

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 740**

51 Int. Cl.:

G01N 27/447 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2002** **E 02290138 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015** **EP 1229325**

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

30 Prioridad:

19.01.2001 FR 0100762

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.01.2016

73 Titular/es:

SEBIA (100.0%)
Parc Technologique Léonard de Vinci Rue
Léonard de Vinci
91090 Lisses, FR

72 Inventor/es:

NOUADJE, GEORGES y
ROBERT, FRÉDÉRIC

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 557 740 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 mediante electroforesis capilar y composiciones de tampón para electroforesis capilar

La presente invención se refiere a un procedimiento para la separación de proteínas y péptidos mediante electroforesis capilar así como a composiciones de tampón que comprenden un aditivo útil para esta separación.

Se conoce analizar la tasa de las proteínas en líquidos biológicos tales como suero, con fines analíticos y concretamente de diagnóstico, y habitualmente separar proteínas mediante electroforesis, tanto en electroforesis en gel como en electroforesis capilar.

En electroforesis en gel, el documento US 5 928 484 describe la separación específica de la Lpa de otras lipoproteínas con ayuda de compuestos aniónicos o catiónicos.

Uno de los intereses de la electroforesis capilar se encuentra en el hecho de que se necesitan cantidades muy pequeñas de los líquidos biológicos que van a analizarse. Además, la separación mediante esta técnica puede ser muy rápida, en la medida en que pueden usarse grandes tensiones sin que la muestra se caliente demasiado durante la separación.

Para la separación de las proteínas séricas, se realiza de manera clásica la electroforesis capilar con tampones alcalinos. Habitualmente, los perfiles proteicos obtenidos comprenden cinco o seis fracciones que son la fracción de albúmina, las fracciones de α_1 y α_2 -globulina, la fracción de β -globulina o las fracciones de β_1 y β_2 -globulina y la fracción de γ -globulina.

Concretamente, en electroforesis capilar, tales separaciones pueden realizarse con ayuda de tampones de análisis y técnicas tales como los descritos en las patentes US Re 36 011 o EP 518 475.

No obstante, hasta ahora, concretamente en electroforesis capilar, la separación de la albúmina y de la α_1 -globulina es insatisfactoria.

El documento US 5 536 382 describe un método de análisis de constituyentes de muestras biológicas, concretamente de muestras de sangre previamente mezcladas con un reactivo marcado específico. Se describe el análisis de una hemoglobina glicosilada, estando precedido este análisis por la etapa de marcaje y de incubación con un anticuerpo marcado específico para la hemoglobina humana A1C.

El solicitante ha demostrado ahora que usando un aditivo con el tampón de análisis, aditivo que comprende un polo aniónico cuando el pH es superior a 9 y una parte hidrófoba, era posible obtener una separación mejorada, concretamente la separación de albúmina/ α_1 -globulina. Estos aditivos pueden, por un lado, producir interacciones hidrófobas con uno o varios constituyentes proteicos y, por otro lado, pueden aportar a este o estos constituyentes proteicos una o varias cargas negativas y modificar su movilidad electroforética.

Por tanto, 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, tal como se define mediante la reivindicación 1, y en el que se introduce la muestra en un tubo capilar que contiene un tampón de análisis, comprendiendo dicho tampón de análisis además al menos un aditivo que puede producir interacción hidrófoba con uno o varios constituyentes proteicos y que puede aportar a este o estos constituyentes proteicos una o varias cargas negativas y modificar su movilidad electroforética. Esta etapa va seguida en general por la separación de los constituyentes proteicos mediante migración y detección de los constituyentes.

La invención también se refiere a un procedimiento de separación mediante electroforesis de los constituyentes proteicos de muestras que comprenden albúmina y las fracciones de α_1 ; α_2 ; β (o β_1 y β_2); y γ -globulina, en un tampón de análisis, en el que el tampón de análisis comprende además un aditivo que puede al menos producir interacción hidrófoba con la albúmina.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de separación electroforética, 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 a un capilar que contiene un tampón de análisis que comprende además al menos un aditivo, siendo el aditivo un compuesto que comprende un polo aniónico cuando el pH es superior a 9 y una parte hidrófoba.

Así, los compuestos útiles como aditivo para tampón de análisis en electroforesis capilar de la invención pueden concretamente producir interacción hidrófoba con la albúmina; estos compuestos pueden ser por ejemplo tensioactivos aniónicos tales como los usados en MECC (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, cromatografía capilar electrocinética micelar), pero a una concentración inferior a su concentración micelar crítica.

