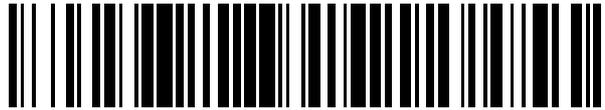


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 156**

51 Int. Cl.:

G01N 27/447 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2005 E 05291001 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012 EP 1596192**

54 Título: **Procedimiento de separación de proteínas por electroforesis capilar y composiciones tampón para electroforesis capilar**

30 Prioridad:

10.05.2004 FR 0405039

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

05.03.2013

73 Titular/es:

**SEBIA (100.0%)
PARC TECHNOLOGIQUE LEONARD DE VINCI,
RUE LEONARD DE VINCI
91090 LISSES, FR**

72 Inventor/es:

**ROBERT, FRÉDÉRIC y
SIMONIN, DENIS**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 397 156 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

Procedimiento de separación de proteínas por electroforesis capilar y composiciones tampón para electroforesis capilar.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la separación de proteínas y péptidos por electroforesis capilar, así como a unas composiciones tampón que comprenden un aditivo útil para esta separación, en presencia de lipoproteínas en la muestra.

10 Es conocido analizar el índice de proteínas en líquidos biológicos como el suero, con objetivos analíticos y en particular diagnósticos, y habitualmente separar unas proteínas por electroforesis, tanto en electroforesis sobre gel como electroforesis capilar. Uno de los intereses de la electroforesis capilar reside en el hecho de que se necesitan cantidades muy pequeñas de líquidos biológicos a analizar. Además, la separación mediante esta técnica puede ser muy rápida, en la medida en la que se pueden utilizar fuertes voltajes sin que la muestra se caliente demasiado durante la separación.

15 Para la separación de las proteínas séricas, se efectúa clásicamente la electroforesis capilar con unos tampones alcalinos. Habitualmente, los perfiles proteicos obtenidos comprenden cinco o seis fracciones que corresponden a los constituyentes proteicos que son la fracción albúmina, las fracciones α_1 - y α_2 -globulina, la fracción β -globulina o las fracciones β_1 - y β_2 -globulina, y la fracción γ -globulina. Cada una de estas fracciones comprende una o varias proteínas séricas.

20 Dichas separaciones se pueden realizar mediante electroforesis capilar, en particular con la ayuda de tampones de análisis y técnicas tales como se describen en las patentes US Re 36 011, EP 518 475, o EP 1 229 325 y EP 1 258 724.

La separación de las proteínas séricas es, sin embargo, insatisfactoria.

30 En efecto, por "constituyente proteico", se entiende en este caso no sólo los constituyentes proteicos que son las fracciones α_1 ; α_2 ; β - o β_1 - y β_2 - y γ -globulina, sino también los constituyentes lipoproteicos que son principalmente las α -lipoproteínas, β -lipoproteínas y pre- β -lipoproteínas también denominadas HDL, LDL y VLDL por "High Density Lipoproteine", "Low Density Lipoproteine" y "Very Low Density Lipoproteine". Ahora bien, los perfiles son a veces imprecisos especialmente a causa de estas lipoproteínas, y principalmente de la β -lipoproteína y la pre- β -lipoproteína, que aparecen en la zona de los perfiles que corresponden a las α_1 - y α_2 -globulinas y β_1 -globulina.

35 La solicitante ha puesto de manifiesto ahora que, utilizando un surfactante aniónico, como un aditivo en el tampón de análisis, será posible obtener una separación mejorada, y especialmente un perfil limpio en la zona de las α_1 -, α_2 - y β -globulinas del perfil electroforético. Estos aditivos se seleccionan de entre los surfactantes aniónicos capaces de interacciones hidrófobas con uno o varios constituyentes lipoproteicos, y en particular los residuos hidrófobos de las lipoproteínas. Pueden aportar a este o a estos constituyentes lipoproteicos una o varias cargas negativas. Pueden modificar, y en particular disminuir, la movilidad electroforética con respecto a la de los demás constituyentes proteicos.

45 A bajas concentraciones en aditivo utilizadas según la invención, concentraciones muy bajas con respecto a las concentraciones utilizadas para estos aditivos en otras aplicaciones, los perfiles obtenidos en electroforesis capilar pueden presentar unos picos más puros, exentos de apoyo en particular en lo que se refiere a las fracciones α_1 y α_2 , como aparece en los ejemplos. Esto tiene un gran interés para la explotación de los perfiles de muestras de suero hiperlipémicas en particular, y presenta un cierto interés también durante el análisis de muestras normolipémicas.

50 Así, la invención se refiere a un procedimiento de electroforesis capilar en disolución libre a pH alcalino para el análisis de muestras que comprenden constituyentes proteicos, entre ellos uno (o unos) constituyente(s) lipoproteico(s) según la reivindicación 1.

55 Este aditivo es capaz de aportar a este (estos) constituyente(s) lipoproteico(s) una o varias cargas negativas y modificar la movilidad electroforética, con respecto a la de los demás constituyentes proteicos, no lipídicos.

Esta etapa está generalmente seguida de la separación de los constituyentes proteicos por migración y detección de los constituyentes.

60 Se describe asimismo un procedimiento de separación por electroforesis de los constituyentes proteicos de muestras que comprenden por lo menos albúmina y las fracciones α_1 -, α_2 - y β -globulina, así como unas lipoproteínas, en un tampón de análisis, en el que el tampón de análisis comprende además por lo menos un aditivo surfactante aniónico capaz de interacción hidrófoba con las lipoproteínas.

