

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 315**

51 Int. Cl.:

C07K 1/14 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2012 PCT/GB2012/051171**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013 WO13027008**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2012 E 12725874 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020 EP 2744817**

54 Título: **Composición para separar proteínas de detergentes y detección de proteínas**

30 Prioridad:

19.08.2011 GB 201114341

23.09.2011 GB 201116421

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

29.12.2020

73 Titular/es:

ACQUASCIENCE LIMITED (100.0%)

**Ground Floor Unit 2/7 Horsted Square Bellbrook
Business Park**

Uckfield Sussex TN22 1QG, GB

72 Inventor/es:

NEVES, ANDRÉ T. R. M. A. y

PAGE, BRIAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 800 315 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

Composición para separar proteínas de detergentes y detección de proteínas

La presente invención se refiere a reactivos para separar proteínas de detergente, reactivos para detectar proteínas en presencia de un detergente y métodos para usar los mismos.

5 Antecedentes de la invención

Las proteínas se encuentran comúnmente en combinación con detergentes. Por ejemplo, los detergentes se usan a menudo para alterar las membranas celulares para separarlas al extraer proteínas de las células. Los detergentes también se usan típicamente cuando se separan mezclas de proteínas usando electroforesis en gel. Debido a que los detergentes afectan negativamente el cambio de color en la unión de los colorantes Coomassie a las proteínas, el detergente debe eliminarse mediante varias etapas de lavado, lo que resulta en procedimientos de tinción prolongados y complicados. También se sabe que algunos detergentes, como el dodecil sulfato de sodio, desnaturalizan las proteínas. Por lo tanto, a menudo es deseable separar las proteínas de los detergentes antes de su uso posterior.

El documento WO2007/125372 describe reactivos de detección de proteínas que contienen colorantes Coomassie en combinación con una dextrina como la ciclodextrina. Supuestamente, la presencia de la dextrina supera las dificultades con la presencia de detergentes en combinación con el colorante Coomassie. En consecuencia, no hay necesidad de llevar a cabo las laboriosas etapas de lavado que generalmente se necesitan. Sin embargo, se ha encontrado que los reactivos descritos en el documento WO2007/125372 que contienen un ácido como el ácido fosfórico a menudo sufren de poca estabilidad y tienen una alta tinción de fondo debido a la precipitación no deseada.

Sigue existiendo la necesidad de proporcionar reactivos adicionales para separar las proteínas de los detergentes. También existe la necesidad de proporcionar reactivos adicionales para la detección de proteínas que hayan mejorado la sensibilidad y la estabilidad.

El documento JP 61133138 describe composiciones de emulsión que comprenden ciclodextrina, medio acuoso y carboximetilcelulosa de sodio.

Tsai et al., (1998) Journal of Pharmaceutical Sciences 87(1): 117-122 describe la modificación de las características físicas de la celulosa microcristalina mediante el secado conjunto con β -ciclodextrinas.

El documento EP 2088434 describe una composición de reactivo de ensayo de proteínas que comprende violeta de pirocatecol, un metal, alcohol polivinílico, opcionalmente metanol, polivinilpirrolidona, un tampón y al menos uno de un quelante o benzoato de sodio. El citrato de sodio y el ácido salicílico se describen en una lista de tampones.

Pei-Pei et al., (1994) Microchemical Journal 49(1): 85-90 describe la interferencia de las ciclodextrinas en la cuantificación de micro cantidades de proteína por el método de Bradford.

El documento US 3063812 describe el uso de una composición que comprende citrato de sodio, ácido cítrico, éster etílico de tetrabromftaleína, polvo de celulosa y sacarosa en un método para detectar albúmina.

Lacovache et al., (2010) Journal of Structural Biology 169(3): 370-378 describe un método impulsado por ciclodextrina para la eliminación de detergente en la producción de cristales bidimensionales y que la complejación de detergente por ciclodextrina es de naturaleza estequiométrica.

Luo Xi-Yaun et al., (1997) Biochemical Archives 13(4): 319-326 describe la interferencia por detergente en el ensayo de Lowry de proteína de membrana de glóbulo de grasa de leche bovina.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición para separar una proteína de un detergente, un kit, una composición para la detección de proteínas y métodos para detectar y/o cuantificar proteínas como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona una composición (en adelante, la "composición de separación") para separar una proteína de un detergente, comprendiendo dicha composición

a) celulosa en la que al menos algunos de los grupos hidroxilo libres se han funcionalizado con grupos alquilo, hidroxialquilo o carboxialquilo,

b) un oligómero cíclico seleccionado de un oligosacárido cíclico, calixareno, curcubiturilo, pillarareno o derivados de los mismos; y

c) un ácido α -hidroxicarboxílico que tiene un pKa de 4 o menos, en donde dicha composición no comprende un colorante complejante de proteínas.

Se describe un método (en adelante, el "método de separación") para separar la proteína de un detergente, comprendiendo dicho método

1) Poner en contacto una muestra que contiene una proteína y un detergente con una disolución que comprende

a) un derivado de celulosa, y

5 b) un oligómero cíclico; y

2) Separar la proteína del detergente.

La presente invención también proporciona un método (en adelante, el "método de tinción") para detectar y/o cuantificar proteínas que comprenden

i) poner en contacto una muestra que contiene proteína y detergente con una primera disolución que comprende

10 a) celulosa en la que al menos algunos de los grupos hidroxilo libres se han funcionalizado con grupos alquilo, hidroxialquilo o carboxialquilo,

b) un oligómero cíclico seleccionado de un oligosacárido cíclico, calixareno, curcubiturilo, pillarareno o derivados de los mismos, y

c) un ácido α -hidroxicarboxílico que tiene un pKa de 4 o menos,

15 en donde dicha disolución no comprende un colorante complejante de proteínas y en donde la muestra que contiene una proteína está en forma de un soporte que contiene la proteína;

ii) poner en contacto la muestra que contiene proteínas con una segunda disolución que comprende un colorante que forma complejos de proteínas en donde la muestra que contiene una proteína se elimina opcionalmente de la primera disolución antes de la etapa ii); y

20 iii) detectar y/o cuantificar la formación de un complejo colorante/proteína.

En una descripción, al menos una de las disoluciones primera o segunda comprende un ácido que tiene un pKa de 4 o menos.

La primera disolución comprende un derivado de celulosa.

25 La presente invención también proporciona una composición (en adelante, la "composición de tinción") para la detección de proteínas que comprende:

a) un colorante complejante de proteínas;

b) un oligómero cíclico seleccionado de un oligosacárido cíclico, calixareno, curcubiturilo, pillarareno o derivados de los mismos; y

c) un ácido hidroxicarboxílico que tiene un pKa de 4 o menos; y

30 d) celulosa en la que al menos algunos de los grupos hidroxilo libres se han funcionalizado con grupos alquilo, hidroxialquilo o carboxialquilo.

Preferiblemente, el ácido hidroxicarboxílico en la composición de tinción es ácido tartárico.

La composición de tinción comprende un derivado de celulosa.

Descripción detallada de la invención

35 Las composiciones de la presente invención contienen un derivado de celulosa.

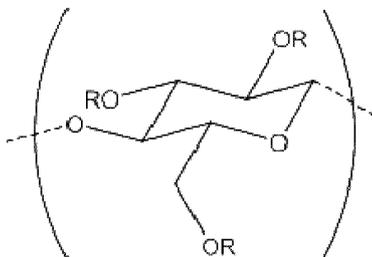
Por "composiciones de la presente invención" se entiende la "composición de tinción" y/o la "composición de separación" mencionadas anteriormente. Asimismo, por "métodos de la presente invención" se entiende el "método de tinción" mencionado anteriormente.

40 Por "derivado de celulosa" se entiende celulosa en la que al menos algunos de los grupos hidroxilo libres se han funcionalizado con grupos alquilo, hidroxialquilo o carboxialquilo.

Preferiblemente, el derivado de celulosa incluye grupos hidroxialquilo o carboxialquilo que tienen dos o tres átomos de carbono. Por lo tanto, los derivados de celulosa preferidos incluyen hidroxietilo, hidroxipropilo, carboximetilo y carboxietilo.

Los derivados de celulosa preferidos se seleccionan de hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa.

Preferiblemente, el derivado de celulosa se selecciona de hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa. Por lo tanto, los derivados de celulosa preferidos para uso en las composiciones de la presente invención comprenden unidades repetidas que tienen la siguiente fórmula general:



en la que R denota R', R'' o R''', en donde

R' denota H o CH₂CH₂OH (es decir, hidroxietilcelulosa),

R'' denota H o CH₂CH(OH)CH₃ (es decir, hidroxipropilcelulosa) y

R''' denota H, CH₃ o CH₂CH(OH)CH₃ (es decir, hidroxipropilmetilcelulosa).