En la presente invención, se usan estos compuestos en EC en disolución libre: hay un aporte de cargas negativas sobre la albúmina mediante interacción hidrófoba entre los residuos hidrófobos de la albúmina y la parte hidrófoba de estos compuestos, de ahí una disminución de la movilidad de la albúmina con respecto a la de las demás proteínas. Una de las consecuencias es la separación mejorada de la albúmina y de la fracción de α_1 .

5 Finalmente, la invención se refiere a composiciones de electrolito para electroforesis capilar tal como se definen mediante la reivindicación 18 y que comprenden al menos un tampón y un aditivo que puede producir interacción hidrófoba con la albúmina, en un soporte aceptable.

10 Tal como aparece en los ejemplos, el uso de aditivos según la invención permite una separación mejorada de las fracciones de albúmina y α_1 -globulina. Permite además un retorno a la línea de base entre estas dos fracciones mejor que con los tampones habituales.

Otras características y ventajas de la invención se desprenderán tras la lectura de la descripción detallada, de los ejemplos y las figuras adjuntas.

15 La figura 1 representa un electroferograma de un suero humano normal analizado mediante electroforesis capilar usando un tampón de glicina.

20 La figura 2 representa un electroferograma de un suero humano normal analizado mediante electroforesis capilar usando el mismo tampón de glicina con un aditivo según la invención.

La figura 3 representa un electroferograma de un suero humano normal analizado mediante electroforesis capilar usando un tampón de borato.

25 La figura 4 representa un electroferograma de un suero humano normal analizado mediante electroforesis capilar usando el mismo tampón de borato con un aditivo según la invención.

30 La figura 5 representa un electroferograma de un suero humano normal, obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa.

La figura 6 representa un electroferograma de un suero de un paciente que presenta un síndrome inflamatorio agudo, realizado en electroforesis capilar con un tampón de glicina.

35 La figura 7 representa un electroferograma de un suero de un paciente que presenta un síndrome inflamatorio agudo realizado en electroforesis capilar usando el mismo tampón de glicina con un aditivo según la invención.

La figura 8 representa un electroferograma de un suero de un paciente que presenta un síndrome inflamatorio agudo realizado en electroforesis capilar con un tampón de borato.

40 La figura 9 representa un electroferograma de un suero de un paciente que presenta un síndrome inflamatorio agudo realizado en electroforesis capilar usando el mismo tampón de borato con un aditivo según la invención.

45 La figura 10 representa un electroferograma del suero de un paciente que presenta un síndrome inflamatorio agudo, obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa.

La figura 11 ilustra para diversas longitudes de la cadena carbonada de un alquilsulfonato añadido a un tampón de borato habitual, la movilidad de la fracción de α_1 -globulina y la de la fracción de albúmina.

50 A modo de aditivo para tampón útil según la invención y que puede producir interacción con la parte hidrófoba de la albúmina, pueden mencionarse los compuestos que comprenden un polo aniónico cuando el pH es superior a 9 y una parte hidrófoba. La parte hidrófoba puede estar compuesta por al menos una cadena de alquilo, ramificada o no, de 4 a 22 átomos de carbono, concretamente de 4 a 20 átomos de carbono, y/o por al menos una combinación de 1 a 10 ciclos, aromáticos o no. Se prefieren combinaciones de 1 a 4 ciclos. Tal como comprenderá fácilmente el especialista, esta parte hidrófoba podrá comprender residuos o funciones que no modifiquen de manera esencial su carácter hidrófobo, tales como uno o varios grupos hidroxilo o de amina, por ejemplo.

55 El polo aniónico puede estar constituido por uno o varios de los grupos o las funciones químicas de la siguiente lista: sulfonatos, carboxilatos, sulfatos, fosfatos, carbonatos.

60 Así, pueden citarse concretamente los tensioactivos aniónicos del tipo colato, los alquil-mono, di o trialquilsulfonatos C_6 - C_{22} , el tetradecenosulfonato, los naftalenosulfonatos, los alquil-mono, di o tricarboxilatos C_6 - C_{22} , los alquil-carboxisulfonatos C_6 - C_{22} , los naftalenocarboxilatos, los alquil-sulfatos C_4 a C_{14} , los alquil-carbonatos C_4 a C_{14} , los bencenosulfonatos y los bencenocarboxilatos.