65 Se describe asimismo un procedimiento de separación electroforética, por electroforesis capilar a pH alcalino en

disolución libre, de los constituyentes proteicos de una muestra líquida que comprende unas lipoproteínas, procedimiento en el que se hace pasar la muestra que comprende dichos constituyentes por un capilar que contiene un tampón de análisis que comprende además por lo menos un aditivo capaz de interactuar específicamente con las lipoproteínas; el aditivo puede ser un surfactante aniónico que comprende una parte hidrófoba, como una cadena alquilo de C₁₀ a C₂₀, y una parte aniónica que aporta una carga negativa fuerte a un pH superior a 9.

El aditivo de tipo surfactante aniónico se utiliza a concentraciones bajas en el tampón, de manera que la interacción sigue baja sobre la albúmina y los demás constituyentes proteicos no lipídicos y particularmente centrada en las lipoproteínas, lo cual se denomina en la presente memoria "específico a las lipoproteínas". En efecto, para una interacción específica de este tipo con las lipoproteínas, es preferible utilizar el aditivo de tipo surfactante aniónico a concentraciones bajas. Estas concentraciones dependen, para cada surfactante aniónico, de su afinidad para las lipoproteínas, por un lado, y de su afinidad para la albúmina y los otros constituyentes proteicos no lipídicos, por otro lado. La concentración óptima es así diferente para cada surfactante. Puede ser del orden de menos de 1 mM en el tampón, por ejemplo del orden de 0,001 a 0,2 mM, preferiblemente superior a 0,01 e inferior a 0,1 mM, por ejemplo estar comprendida entre 0,01 mM y 0,09 mM, por ejemplo.

La solicitante ha constatado, en particular para el SDS, que una concentración de aproximadamente 0,05 mM no conlleva un desplazamiento suficiente de los constituyentes lipoproteicos, y que una concentración superior a 0,2 mM deforma los perfiles (disminución de las fracciones β_2 y α_1 a 0,25 mM), e incluso conduce, a 0,5 mM, a una deformación total de los perfiles.

Así, los compuestos útiles como aditivo para tampón de análisis en electroforesis capilar de la invención capaces de interacción hidrófoba específica con las lipoproteínas pueden ser unos surfactantes aniónicos tales como los utilizados en MECC (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography), pero a una concentración claramente inferior a su concentración micelar crítica. En la presente invención, estos compuestos se utilizan en EC en disolución libre como se ha indicado anteriormente, hay una aportación de cargas negativas sobre las lipoproteínas por interacción hidrófoba entre los residuos hidrófobos de estas lipoproteínas y la parte hidrófoba de estos compuestos, dando como resultado una migración ralentizada de estas lipoproteínas con respecto a la de las demás proteínas. Una de las consecuencias es la separación mejorada de las fracciones α_1 , α_2 y β_1 , migrando las lipoproteínas fuera de las zonas a las que migran habitualmente, es decir en las zonas α_1 , α_2 y β_1 . Se utilizan asimismo a una concentración inferior a las concentraciones descritas en EP 1 229 325.

Además, la invención se refiere a la utilización de una composición para la electroforesis capilar según la reivindicación 19. En un soporte aceptable, en presencia de por lo menos un tampón, se describe que un aditivo del tipo surfactante aniónico tal como se ha definido anteriormente, es capaz de hacer migrar las lipoproteínas fuera de las zonas a las que migran habitualmente, en particular fuera de las zonas de las fracciones α_1 , α_2 y β_1 .

Como aparece en los ejemplos, la utilización de aditivos según la invención permite una separación muy mejorada de las fracciones proteicas α_1 , α_2 y β_1 , por desplazamiento de las lipoproteínas fuera de la zona propia de estas fracciones. Permite así mejorar la exactitud y precisión del análisis cuantitativo de las proteínas séricas, con respecto a los análisis realizados con los tampones habituales. Los aditivos son particularmente útiles para el análisis de muestras biológicas ricas en β -lipoproteína y pre- β -proteína.

Por último, la invención tiene por objeto la utilización de un estuche (o kit) de análisis de los constituyentes proteicos en una muestra biológica, según la reivindicación 24.

En este kit, el tampón y el o los aditivo(s) y diluyente(s) pueden ser almacenado(s) separadamente para ser mezclados extemporáneamente, o almacenados en mezcla. Este kit comprende eventualmente unas indicaciones de utilización para realizar el análisis.

Otras características y ventajas de la invención aparecerán con la lectura de la descripción detallada siguiente de los ejemplos y figuras anexas.

La figura 1 representa un electroforegrama de un suero humano analizado por electroforesis capilar utilizando un tampón según el documento EP 1 229 325.

La figura 2 representa un electroforegrama del mismo suero analizado por electroforesis capilar utilizando el mismo tampón, que comprende, sin embargo, además un aditivo surfactante aniónico según la invención.

Las figuras 3A, 3B, 3C y 3D representan los electroforegramas de un mismo suero normolipémico, realizados por EC utilizando un mismo tampón adicionado con 0; 0,05; 0,07 y 0,25 mM de SDS respectivamente.

Las figuras 4A, 4B, 4C y 4D representan los electroforegramas de un mismo suero hiperlipémico, realizados en EC utilizando un mismo tampón adicionado con 0; 0,05; 0,07 y 0,25 mM de SDS respectivamente.

Las condiciones de realización de una electroforesis capilar EC son conocidas por el experto en la materia. Pueden comprender habitualmente un lavado de los capilares mediante una disolución de lavado, un lavado con tampón de análisis, una o más disoluciones eventuales de la muestra, la inyección de la muestra, la migración y la detección. Estas etapas pueden ser realizadas por autómatas.

5 Unas condiciones de realización de una electroforesis capilar son, por ejemplo, las condiciones apropiadas para utilizar el autómata Capillarys (SEBIA).

10 A título de aditivo para tampón útil según la invención y capaz de interacción con la parte hidrófoba de las lipoproteínas, se pueden citar los compuestos que comprenden un polo aniónico que aporta una carga negativa fuerte a pH alcalino y una parte hidrófoba.