Los derivados de celulosa particularmente preferidos se seleccionan de hidroxietilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa (es decir, R denota R' o R''). El derivado de celulosa más preferido es hidroxietilcelulosa (es decir, R denota R'), tal como 2-hidroxietilcelulosa.

Las composiciones de la invención también contienen un oligómero cíclico seleccionado de un oligosacárido cíclico, calixareno, curcubiturilo, pilarareno o derivados de los mismos.

Por "oligómero cíclico" se entiende un oligómero que se forma en un anillo (o macrociclo). En otras palabras, "oligómero cíclico" no significa un oligómero de unidades monoméricas cíclicas (aunque estos pueden estar abarcados por el término, como oligosacáridos cíclicos), sino más bien un oligómero que está en forma de un anillo continuo de unidades monoméricas.

Los oligómeros cíclicos adecuados tienen grupos hidrófilos tales como hidroxilo para solubilizarlos en disoluciones acuosas. El oligómero cíclico tiene forma de anillo y tiene una cavidad interna. Preferiblemente, el oligómero cíclico tiene un tamaño tal que la cavidad interna puede acomodar una molécula, tal como un colorante, un tensioactivo o un detergente.

Los oligómeros cíclicos se seleccionan de oligosacáridos cíclicos, calixareno, cucurbiturilo, pilarareno o derivados de los mismos.

Por "oligosacárido cíclico" se entiende un oligosacárido, o un compuesto formado por moléculas de azúcar, que se forma en un anillo (o macrociclo). En principio, se puede usar cualquier tipo de oligosacárido cíclico, aunque se prefiere usar oligosacáridos cíclicos que contienen solo un tipo de molécula de azúcar.

Preferiblemente, el oligosacárido cíclico contiene de 5 a 12 moléculas de azúcar en el anillo, más preferiblemente de 6 a 8 moléculas de azúcar, lo más preferiblemente 6 moléculas de azúcar.

Los oligosacáridos cíclicos preferidos se seleccionan de ciclodextrina (o ciclo- α (1 \rightarrow 4)-glucósido), ciclodextrano (ciclo- α (1 \rightarrow 6)-glucósido), ciclocurdlan (ciclo- β (1 \rightarrow 3)-glucósido), ciclomannina (ciclo- α (1 \rightarrow 4)-manósido), ciclofructina (ciclo- β (1 \rightarrow 2)-fructósido) y ciclogalactina (ciclo- β (1 \rightarrow 4)-galactósido).

Las ciclodextrinas particularmente preferidas que pueden usarse en la composición de la invención se seleccionan entre α -ciclodextrina (ciclo- α (1 \rightarrow 4)-glucohexaósido), β -ciclodextrina (ciclo- α (1 \rightarrow 4)-glucoheptaósido) y γ -ciclodextrina (ciclo- α (1 \rightarrow 4)-glucooctaósido), siendo la α -ciclodextrina (ciclo- α (1 \rightarrow 4)-glucohexaósido) la más preferida.

Los calixarenos preferidos se seleccionan de calix[4]areno, calix[6]areno y calix[8]areno.

Los cucurbiturilos preferidos se seleccionan de cucurbit[6]uril y cucurbit[8]uril.

Los pilararenos preferidos se seleccionan del pilar[5]areno y el pilar[6]areno.

El término "oligómero cíclico" y "oligosacárido cíclico" y cada uno de los oligómeros/oligosacáridos cíclicos específicos mencionados anteriormente también abarca derivados de estos compuestos, tales como oligosacáridos en los que se han funcionalizado los grupos hidroxilo libres, u oligómeros cíclicos que contienen grupos hidrofílicos y/o grupos que

son capaces de unirse con hidrógeno al agua. Se prefieren estos tipos de derivados ya que mejoran la solubilidad del oligómero cíclico en agua.

5 Los derivados adecuados incluyen oligómeros cíclicos, por ejemplo cualquiera de los oligómeros cíclicos específicos u oligosacáridos cíclicos mencionados anteriormente, en los que uno o más de los grupos hidroxilo libres se han funcionalizado con alquilo-C₁₋₄, carboximetilo, sulfonilo, acetilo, hidroxietilo o hidroxipropilo. Los grupos derivados que son hidrófilos y/o capaces de unirse con hidrógeno al agua incluyen carboximetilo, sulfonilo, hidroxietilo o hidroxipropilo.

10 Las composiciones de la presente invención son típicamente disoluciones acuosas. Como las proteínas pueden ser sensibles a la fuerza iónica, se prefiere usar agua desionizada para formar las composiciones de la invención, aunque esto no es esencial.

La composición de separación típicamente deja la proteína libre y disponible para uso posterior, tal como disponible para formar un complejo proteína-colorante. Por lo tanto, la composición de separación no contiene ningún colorante complejante de proteínas.

15 Por "colorante complejante de proteínas" se entiende cualquier resto que muestra un cambio en las propiedades ópticas en la formación de un complejo de colorante de proteínas, tal como un cambio en los espectros de absorción o un cambio en los espectros de emisión.

20 Los ingredientes adicionales opcionales en las composiciones de la presente invención incluyen agentes solubilizantes para ayudar a evitar la agregación de las proteínas una vez que se forma el complejo detergente-oligómero cíclico. Los agentes solubilizantes adecuados que pueden usarse incluyen alcoholes tales como metanol, etanol e isopropanol, prefiriéndose particularmente el etanol.

Típicamente, las cantidades de cada uno de los componentes en la composición de separación de la presente invención se resumen en la siguiente tabla (todas las cantidades se dan como porcentaje p/v, es decir, gramos por ml):

Componente	Cantidad típica	Cantidad preferida	Cantidad más preferida
Oligómero cíclico	0,1-20%	0,5-6%	2-5%
Derivado de celulosa	0,01-2%	0,05-1%	0,1-0,5%
Solubilizante (por ejemplo, etanol)	0-10%	0,5-4%	1-3%

25 Las cantidades en la tabla anterior son independientes entre sí y representativas de las cantidades típicas y preferidas de cada uno de los componentes contenidos en las composiciones de separación de la presente invención.

Otros intervalos preferidos de oligómero cíclico incluyen de 0,1 a 10% p/v, preferiblemente de 0,1 a 4% p/v, más preferiblemente de 0,5 a 4% p/v, por ejemplo de 1 a 3% p/v.

Otros intervalos preferidos de solubilizante incluyen de 0 a 5% p/v.

30 La composición de separación encuentra uso en la separación de proteínas de detergentes. Por lo tanto, se prefiere que la composición de separación en sí misma no contenga detergentes/tensioactivos.

La composición de separación se puede preparar simplemente mezclando los ingredientes, por ejemplo, para formar una disolución acuosa. Sin embargo, se prefiere asegurarse de que cada ingrediente se disuelva completamente antes de añadir el siguiente. Esto puede implicar un calentamiento moderado, por ejemplo a aproximadamente 40-50 °C.

35 Típicamente, el oligómero cíclico se disuelve en agua desionizada mezclada hasta que se obtiene una disolución uniforme (por ejemplo, durante aproximadamente 30 minutos a 1 hora, tal vez más si es necesario). El derivado de celulosa se puede añadir en este punto, por ejemplo formando una disolución de derivado de celulosa en agua desionizada y añadiendo esto a la disolución que contiene el oligómero cíclico. Sin embargo, son posibles otras órdenes de adición.

40 Recientemente, se ha sugerido que los oligosacáridos como la ciclodextrina se pueden usar para superar las dificultades asociadas con los detergentes y los tensioactivos que interfieren con los cambios de color de los colorantes que tiñen las proteínas. Sin desear limitarse a la teoría, se cree que el detergente forma un complejo con el oligómero cíclico presente en la composición de separación de la invención. Al usar una cantidad adecuada de uno o más oligómeros cíclicos, el detergente puede quedar atrapado en un complejo oligómero-detergente, permitiendo así su separación de la proteína.

45

La composición de separación de la invención es capaz de atrapar detergentes/tensioactivos permitiendo que se separen fácilmente de la proteína. La composición de separación encuentra un uso particular cuando una mezcla de proteína/detergente está contenida en un gel de electroforesis. En tales casos, el detergente a menudo está presente para mitigar la aglomeración de proteínas asegurando que las proteínas puedan separarse efectivamente en el gel. Después de la separación, el gel puede exponerse a una disolución que contiene un oligómero cíclico para atrapar el detergente. La proteína se puede separar del detergente continuando con la electroforesis.

Se describe un método (en adelante, el "método de separación") para separar la proteína de un detergente, comprendiendo dicho método

1) Poner en contacto una muestra que contiene una proteína y un detergente con una disolución que comprende

- a) un derivado de celulosa, y
- b) un oligómero cíclico; y

2) Separar la proteína del detergente.