65 Los di y tri-carboxilatos, di y tri-sulfonatos y carboxisulfonatos anteriores son por tanto combinaciones de una o

varias funciones carboxilato o sulfonato sobre cadenas de alquilo de 6 a 22 átomos de carbono. A modo de ejemplo no limitativo, puede mencionarse el ácido 1,2,3-nonadecanotricarboxílico que comprende tres funciones carboxilato y una cadena C₁₉, el ácido 2-metil-2-sulfooctadecanoico que comprende una función carboxilato y una función sulfonato y una cadena C₁₈, y el ácido 1,12-dodecanodicarboxílico que comprende dos funciones carboxilato y una cadena C₁₂.

Más precisamente, pueden mencionarse los alquil-sulfonatos C₆ a C₁₀ entre los alquil-mono, di o trialquilsulfonatos C₆-C₂₂ y los alquil-carboxilatos C₆ a C₁₄ entre los alquil-mono, di o tri-carboxilatos C₆-C₂₂.

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

Pueden usarse tampones biológicos como aditivo según la invención. Pueden mencionarse concretamente los tampones zwitteriónicos del tipo de Good tales como CAPS (ácido 3-ciclohexilamino-1-propano-sulfónico) y CHES (ácido 2-(N-ciclohexilamino)etanosulfónico).

Según la invención pueden usarse otros tampones biológicos zwitteriónicos. No obstante, no se considera que los tampones de aminoácidos formen parte de la presente invención.

Entre los aditivos mencionados anteriormente, se prefieren los alquil-sulfonatos C₆ a C₁₀ y entre los alquil-sulfonatos C₆ a C₁₀, se prefiere particularmente el octanosulfonato.

Estos compuestos se conocen en sí mismos y están disponibles en el mercado. Pueden estar en forma ácida o en forma de sales.

Por muestra, según la invención, se entiende la muestra biológica que va a analizarse, previamente diluida con una disolución de dilución apropiada o del tampón de análisis, por ejemplo, o pura.

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

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

En las muestras de suero, las proteínas séricas que van a separarse son la albúmina y las fracciones de α_1 ; α_2 ; β (β_1 y β_2) y γ -globulina.

A modo de tampón de análisis, puede usarse cualquier tampón de análisis conocido, adecuado para la separación deseada, y útil en electroforesis en general, y en electroforesis capilar en particular. A modo de ejemplos, pueden mencionarse los tampones de borato, fosfato y carbonato, los tampones a base de aminoácido y los tampones denominados biológicos.

Como tampón biológico, pueden mencionarse los tampones conocidos con los nombres de Bis-TRIS (2-bis[2-hidroxi-etil]amino-2-hidroxi-metil-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-hidroxi-propanosulfónico), Bis-TRIS-PROPANO (1,3-bis[tris(hidroxi-metil)metilamino-propano]), BES (ácido N,N-bis[2-hidroxi-etil]-2-aminoetanosulfónico), MOPS (ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico), TES (ácido 2-[2-hidroxi-1,1-bis(hidroxi-metil)etilamino]etanosulfónico), HEPES (ácido N-[2-hidroxi-etil]piperazin-N'-(2-etanosulfónico)), DIPSO (ácido 3-N,N-bis[2-hidroxi-etil]amino-2-hidroxi-propanosulfónico), MOBS (ácido 4-N-morfolinobutanosulfónico), TAPSO (ácido 3-[N-tris(hidroxi-metil)-metilamino]-2-hidroxi-propanosulfónico), TRIS (2-amino-2-[hidroxi-metil]-1,3-propanodiol), HEPPSO (ácido N-[2-hidroxi-etil]piperazin-N'-[2-hidroxi-propanosulfónico]), POPSO (ácido piperazin-,N'-bis[2-hidroxi-propanosulfónico]), TEA (trietanolamina), EPPS (ácido N-[2-hidroxi-etil]-piperazin-N'-[3-propano-sulfónico]), TRICINA (N-tris[hidroxi-metil]metilglicina), GLY-GLY (diglicina), BICINA (N,N-bis[2-hidroxi-etil]-glicina), HEPBS (ácido N-[2-hidroxi-etil]piperazin-N'-[4-butanosulfónico]), TAPS (ácido N-tris[hidroxi-metil]-metil-3-aminopropanosulfónico), AMPD (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol), TABS (ácido N-tris[hidroxi-metil]metil-4-aminobutanosulfónico), AMPSO (ácido 3-[(1,1-dimetil-2-hidroxi-etil)amino]-2-hidroxi-propanosulfónico), CHES (ácido 2-(N-ciclohexilamino)etanosulfónico), CAPSO (ácido 3-ciclohexilamino-2-hidroxi-1-propanosulfónico), AMP (2-amino-2-metil-1-propanol), CAPS (ácido 3-ciclohexilamino-1-propano-sulfónico) o CABS (ácido 4-[ciclohexilamino]-1-butanosulfónico), preferiblemente AMPD, TABS, AMPSO, CHES, CAPSO, AMP, CAPS o CABS.

