

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 968**

51 Int. Cl.:

B01D 15/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2013 PCT/EP2013/002795**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014 WO14040754**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2013 E 13774603 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2895246**

54 Título: **Separación de proteínas**

30 Prioridad:

17.09.2012 DE 102012018234

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

10.04.2018

73 Titular/es:

**MAGNAMEDICS GMBH (100.0%)
Dennewartstrasse 25-27
52068 Aachen, DE**

72 Inventor/es:

**RUSU, VIOREL y
GÖTHEL, SVEN**

74 Agente/Representante:

VÁZQUEZ FERNÁNDEZ-VILLA, Concepción

ES 2 662 968 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

Separación de proteínas

- 5 La invención se refiere a un procedimiento para la separación selectiva de proteínas de materiales biológicos líquidos que, con respecto a la cantidad total, contienen un porcentaje de menos del 10% en peso de un componente traza, que se seleccionan de un grupo de compuestos tales como inmunosupresores antiinflamatorios, antiarrítmicos, biomarcadores no proteicos, drogas, sustancias dopantes, micotoxinas, antidepresivos, antiepilépticos, antipsicóticos, antibióticos.
- 10 Los materiales biológicos contienen a menudo un alto contenido en proteínas además de un contenido reducido en componentes adicionales. Estos componentes solo pueden determinarse cualitativamente de manera analítica con gran dificultad en el caso del alto contenido de proteínas, por ejemplo durante el control del nivel de medicamentos durante la administración de medicamentos inmunosupresores o sus metabolitos de sangre, plasma o muestras de suero.
- 15 Los materiales biológicos líquidos, tales como muestras de plasma (y otros líquidos clínicamente relevantes) se estudian normalmente por medio de ensayos ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) para determinar el contenido cuantitativo de biomarcadores (compuestos orgánicos de bajo peso molecular), para registrar la evolución de una enfermedad o en todo caso diagnosticar por primera vez una enfermedad. En los últimos años ha empezado a establecerse la CL-EM (o CL-EM/EM) como alternativa a los ensayos ELISA. Normalmente, para ello se separa la muestra de plasma por medio de precipitación y posterior centrifugación de proteínas plasmáticas y a continuación se separan los compuestos de bajo peso molecular en una CL de fase inversa, se cuantifican (área del diagrama de CL) y se analiza la masa molar por espectrometría de masas (EM).
- 20 A este respecto, la separación de proteínas se realiza habitualmente de manera manual, dado que las etapas de centrifugación (o alternativas tales como succión a través de una membrana por medio de vacío o presión) son difíciles de automatizar.
- 25 Se conoce que, en función del origen de la muestra y del planteamiento analítico, el porcentaje cualitativo así como cuantitativo de un componente traza de una muestra biológica puede realizarse en diferentes plataformas instrumentales y para diferentes usos finales, tales como controles clínicos, investigaciones de dopaje, informes e investigaciones forenses y toxicológicos. Independientemente del desarrollo tecnológico en la lectura de los datos experimentales, tal como por ejemplo el desarrollo tecnológico en la espectrometría de masas, sigue siendo necesario un pretratamiento de la muestra analítica para reducir la complejidad.
- 30 Esencialmente, el proceso analítico desde la extracción de las muestras hasta el resultado final se divide en cinco etapas:
- 35 1) extracción de las muestras,
2) preparación de las muestras,
3) fraccionamiento de las muestras,
4) detección de los analitos y
45 5) evaluación de los datos.
- 50 En la mayoría de los casos, el tiempo esencial se usa en las etapas 1) y 2).
- Así, en Journal of Proteome Research tomo 7, n.º 4, páginas 1767-1777 se da a conocer un procedimiento, en el que partículas de sílice con Ce^{4+} queladas sirven para separar fosfopéptidos. A este respecto, el procedimiento sirve para separar y analizar directamente los fosfopéptidos.
- 55 Además, en Advanced Materials, tomo 18, n.º 24 del 18 de diciembre de 2006, páginas 3289-3293, se describe un procedimiento para la producción de compuestos metálicos magnéticos para el enriquecimiento y la determinación de fosfopéptidos, debiendo suministrarse los péptidos que deben obtenerse a estudios espectroscópicos posteriores.
- 60 Además, por Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, tomo 52, n.º 5, del 05 de septiembre de 2010, páginas 727 a 733 se conoce que esteroides anabólicos de muestras de orina pueden aislarse y analizarse mediante extracción en fase sólida junto con CL/EM.
- 65 En Journal of Chromatography, tomo 1259, páginas 251-257 también se da a conocer que pueden aislarse péptidos con un peso de menos de 1,5 kD y suministrarse a un estudio de espectroscopía de masas.