15 La cadena alquilo hidrófoba puede estar compuesta por lo menos por una cadena alquilo de C₁₀ a C₂₄, ramificada o no, que comprende por lo menos una parte lineal de aproximadamente 10 átomos de carbono, en particular 10 a 20 átomos de carbono. Como lo entenderá fácilmente por el especialista, esta parte hidrófoba podrá comprender unos residuos o funciones que no modifican esencialmente su carácter hidrófobo.

20 El polo aniónico puede estar constituido por uno o varios de los grupos o funciones químicas de la lista siguiente; sulfonatos, carboxilatos, sulfatos y fosfatos.

Se pueden citar así, en particular, los surfactantes aniónicos como los alquil C₁₀-C₂₄-mono-, di- o tri-sulfatos, los alquil C₁₀-C₂₄-mono-, di- o tri-sulfonatos, los alquil C₁₀-C₂₄-mono-, di- o tri-carboxilatos, los alquil C₁₀-C₂₄-mono-, di- o tri-fosfatos y los alquil C₁₀-C₂₄-carboxi-sulfonatos, -sulfatos y -fosfatos, y en particular los alquil C₁₀-C₂₄-sulfatos.

25 Los di- y tri-carboxilatos, di- y tri-sulfonatos, di- o tri-sulfatos y di- o tri-fosfatos, y carboxi-sulfonatos, -sulfatos y -fosfatos anteriores son así unas combinaciones de una o varias funciones carboxilatos, sulfatos, sulfonatos o fosfatos sobre unas cadenas alquilo de 10 a 24 átomos de carbono.

30 Entre los tensioactivos aniónicos citados anteriormente, se prefieren los monoalquil C₁₀-C₂₄-sulfatos, particularmente los alquil C₁₀ a C₂₀-sulfatos, y entre estos los alquil C₁₀ a C₁₆-sulfatos.

Estos compuestos son conocidos en sí y están disponibles en el comercio. Pueden estar en forma ácida o en forma de sales, en particular sales de metales alcalinos.

35 Se prefieren particularmente el dodecilsulfato y más precisamente el dodecilsulfato de sodio (SDS).

En las denominaciones anteriores, los radicales alquilo son preferentemente lineales.

Los aditivos del tipo surfactantes aniónicos definidos anteriormente pueden además ser utilizados en mezcla.

40 Además, los aditivos de tipo surfactante aniónico pueden ventajosamente ser utilizados en presencia de otros aditivos conocidos para interactuar con la albúmina, mejorando la distancia entre α_1 -globulina y la albúmina, tales como se describen en el documento EP 1 229 325.

45 Entre los aditivos citados en el documento EP 1 229 325 anterior para su interacción con la albúmina, se prefieren los alquil C₆ a C₁₀-sulfonatos, y entre los alquil C₆-C₁₀-sulfonatos, se prefiere particularmente el octanosulfonato que mejora notablemente la legibilidad de los perfiles frente a la separación entre la α_1 -globulina y la albúmina.

50 Por muestra según la invención, se entiende la muestra biológica a analizar, previamente diluida con una disolución de dilución apropiada o del tampón de análisis, por ejemplo, o puro.

55 Como muestra, se puede analizar cualquier líquido biológico de pacientes sanos o enfermos. Así, los líquidos biológicos humanos pueden ser un suero normal o no, y también sangre hemolizada, plasma, orina, o fluido cerebroespinal. Además de las muestras biológicas humanas, se pueden analizar unas muestras de origen animal. Las muestras pueden también ser unas proteínas sintéticas, y el procedimiento de la invención puede entonces tener objetivos de control de producción por ejemplo.

60 Los aditivos según la invención son particularmente útiles para los análisis de suero, y la separación de proteínas séricas en unas muestras humanas.

65 En las muestras de suero, las proteínas séricas a separar son la albúmina y las fracciones α_1 -; α_2 -; y β (o β_1 - y β_2 -); y γ -globulina, y las α -lipoproteínas, β -lipoproteínas y pre- β -lipoproteínas, particularmente, las β -lipoproteínas y las pre- β -lipoproteínas. Estas denominaciones pueden incluir los constituyentes proteicos de todos los sub-tipos de estas clases.

A título de tampón de análisis, se puede utilizar cualquier tampón de análisis conocido, adaptado para la separación deseada y útil en electroforesis en general, y en electroforesis capilar en particular. A título de ejemplos, se pueden citar los tampones borato, fosfato y carbonato, los tampones a base de aminoácidos y los tampones denominados biológicos. Se puede citar en particular el tampón Capillarys B1B2+ (SEBIA).

