



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① N.º de publicación: **ES 2 080 690**

② Número de solicitud: 9400891

⑤ Int. Cl.⁶: C25B 15/02

B01D 57/02

G01N 27/26

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **27.04.94**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.96**

Fecha de concesión: **31.07.96**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.09.96**

⑮ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.09.96

⑰ Titular/es: **Universidad de Alcalá de Henares
Plaza de San Diego s/n
Alcalá de Henares, Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Domingo Galán, Alberto**

⑳ Agente: **No consta**

② TÍTULO: **Electroforesis con programación temporal de cambios de temperatura.**

③ Resumen:

Procedimiento electroforético para la detección, identificación o separación de moléculas caracterizado por la introducción de un cambio de temperatura programado en el tiempo durante la migración electroforética. Este procedimiento permite separar 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. El procedimiento tiene una aplicación particularmente interesante en la detección de mutaciones en el material genético humano. Puede aplicarse a cualquier tipo de electroforesis incluyendo la electroforesis capilar.

ES 2 080 690 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Electroforesis con programación temporal de cambios de temperatura.

Introducción

Se describe un procedimiento para la separación analítica o preparativa de moléculas mediante electroforesis (migración de dichas moléculas en el seno de un campo eléctrico) con programación temporal de cambios de temperatura durante el transcurso de la migración electroforética.

Este procedimiento permite separar moléculas muy similares pero no idénticas de cualquier naturaleza, siempre que su movilidad electroforética (velocidad de migración en el seno de un campo eléctrico) 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

Separación analítica o preparativa de moléculas en general

El procedimiento que se describe en esta patente 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 tridimensional, 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. El procedimiento que se describe en esta patente 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 material 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

Procedimientos electroforéticos dependientes de temperatura. Electroforesis en gel con gradiente espacial de temperatura.

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 WO9 100925).

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.

En este procedimiento se utiliza una distribución espacial no homogénea (gradiente) de la temperatura en el gel de soporte de electroforesis. El gradiente de temperatura se establece generalmente mediante un sistema de circulación de líquidos a diferentes temperaturas y se estabiliza previamente a la aplicación y migración de la muestra. Durante el transcurso de la migración electroforética el gradiente espacial permanece constante en el tiempo. Las descripciones de instrumentación para realizar el procedimiento de TGGE se limitan a aparatos para electroforesis en gel dotados de un sistema de termostatación adecuado para generar gradientes espaciales estables de temperatura.

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).

Técnicas de separación con programación temporal de cambios de temperatura.

Una característica fundamental de esta invención, como se especifica posteriormente, es la utilización de una variación de temperatura pro-

gramada en el tiempo durante el transcurso de la migración electroforética de las moléculas a separar, y que dicha variación de temperatura posibilita, facilita o incrementa la separación. La cromatografía de gases es el único antecedente conocido de una técnica de separación a la que se ha aplicado una programación temporal de temperatura durante y como parte del proceso de separación. No existe ninguna descripción conocida de la utilización de una programación temporal de temperatura en una técnica de separación electroforética.

Sistemas de termostatación para electroforesis en gel.

En aparatos para electroforesis en gel convencional (no capilar) se han incorporado circuitos de termostatación y sistemas que mantienen la temperatura constante, o bien sistemas que generan una distribución espacial no homogénea pero temporalmente estable de temperaturas como se ha mencionado anteriormente. No existe ningún aparato descrito que combine estos sistemas de termostatación con un sistema de programación temporal de temperaturas. En el procedimiento de TGGE no se efectúa un cambio de temperaturas programado durante la migración electroforética. La variación de temperaturas en el procedimiento de TGGE es espacial, esto es, la temperatura es distinta en distintos puntos concretos del medio o soporte de la electroforesis pero la temperatura de un punto concreto cualquiera de dicho medio o soporte permanece constante en el tiempo o se pretende que así lo haga durante el transcurso de la migración electroforética de las moléculas a separar.

Sistemas de termostatación para electroforesis capilar.

En aparatos para electroforesis capilar se han incorporado sistemas de termostatación que mantienen la temperatura del capilar constante. No existe ningún aparato descrito que combine estos sistemas de termostatación con un sistema de programación temporal de temperaturas. No existe 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 temporal (durante la migración de las moléculas de la muestra por dicho capilar).

Conclusión. resumida sobre el estado de la técnica.

La generación de una distribución espacial no homogénea de temperaturas pero estable en el tiempo para electroforesis convencional es pues el único procedimiento desarrollado hasta la actualidad para aprovechar el fenómeno físico-químico de cambio de movilidad electroforética de determinadas moléculas en función de la temperatura. Estos instrumentos o partes presentan una limitada versatilidad en cuanto a la forma del gradiente de temperaturas (distribución de temperaturas en función de la posición en el medio o soporte donde se realiza la migración electroforética) y generalmente requieren un largo tiempo para el establecimiento y estabilización del gradiente espacial de temperaturas, que puede ser de varias horas. No existe ningún procedimiento descrito para aprovechar dicho fenómeno en aparatos de

electroforesis capilar ni existe ningún método instrumental descrito para generar una distribución espacial no homogénea de temperaturas a lo largo del capilar en el que se realiza la separación mediante esta técnica. Un método instrumental de este tipo puede ser complejo de realizar y difícil de controlar, pero en cualquier caso no existe.