El objetivo de la presente invención es conseguir una separación de proteínas, para poder someter los componentes traza que quedan en el sobrenadante de manera selectiva a un análisis limpio y adecuado (CL/EM, etc.).

5 El objetivo se alcanza mediante el procedimiento reivindicado. Este procedimiento contiene entre otros las etapas de:

a) añadir al menos un disolvente orgánico polar, al material biológico líquido, teniendo el disolvente un momento dipolar en el intervalo de desde 1,6 hasta 4,0 Debye y

10

b) añadir partículas de gel de sílice magnéticas al material biológico líquido para la adsorción de las proteínas,

c) retirar magnéticamente las partículas de gel de sílice con las proteínas adsorbidas del material biológico líquido y obtener un residuo líquido, quedando los componentes traza de manera selectiva en el líquido y analizándose posteriormente.

15

Una forma de realización preferida del procedimiento según la invención se caracteriza porque las partículas de gel de sílice presentan dado el caso uno o varios núcleos magnéticos y presentan un diámetro en el intervalo de desde 20 nm hasta 500 μm . Las partículas de gel de sílice contienen preferiblemente de 0 a 30 núcleos magnéticos.

20

La separación de las partículas de gel de sílice con las proteínas adsorbidas puede tener lugar en un campo magnético o mediante adsorción de las proteínas en partículas de gel de sílice no magnéticas y separación de las partículas de gel de sílice por medio de presión, fuerza centrífuga o gravitacional.

25

Por tanto se ha encontrado un procedimiento preferido para la separación selectiva de proteínas de materiales biológicos líquidos que, con respecto a la cantidad total, contienen un porcentaje pequeño de componentes traza, mediante la adición de

30

a) disolventes orgánicos polares, con un momento dipolar en el intervalo de desde 1,6 hasta 4,0 Debye y

b) partículas de gel de sílice con uno o varios núcleos magnéticos, adsorción de las proteínas a las partículas de gel de sílice magnéticas y separación de las partículas de gel de sílice magnéticas con las proteínas adsorbidas en un campo magnético, o adsorción de las proteínas a partículas de gel de sílice no magnéticas y separación de las partículas de gel de sílice por medio de presión, fuerza centrífuga o gravitacional, quedando los componentes traza en el líquido.

35

Los materiales biológicos líquidos, en el marco de la presente invención, son preferiblemente líquidos corporales acuosos de un ser humano o animal.

40

Los materiales biológicos líquidos, en el marco de la presente invención, pueden ser, por ejemplo, plasma, suero, saliva, lágrimas, líquido cefalorraquídeo, líquido tisular, líquido amniótico, líquido folicular, sangre completa o sangre hemolizada, orina, licor, tal como licor cerebroespinal, líquidos intersticiales, pero también por ejemplo medios de fermentación.

45

Los materiales biológicos líquidos son por regla general disoluciones acuosas que además de proteínas contienen sales y componentes orgánicos adicionales.

