lo largo del capilar en el que se realiza la electroforesis).

En las descripciones de estas técnicas no se considera la posibilidad de que el gradiente espacial (distribución no homogénea) de temperaturas pueda además modificarse temporalmente y

de forma programada durante el proceso de separación.

Explicación de la invención

La invención consta en primer lugar de un dispositivo instrumental, y en segundo lugar de una técnica de separación de moléculas basada en la utilización de dicho dispositivo instrumental.

Descripción del dispositivo de termostatización

La primera parte de la invención consiste en un dispositivo de termostatización para soportes de electroforesis capilar capaz de generar gradientes de temperatura estables o variables en el tiempo.

Por gradiente de temperatura se entiende una distribución espacial no homogéneas de temperatura a lo largo del soporte capilar de electroforesis, en la dirección de migración de las moléculas a separar.

Componentes

El elemento principal del dispositivo de termostatización consiste en tubo o canal de diámetro interior mayor que el diámetro exterior del capilar de electroforesis. El capilar se sitúa en el interior del tubo. Por el interior del tubo se fuerza un flujo de líquido a una temperatura inicial y velocidad de flujo graduables, constantes o programables en el tiempo. El conjunto del tubo de termostatización con el capilar en su interior se mantiene arrollado con una adecuada separación entre vueltas mediante un sistema de anclaje o guía. Dicho conjunto se encuentra dentro de o en contacto con un compartimento térmico (descrito posteriormente) de temperatura graduable constante o programable en el tiempo. A lo largo del tubo de termostatización pueden situarse elementos de medida de temperatura para monitorizar el gradiente de temperatura efectivo. Un sistema de control permite ajustar la temperatura del compartimento térmico, la temperatura inicial del fluido que entra en el tubo o canal y la velocidad de flujo de este fluido. Estos parámetros pueden mantenerse constantes en el tiempo o variar durante el tiempo de migración de las moléculas en el capilar de electroforesis.

El compartimento térmico consiste en cualquier elemento o dispositivo cuya temperatura pueda ajustarse arbitrariamente, como un fluido en un recipiente con una resistencia eléctrica para calentarlo o elevar su temperatura por encima de la exterior o ambiental, o un sistema de refrigeración para enfriarlo o reducir dicha temperatura por debajo de la exterior, o elementos Peltier que permiten tanto calentar como enfriar respecto de la temperatura ambiental. El compartimento térmico puede ser también un elemento sólido calentado o enfriado por cualquiera de los procedimientos ya mencionados.

Funcionamiento

El establecimiento de una distribución espacial no homogénea de temperaturas se consigue gracias a la transferencia de calor entre el fluido que circula por el tubo o canal y el compartimento térmico. La distribución final de temperaturas a lo largo del tubo o canal dependerá de varios factores, todos ellos controlables, a saber: la temperatura inicial del fluido a su entrada en el tubo o canal, la velocidad de flujo de este fluido, la temperatura del compartimento térmico, y la gene-

ración de calor por el propio capilar de electroforesis. Al ser todos los factores controlables, pueden mantenerse constantes alcanzándose así un gradiente de temperaturas estable en el tiempo, o bien pueden variarse arbitrariamente en el tiempo obteniéndose así un gradiente espacial de temperaturas que además varía en el tiempo.

Descripción del procedimiento de electroforesis capilar en gradiente de temperatura

Cuando este dispositivo está incorporado a un equipo de electroforesis capilar, permite realizar un procedimiento de separación de moléculas que se denomina en lo sucesivo electroforesis capilar en gradiente de temperatura. Este procedimiento permite la separación analítica o preparativa de moléculas muy similares pero no idénticas de cualquier naturaleza, siempre que su movilidad electroforética pueda variar dependiendo de la temperatura, como polinucleótidos, polipéptidos, polisacáridos, derivados de cualquiera de estos, u otras moléculas o complejos orgánicos poliméricos o no poliméricos.

Fundamentos físico-químicos

Los fundamentos físico-químicos por los cuales la temperatura puede afectar a la velocidad de migración y la consecuente separación electroforética de determinadas moléculas no constituyen el objeto de esta patente, pero se describe aquí un caso significativo para facilitar la comprensión del fundamento del procedimiento de separación mediante electroforesis con programación temporal de cambios de temperatura. Dicho caso es además una aplicación específica de este procedimiento reivindicada por esta patente: Ejemplo:

Aplicación a la separación de ácidos nucleicos.

Introducción:

Características y comportamiento electroforético de los ácidos nucleicos

Las moléculas o fragmentos de moléculas de ácido ribonucleico o deoxi-ribonucleico presentan la capacidad de establecer interacciones o enlaces químicos no covalentes entre distintas partes de la misma molécula o entre dos moléculas independientes (definiendo en este contexto una molécula de ácido nucleico como una cadena polinucleotídica sencilla, cuyos átomos están unidos por enlaces químicos covalentes). Dichas interacciones no covalentes son sensibles a la temperatura, de modo que pueden ocurrir y mantenerse estables por debajo de una determinada temperatura, pero no ocurren o son inestables a temperaturas más elevadas. La estructura espacial de la molécula o asociación de moléculas es diferente dependiendo de que ocurran o no dichas interacciones no covalentes y esta estructura espacial o conformación afecta a la velocidad de migración electroforética. La ruptura de las interacciones no covalentes por efecto de la temperatura se denomina fusión por analogía con otros materiales y la temperatura a la que se produce dicha ruptura y la transición conformacional correspondiente se denomina temperatura de fusión. Generalmente y de forma condicionada por el tipo de soporte en el que se realiza la electroforesis, cuando se establecen muchas interacciones no covalentes como las mencionadas la conformación es más compacta y la velocidad de migración es ma-

yor, mientras que cuando se establecen pocas de estas interacciones la conformación es más laxa y la velocidad de migración es menor.