Desde el punto de vista del pH del líquido biológico en el tampón de análisis, incluido el aditivo, éste puede variar entre 2 y 12. No obstante, en electroforesis capilar a pH alcalino, el pH está comprendido entre 8 y 12. Según la invención, el pH está comprendido 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 al menos un compuesto que modifica el pH. A modo de modificador del pH, puede usarse un compuesto elegido de hidróxido de litio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de rubidio, hidróxido de cesio, hidróxido de francio, un hidróxido de mono, di, tri o tetra-alkilamonio que tiene de 1 a 8 átomos de carbono en la parte alquilo.

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

Los aditivos según la invención se usan en concentraciones que van de 0,1 mM a 500 mM, sin superar no obstante su concentración micelar crítica en el tampón de análisis.

Este valor de concentración micelar crítica interviene para los aditivos que son tensioactivos.

Cuando se usa el octanosulfonato, su concentración en el tampón es del orden de 1 a 5 mM, y preferiblemente de 1 a 4 mM. De manera preferida, la concentración puede ser de aproximadamente 2,5 mM.

En los procedimientos de la invención, el tampón de análisis puede comprender además sulfato de sodio.

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

Desde el punto de vista de los materiales usados para los capilares, estos son habituales en la electroforesis capilar. Así, pueden usarse capilares de sílice fundida. Su diámetro interno puede ir de 5 a 2.000 μm . De manera preferida, según la invención se usan capilares con un diámetro interno inferior a 200 μm , preferiblemente inferior a 100 μm . Se usan preferiblemente capilares con una superficie interior no tratada. El especialista sabrá adaptar la naturaleza del capilar y su tamaño a las necesidades del análisis.

Ejemplos

MATERIALES Y MÉTODOS

A) Electroforesis capilar (método A)

La electroforesis capilar de muestras clínicas se realiza con un aparato de EC equipado con un capilar de sílice fundida con un diámetro interno de 25 micrómetros. La detección se realiza a 200 nm. Se colocan las muestras en el inyector de muestras del aparato y se inyectan automáticamente mediante inyección hidrodinámica (50 mbar durante 7 s). La separación de las muestras se realiza en menos de 10 minutos aplicando un campo eléctrico de aproximadamente 400 V/cm. Se lava el capilar antes de cada análisis mediante sosa 0,5 M, después mediante el tampón de análisis.

Tampones de análisis:

Los productos químicos usados son de calidad analítica.

Se prepara el tampón de glicina 150 mM disolviendo 11,26 g de glicina (masa molar: 75,07 g/mol) en 1 l de agua desmineralizada. La concentración final es de 150 mM y se ajusta el pH a 10,0 mediante la adición de pastillas de sosa (masa molar: 40,0 g/mol).

Se prepara el tampón de borato 150 mM 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.

B) Electroforesis en gel de agarosa (método B)

Se realiza el análisis comparativo de proteínas séricas en gel de agarosa. Se cargaron 10 μl de suero en cada pocillo del aplicador de membrana descrito en las patentes EP 0 493 996, US 5.464.515, US 5.405.516. A continuación se aplicó el aplicador así cargado a la superficie de un gel de agarosa durante 30 s. Se obtuvo la separación de estas muestras aplicadas sobre este gel de agarosa mediante electroforesis durante aproximadamente 7,5 minutos y a una potencia de 20 W, en un instrumento que permite regular la temperatura a 20°C. Tras la migración, se secó el gel y se coloreó con negro de amido. Tras la coloración, se descoloró el gel y se secó de nuevo. Entonces se analizaron los geles mediante densitometría, lo que permite obtener los perfiles proteicos.