En el marco de la presente invención, los materiales biológicos líquidos contienen, con respecto a la cantidad total, un pequeño porcentaje de componentes orgánicos adicionales ("componentes traza"). El porcentaje de los componentes traza en los materiales biológicos líquidos es, con respecto a la cantidad total, menor del 10% en peso. En el marco de la invención se prefiere un porcentaje del componente traza en el intervalo de desde 10^{-12} hasta el 5% en peso. En particular se prefiere un porcentaje del componente traza en el intervalo de desde 10^{-9} hasta el 2% en peso.

50

Sorprendentemente, con el procedimiento según la invención pueden separarse fácil y rápidamente las proteínas de los líquidos biológicos, sin que tengan que variarse la composición y las cantidades de los componentes traza.

55

Los componentes traza en el marco de la presente invención son:

60

a) inmunosupresores antiinflamatorios, tales como por ejemplo azatioprina, mercaptopurina, micofenolato, mofetilo, ácido micofenólico, sirolimús (rapamicina), leflunomida, teriflunomida, metotrexato, tacrolimús, ciclosporina, pimecrolimús, gusperimús, lenalidomida, etc.

b) antiarrítmicos, tales como por ejemplo procainamidas, quinidinas, disopiramidas A, lidocaínas, fenitoína, mexiletinas, tocainidas, flecainidas, propafenonas, moricizinas, lidocaínas, fenitoína, mexiletinas, propanolol,

65

esmolol, timolol, metoprolol, atenolol, bisoprolol, sotalol, ibutilidas, dofetilidas, droneradonas, E-4031, verapamilo, diltiazem, adenosinas, digoxina, etc.

5 c) biomarcadores no proteicos, tales como por ejemplo estrógenos y hormonas sexuales, ácido ascórbico, carotenoides, citocinas, etc.

d) drogas, tales como por ejemplo heroína, cocaína, anfetamina, morfina, etc.

10 e) sustancias dopantes, tales como por ejemplo

15 e1) Principios activos anabólicos tales como esteroides anabolizantes androgénicos (AAS), por ejemplo 1-androstendiol, 1-androstendiona, bolandiol, bolasteronas, boldenona, boldionas, calusteronas, clostebol, danazol, deshidroclorometiltestosteronas, desoximetiltestosteronas, drostanolonas, etilestrenol, fluoximesterona, formebolonas, furazabol, androstendiol, androstendiona, dihidrotestosterona, testosterona, clembuterol, tibolona, zeranol, zilpaterol.

20 e2) Agonistas beta-2, tales como abediterol, amibegrón, arbutamina, arformoterol, bambuterol, bitolterol, carbuterol, clenbuterol, fenoterol, formoterol, hexoprenalina, indacaterol, isoetarinas, isoprenalina, levosalbutamol, olodaterol, pirbuterol, procaterol, adrenalina, ractopaminas, reproterol, rimiterol, salbutamol, salmeterol, solabegrón, terbutalina, tulbuterol.

e3) Antagonistas y moduladores hormonales, tales como anastrozol, androstatriendionas, exemestano, formestano, letrozol, testolactona, raloxifeno, tamoxifeno, toremifeno, clomifeno, ciclofenilo, fulvestrant.

25 e4) Diuréticos, tales como acetazolamida, amilorida, bumetanida, canrenona, clortalidona, ácido etacrínico, furosemida, indapamida, metolazona, espironolactona, tiazidas, triamtereno.

30 e5) Estimulantes, tales como adrafinilo, amfepramona, amifenazol, anfetamina, anfetaminil, benfluorex, benzfetamina, bencilpiperazina, bromantán, clobenzorex, cocaína, cropropamida, crotetamida, dimetilanfetaminas, etilanfetaminas, famprofazonas, fencaminas, fenetilina, fenfluramina, fenproporex, furfenorex, mefenorex, mefentermina, mesocarb, metanfetamina, (d-), p-metilanfetamina, metilendioxianfetamina, metilendioximetanfetamina, metilhexanamina, modafinilo, norfenfluraminas, fendimetrazina, fenmetrazina, fenterminas, 4-fenilpiracetam, prenilamina, prolintano.