En el método de separación, el oligómero cíclico y el detergente forman un complejo que es capaz de separarse de la proteína. El experto en la técnica conocerá los métodos adecuados para separar una proteína del detergente. Los métodos adecuados incluyen, pero no se limitan a, centrifugación; cromatografía tal como cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC); y electroforesis.

En una realización preferida, la muestra que contiene una proteína es un gel de electroforesis, y la etapa 2) en el método comprende aplicar un potencial al gel para separar la proteína.

Si bien la composición de separación de la invención se usa generalmente para separar proteínas y detergentes, encuentra un uso particular como pretratamiento antes de la tinción con un colorante que forma complejos de proteínas. Por lo tanto, las composiciones de separación de la invención preferiblemente forman parte de un kit que comprende

i) una primera disolución que es una disolución acuosa que comprende

- a) celulosa en la que al menos algunos de los grupos hidroxilo libres se han funcionalizado con grupos alquilo, hidroxialquilo o carboxialquilo,
- b) un oligómero cíclico seleccionado de un oligosacárido cíclico, calixareno, curcubiturilo, pilarareno o derivados de los mismos, y
- c) un ácido α -hidroxicarboxílico que tiene un pKa de 4 o menos,

ii) una segunda disolución que comprende un colorante complejante de proteínas, en donde la primera disolución (o separación) no contiene un colorante complejante de proteínas.

Los colorantes que forman complejos de proteínas son bien conocidos en la técnica. En términos generales, cualquier reactivo de ensayo de Bradford u otros reactivos de tinción de proteínas Coomassie se pueden usar en combinación con la composición de separación de la presente invención. Los ejemplos de colorantes que forman complejos de proteínas disponibles comercialmente que pueden usarse incluyen azul brillante Coomassie G-250 y azul brillante Coomassie R-250, disponibles de Sigma-Aldrich.

Para algunos colorantes de tinción de proteínas, como los colorantes de Coomassie en particular, se requiere un pH bajo para obtener el cambio de color deseado cuando el colorante forma complejos con una proteína. Típicamente, el pH del reactivo de tinción de proteínas debe estar por debajo de aproximadamente 4, tal como alrededor de pH 1-2. Estos valores bajos de pH a menudo se logran añadiendo un ácido inorgánico como el ácido fosfórico.

Sin embargo, se ha encontrado que los reactivos de tinción de proteínas que contienen oligómeros cíclicos y un colorante que forma complejos de proteínas pueden tener altos niveles de precipitado no deseado cuando se usan ácidos como el ácido fosfórico. Estos precipitados producen un ruido de fondo alto que hace que la detección de pequeñas cantidades de proteína sea difícil, si no imposible. Por lo tanto, los niveles de detección típicos para un reactivo "tolerante de detergentes" que contiene una ciclodextrina, un colorante Coomassie y ácido fosfórico son alrededor de 20-30 ng (nanogramos) de proteína.

Sorprendentemente, se ha descubierto que la composición de separación de la invención reduce la cantidad de precipitados que se forman cuando se usa un ácido como el ácido fosfórico en combinación con un colorante que forma complejos de proteínas. Como se muestra en los ejemplos, el ácido fosfórico se puede incluir en la composición de separación de la invención y/o en combinación con el colorante que forma complejos de proteínas (es decir, en la primera y/o segunda disolución en el kit de la invención) para proporcionar un sistema de detección de proteínas sin precipitados.

5 El ácido usado en combinación con el colorante de tinción de proteínas es un ácido α -hidroxicarboxílico que tiene un pKa de 4 o menos, preferiblemente de 1 a 4, más preferiblemente de 2 a 3,5. Los ácidos adecuados que pueden incluirse en la composición de separación descrita o usarse en combinación con un colorante complejante de proteínas incluyen ácido fosfórico, ácido fosforoso (fosfónico), ácido peryódico, ácido selénico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido dicloroacético y ácidos hidroxicarboxílicos (por ejemplo, ácidos α -hidroxicarboxílicos). Los ácidos descritos son ácido fosfórico y ácidos α -hidroxicarboxílicos, por ejemplo ácido tartárico.

Las composiciones de separación de la invención usan un ácido α -hidroxicarboxílico que tiene un pKa de 4 o menos.

10 Los ácidos α -hidroxicarboxílicos preferidos se seleccionan de ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido isocítrico, ácido glicólico y ácido láctico. Los ácidos α -hidroxicarboxílicos particularmente preferidos se seleccionan de ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico y ácido isocítrico, siendo el ácido tartárico el más preferido.

Se prefiere el uso de un ácido α -hidroxicarboxílico ya que generalmente son menos tóxicos que los ácidos tales como el ácido fosfórico. Además, los ácidos α -hidroxicarboxílicos, tales como el ácido tartárico, proporcionan sistemas de tinción altamente sensibles que son capaces de detectar proteínas a niveles tan bajos como 4 ng sin problemas derivados del alto ruido de fondo debido a los precipitados.

15 Típicamente, si está presente, la cantidad de ácido en la primera y/o segunda disolución en el kit de la invención es de 1 a 30% p/v (es decir, g/ml), preferiblemente de 5 a 25% p/v, lo más preferiblemente del 15 al 25% p/v. El experto en la técnica sabría que los colorantes que forman complejos de proteínas pueden no funcionar correctamente si el pH es demasiado bajo. En consecuencia, la primera y/o segunda disolución típicamente solo contendría de 5 a 15% p/v de un ácido fuerte como el ácido fosfórico, mientras que un ácido más débil como el ácido tartárico puede estar
20 presente en cantidades más altas, tal como 15 a 25 % p/v.

25 Sorprendentemente, se ha encontrado que la inclusión de un derivado de celulosa tal como 2-hidroxiethylcelulosa mejora en gran medida el contraste de la tinción de un gel de proteína que se ha tratado con la composición de separación o tinción de la invención. El mecanismo exacto que conduce a este efecto no se entiende completamente. Sin embargo, es posible que el derivado de celulosa estabilice el complejo de oligómero-detergente cíclico, reduciendo aún más la cantidad de detergente libre y mitigando cualquier interferencia que el detergente pueda tener sobre el complejo de proteína-colorante.

La presente invención también proporciona un método (en adelante, el "método de tinción") para detectar y/o cuantificar proteínas que comprende

- i) poner en contacto una muestra que contiene proteína y detergente con una primera disolución que comprende
 - 30 a) celulosa en la que al menos algunos de los grupos hidroxilo libres se han funcionalizado con grupos alquilo, hidroxialquilo o carboxialquilo;
 - b) un oligómero cíclico seleccionado de un oligosacárido cíclico, calixareno, curcubiturilo, pillarareno o derivados del mismo; y
 - c) un ácido α -hidroxicarboxílico que tiene un pKa de 4 o menos,
- 35 en donde dicha disolución no comprende un colorante complejante de proteínas y en donde la muestra que contiene una proteína está en forma de un soporte que contiene la proteína;
- ii) poner en contacto la muestra que contiene proteínas con una segunda disolución que comprende un colorante que forma complejos de proteínas en donde la muestra que contiene una proteína se elimina opcionalmente de la primera disolución antes de la etapa ii); y
- 40 iii) detectar y/o cuantificar la formación de un complejo colorante/proteína.

45 Los métodos de tinción preferidos de la invención usan las composiciones de separación preferidas de la invención como la primera disolución, y los kits preferidos de la invención con el componente i) en el kit correspondiente a la primera disolución en el método de tinción y el componente ii) en el kit correspondiente a la segunda disolución en el método de tinción, siendo dichas composiciones y kits preferidos como se expuso anteriormente y en las reivindicaciones.

La primera disolución en el método de tinción de la invención contiene un derivado de celulosa, tal como los derivados de celulosa expuestos anteriormente. Se describe que al menos una de las disoluciones primera o segunda comprende un ácido que tiene un pKa de 4 o menos, tal como los ácidos preferidos expuestos anteriormente.

Preferiblemente, la primera y segunda disoluciones son disoluciones acuosas.

50 En la etapa i) del método de tinción de la invención, el oligómero cíclico forma un complejo con cualquier detergente que pueda estar presente en la muestra que contiene proteínas. Por lo tanto, cuando se añade el colorante complejante de proteínas en la etapa ii), el detergente no puede interferir con la formación del complejo colorante proteico. Por lo

tanto, el método de tinción permite la detección de proteínas a niveles muy bajos, incluso si hay cantidades significativas de detergente en la muestra inicial que contiene proteínas.

5 En consecuencia, el uso de un oligómero cíclico como una ciclodextrina en combinación con un colorante de tinción de proteínas proporciona un sistema de tinción de proteínas "tolerante de detergentes" que no requiere las laboriosas etapas de lavado para eliminar cualquier detergente que pueda estar presente. Estos reactivos simplifican enormemente los protocolos utilizados para teñir proteínas durante la electroforesis.