C) Muestras clínicas:

Para la EC, se diluyen los sueros humanos a 1/10 en el tampón de análisis.

Ejemplo 1 (comparativo)

Se prepara un tampón de análisis de glicina tal como anteriormente. Se analizó suero normal.

5 Se realizó la electroforesis según el método A anterior.

Tal como aparece en la figura 1, el electroferograma obtenido presenta, de izquierda a derecha, cinco picos sucesivos atribuidos respectivamente a las fracciones de γ , β , α_2 , α_1 -globulina y albúmina.

10 Ejemplo 2

Al tampón de análisis del ejemplo 1, se le añade octanosulfonato a una concentración de 2,5 mM.

Se realizó la electroforesis como en el ejemplo 1.

15 Tal como aparece en la figura 2, el electroferograma obtenido presenta, de izquierda a derecha, cinco picos sucesivos atribuidos respectivamente a las fracciones de γ , β , α_2 , α_1 -globulina y albúmina. Mediante comparación con el resultado del ejemplo 1, la separación entre las dos fracciones de α_1 -globulina y albúmina se mejora netamente y el retorno a la línea de base es mejor.

20 Ejemplo 3 (comparativo)

Se trabaja como en el ejemplo 1, siendo el tampón de análisis usado un tampón de borato preparado tal como se indicó anteriormente.

25 Se realizó la electroforesis como en el ejemplo 1.

Tal como aparece en la figura 3, el electroferograma obtenido presenta, de izquierda a derecha, seis picos sucesivos atribuidos respectivamente a las fracciones de γ , β_2 , β_1 , α_2 , α_1 -globulina y albúmina.

30 Ejemplo 4

Al del ejemplo 3, se le añade octanosulfonato a una concentración de 2,5 mM.

35 Se realizó la electroforesis como en el ejemplo 1.

Tal como aparece en la figura 4, el electroferograma obtenido presenta, de izquierda a derecha, seis picos sucesivos atribuidos respectivamente a las fracciones de γ , β_2 , β_1 , α_2 , α_1 -globulina y albúmina. La separación entre las dos fracciones de α_1 y albúmina se mejora netamente y el retorno a la línea de base es mejor.

40 Ejemplo 5 (comparativo)

Se obtiene el electroferograma de la figura 5 analizando el mismo suero que en los ejemplos anteriores mediante el método B anterior. Mediante comparación con el resultado obtenido en los ejemplos 2 y 4, se constata que estos modos de realización permiten obtener una resolución prácticamente comparable a la resolución obtenida en gel de agarosa.

45 Ejemplo 6 (comparativo)

50 Se preparó un tampón de análisis de glicina 150 mM.

Se analizó suero con grandes cantidades de α_1 y α_2 -globulinas.

Se realizó la electroforesis como en el ejemplo 1.

55 Tal como aparece en la figura 6, el electroferograma obtenido presenta, de izquierda a derecha, cinco picos sucesivos atribuidos respectivamente a las fracciones de γ , β , α_2 , α_1 -globulina y albúmina.

Ejemplo 7

60 Al tampón de análisis del ejemplo 6, se le añade octanosulfonato a una concentración de 2,5 mM.

Se realizó la electroforesis como en el ejemplo 6.

65 Tal como aparece en la figura 7, el electroferograma obtenido presenta, de izquierda a derecha, cinco picos

sucesivos atribuidos respectivamente a las fracciones de γ , β , α_2 , α_1 -globulina y albúmina. Mediante comparación con el resultado del ejemplo 6, la separación entre las dos fracciones de α_1 -globulina y albúmina se mejora netamente y el retorno a la línea de base es mejor.

5 Ejemplo 8 (comparativo)

Se trabaja como en el ejemplo 6, siendo el tampón usado un tampón de borato 150 mM.

Se realizó la electroforesis como en el ejemplo 6.

10 Tal como aparece en la figura 8, el electroferograma obtenido en las mismas condiciones presenta, de izquierda a derecha, seis picos sucesivos atribuidos respectivamente a las fracciones de γ , β_2 , β_1 , α_2 , α_1 -globulina y albúmina.

Ejemplo 9

15 Al tampón del ejemplo 8, se le añade octanosulfonato a una concentración de 2,5 mM.

Se realizó la electroforesis como en el ejemplo 6.