Como tampón biológico, se pueden citar los tampones conocidos bajo los nombres de Bis-TRIS (2-bis[2-hidroxietil]amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol), ADA (ácido N-[2-acetamido]-2-iminodiacético), ACES (ácido 2-[2-acetamino]-2-aminoetanosulfónico), PIPES (ácido 1,4-piperazindietanosulfónico), MOPSO (ácido 3-[N-morfolino]-2-hidroxiopropanosulfónico), Bis-TRIS PROPANO (1,3-bis[tris(hidroximetil)metilaminopropano]), BES (ácido N,N-bis[2-hidroxietil]-2-aminoetanosulfónico), MOPS (ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico), TES (ácido 2-[2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etilamino]etanosulfónico), HEPES (ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-(2-etano-sulfónico)), DIPSO (ácido 3-N,N-bis[2-hidroxietil]amino-2-hidroxiopropanosulfónico), MOBS (ácido 4-N-morfolinobutanosulfónico), TAPSO (ácido 3[N-tris-hidroximetil-metilamino]-2-hidroxiopropanosulfónico), TRIS (2-amino-2-[hidroximetil]-1,3-propanodiol), HEPPSO (ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[2-hidroxiopropanosulfónico]), POPSO (ácido piperazin-N,N'-bis[2-hidroxiopropanosulfónico]), TEA (trietanolamina), EPPS (ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[3-propano-sulfónico]), TRICINE (N-tris[hidroximetil]metilglicina), GLY-GLY (diglicina), BICINE (N,N-bis[2-hidroxietil]-glicina), HEPBS (ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[4-butanesulfónico]), TAPS (ácido N-tris[hidroximetil]metil-3-aminopropanosulfónico), AMPD (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol), TABS (ácido N-tris[hidroximetil]metil-4-amino-butano-sulfónico), AMPSO (ácido 3-[(1,1-dimetil-2-hidroxietil)amino]-2-hidroxiopropanosulfónico), CHES (ácido 2-(N-ciclohexilamino)etanosulfónico), CAPSO (ácido 3-[ciclo-hexilamino]-2-hidroxi-1-propanosulfónico), AMP (2-amino-2-metil-1-propanol), CAPS (ácido 3-ciclohexilamino-1-propano-sulfónico) o CABS (ácido 4-[ciclohexilamino]-1-butanesulfónico), preferiblemente AMPD, TABS, AMPSO, CHES, CAPSO, AMP, CAPS o CABS.

En electroforesis capilar a pH alcalino, el pH del tampón de análisis está comprendido entre 8 y 12, preferiblemente entre 9 y 11, y de manera más particularmente preferida tiene un valor de aproximadamente 10.

Los tampones de análisis según la invención pueden comprender además por lo menos un compuesto que modifica el pH. A título de modificador de pH, se puede utilizar un compuesto seleccionado de entre el hidróxido de litio, el hidróxido de sodio, el hidróxido de potasio, el hidróxido de rubidio, el hidróxido de cesio, el hidróxido de francio, un hidróxido de mono-, di-, tri- o tetra-alquilamonio que tiene de 1 a 8 átomos de carbono en la parte alquilo.

Según la invención, los tampones de análisis se utilizan en las condiciones y a las concentraciones habituales, a saber del orden de 10 a 500 mM, preferentemente 20 a 400 mM.

Los aditivos según la invención se utilizan a las concentraciones definidas anteriormente, bajas con respecto a las concentraciones descritas en el documento EP 1 229 325 en el marco de su interacción con la albúmina. De manera general, es del orden de 0,001 a 0,2 mM, preferiblemente 0,01 a 0,09 mM, y en el caso del SDS, es inferior a la que provocaría una interacción demasiado alta con la albúmina y los otros constituyentes proteicos no lipídicos, es decir que perturbaría de manera demasiado importante el perfil.

Los aditivos dedicados más específicamente, de manera conocida, a la interacción con la albúmina se utilizan a concentraciones que van de 0,1 mM a 500 mM, sin exceder su concentración micelar crítica en el tampón de análisis. Este valor de concentración micelar crítica interviene para los aditivos que son unos surfactantes.

Cuando se utiliza el octanosulfonato, su concentración en el tampón es del orden de 1 a 10 mM, y preferentemente 2,5 a 5 mM.

Su utilización en presencia de SDS puede permitir oponerse al efecto del SDS sobre el desplazamiento de los picos, en particular en la zona albúmina.

Además, el tampón puede comprender uno o más aditivos propios para aumentar la fuerza iónica.

A título de dicho aditivo para tampón capaz de aumentar la fuerza iónica del electrolito, se pueden citar los compuestos seleccionados de entre los cloruros, sulfatos, sulfonatos, carbonatos, carboxilatos, fluoruros o fosfatos de metales alcalinos, y sus mezclas. Entre ellos, se prefieren los cloruros, sulfatos o sulfonatos, de metales alcalinos, y sus mezclas.

De manera aún más preferida, se utiliza el sulfato. Preferentemente, se seleccionan las sales de sodio, litio o potasio. Entre los aditivos citados anteriores, se prefiere el sulfato de sodio y/o de litio.

Las composiciones tampón de la invención se preparan de manera habitual para composiciones tampón de análisis, a saber por adición de los constituyentes en forma líquida, o sólida a diluir, a un soporte aceptable. De manera habitual, el soporte es agua, destilada o desmineralizada.

Desde el punto de vista de los materiales utilizados para los capilares, éstos son habituales en electroforesis capilar. Así, se pueden utilizar unos capilares de sílice fundida. Su diámetro interno puede ir de 5 a 2000 μm . De manera

preferida, se utilizan según la invención unos capilares de diámetro interno inferior a 200 μm , de preferencia inferior a 100 μm . Preferentemente, se utilizan unos capilares de superficie interior no tratada. El especialista sabrá adaptar la naturaleza del capilar y su tamaño a las necesidades del análisis.

5 Ejemplos

MATERIAL Y MÉTODOS

A) electroforesis capilar

10 La electroforesis capilar de muestras clínicas se realiza sobre un aparato de EC equipado con un capilar de sílice fundida de diámetro interno de 25 micrones. La detección se realiza a 200 nm. Las muestras están colocadas en la bandeja de muestras del aparato Capillarys (SEBIA) y las muestras son inyectadas automáticamente por inyección hidrodinámica. La separación de las muestras se realiza en menos de 5 minutos aplicando un campo eléctrico de aproximadamente 400 V/cm. El capilar se lava antes de cada análisis por sosa 0,25 M, y después por el tampón de análisis.

Tampones de análisis:

20 Los productos químicos utilizados son de grado analítico.

El tampón borato 150 mM se prepara disolviendo 9,3 g de ácido bórico (masa molar: 61,83 g/mol) en 1 l de agua desmineralizada, y 5,1 g de sosa (masa molar: 40,0 g/mol). La concentración final es de 150 mM y el pH de 10,0.