10 La segunda disolución utilizada en el método de tinción de la invención puede ser cualquier tipo de colorante complejante de proteínas, aunque se prefieren particularmente los colorantes de Coomassie. Los colorantes de complejación de proteínas disponibles comercialmente se pueden usar como la segunda disolución en el método de tinción de la invención, ya sea como se suministra o se modifica adecuadamente, tal como mediante la adición de un ácido que tiene un pKa de 4 o menos.

15 La primera disolución (o separación) actúa como un "pretratamiento" para eliminar (o negar el efecto de) el detergente que está presente. La segunda disolución se puede usar para teñir la proteína según los procedimientos habituales para ese colorante. La ventaja de usar el pretratamiento (es decir, la primera disolución) según la invención es evidente, ya que puede omitirse cualquier etapa para eliminar el detergente que generalmente debe tomarse.

La muestra que contiene proteínas puede estar en forma de una disolución tal como una disolución acuosa (ya sea disuelta o como una suspensión), como un sólido tal como un precipitado, o en forma de un soporte que contiene la proteína.

20 Los soportes típicos que pueden contener una proteína incluyen una placa de cromatografía, papel de filtro, membrana o resina de nitrocelulosa, o una matriz de gel, como un gel de electroforesis. Los expertos en la técnica conocen las matrices de gel adecuadas e incluyen gel de poliacrilamida y gel de agarosa.

Cuando la muestra que contiene proteínas es una disolución o suspensión de la proteína, normalmente no vale la pena separar el complejo de oligómero/detergente cíclico de la disolución una vez formada. En cambio, el colorante complejante de proteínas simplemente puede añadirse a la disolución formada en la etapa i) del método de tinción.

25 Cuando la muestra que contiene proteínas está en forma de un soporte que contiene la proteína, el soporte se puede eliminar de la primera disolución (por ejemplo, vertiendo la primera disolución) después de la etapa i) antes de añadir la segunda disolución en la etapa ii). Esto evita que la disolución que contiene el colorante complejante de proteínas se diluya demasiado, lo que ayuda a mantener el tiempo necesario para formar el complejo de colorante proteico al mínimo. Opcionalmente, el soporte se puede enjuagar antes de la etapa ii). Sin embargo, esto no es necesario ya que
30 la primera y la segunda disolución son compatibles entre sí.

Típicamente, los métodos de tinción y separación de la invención se llevan a cabo a temperatura ambiente. Sin embargo, se pueden usar temperaturas ligeramente elevadas, tal como hasta 50 °C si es necesario.

35 La velocidad de formación del complejo oligómero cíclico/detergente dependerá de la forma exacta de la muestra que contiene proteínas. Por ejemplo, si la muestra que contiene proteínas es una disolución, la velocidad de formación es casi instantánea. Sin embargo, en el caso de que la proteína quede atrapada dentro de una matriz, tal como un gel de electroforesis, la etapa de poner en contacto la muestra que contiene la proteína con la primera disolución generalmente toma hasta 15 minutos en la mayoría de los casos, pero puede tomar hasta 1 hora dependiendo sobre la concentración del detergente en la muestra que contiene proteínas. Se necesitan escalas de tiempo similares para la etapa ii) para formar el complejo proteína-colorante.

40 Cuando se usa para teñir geles tales como geles de electroforesis, la primera disolución se calienta preferiblemente en un microondas junto con el gel durante hasta 30 segundos, por ejemplo 20 segundos. Estos valores son para un microondas típico de 1000 W. Después de microondas, la composición y el gel se dejan típicamente por ejemplo 15 minutos, ya sea a temperatura ambiente (por ejemplo, 20-25 °C) o a una temperatura elevada, tal como 50 °C. Las temperaturas elevadas se pueden mantener utilizando un baño de agua o cualquier otro medio adecuado. Este
45 protocolo puede repetirse opcionalmente para la etapa ii), si es necesario. Sin embargo, el protocolo para la etapa ii) puede variar levemente dependiendo del colorante de complejación de proteínas que se use. El experto en la técnica estaría al tanto de los protocolos adecuados que deberían usarse para cualquier colorante complejante de proteínas.

50 Aunque estos son protocolos preferidos, los ejemplos muestran que el kit de tinción de la invención puede usarse a temperatura ambiente para teñir geles de electroforesis en solo 15 minutos. Típicamente, el método de la invención implica exponer el gel de electroforesis a la primera disolución durante hasta 30 minutos, por ejemplo de 5 a 15 minutos; verter la primera disolución; y exponer el gel de electroforesis a la segunda disolución durante hasta 30 minutos, por ejemplo de 5 a 15 minutos. Por supuesto, cuanto más tiempo esté expuesto el gel a la primera y segunda disolución, más sensible será el método, particularmente si el gel se tiñe a temperaturas elevadas como se indicó anteriormente.

55 Por lo tanto, en realizaciones preferidas (especialmente cuando la muestra que contiene proteínas es un gel de electroforesis y se requiere una alta sensibilidad), el método de tinción de la invención comprende, después de la

etapa de poner en contacto la primera disolución con la muestra que contiene proteínas, calentar la primera disolución y muestra que contiene proteínas (tal como calentar en un microondas durante 10-30 segundos, preferiblemente 15-20 segundos) y mantener la disolución y la muestra a una temperatura de 20-60 °C, preferiblemente de 20-50 °C, durante hasta 1 hora, preferiblemente durante 5 a 30 minutos, más preferiblemente de 5 a 20 minutos.

5 Ventajosamente, el uso de un oligómero cíclico significa que no hay necesidad de eliminar detergentes y/o tensioactivos antes de detectar la proteína. Por lo tanto, los geles de electroforesis se pueden teñir usando la composición de la invención sin lavarlos después de correr el gel. Por lo tanto, en un aspecto preferido, la presente invención se refiere a un método para detectar y/o cuantificar una proteína que comprende

a) proporcionar un gel de electroforesis que contiene proteínas,

10 b) aplicar un campo eléctrico al gel,

c) exponer el gel a la primera disolución,

d) opcionalmente eliminar el gel de la primera disolución,

e) exponer la muestra que contiene proteínas a una segunda disolución que contiene un colorante que forma complejos de proteínas, y

15 f) detectar y/o cuantificar la formación del complejo colorante/proteína.

En tales métodos, se prefiere que el gel no se lave después de la etapa b) y antes de la etapa c). Se puede usar cualquier gel de electroforesis adecuado en este método, tal como un gel de poliacrilamida o agarosa.

20 Por "eliminar opcionalmente el gel de la primera disolución" en la etapa d) se entiende que el gel y la primera disolución se separan por cualquier medio, de modo que la primera disolución ya no esté presente cuando el gel se expone a la segunda disolución durante la etapa e). En la práctica, puede no ser deseable mover realmente el gel durante la etapa d), ya que los geles de electroforesis son típicamente bastante frágiles. En cambio, la etapa d) típicamente comprende verter la primera disolución, de modo que el gel permanezca en el recipiente que se está utilizando en el método.

25 En el método de tinción de la invención, la detección del complejo proteína/colorante puede comprender cuantificar la cantidad de complejo proteína/colorante presente para determinar la cantidad o concentración de proteína. Típicamente, la formación del complejo proteína-colorante da como resultado un cambio en las propiedades espectroscópicas del colorante, que puede detectarse y analizarse utilizando una metodología conocida. Por ejemplo, la cuantificación puede realizarse mediante métodos que comprenden medir un cambio en los espectros de absorción o emisión del complejo colorante/proteína. La cuantificación puede comprender, por ejemplo, medir un cambio de color. Para la mayoría de los colorantes que forman complejos de proteínas, la absorbancia generalmente se mide a una longitud de onda en el intervalo de aproximadamente 400 a aproximadamente 700 nm.

30 El uso de medios espectroscópicos adecuados en tiempo real permite medir el cambio de absorbancia con el tiempo. Para el azul brillante Coomassie G-250, la absorbancia se mide a una longitud de onda de aproximadamente 595 nm, el máximo de absorbancia para este colorante cuando forma un complejo con la proteína. Cuando se usa el azul brillante Coomassie G-250, la proteína se puede detectar mediante el monitoreo del aumento de la absorbancia a 595 nm debido a la formación del complejo colorante/proteína.

35 Para determinar la concentración de proteína, la absorbancia o emisión medida se puede comparar con un valor estándar, un conjunto estándar de valores o una curva estándar.

40 Los métodos de esta invención son altamente susceptibles de automatización y análisis de grandes cantidades de muestras. Aparatos de alto rendimiento adecuados están disponibles comercialmente, y serían conocidos por el experto en la técnica.

Como se mencionó anteriormente, el uso de la composición de separación de la invención evita los problemas que surgen cuando se usan ácidos inorgánicos tales como ácidos fosfóricos en combinación con un colorante complejante de proteínas y un oligómero cíclico como la ciclodextrina. Sorprendentemente, se ha encontrado que estas desventajas también pueden superarse si se usa un ácido hidroxicarboxílico en una composición de tinción "todo en uno".