20 Tal como aparece en la figura 9, el electroferograma obtenido en las mismas condiciones presenta, de izquierda a derecha, seis picos sucesivos atribuidos respectivamente a las fracciones de γ , β_2 , β_1 , α_2 , α_1 -globulina y albúmina. La separación entre las dos fracciones de α_1 y albúmina se mejora mediante un mejor retorno a la línea de base. Se observa que la fracción de α_1 está compuesta por dos picos, de los cuales uno, que corresponde a la orosomucoide se confundía, en ausencia de octanosulfonato, con el pico de la albúmina.

25 Ejemplo 10 (comparativo)

Se obtiene el electroferograma de la figura 10 analizando el mismo suero que en los ejemplos 6 a 9 mediante el método B anterior. Mediante comparación con el resultado obtenido en los ejemplos 7 y 9, se constata que estos modos de realización permiten obtener una resolución prácticamente comparable a la resolución obtenida en gel de agarosa.

Ejemplo 11

35 Se midió la movilidad (mn^{-1}) comparada de la α_1 -globulina y de la albúmina, en un tampón de borato (150 mM) a pH 10, mediante el método A anterior. Se añadieron alquilsulfonatos con longitud (n) de cadena de alquilo creciente (n representa 4, 6, 8 y 10 respectivamente para C_4 , C_6 , C_8 y C_{10} y $n=0$ corresponde a un tampón sin alquilsulfonato) a una concentración de 2,5 mM al tampón de borato. Se calcularon las movilidades de las fracciones de alfa-1 y albúmina y se notifican en el gráfico de la figura 11. Se observa una neta disminución de la movilidad de la albúmina (■) con respecto a la de la fracción de alfa-1 (♦) a partir de una cadena C_6 .

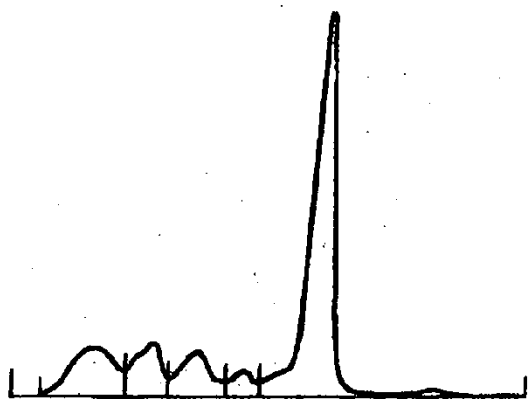
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de electroforesis capilar en disolución libre a pH alcalino para el análisis de muestras biológicas que comprenden constituyentes proteicos, caracterizado porque los constituyentes son la albúmina y las fracciones de α_1 , α_2 , β o (β_1 y β_2) y γ -globulina y porque comprende al menos una etapa en la que:
se introduce la muestra en un tubo capilar que contiene un tampón de análisis que presenta un pH comprendido entre 9 y 11, comprendiendo dicho tampón de análisis además al menos un aditivo que puede producir interacción hidrófoba con uno o varios constituyentes proteicos y que puede aportar a este o estos constituyentes proteicos una o varias cargas negativas y disminuir la movilidad electroforética de la albúmina con respecto a la de las demás proteínas, comprendiendo dicho aditivo un polo aniónico cuando el pH es superior a 9 y una parte hidrófoba.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende además la separación de los constituyentes mediante migración y la detección de estos constituyentes.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la muestra es una muestra de suero, sangre hemolizada, plasma, orina o líquido cefalorraquídeo.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque los constituyentes son proteínas séricas.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque dicho aditivo comprende una parte hidrófoba compuesta por al menos una cadena de alquilo, ramificada o no, de 4 a 22 átomos de carbono, y/o por al menos una combinación de 1 a 10 ciclos, aromáticos o no, y un polo aniónico constituido por uno o varios grupos elegidos de los sulfonatos, carboxilatos, sulfatos, fosfatos y carbonatos.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque dicho aditivo se elige de los tensioactivos aniónicos del tipo colato, los alquil-mono, di o tri-sulfonatos C_6 a C_{22} , el tetradecenosulfonato, los naftalenosulfonatos, los alquil-mono, di o tri-carboxilatos C_6 a C_{22} , los alquilcarboxisulfonatos C_6 - C_{22} , los naftalenocarboxilatos; los alquilsulfatos C_4 a C_{14} , los alquilcarbonatos C_4 a C_{14} ; los bencenosulfonatos, los bencenocarboxilatos y los tampones biológicos zwitteriónicos.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque dicho aditivo se elige de los tensioactivos aniónicos del tipo colato, los alquil-mono, di o tri-sulfonatos C_6 a C_{22} , el tetradecenosulfonato, los naftalenosulfonatos, los alquil-mono, di o tri-carboxilatos C_6 a C_{22} , los alquilcarboxisulfonatos C_6 - C_{22} , los naftalenocarboxilatos, los alquilsulfatos C_4 a C_{14} , los alquilcarbonatos C_4 a C_{14} , los bencenosulfonatos y los bencenocarboxilatos.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado porque los radicales alquilo son lineales.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el aditivo es un alquilsulfonato C_6 a C_{10} .
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el aditivo es el octanosulfonato.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque la concentración de aditivo en el tampón está comprendida entre 0,1 mM y 500 mM, sin superar dado el caso la concentración micelar crítica de dicho aditivo en dicho tampón.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque la concentración de dicho aditivo en dicho tampón está comprendida entre 1 mM y 5 mM.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque la concentración de aditivo en el tampón es del orden de 2,5 mM.
14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque el capilar es de sílice fundida.
15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque el tampón de análisis comprende además al menos un modificador del pH.
16. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque el modificador del pH se elige de hidróxido