25 B) Muestras clínicas:

Para el EC, el suero humano se diluye a 1/5^o en el tampón de análisis.

Ejemplo 1 (comparativo)

30 Un tampón de análisis borato se prepara como anteriormente.

La electroforesis se ha realizado según el método anterior sobre un suero humano hiperlipémico (triglicéridos: 5,73 g/l).

35 Como aparece en la figura 1, el electroforegrama obtenido presenta, de izquierda a derecha, seis picos sucesivos atribuidos respectivamente a las fracciones albúmina y α_1 , α_2 , β_1 , β_2 y γ -globulina.

Fracción	%
Albúmina	52,3
Alfa 1	9,7
Alfa 2	9,6
Beta 1	6,4
Beta 2	7,8
Gama	14,2

40 Ejemplo 2

Al tampón de análisis del ejemplo 1, se añade SDS a una concentración de 0,07 M.

La electroforesis se ha realizado como en el ejemplo 1.

45 Como aparece en la figura 2, el electroforegrama obtenido presenta, de izquierda a derecha, seis picos sucesivos atribuidos respectivamente a las fracciones albúmina y α_1 , α_2 , β_1 , β_2 y γ -globulina. Por comparación con el resultado del ejemplo 1, la separación entre las dos fracciones está claramente mejorada. En efecto, el pico señalado por una flecha y apoyado sobre el pico alfa-1 (que corresponde a las pre- β -lipoproteínas) se elimina del perfil.

50

Fracción	%
Albúmina	57,7
Alfa 1	3,9
Alfa 2	9,1
Beta 1	6,2
Beta 2	7,6
Gamma	15,5

Ejemplo 3

La electroforesis de un suero humano normolipémico (triglicéridos: 1,10 g/l) se ha realizado como en los ejemplos anteriores añadiendo SDS al tampón a una concentración de 0,00; 0,05; 0,07 y 0,25 mM.

5 Los electroforegramas obtenidos presentan de izquierda a derecha seis picos sucesivos atribuidos respectivamente a las fracciones albúmina y α_1 , α_2 , β_1 , β_2 y γ -globulina. La tabla siguiente recoge los resultados obtenidos.

FRACCIÓN	%			
	Concentración SDS (mM)			
	0,00 fig. 3A	0,05 fig. 3B	0,07 fig. 3C	0,25 fig. 3D
Albúmina	50,4	50,5	49,1	52,4
α_1	6,5	5,2	6,0	7,3
α_2	16,2	17,9	18,3	16,5
β_1	6,2	5,0	4,9	4,1
β_2	5,4	4,9	4,8	2,3
γ	15,3	16,5	16,9	17,4
		Ligera interferencia lipídica sobre pico albúmina	Sin interferencia	Deformación fracción α_1 ; Ligero apoyo sobre pico albúmina; disminución de la fracción β_2

10 **Ejemplo 4**

Se ha procedido como en el ejemplo 3 con un suero humano hiperlipémico (triglicéridos: 5,63 g/l). Los electroforegramas obtenidos presentan de izquierda a derecha seis picos sucesivos atribuidos respectivamente a las fracciones albúmina y α_1 , α_2 , β_1 , β_2 y γ -globulina. La tabla siguiente recoge los resultados obtenidos.

15

FRACCIÓN	%			
	Concentración SDS (mM)			
	0,00 fig. 4A	0,05 fig. 4B	0,07 fig. 4C	0,25 fig. 4D
Albúmina	54,7	59,1	57,2	58,7
α_1	9,7	4,9	5,6	5,9
α_2	7,9	8,3	8,6	7,2
β_1	5,0	5,0	4,9	3,7
β_2	3,4	3,2	3,4	1,8
γ	19,3	19,5	20,3	22,7
	Interferencia lipídica; apoyo sobre α_1	Apoyo sobre pico albúmina	Sin interferencia	Interferencia sobre pico albúmina; deformación de la fracción α_1 ; disminución de la fracción β_2 .