45 Por lo tanto, la presente invención se refiere a una composición (denominada en la presente memoria "composición de tinción") para la detección de proteínas que comprende:

a) un colorante complejante de proteínas;

b) un oligómero cíclico seleccionado de un oligosacárido cíclico, calixareno, curcubiturilo, pillarareno o derivados de los mismos;

50 c) un ácido α -hidroxicarboxílico que tiene un pKa de 4 o menos; y

d) celulosa en la que al menos algunos de los grupos hidroxilo libres se han funcionalizado con grupos alquilo, hidroxialquilo o carboxialquilo.

En algunas realizaciones, el oligómero cíclico en la composición de tinción no es α -ciclodextrina (ciclo- $\alpha(1\rightarrow4)$ -glucohexaósido).

- 5 Preferiblemente, el ácido hidroxicarboxílico en la composición de tinción es ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido isocítrico, ácido glicólico o ácido láctico. El ácido hidroxicarboxílico más preferido es el ácido tartárico.

La composición de tinción comprende un derivado de celulosa, tal como cualquiera de los derivados de celulosa preferidos mencionados anteriormente en el contexto de la composición de separación. Los derivados de celulosa más preferidos son hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa, prefiriéndose particularmente la hidroxietilcelulosa y particularmente la 2-hidroxietilcelulosa.

10

Las cantidades típicas de los diversos componentes en la composición de tinción de la invención se muestran en la siguiente tabla (todas las cantidades se dan como porcentaje p/v, es decir, gramos por ml):

Componente	Cantidad típica	Cantidad preferida	Cantidad más preferida
Colorante	0,0001-0,1%	0,0005-0,01%	0,001-0,005%
Oligómero cíclico	0,1-4%	0,5-4%	1-3%
Ácido hidroxicarboxílico	10-30%	15-25%	18-22%
Derivado de celulosa	0-2%	0,05-1%	0,1-0,5%
Solubilizante (por ejemplo, etanol)	0-5%	0,5-4%	1-3%

15 Mientras que la composición de tinción de la invención puede estar en forma de una disolución, tal como una disolución acuosa, se describen kits que contienen dos o más disoluciones que se combinan para formar la composición de tinción de la invención. Por lo tanto, se describe un kit que comprende

a) un colorante complejante de proteínas,

b) un oligómero cíclico, y

c) un ácido hidroxicarboxílico,

20 en donde los componentes a), b) y c) están presentes en dos o más composiciones separadas que cuando se combinan forman una composición para la detección de proteínas.

En realizaciones preferidas de la descripción, el kit comprende

i) una composición que comprende un colorante de tinción de proteínas, y

ii) una composición que comprende un oligómero cíclico y un ácido hidroxicarboxílico,

25 en donde los componentes i) y ii), cuando se combinan, forman una composición para la detección de proteínas.

En tales kits, la primera disolución preferiblemente también comprende un ácido hidroxicarboxílico, tal como un ácido α -hidroxicarboxílico. Los ácidos α -hidroxicarboxílicos preferidos se mencionan anteriormente, siendo el ácido tartárico el más preferido.

30 Proporcionar la composición de tinción en forma de kit es ventajoso ya que puede aumentar la estabilidad y la vida útil de la composición como un todo.

Tales kits también contienen preferiblemente un derivado de celulosa en la segunda disolución. Los derivados de celulosa preferidos se mencionan anteriormente, siendo la 2-hidroxietilcelulosa la más preferida.

Dichos kits también contienen preferiblemente un solubilizante en la segunda disolución. Los solubilizantes preferidos se mencionan anteriormente, siendo el etanol el más preferido.

35 Los tipos y cantidades preferidos de oligómero cíclico, ácido α -hidroxicarboxílico, derivado de celulosa opcional y solubilizante opcional se mencionan anteriormente en relación con las composiciones de separación de la invención.

La composición de tinción de la invención también puede aplicarse directamente a una muestra que contiene proteínas en un método alternativo de la invención.

Por lo tanto, la invención también proporciona un método para detectar y/o cuantificar proteínas que comprende poner en contacto una muestra que contiene proteínas que también comprende detergente con una disolución que comprende

a) un colorante complejante de proteínas,

5 b) un oligómero cíclico seleccionado de un oligosacárido cíclico, calixareno, curcubiturilo, pilarareno o derivados de los mismos,

c) un ácido hidroxicarboxílico que tiene un pKa de 4 o menos, y

d) celulosa en la que al menos algunos de los grupos hidroxilo libres se han funcionalizado con grupos alquilo, hidroxialquilo o carboxialquilo; y detectar y/o cuantificar la formación del complejo colorante/proteína.

10 Preferiblemente, la muestra que contiene la proteína está en forma de un soporte que contiene la proteína, tal como un gel de electroforesis.

Por lo tanto, los métodos particularmente preferidos que usan la composición de tinción comprenden

i) proporcionar un gel que contiene proteínas,

ii) aplicar un campo eléctrico al gel,

15 iii) exponer el gel a la composición de tinción de la invención, y

iv) detectar y/o cuantificar la formación del complejo colorante/proteína.

En tales métodos, el gel preferiblemente no se lava después de la etapa ii) y antes de la etapa iii). Se puede usar cualquier gel de electroforesis adecuado en este método, tal como un gel de poliacrilamida o agarosa.

20 Como se señaló anteriormente, la velocidad de formación de complejos colorante/proteína dependerá de la forma exacta de la muestra que contiene proteínas. Por ejemplo, en el caso de que la proteína quede atrapada dentro de una matriz tal como un gel de electroforesis, la etapa de poner en contacto la muestra que contiene proteína con la composición de tinción de la invención generalmente toma hasta 15 minutos en la mayoría de los casos, pero puede tomar a 1 hora para teñir eficazmente proteínas que solo están presentes en concentraciones muy bajas.

25 Típicamente, la composición de tinción se aplica a un gel de electroforesis para teñir las proteínas usando la misma metodología expuesta anteriormente para la composición de separación. Por lo tanto, cuando se usa para teñir geles tales como geles de electroforesis, la composición de tinción de la invención se calienta preferiblemente en un microondas junto con el gel durante hasta 30 segundos, por ejemplo 20 segundos. Estos valores son para un microondas típico de 1000 W. Después de microondas, la composición y el gel se dejan típicamente por ejemplo 15 minutos, ya sea a temperatura ambiente (por ejemplo, 20-25 °C) o a una temperatura elevada, tal como 50 °C. Las
30 temperaturas elevadas se pueden mantener utilizando un baño de agua o cualquier otro medio adecuado.

Como se indicó anteriormente, el uso de la primera disolución (es decir, la separación) y la segunda en el kit de la invención reduce la cantidad de precipitados que se forman cuando el colorante complejante de proteínas se pone en contacto con la muestra que contiene la proteína. Aun así, se obtienen mejores resultados cuando se usa un ácido α -hidroxicarboxílico como tal el ácido tartárico. Además, el uso de derivados de celulosa mejora el contraste del complejo colorante/proteína, particularmente cuando está presente en un gel de electroforesis.
35

Se describe el uso de un ácido hidroxicarboxílico, particularmente un ácido α -hidroxicarboxílico tal como el ácido tartárico, para reducir la cantidad de precipitados en una disolución acidificada que contiene un colorante que forma complejos de proteínas.

40 Se describe el uso de un derivado de celulosa tal como hidroxietilcelulosa (por ejemplo, 2-hidroxietilcelulosa) para mejorar la tinción de un complejo colorante/proteína.

Se describe el uso de la combinación de un derivado de celulosa como la hidroxietilcelulosa (por ejemplo, 2-hidroxietilcelulosa) y un oligómero cíclico tal como la ciclodextrina (por ejemplo, α -, β - o γ -ciclodextrina) para mejorar la tinción de un complejo colorante/proteína .

45 Claramente, los precipitados en una composición para detectar proteínas inevitablemente proporcionarán un fondo poco claro de cualquier mezcla teñida, tal como un gel de electroforesis teñido.

Se describe el uso de la combinación de un ácido hidroxicarboxílico, particularmente un ácido α -hidroxicarboxílico tal como el ácido tartárico, y un derivado de celulosa tal como la hidroxietilcelulosa (por ejemplo, 2-hidroxietilcelulosa) para mejorar la tinción de un complejo colorante/proteína.

50 Se describe el uso de la combinación de un ácido hidroxicarboxílico, particularmente un ácido α -hidroxicarboxílico tal como ácido tartárico, un derivado de celulosa tal como hidroxietilcelulosa (por ejemplo, 2-hidroxietilcelulosa) y un

oligómero cíclico tal como ciclodextrina (por ejemplo, α -, β - o γ -ciclodextrina) para mejorar la tinción de un complejo colorante/proteína.