Por otra parte, la única aplicación descrita de este procedimiento y del fenómeno físico-químico es la separación analítica de moléculas de ácido deoxi-ribonucleico de doble cadena para la detección de mutaciones en el material genético.

Por último y como resumen del estado de la técnica, no existe ninguna descripción de la posibilidad de utilizar un cambio de temperatura en el tiempo, durante el transcurso de la migración electroforética, para aprovechar el fenómeno físico-químico de cambio de movilidad electroforética de determinadas moléculas en función de la temperatura como parte del fundamento de un procedimiento de separación electroforética.

Explicación de la invención

La invención consiste en un procedimiento para la separación analítica o preparativa de moléculas mediante la combinación de una electroforesis (migración de dichas moléculas en el seno de un campo eléctrico) con una programación temporal de cambios de temperatura durante el transcurso de la migración electroforética.

Como ya se ha indicado, este procedimiento permite separar moléculas muy similares pero no idénticas de cualquier naturaleza, siempre que su movilidad electroforética (velocidad de migración en el seno de un campo eléctrico) 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 y modo de realización 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 de la electroforesis con programación temporal de cambios de temperatura 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 interac-

ciones 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 mayor, 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.

La presente invención tiene por objeto resolver varios problemas técnicos y llenar determinados vacíos metodológicos. El procedimiento que se describe en esta patente para aprovechar el ya mencionado fenómeno fisicoquímico se fundamenta en el concepto de realizar cambios de temperatura durante el tiempo de migración electro-

forética de las moléculas que se pretende separar. La instrumentación requerida es de fácil diseño y ejecución, fácilmente controlable y muy versátil, ya que en principio se puede conseguir cualquier cambio de temperatura en función del tiempo que se desee. Puesto que el cambio de temperaturas se realiza en el tiempo y durante el transcurso de la migración electroforética, no se requiere ningún tiempo previo de establecimiento o estabilización, y por tanto se economiza tiempo en su aplicación real.

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. De hecho el cambio temporal de temperatura es 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 de los procedimientos de electroforesis con cambio espacial y/o temporal de temperatura incluyendo la separación analítica o preparativa de moléculas de naturaleza no polinucleotídica.

Modos de realización de la programación temporal de cambios de temperatura durante la migración electroforética.

La presente invención propone un procedimiento de separación analítica o preparativa de moléculas de cualquier naturaleza mediante electroforesis caracterizado por la introducción de cambios arbitrarios de temperatura programados en el tiempo durante la migración electroforética de las moléculas a separar.

Los cambios de temperatura se pueden producir mediante calentamiento o refrigeración del gel o cualquier otro soporte o tampón electroforético, o cualquier recipiente que contiene a estos, incluidos los recipientes capilares empleados en electroforesis capilar. Todos estos componentes o partes se refieren conjuntamente en lo sucesivo como soporte de electroforesis para abreviar las descripciones.

El intercambio de calor puede producirse entre el soporte de electroforesis y un medio externo de cualquier tipo: gaseoso (aire en un compartimento abierto o cerrado por ejemplo), líquido (baño en el que se encuentra parcial o totalmente inmerso el soporte de electroforesis por ejemplo), sólido (por contacto directo o indirecto con el soporte de electroforesis) o cualquier combinación de estos. La parte o dispositivo que realiza esta función en otros procedimientos, como la cromatografía de gases que ya se ha mencionado, se denomina genéricamente compartimento térmico.

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.

De forma independiente o en conjunción con los procedimientos anteriores, la generación de calor por la propia corriente eléctrica que se establece en el soporte electroforético puede utilizarse para variar la temperatura del mismo. Considerando esta circunstancia en lo sucesivo, y para abreviar las descripciones, se referirá como compartimento térmico cualquiera de estos dispositivos o procedimientos que permiten seleccionar y variar arbitrariamente en el tiempo la temperatura del soporte electroforético, aun cuando todo o parte de dicho soporte esté involucrado en la generación o disipación de calor y por tanto en la variación de su propia temperatura.

La temperatura alcanzada en cada momento por el compartimento térmico se regula o programa mediante dispositivos adecuados que pueden ser de muy diferente grado de complejidad.

Ejemplo de dispositivo complejo y versátil.

Un ejemplo de dispositivo sofisticado y versátil podría estar formado por elementos Peltier,

un medio de transferencia de calor por ejemplo líquido, y sensores de temperatura adecuados, estando todo el conjunto controlado por un computador que ejecutase un programa preestablecido y completamente arbitrario de cambios de temperatura en función del tiempo.