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de electroforesis capilar en disolución libre a pH alcalino para el análisis de muestras que comprende unos constituyentes proteicos entre los cuales hay uno (o unos) constituyente(s) lipoproteico(s), siendo los constituyentes proteicos la albúmina y las fracciones α_1 -, α_2 -, β - o (β_1 - y β_2 -), γ -globulina, y siendo los constituyentes lipoproteicos la α -lipoproteína, la β -lipoproteína y/o la pre- β -lipoproteína, caracterizado porque comprende por lo menos una etapa en la que:
- 10 se introduce la muestra en un tubo capilar que contiene un tampón de análisis, comprendiendo dicho tampón de análisis además por lo menos un aditivo de tipo surfactante aniónico capaz de interacción hidrófoba con el (o los) constituyente(s) lipoproteico(s), y de modificar su movilidad electroforética, con respecto a la de los otros constituyentes proteicos,
- 15 comprendiendo dicho aditivo una parte hidrófoba compuesta por lo menos por una cadena alquilo de C_{10} a C_{24} , ramificada o no, que comprende una parte lineal de por lo menos 10 átomos de carbono, y un polo aniónico constituido por uno o varios grupos seleccionado(s) de entre los sulfonatos, carboxilatos, sulfatos o fosfatos, siendo la concentración en aditivo en el tampón superior a 0,001 mM e inferior a 0,1 mM.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende además la separación de los constituyentes por migración y la detección de estos constituyentes.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la muestra es biológica.
- 25 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la muestra es una muestra de suero, sangre hemolizada, plasma, orina o líquido cefalorraquídeo.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque los constituyentes son séricos.
- 30 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque dicho aditivo comprende un polo aniónico con un pH superior a 9 y una parte hidrófoba.
- 35 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque dicho aditivo se selecciona de entre los surfactantes aniónicos como los alquil C_{10} - C_{24} -mono-, di- o tri-sulfatos, los alquil C_{10} - C_{24} -mono-, di- o tri-sulfonatos, los alquil C_{10} - C_{24} -mono-, di- o tri-carboxilatos, los alquil C_{10} - C_{24} -mono-, di- o tri-fosfatos y los alquil C_{10} - C_{24} -carboxi-sulfonatos, -sulfatos y -fosfatos, y en particular los alquilsulfatos C_{10} a C_{24} .
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el aditivo es un alquil C_{10} - C_{20} -sulfato.
- 40 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el aditivo es el dodecilsulfato de sodio.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque la concentración en aditivo en el tampón está comprendida entre 0,01 mM y 0,09 mM.
- 45 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque la concentración de aditivo en el tampón es del orden de 0,07 mM.
- 50 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque el tampón comprende además un aditivo de tipo octanosulfonato, a una concentración en dicho tampón comprendida entre 1 mM y 10 mM, preferiblemente entre 2,5 y 5 mM.
- 55 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque el pH de dicho tampón de análisis está comprendido entre 9 y 11.
14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque el capilar es de sílice fundida.
- 60 15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque el tampón de análisis comprende además por lo menos un modificador de pH.
- 65 16. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque el modificador de pH se selecciona de entre el hidróxido de litio, el hidróxido de sodio, el hidróxido de potasio, el hidróxido de rubidio, el hidróxido de cesio, el hidróxido de francio, un hidróxido de mono-, di-, tri- o tetra-alquil-amonio que tiene de 1 a 8 átomos de carbono en la parte alquilo.

- 5 17. Procedimiento de separación electroforética según la reivindicación 1, mediante electroforesis capilar a pH alcalino en disolución libre, de los constituyentes proteicos de una muestra líquida, procedimiento en el que se hace pasar la muestra que comprende dichos constituyentes por un capilar que contiene un tampón de análisis capaz de interactuar con las lipoproteínas que comprenden además por lo menos un aditivo, siendo el aditivo un compuesto que comprende un polo aniónico cargado negativamente a un pH superior a 9 y una parte hidrófoba que comprende por lo menos una cadena alquilo de C₁₀ a C₂₀, y siendo la concentración en aditivo en el tampón superior a 0,001 mM e inferior a 0,1 mM.
- 10 18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado porque el tampón de análisis comprende además sulfato de sodio o de litio.
- 15 19. Utilización de una composición para la electroforesis capilar en disolución libre a pH alcalino para el análisis de muestras que comprende unos constituyentes proteicos de los cuales uno (o unos) constituyente(s) proteico(s) es (son) la albúmina y las fracciones α_1 -, α_2 -, β - o (β_1 - y β_2 -), γ -globulina y unos constituyentes lipoproteicos α -lipoproteína, β -lipoproteína y/o pre- β -lipoproteína, comprendiendo dicha composición por lo menos un tampón y además por lo menos un aditivo capaz de interacción hidrófoba con las lipoproteínas en un soporte aceptable, comprendiendo el aditivo una parte hidrófoba compuesta por lo menos por una cadena alquilo de C₁₀ a C₂₄, ramificada o no, que comprende por lo menos una cadena lineal de 10 átomos de carbono, y un polo aniónico constituido por uno o varios grupos seleccionado(s) de entre los sulfonatos, carboxilatos, sulfatos y fosfatos, siendo la concentración en aditivo en el tampón superior a 0,001 mM e inferior a 0,1 mM.
- 20 20. Utilización según la reivindicación 19, caracterizada porque dicho aditivo se selecciona de entre los surfactantes aniónicos como los alquil C₁₀-C₂₄-mono-, di- o tri-sulfatos, los alquil C₁₀-C₂₄-mono, di- o tri-sulfonatos, los alquil C₁₀-C₂₄-mono-, di- o tri-carboxilatos, alquil C₁₀-C₂₄-mono-, di- o tri-fosfatos y alquil C₁₀-C₂₄-carboxi-sulfonatos, -sulfatos y -fosfatos, y en particular los alquilsulfatos C₁₀ a C₂₄.
- 25 21. Utilización según una de las reivindicaciones 19 o 20, caracterizada porque dicho aditivo se selecciona de entre los surfactantes aniónicos alquilsulfatos C₁₀ a C₂₀, y sus mezclas.
- 30 22. Utilización según una de las reivindicaciones 19 a 21, caracterizada porque el aditivo es un alquilsulfato C₁₀ a C₁₆.
- 35 23. Utilización según una de las reivindicaciones 19 a 22, caracterizada porque el aditivo es el dodecilsulfato de sodio.
- 40 24. Utilización de un estuche de análisis de constituyentes proteicos en una muestra biológica, para la electroforesis capilar en disolución libre a pH alcalino para el análisis de muestras que comprenden unos constituyentes proteicos de los cuales uno (o unos) constituyente(s) proteico(s) es (son) la albúmina y las fracciones α_1 -, α_2 -, β - o (β_1 - y β_2 -), γ -globulina y unos constituyentes lipoproteicos α -lipoproteína, β -lipoproteína y/o pre- β -lipoproteína, con la ayuda de una composición según una de las reivindicaciones 19 a 23, comprendiendo dicho estuche por lo menos un tampón de análisis y un aditivo de tipo surfactante aniónico, capaz de hacer migrar las lipoproteínas fuera de las zonas a las que migran habitualmente, en particular fuera de las zonas de las fracciones α_1 , α_2 y β_1 y/o que comprende una parte hidrófoba, como una cadena alquilo de C₁₀ a C₂₀, y una parte aniónica que aporta una carga negativa fuerte a un pH superior a 9, siendo la concentración en aditivo en el tampón superior a 0,001 mM e inferior a 0,1 mM después de la eventual mezcla del tampón y del aditivo; y
- 45 una (o unas) disolución(es) de lavado de los capilares y/o uno (o unos) diluyente(s) apropiado(s) y/o unas tiras de dilución.