Descripción del ejemplo:

Separación de ácidos nucleicos muy similares

Supongamos una mezcla hipotética simple de dos moléculas o dos asociaciones de moléculas muy parecidas, por ejemplo dos fragmentos de ácido deoxi-ribonucleico prácticamente idénticos excepto en una pequeña parte, que podrían corresponder en el ejemplo a un fragmento de un gen normal o sano y el mismo fragmento de un gen mutante o patológico. Puesto que ambos fragmentos son muy similares su migración electroforética será también muy similar y no podrán diferenciarse o separarse mediante electroforesis simple. Sin embargo las interacciones no covalentes que mantienen la conformación espacial pueden presentar una diferente sensibilidad a la temperatura, teniendo por ejemplo el fragmento normal una temperatura de fusión T1 y el fragmento mutante una temperatura de fusión T2 (siendo T1 distinto de T2, T1 menor que T2 en el ejemplo). A temperaturas inferiores a T1 ambos fragmentos migran a igual velocidad. Al alcanzarse una temperatura T1 se produce la fusión del fragmento mutante y una reducción de su velocidad de migración electroforética, mientras que el fragmento normal aún mantiene esencialmente la misma conformación compacta y por tanto la misma velocidad de migración, de modo que adelanta al fragmento mutante y se produce la separación efectiva entre ambos. Análogamente al

alcanzar la temperatura T2 se produce la fusión del fragmento normal y se reduce su velocidad de migración. A temperaturas superiores a T2 ambos fragmentos migran esencialmente a igual velocidad, pero en el intervalo entre ambas temperaturas se ha producido la separación física entre ambos que era lo que se pretendía.

Ventajas sobre la tecnología actual

El dispositivo que se describe tiene por objeto principal resolver el problema técnico de la generación de un gradiente espacial de temperaturas en un capilar de electroforesis.

Además de resolver este problema técnico, en esta patente se introduce una innovación metodológica consistente en la posibilidad de utilizar un gradiente espacial de temperaturas con cambios del mismo programados en el tiempo durante la migración de las moléculas a separar. Para la aplicación de un cambio de temperatura en el tiempo la forma física del soporte donde se realiza la electroforesis es esencialmente irrelevante, y por tanto este procedimiento puede aplicarse tanto a electroforesis convencional como capilar. El cambio temporal de temperatura es sin embargo especialmente eficiente en electroforesis capilar dada la elevada superficie y reducido volumen de los soportes capilares que permite una transferencia de calor prácticamente instantánea.

Otro objeto de esta patente es la extensión del campo de aplicación del procedimiento de electroforesis en gradiente de temperatura incluyendo la separación analítica o preparativa de moléculas de naturaleza no polinucleotídica.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de termostatización para soportes de electroforesis capilar capaz de generar gradientes de temperatura estables o variables en el tiempo. El dispositivo consiste en un tubo o canal por el que circula un flujo de líquido y en cuyo interior se sitúa el soporte capilar, estando el conjunto dentro de o en contacto con un compartimento térmico. Un sistema de control ajusta la temperatura del compartimento térmico, la temperatura inicial del fluido que entra en el tubo y su velocidad de flujo, manteniendo todos estos parámetros constantes o variándolos durante la electroforesis, según un programa preestablecido.

2. Aparatos de electroforesis capilar dotados de un sistema de termostatización del capilar según reivindicación 1.

3. Accesorios adaptables a aparatos de electroforesis capilar consistentes en un sistema de termostatización del capilar según reivindicación 1.

4. Procedimiento de electroforesis capilar en gradiente de temperatura, consistente en la utilización de los aparatos o accesorios según reivindicaciones 2 y 3, para la separación de moléculas con fines analíticos o preparativos.

5. Aplicación del procedimiento según reivindicación 4 a la separación de polinucleótidos con fines analíticos o preparativos.

6. Aplicación del procedimiento según reivindicación 4 a la detección de mutaciones en el material genético humano con fines diagnósticos.

7. Aplicación del procedimiento según reivindicación 4 a la separación de polipéptidos con fines analíticos o preparativos.

8. Aplicación del procedimiento según reivindicación 4 a la separación de polisacáridos con fines analíticos o preparativos.

9. Aplicación de los procedimientos de electroforesis convencional o capilar con cambio espacial y/o temporal de temperatura a la separación analítica o preparativa de moléculas de naturaleza no polinucleotídica.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 078 878
⑫ N.º solicitud: 9400890
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 27.04.94
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C25B15/02, B01D57/02, G01N27/26

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US-5221448-A (WEINBERGER et al.) 22.07.93 *Col. 4, lín. 40-68; col. 5, lín. 1-37; col. 11-13; reiv. 1-8*	1,2,3,4
Y	*Reiv. 1-8*	1-9
Y	US-5066377-A (ROSENBAUM et al.) 19.11.91 *Col. 2-5; reiv. 1-19*	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
15.11.95

Examinador
J.L. Vizán Arroyo

Página
1/1