35 e6) Analgésicos narcóticos, tales como buprenorfina, dextromoramida, diamorfina (heroína), fentanilo y sus derivados, hidromorfona, metadona, morfina, oxicodona, oximorfona, pentazocina, petidina.

f) Micotoxinas, tales como por ejemplo aflatoxina B1, fumonisina B1 y B2, ocratoxina A, patulina y zearalenona.

40 g) Antidepresivos, tales como por ejemplo Celexa, Cipramil, Lexapro, Cipralext, Seroplex, Lexamil, Prozac, Sarafem, Symbyax, Luvox, Paxil, Aropax, Zoloff, Viibryd, Pristiq, Cymbalta, Ixel, Effexor, Tolvon, Remeron, Avanza, Zispin, Strattera, Mazanor, Sanorex, Edronax, Vivalan, Wellbutrin, Zyban, Stabion, Coaxil, Tatinol, amineptinas, Valdoxan, Melitor, Thymanax, Elavil, Endep, Anafranil, Adapin, Sinequan, Tofranil, Surmontil, Norpramin, Pamelor, Aventyl, Noritren, Vivactil, Marplan, Aurorix, Manerix, Nardil, Eldepryl, Emsam, Parnate, nicotinas.

50 h) Antiepilépticos, tales como por ejemplo acetazolamida, carbamazepina, clobazam, clonazepam, diazepam, etosuximida, felbamato, gabapentina, lacosamida, lamotrigina, levetiracetam, mesuximida, midazolam, oxcarbazepina, fenobarbital, fenitoína, pregabalina, primidona, rufinamida, estiripentol, sultiama, tiagabina, topiramato, ácido valproico.

i) Antipsicóticos, tales como por ejemplo aripiprazol, olanzapina, paliperidona, quetiapina, risperidona, ziprasidona, Solian, Abilify, Leponex y/o

55 j) antibióticos, tales como por ejemplo ciprofloxacino, fosfomicina, fusafungina, rifaximina, telitromicina, vancomicina, cefalosporinas, antibióticos macrólidos, penicilinas, sulfonamida y trimetoprima, tetraciclinas, etambutol, isoniazida, mambutol, pirazinamida, rifampicina, estreptomina, imipenem, cilastina, meropenem, lincosamida, monobactama.

60 Componentes traza especialmente preferidos para el procedimiento según la invención son inmunosupresores, antiarrítmicos, biomarcadores no proteicos, sustancias dopantes, antidepresivos y antibióticos.

Proteínas que pueden separarse en el marco de la presente invención, pueden ser, por ejemplo, seroalbúminas, inmunoglobulinas, fibrinógeno, proteínas reguladoras.

65

En el marco de la presente invención, los materiales biológicos líquidos pueden contener más del 0,1% en peso

de proteínas.

En el marco de la presente invención, un contenido en proteínas está preferiblemente en el intervalo de desde el 0,01 hasta el 25% en peso, de manera particularmente preferible en el intervalo de desde el 0,1 hasta el 12% en peso.

Los componentes traza en el marco de la presente invención son en general fácilmente solubles en los disolventes orgánicos polares.

En general, los componentes traza presentan en los disolventes orgánicos polares una solubilidad de al menos 0,1 pg/l, preferiblemente en el intervalo de desde 1 ng/l hasta 500 mg/l.

Los disolventes orgánicos polares en el marco de la presente invención tienen en general un momento dipolar en el intervalo de desde 1,6 hasta 4,0 Debye, preferiblemente de desde 1,69 hasta 3,96 Debye.

Como disolventes orgánicos polares se mencionan, por ejemplo: acetona, acetonitrilo, etanol, metanol, propanol, isopropanol, dimetilsulfóxido, polietilenglicol (PEG).

Disolventes orgánicos polares preferidos son: acetona, acetonitrilo, etanol e isopropanol.

Los disolventes orgánicos polares pueden usarse individualmente o en mezcla.