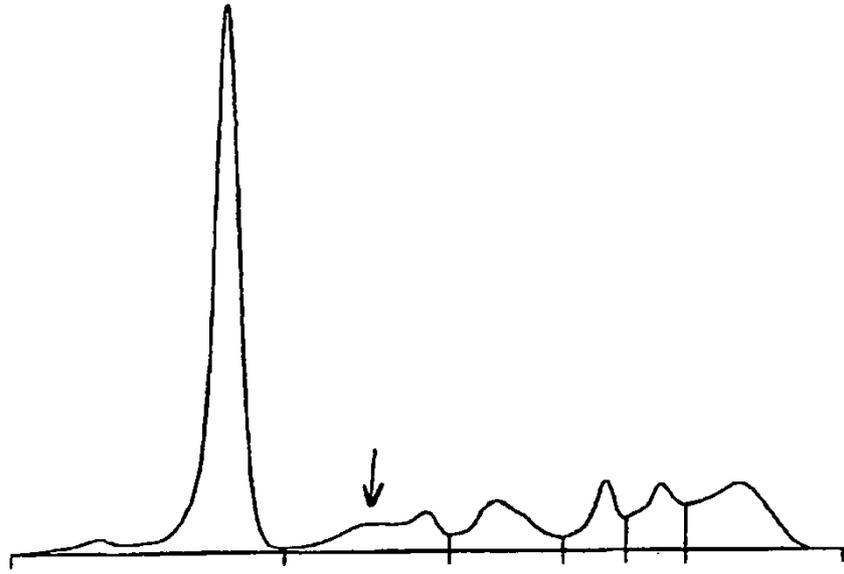


Fig. 1

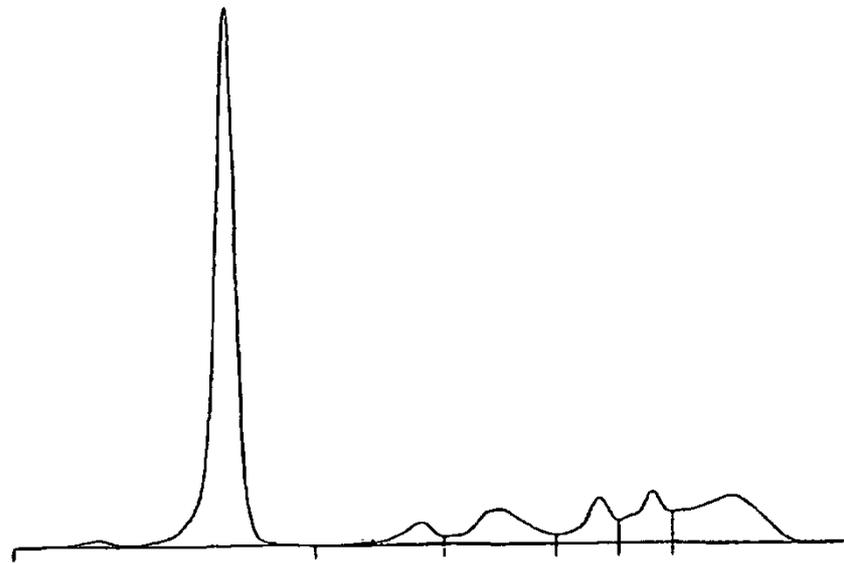


Fig. 2