5 Por "mejorar la tinción" se entiende hacer que el complejo colorante/proteína sea más fácil de identificar en la mezcla teñida, por ejemplo, mejorando el contraste en un gel que contiene una proteína que ha sido expuesta a un colorante complejante de proteínas. Esta mejora puede ser mejorando la formación del complejo colorante/proteína o reduciendo la cantidad de fondo en regiones que no contienen ninguna proteína, o mediante ambas. La mejora en la mejora de tinción puede determinarse calculando la relación señal/ruido, por ejemplo, usando densitometría.

10 Se describe el uso de un derivado de celulosa tal como hidroxietilcelulosa (por ejemplo, 2-hidroxietilcelulosa) para mejorar la relación señal/ruido de un complejo colorante/proteína teñido en un gel, preferiblemente según lo determinado por densitometría.

Se describe el uso de la combinación de un derivado de celulosa tal como la hidroxietilcelulosa (por ejemplo, 2-hidroxietilcelulosa) y un oligómero cíclico tal como la ciclodextrina (por ejemplo, α -, β - o γ -ciclodextrina) para mejorar la relación señal/ruido de un complejo colorante/proteína en un gel, preferiblemente según lo determinado por densitometría.

15 Se describe el uso de la combinación de un ácido hidroxicarboxílico, particularmente un ácido α -hidroxicarboxílico como el ácido tartárico y un derivado de celulosa como la hidroxietilcelulosa (por ejemplo, 2-hidroxietilcelulosa) para mejorar la relación señal/ruido de un complejo colorante/proteína teñido en un gel, preferiblemente según lo determinado por densitometría.

20 Se describe el uso de la combinación de un ácido hidroxicarboxílico, particularmente un ácido α -hidroxicarboxílico tal como ácido tartárico, un derivado de celulosa tal como hidroxietilcelulosa (por ejemplo, 2-hidroxietilcelulosa) y un oligómero cíclico tal como ciclodextrina (por ejemplo, α -, β - o γ -ciclodextrina) para mejorar la relación señal/ruido de un complejo colorante/proteína teñido en un gel, preferiblemente según lo determinado por densitometría.

25 En los usos anteriores, el derivado de celulosa está presente preferiblemente como parte de una disolución (es decir, el derivado de celulosa no es una matriz sólida). Se describe el uso de una disolución de un derivado de celulosa, opcionalmente en combinación con un ácido hidroxicarboxílico y/o un oligómero cíclico, para lograr los efectos mencionados anteriormente.

30 La relación señal/ruido mejorada se puede lograr incluso si la primera disolución se elimina antes de añadir la segunda disolución en el método de la invención. Se cree que esto se debe a que el derivado de celulosa impregna o recubre el gel durante la etapa i) del método de la invención. Por lo tanto, incluso si se elimina la primera disolución y el gel se enjuaga antes de la etapa ii), al menos parte del derivado de celulosa se retiene en el gel para dar lugar a una mejora en la relación señal/ruido.

35 Las mismas consideraciones se aplican al ácido α -hidroxicarboxílico, que puede estar presente en la primera y/o segunda disolución. Por lo tanto, incluso si el ácido α -hidroxicarboxílico se incluye solo en la primera disolución, el ácido impregna el gel y se retiene incluso si se elimina la primera disolución. Por lo tanto, el ácido puede dar lugar a una mejora en la relación señal/ruido incluso si no está contenido en la segunda disolución. Por supuesto, los mejores resultados se obtienen cuando se usa un ácido α -hidroxicarboxílico tanto en la primera como en la segunda disolución.

La invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos y figuras no limitantes en los que:

La figura 1 muestra viales con la formulación A (Fig. 1a) y azul instantáneo (Fig. 1b)

La figura 2 muestra un gel sin lavar teñido con la formulación A

40 La figura 3 muestra un gel sin lavar teñido con azul instantáneo

La figura 4 muestra el gel obtenido del ejemplo 2a

La figura 5 muestra el gel obtenido del ejemplo 2b

La figura 6 muestra el gel obtenido del ejemplo 2c

La figura 7 muestra el gel obtenido del ejemplo 3a

45 La figura 8 muestra el gel obtenido del ejemplo 3b

La figura 9 muestra el gel obtenido del ejemplo 3c

La figura 10 muestra el gel obtenido del ejemplo 3d

La figura 11 muestra los escaneos de geles teñidos con la formulación B

La figura 12 muestra los escaneos de geles teñidos con la formulación C

ES 2 800 315 T3

La figura 13 muestra los escaneos de geles teñidos con la formulación D

La figura 14 muestra la relación señal/ruido de geles teñidos con la formulación A y azul instantáneo

Ejemplo 1

La siguiente formulación se preparó mezclando los ingredientes en agua desionizada:

5 Formulación A:

Ácido tartárico	20 % p/v
α -Ciclodextrina	2 % p/v
Etanol	2 % p/v
2-Hidroxiethylcelulosa	0,3 p/v
Colorante G250	0,0015 % p/v

Como comparación, se obtuvo "azul instantáneo" de Expedeon Limited, que se cree que contiene ácido fosfórico, α -ciclodextrina, etanol y un colorante Coomassie, en línea con los ejemplos del documento WO2007/125372.

10 La figura 1a muestra un vial que contiene la formulación A, mientras que la figura 1b muestra un vial que contiene azul instantáneo. Estas figuras muestran claramente que la formulación de tinción de la invención era transparente sin precipitados y tenía un color azul claro/verde. En contraste, el azul instantáneo era marrón turbio con cantidades significativas de partículas suspendidas/precipitadas.

15 Estas formulaciones se usaron para teñir un gel de PAGE que contenía varias concentraciones de BSA. Los geles sin lavar después de la tinción durante 1 hora se muestran en las figuras 2 y 3. Los altos niveles de precipitados en el azul instantáneo hacen que sea difícil ver bajos niveles de BSA en el fondo.

Este ejemplo muestra claramente el alto nivel de precipitados en disoluciones de tinción de proteínas que contienen un oligómero cíclico como la ciclodextrina junto con ácido fosfórico.

Ejemplo 2

Las siguientes formulaciones se prepararon mezclando los ingredientes en agua desionizada:

20 Formulación 1-1

Ácido tartárico	20 % p/v
α -Ciclodextrina	4 % p/v
Etanol	2 % p/v
2-Hidroxiethylcelulosa	0,3 P/v

Formulación I-2

Ácido fosfórico	10 % p/v
α -Ciclodextrina	4 % p/v
Etanol	2 % p/v
2-Hidroxiethylcelulosa	0,3 P/v

Formulación I-3

α -Ciclodextrina	4 % p/v
Etanol	2 % p/v
2-Hidroxiethylcelulosa	0,3 P/v

ES 2 800 315 T3

Formulación 11-1

Colorante G250	0,013 % p/v
Ácido tartárico	20 % p/v

Formulación II-2

Colorante G250	0,013 % p/v
Ácido fosfórico	10 % p/v

- 5 Los geles de PAGE que contienen diversas concentraciones de BSA se tiñeron usando las siguientes combinaciones de formulaciones I y II mostradas anteriormente:

Ejemplo	Pretratamiento	Tinción
2a	I-1	II-1
2b	I-2	II-2
2c	I-3	II-2

- 10 Los geles de PAGE se expusieron primero al pretratamiento I durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la exposición, la disolución de tratamiento se vertió y se añadió la disolución de tinción II. Después se dejó el gel durante otros 5 minutos a temperatura ambiente antes de eliminar la disolución de tinción.

Los geles teñidos de 2a, 2b y 2c se muestran en las figuras 4, 5 y 6 respectivamente. Estos geles muestran claramente que el kit según la invención se puede usar en combinación con ácidos como el ácido fosfórico sin sufrir ningún problema de precipitación. Además, una comparación entre las figuras 4 y 5/6 muestra que las bandas teñidas son mucho más claras cuando se usa ácido tartárico.

- 15 Ejemplo 3

Las siguientes formulaciones se prepararon mezclando los ingredientes en agua desionizada:

Formulación I-4

α -Ciclodextrina	4 % p/v
Etanol	2 % p/v
2-Hidroxietilcelulosa	0,3 P/v

Formulación I-5

Ácido tartárico	20 % p/v
Etanol	2 % p/v
2-Hidroxietilcelulosa	0,3 P/v

- 20

Formulación I-6

Ácido tartárico	20 % p/v
α -Ciclodextrina	4 % p/v
Etanol	2 % p/v

Los geles de PAGE que contienen diversas concentraciones de BSA se tiñeron usando las siguientes combinaciones de formulaciones I y 11 mostradas anteriormente:

ES 2 800 315 T3

Ejemplo	Pretratamiento	Tinción
3a	I-1	II-1
3b	I-4	II-1
3c	I-5	II-1
3d	I-6	II-1

Los geles de PAGE se expusieron primero al pretratamiento I durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la exposición, la disolución de tratamiento se vertió y se añadió la disolución de tinción II. El gel se dejó durante otros 5 minutos a temperatura ambiente antes de eliminar la disolución de tinción.