Ejemplo de dispositivo simple.

En el extremo opuesto, un dispositivo extremadamente simple pero menos versátil podría estar formado por un baño con un volumen fijo de líquido a una temperatura inicial determinada en cuyo interior se sumerge una resistencia eléctrica fija que se conecta al iniciarse la electroforesis a una tensión fija; el baño se calienta progresivamente y lo mismo ocurre con el soporte electroforético, bien por estar sumergido en el baño o a través de un serpentín por el que se fuerza el paso del líquido mediante una bomba. La programación de temperaturas en un dispositivo tan simple como este sería el conocimiento previo, teórico o empírico, por parte del operador, del cambio de temperatura que ocurre en el sistema en función del tiempo.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento electroforesis con programación temporal de cambios de temperatura **caracterizado** por la introducción de un cambio de temperatura programado en el tiempo durante la migración electroforética.

2. Aparatos de electroforesis convencional (para soportes como papel, membrana, gel, etc.) dotados de sistemas de termostatación de cualquier tipo (aire, líquido u otros procedimientos, con distribución espacial homogénea o no homogénea) controlados en el tiempo de modo que permiten la programación temporal de cambios de temperatura en el soporte electroforético durante la migración de las moléculas a separar para la ejecución del procedimiento descrito en la reivindicación 1.

3. Accesorios adaptables a aparatos de electroforesis convencional (para soportes como papel, membrana, gel, etc.) consistentes en sistemas de termostatación de cualquier tipo (aire, líquido u otros procedimientos, con distribución espacial homogénea o no homogénea) controlados en el tiempo de modo que permiten la programación temporal de cambios de temperatura en el soporte electroforético durante la migración de las moléculas a separar para la ejecución del procedimiento descrito en la reivindicación 1.

4. Aparatos de electroforesis capilar dotados de un compartimento térmico o sistema de termostatación de cualquier tipo (aire, líquido u otros procedimientos, con distribución espacial homogénea o no homogénea) controlado en el tiempo de modo que permite la programación temporal de cambios de temperatura en el soporte electroforético durante la migración de las moléculas a separar para la ejecución del procedimiento descrito en la reivindicación 1.

5. Accesorios adaptables a aparatos de electroforesis capilar consistentes en un compartimento térmico o sistema de termostatación de cualquier tipo (aire, líquido u otros procedimientos, con distribución espacial homogénea o no homogénea) controlado en el tiempo de modo que

permite la programación temporal de cambios de temperatura en el soporte electroforético durante la migración de las moléculas a separar para la ejecución del procedimiento descrito en la reivindicación 1.

6. Aparatos según reivindicaciones 2 y 4 o accesorios según reivindicaciones 3 y 5 **caracterizados** por disponer de uno o más elementos calefactores y/o refrigerantes, un medio de transferencia de calor entre estos y el soporte electroforético, y sensores de temperatura, estando todo el conjunto controlado por un computador que ejecuta un programa preestablecido de cambios de temperatura en función del tiempo.

7. Aparatos según reivindicaciones 2 y 4 o accesorios según reivindicaciones 3 y 5 **caracterizados** por disponer de un sistema de transferencia de calor, por inmersión o contacto con un serpentín, entre el soporte electroforético y el líquido contenido en un baño con un volumen fijo, cuya temperatura inicial puede ser ajustada y en cuyo interior se sumerge una resistencia eléctrica fija que se conecta al iniciarse la electroforesis a una tensión fija. La programación de temperaturas en el soporte electroforético consiste en el conocimiento previo, teórico o empírico, del cambio de temperatura que ocurre en el conjunto en función del tiempo.

8. Aplicación del procedimiento descrito en la reivindicación 1 a la separación de polinucleótidos o derivados con fines analíticos o preparativos.

9. Aplicación del procedimiento descrito en la reivindicación 1 a la detección de mutaciones en el material genético humano con fines diagnósticos.

10. Aplicación del procedimiento descrito en la reivindicación 1 a la separación de polipéptidos o derivados con fines analíticos o preparativos.

11. Aplicación del procedimiento descrito en la reivindicación 1 a la separación de polisacáridos o derivados con fines analíticos o preparativos.

12. 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.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 080 690
- ⑫ N.º solicitud: 9400891
- 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-5066377-A (ROSENBAUM et al.) 19.11.91 *Columnas, 2-5; reiv. 1-10*	1-3, 6-12
X	EP-457526-A (LABINTELLIGENCE, INC.) 21.11.91 *Columnas, 2-16; reiv. 1-18*	1-3, 6-12
X	US-5221448-A (WEINBERGER et al.) 22.06.93 *Columnas, 4-14; reiv. 1-6*	4, 5

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
03.01.96

Examinador
J.L. Vizán Arroyo

Página
1/1