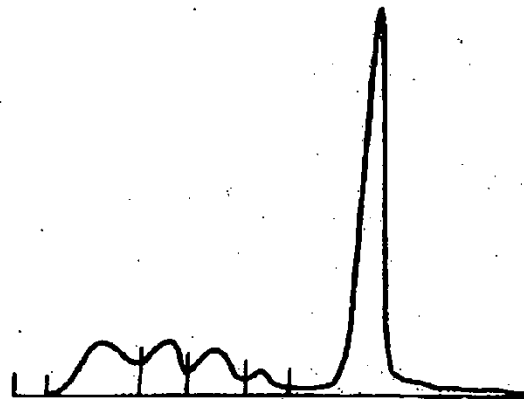
de litio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de rubidio, hidróxido de cesio, hidróxido de francio, un hidróxido de mono, di, tri o tetra-alquilamonio de 1 a 8 átomos de carbono en la parte alquilo.

- 5 17. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque el tampón de análisis comprende además sulfato de sodio.
- 10 18. Composición de electrolito para electroforesis capilar adecuada para la puesta en práctica del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende al menos un tampón y al menos un aditivo en un soporte aceptable, pudiendo el aditivo producir interacción hidrófoba con la albúmina, eligiéndose dicho aditivo, que comprende un polo aniónico cuando el pH es superior a 9 y una parte hidrófoba, de los tensioactivos aniónicos del tipo colato, los alquil-mono, di o tri-sulfonatos C₆ a C₂₂, el tetradecenosulfonato, los naftalenosulfonatos, los alquil-mono, di o tri-carboxilatos C₆ a C₂₂, los alquil-carboxisulfonatos C₆-C₂₂, los naftalenocarboxilatos, los alquilsulfatos C₄ a C₁₄, los alquilcarbonatos C₄ a C₁₄, los bencenosulfonatos y los bencenocarboxilatos, estando el pH de dicha composición comprendido entre 9 y 11.
- 15 19. Composición según la reivindicación 18, caracterizada porque los radicales alquilo son lineales.
- 20 20. Composición según la reivindicación 18 ó 19, caracterizada porque el aditivo es un alquilsulfonato C₆ a C₁₀.
21. Composición según una de las reivindicaciones 18 a 20, caracterizada porque el aditivo es el octanosulfonato.
- 25 22. Composición según una de las reivindicaciones 18 a 21, caracterizada porque el octanosulfonato está presente a una concentración de 1 a 5 mM en el tampón.
23. Composición según una de las reivindicaciones 18 a 22, caracterizada porque la composición comprende además sulfato de sodio.
- 30