- 5 Los geles teñidos de los ejemplos 3a, 3b, 3c y 3d se muestran en las figuras 7, 8, 9 y 10, respectivamente. Los geles en las figuras 7 y 8 muestran que el ácido tartárico no necesita ser incluido en la primera disolución (es decir, el pretratamiento). La figura 9 muestra claramente que no hay bandas visibles si el oligómero cíclico se omite del pretratamiento. Además, la figura 10 muestra que las bandas son apenas visibles si el derivado de celulosa se omite del pretratamiento.

10 Ejemplo 4

Las siguientes formulaciones se realizaron disolviendo los diversos ingredientes en agua desionizada:

Formulación B:

Ácido fosfórico	20 % p/v
α-Ciclodextrina	2 % p/v
Etanol	2 % p/v
Colorante G250	0,0045 % p/v

Formulación C:

Ácido tartárico	20 % p/v
α-Ciclodextrina	2 % p/v
Etanol	2 % p/v
Colorante G250	0,0045 % p/v

15

Formulación D:

Ácido tartárico	20 % p/v
α-Ciclodextrina	2 % p/v
Etanol	2 % p/v
2-Hidroxietilcelulosa	0,3 P/v
Colorante G250	0,0045 % p/v

20

La PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) se completó en condiciones estándar, utilizando productos de gel comerciales. Se crearon muestras de albúmina de suero bovino (estándares) disponibles en el mercado y compradas y se corrieron en el(los) gel(es). También se incluyeron marcadores comerciales. Una vez que se completó la electroforesis, los geles se retiraron de su funda de plástico y se insertaron en una pequeña cubeta que contenía una de las formulaciones anteriores. Se corrieron geles idénticos y se ensayaron usando cada formulación. Los tiempos de tinción fueron idénticos para cada formulación. Las figuras 11 a 13 muestran escaneos de los geles teñidos.

25

Las cuatro bandas intermedias en el gel son las bandas de ensayo de interés, con los carriles exteriores como marcadores estándar. Las imágenes de gel se obtuvieron en un escáner, lo que dio como resultado que el fondo del gel fuera de color gris claro donde había quedado atrapada una capa acuosa entre el gel y la pantalla de vidrio del escáner, o blanco donde había una capa de aire (o burbuja) entre el gel y la pantalla.

- 5 Aunque existen diferencias en el fondo debido a la presencia o ausencia de la capa acuosa entre el gel y la placa de vidrio del escáner, los resultados en las figuras 11-13 muestran claramente que el uso de ácido tartárico en lugar de ácido fosfórico mejoró el contraste en las cuatro bandas de ensayo, lo que facilita su identificación (véanse las figuras 11 y 12). Además, las figuras 12 y 13 muestran que la adición de 2-hidroxietilcelulosa produce un contraste aún mayor entre la muestra de proteína teñida y el fondo.

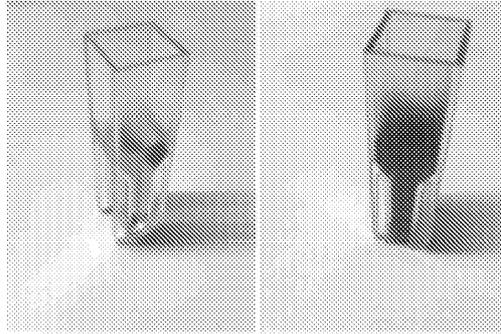
Ejemplo 5

- 10 La formulación A y el azul instantáneo como se describió anteriormente se usaron para teñir un gel de PAGE que contenía diversas concentraciones de BSA. La relación de la proteína teñida al fondo se midió mediante densitometría. Los resultados se muestran en las figuras 14a-c.
- La figura 14c muestra claramente que la formulación A puede detectar proteínas a concentraciones inferiores a 20 ng. Además, cada una de las figuras 14a, 14b y 14c demuestra las mejoras significativas en la relación señal/ruido obtenidas usando la composición de tinción según la invención.

REIVINDICACIONES

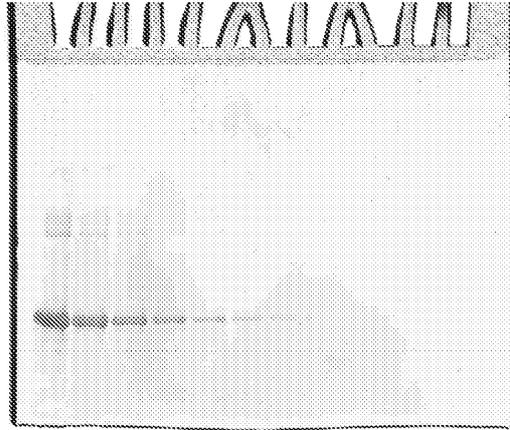
1. Una composición para separar una proteína de un detergente, comprendiendo dicha composición
 - a) celulosa en la que al menos algunos de los grupos hidroxilo libres se han funcionalizado con grupos alquilo, hidroxialquilo o carboxialquilo;
- 5 b) un oligómero cíclico seleccionado de un oligosacárido cíclico, calixareno, curcubiturilo, pillarareno o derivados de los mismos; y
 - c) un ácido α -hidroxicarboxílico que tiene un pKa de 4 o menos,en donde dicha composición no comprende un colorante complejante de proteínas.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en donde el oligómero cíclico se selecciona de ciclodextrina, ciclodextrano, ciclocurdlan, ciclomanina, ciclofructina, ciclogalactina o derivados de los mismos.
3. La composición de la reivindicación 2, en donde el oligómero cíclico es ciclodextrina.
4. La composición de la reivindicación 2, en donde la ciclodextrina es α -ciclodextrina.
5. La composición de cualquier reivindicación precedente, en donde el oligómero cíclico está presente en una cantidad de 0,1 a 10% p/v.
- 15 6. La composición de cualquier reivindicación precedente, en donde la celulosa es un derivado de celulosa seleccionado de hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa, preferiblemente en donde la celulosa es hidroxietilcelulosa, preferiblemente 2-hidroxietilcelulosa, y/o en donde la celulosa está presente en una cantidad de 0,05 a 2% p/v.
- 20 7. La composición de cualquier reivindicación precedente, que comprende además un alcohol, preferiblemente en una cantidad de 0,5 a 10% p/v.
8. La composición de la reivindicación 7, en donde el alcohol es etanol.
9. La composición de cualquier reivindicación precedente, en donde el ácido es ácido tartárico.
10. La composición de cualquier reivindicación precedente, en donde la composición es una disolución acuosa.
11. Un kit que comprende
- 25 i) una primera disolución que comprende la composición de la reivindicación 10, y
 - ii) una segunda disolución que comprende un colorante complejante de proteínas, por ejemplo un colorante Coomassie
12. Un método para detectar y/o cuantificar proteínas que comprende
 - i) poner en contacto una muestra que contiene proteína y detergente con una primera disolución que comprende
 - 30 a) celulosa en la que al menos algunos de los grupos hidroxilo libres se han funcionalizado con grupos alquilo, hidroxialquilo o carboxialquilo;
 - b) un oligómero cíclico seleccionado de un oligosacárido cíclico, calixareno, curcubiturilo, pillarareno o derivados de los mismos; y
 - c) un ácido α -hidroxicarboxílico que tiene un pKa de 4 o menos,en donde dicha disolución no comprende un colorante complejante de proteínas y en donde la muestra que contiene una proteína está en forma de un soporte que contiene la proteína;
- 35 ii) poner en contacto la muestra que contiene proteínas con una segunda disolución que comprende un colorante que forma complejos de proteínas en donde la muestra que contiene una proteína se elimina opcionalmente de la primera disolución antes de la etapa ii); y
- 40 iii) detectar y/o cuantificar la formación de un complejo colorante/proteína.
13. El método de la reivindicación 12, en donde las etapas i), ii) y iii) comprenden las etapas de
 - a) proporcionar un gel de electroforesis que contiene proteínas,
 - b) aplicar un campo eléctrico al gel,

- c) exponer el gel a la primera disolución,
 - d) opcionalmente eliminar el gel de la primera disolución,
 - e) exponer la muestra que contiene proteínas a una segunda disolución que contiene un colorante que forma complejos de proteínas, y
- 5 f) detectar y/o cuantificar la formación del complejo colorante/proteína, preferiblemente en el que el gel no se lava después de la etapa b) y antes de la etapa c).
14. El método de la reivindicación 12, en donde el soporte es una matriz de gel.
15. Una composición para la detección de proteínas que comprende
- a) un colorante complejante de proteínas;
- 10 b) un oligómero cíclico seleccionado de un oligosacárido cíclico, calixareno, curcubiturilo, pilarareno o derivados de los mismos;
- c) un ácido α -hidroxicarboxílico que tiene un pKa de 4 o menos; y
 - d) celulosa en la que al menos algunos de los grupos hidroxilo libres se han funcionalizado con grupos alquilo, hidroxialquilo o carboxialquilo.
- 15 16. Un método para detectar y/o cuantificar proteínas que comprende poner en contacto una muestra que contiene proteínas que también comprende detergente con una composición según la reivindicación 15, y detectar y/o cuantificar la formación de un complejo colorante/proteína.
17. El método de la reivindicación 16, en donde la muestra que contiene una proteína está en forma de un soporte que contiene la proteína, en donde el soporte es un gel de electroforesis, comprendiendo el método las etapas de
- 20 i) proporcionar un gel que contiene proteínas,
- ii) aplicar un campo eléctrico al gel,
 - iii) exponer el gel a una composición según la reivindicación 15, y
 - iv) detectar y/o cuantificar la formación del complejo colorante/proteína, preferiblemente en donde el gel no se lava después de la etapa ii) y antes de la etapa iii).