Las mezclas se ajustan por ejemplo de tal manera que alcoholes tales como etanol e isopropanol en diferentes porcentajes en peso o acetonitrilo junto con un alcohol como por ejemplo isopropanol o etanol o combinaciones de alcoholes tales como etanol e isopropanol con diferentes porcentajes en peso se combinan con por ejemplo acetonitrilo.

El procedimiento según la invención se realiza preferiblemente en un adsorbente de partículas de gel de sílice con uno o varios núcleos magnéticos y con un tamaño de poro en el intervalo de desde 2 hasta 50 nm, preferiblemente de 5 a 30 nm y una superficie interna en el intervalo de desde 0,1 hasta 400 m²/g; preferiblemente de 10 a 200 m²/g. La separación de las proteínas adsorbidas en la fase sólida de partículas de gel de sílice de los componentes traza tiene lugar a este respecto mediante la aplicación de un campo magnético.

Alternativamente, las proteínas, tras la adición de una mezcla de disolventes polares orgánicos tal como se describió anteriormente, pueden adsorberse a partículas de gel de sílice no magnéticas. La separación de las proteínas unidas de los componentes traza que quedan en disolución puede tener lugar a este respecto por medio de presión, fuerza gravitacional o centrífuga.

A este respecto, las partículas de gel de sílice pueden estar presentes como partículas esféricas aisladas, como fases de gel de sílice monolíticas o como membranas.

En particular, en el caso de fases de gel de sílice monolíticas así como en el caso de membranas a base de gel de sílice, mediante la creación de una diferencia de presión se conduce el líquido con los componentes traza disueltos según la diferencia de presión a través del material de gel de sílice y se separa de las proteínas retenidas adsorbidas. A este respecto, la diferencia de presión se crea por medio de sobrepresión/subpresión en la membrana/fase monolítica de la membrana o fase monolítica.

Las partículas tienen en general un diámetro en el intervalo de desde 20 nm hasta 500 μm, preferiblemente desde 200 nm hasta 10 μm, de manera particularmente preferible desde 500 nm hasta 1,3 μm.

El adsorbente de partículas de gel de sílice con un núcleo magnético puede producirse mediante el recubrimiento de partículas que contienen óxido de hierro con gel de sílice.

El recubrimiento de partículas que contienen óxido de hierro con gel de sílice se conoce en sí (J. Colloid Interface Sci. 1968, 26, 62 a 69; Langmuir 2005, 21, 10763 a 10769; J. Colloid Interface Sci 2005, 283, 392 a 396).

El recubrimiento de partículas que contienen óxido de hierro con gel de sílice para el procedimiento según la invención puede realizarse, por ejemplo, tal como sigue:

Una suspensión de partículas que contienen óxido de hierro en un alcohol (por ejemplo isopropanol) se mezcla con agitación intensa en presencia de amoniaco para el recubrimiento con ortosilicato de tetraetilo (TEOS). El grosor del recubrimiento puede controlarse mediante la cantidad del ortosilicato de tetraetilo añadido.

Las partículas que contienen óxido de hierro recubiertas se lavan con un alcohol (por ejemplo metanol) y se almacenan en agua.

Para el procedimiento según la invención se prefieren especialmente partículas de gel de sílice que consisten en una capa mesoporosa que está aplicada sobre el núcleo magnético y presenta un grosor de capa en el intervalo de desde 10 hasta 100 nm.

5 Núcleos magnéticos para las partículas de gel de sílice según la invención pueden ser partículas en sí conocidas de óxido de hierro (Fe_2O_3) y dióxido de silicio, poliestireno y/o poli(alcohol vinílico).

10 Para el procedimiento según la invención se utilizan preferiblemente partículas de óxido de hierro con un recubrimiento de gel de sílice mesoporoso, tal como se genera en presencia de polietilenglicol como agente porógeno.