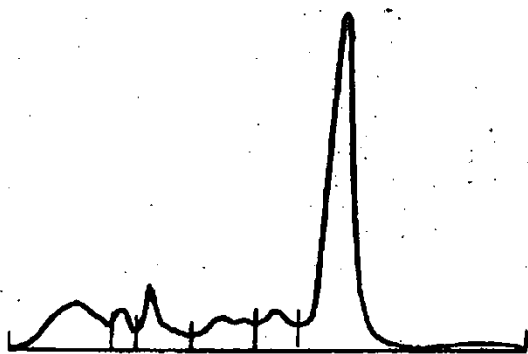
FIG_1



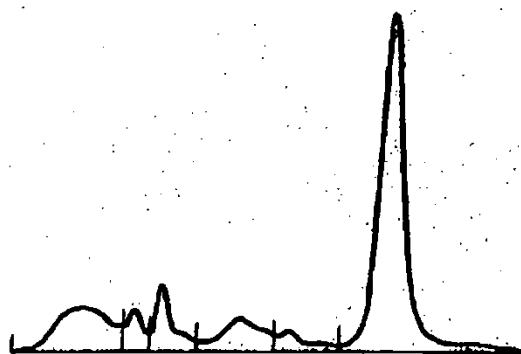
FIG_2



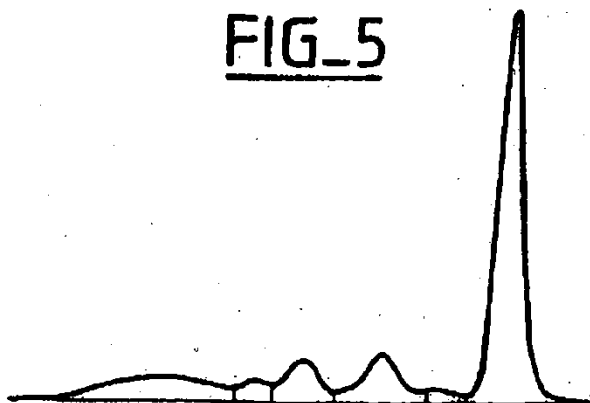
FIG_3



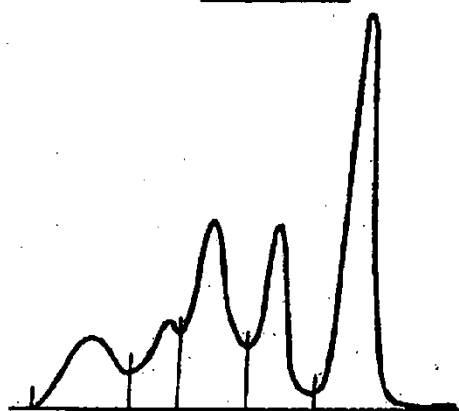
FIG_4



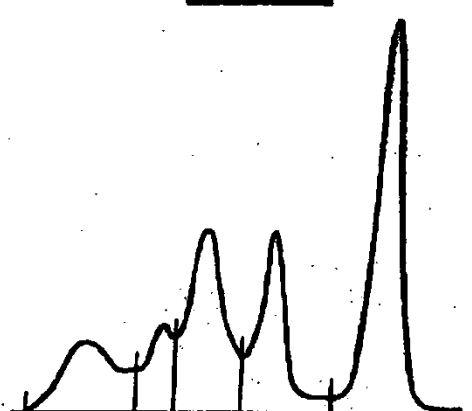
FIG_5



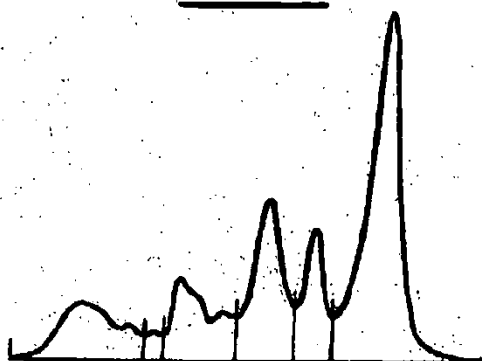
FIG_6



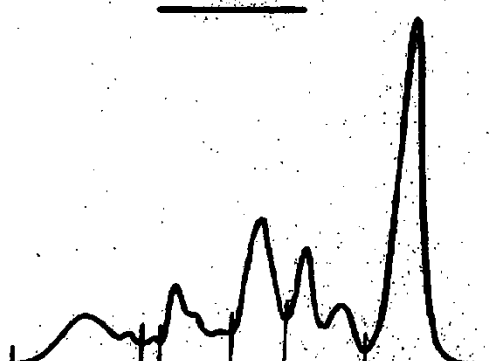
FIG_7



FIG_8



FIG_9



FIG_10