1a

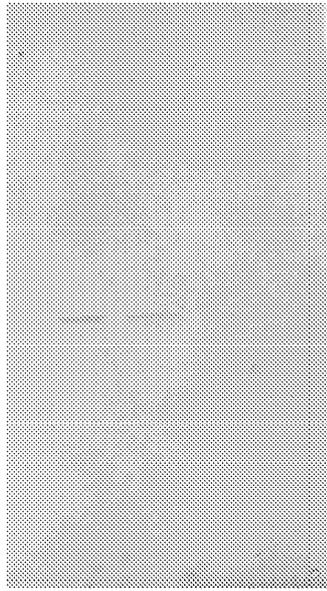
1b



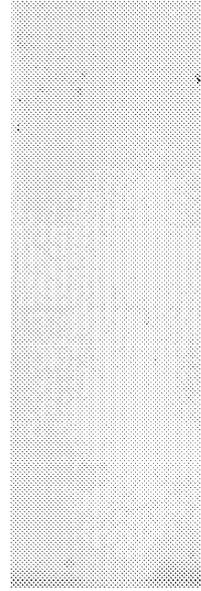
2



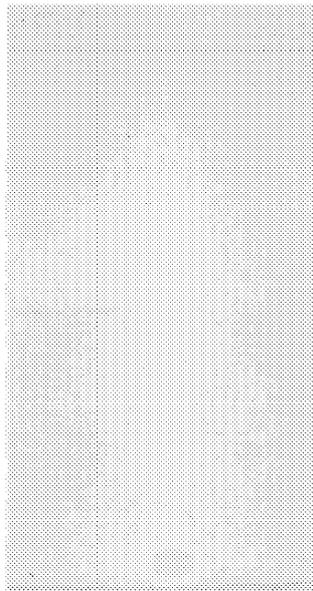
3



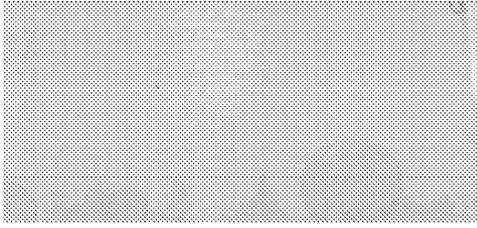
4



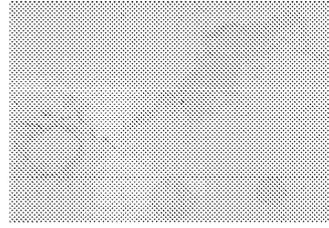
5



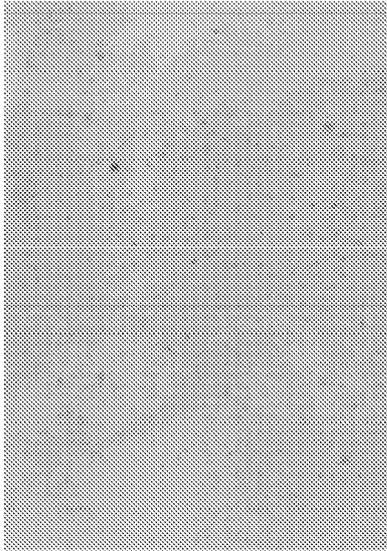
6



7



8



9

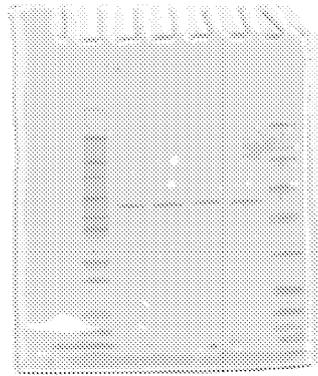


10

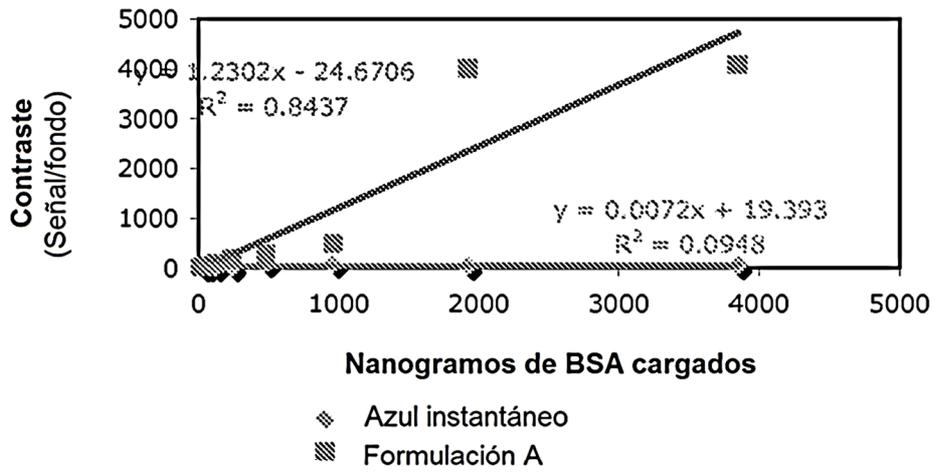


11

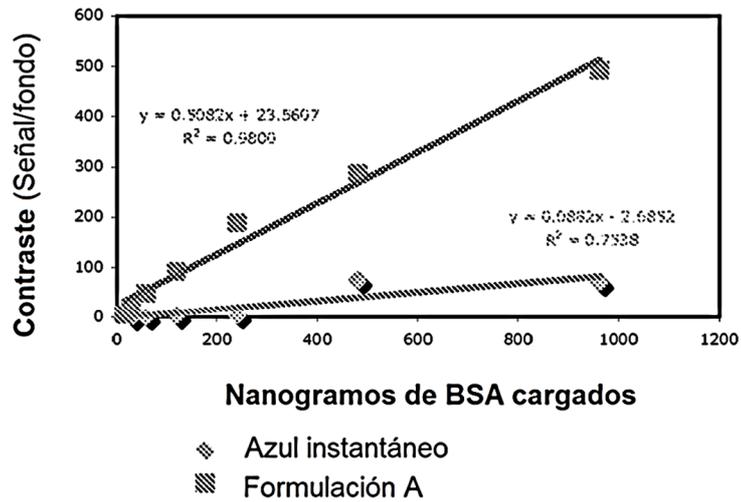
12



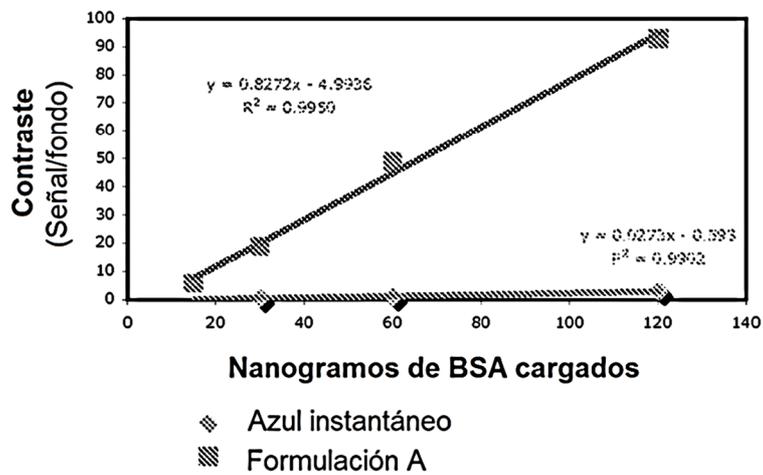
13



14a



14b



14c