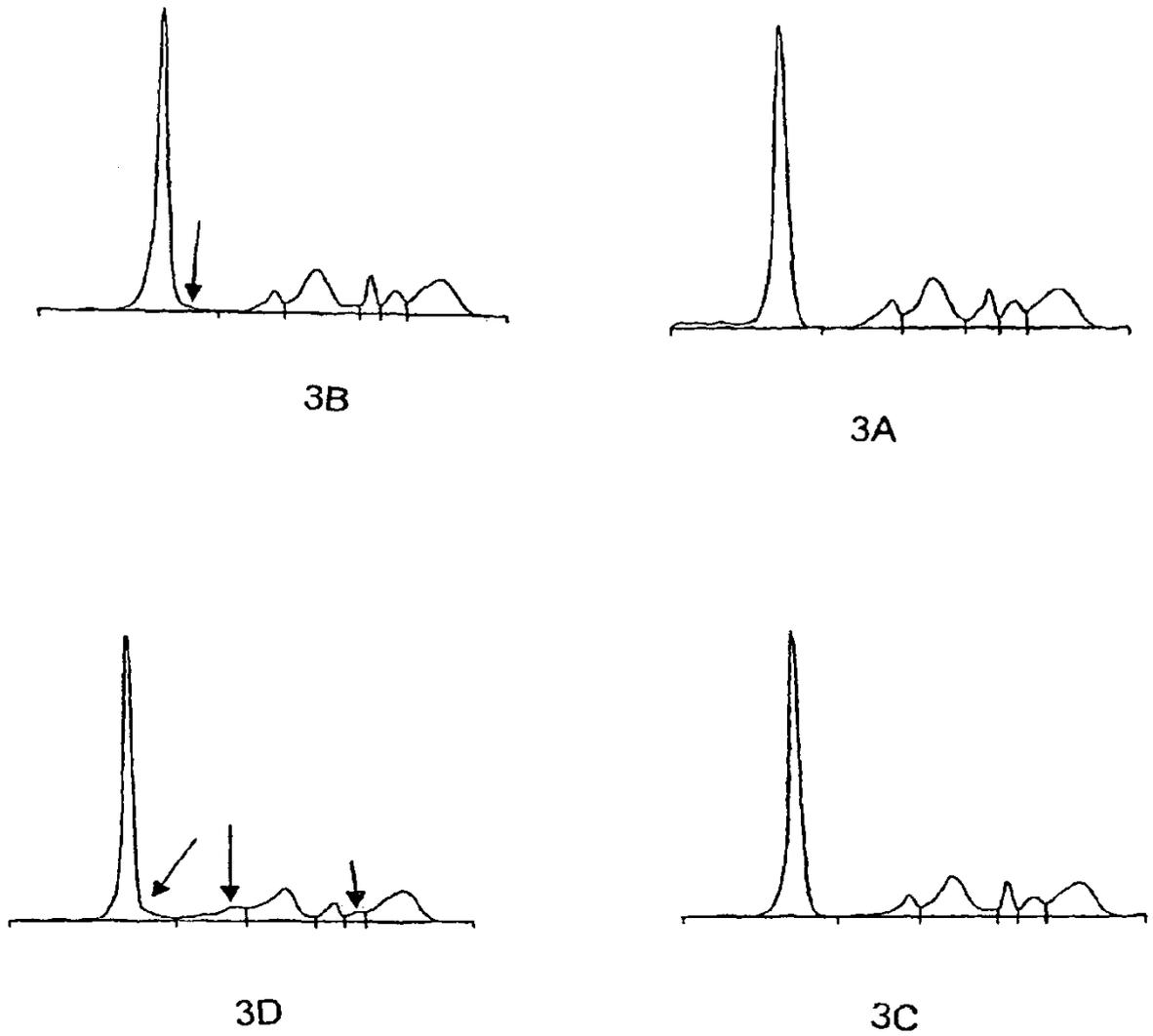


FIGURA 3

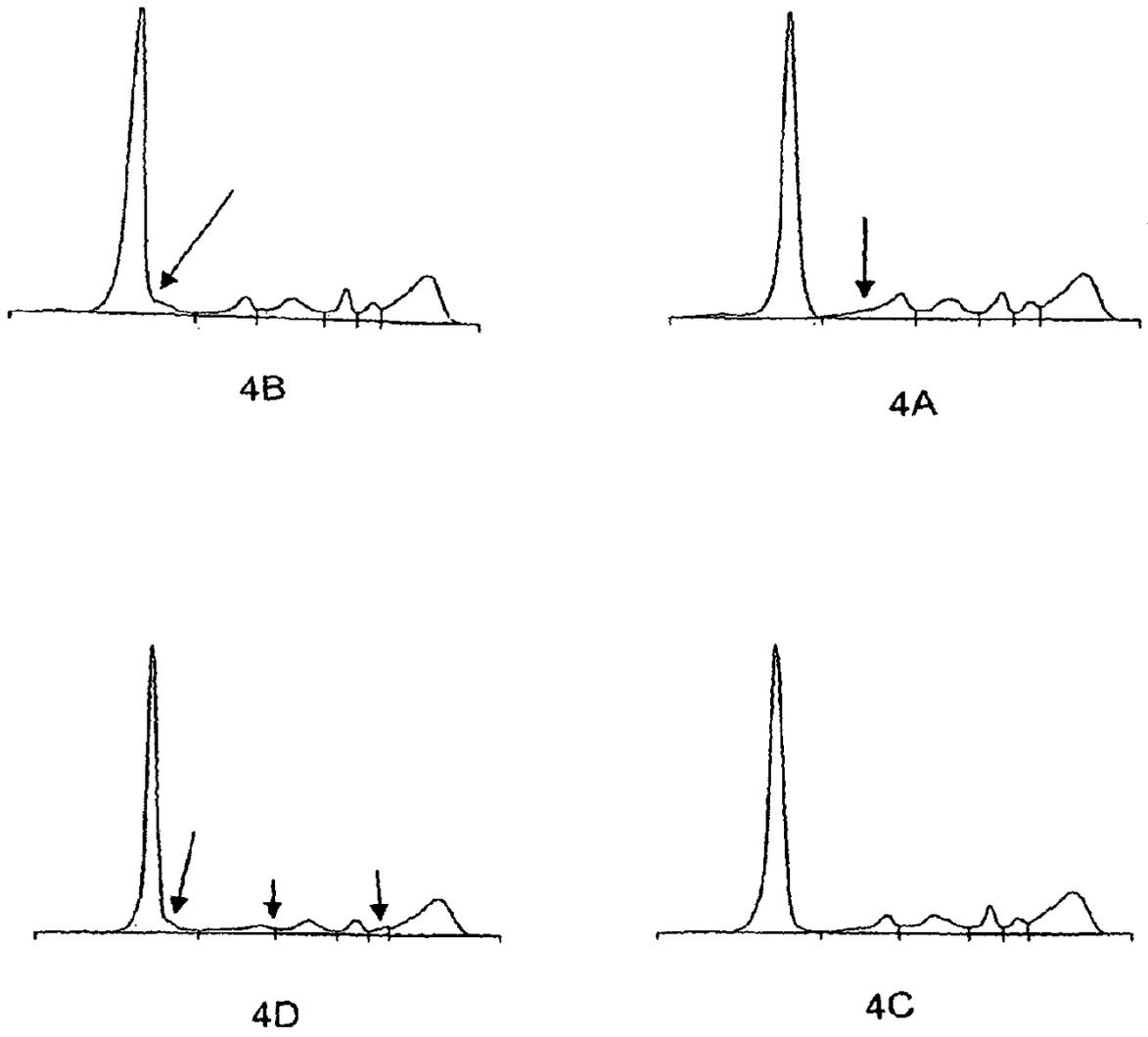


FIGURA 4