15 En particular se prefieren partículas de gel de sílice que consisten en una capa mesoporosa que está aplicada sobre el núcleo magnético y presenta un grosor de capa en el intervalo de desde 10 hasta 100 nm, conteniendo los núcleos magnéticos maghemita y/o magnetita en el intervalo de desde el 30 hasta el 95% en peso y presentando un diámetro medio en el intervalo de desde 10 nm hasta 500 μm , presentando las partículas de gel de sílice un diámetro medio en el intervalo de desde 20 nm hasta 500 μm , preferiblemente de 200 nm a 10 μm , de manera particularmente preferible de 500 nm a 1,5 μm .

20 Una forma de realización preferida del procedimiento según la invención se caracteriza porque a una parte en peso de materiales biológicos líquidos se le añaden de 1,5 a 4 partes en peso, preferiblemente de 2 a 3 partes en peso, del disolvente orgánico polar, y de 0,02 a 0,50 partes en peso, preferiblemente de 0,05 a 0,40 partes en peso, del núcleo de las partículas de gel de sílice.

25 La separación de las partículas de gel de sílice con un núcleo magnético puede tener lugar con ayuda de un separador magnético.

30 Tras la separación selectiva según la invención de proteínas de materiales biológicos líquidos, el líquido que queda contiene solo pocas proteínas que no impiden estudios adicionales o un aislamiento de los componentes traza. El porcentaje de las proteínas en el líquido que queda es en general inferior al 0,0001% en peso.

El procedimiento según la invención puede realizarse por ejemplo tal como en las siguientes etapas:

(i) proporcionar materiales biológicos líquidos que contienen uno o varios componentes traza,

35 (ii) poner en contacto los materiales biológicos líquidos con partículas de gel de sílice,

(iii) separar la proteína mediante la adición de disolventes orgánicos en la razón predefinida

40 (iv) agitar e incubar la mezcla, adsorbiéndose las proteínas en la superficie de las partículas,

(v) separar el sobrenadante que contiene los componentes traza de las partículas que contienen las proteínas adsorbidas mediante la aplicación de un campo magnético o mediante presión, fuerzas centrífugas o gravitacionales,

45 (vi) retirar el sobrenadante con uno o varios compuestos, con lo que tiene lugar una extracción selectiva de compuestos de la muestra biológica,

50 (vii) una etapa opcional adicional que incluye secar el sobrenadante mediante evaporación de la mezcla de disolventes orgánicos a temperatura elevada (50 - 85°C) y a continuación se incorpora la muestra de nuevo a un volumen definido reducido de disolvente orgánico,

55 (ix) analizar uno o varios compuestos de (vi) o (vii) por medio de espectrometría de masas, pudiendo tener lugar opcionalmente una separación cromatográfica adicional de la muestra y/o inmunoensayos que pueden estar contruidos de manera monoplexada o multiplexada, pudiendo tener lugar un inmunoensayo multiplexado mediante una codificación de partículas multicolor.

El objeto de la presente divulgación son también materiales biológicos con un contenido reducido en proteínas y componentes traza que están caracterizados porque proteínas de materiales biológicos líquidos que, con respecto a la cantidad total, contienen un pequeño porcentaje de un componente traza, mediante la adición de

60 a) disolventes orgánicos polares con un momento dipolar en el intervalo de desde 1,6 hasta 4,0 Debye y

65 b) partículas de gel de sílice, se separan mediante la adsorción de las proteínas a las partículas de gel de sílice, y tras la separación de las partículas de gel de sílice con las proteínas adsorbidas los componentes traza quedan en el líquido.

En una forma de realización preferida de la presente invención, los materiales biológicos con un contenido reducido en proteínas y componentes activos, se seleccionan por ejemplo de uno de los grupos

- 5 a) de los inmunosupresores antiinflamatorios,
b) de los antiarrítmicos,
c) de los biomarcadores no proteicos,
10 d) de las drogas
e) de las sustancias dopantes
15 f) de las micotoxinas
g) de los antidepresivos
h) de los antiepilépticos
20 i) de los antipsicóticos
j) de los antibióticos.

25 El objeto de la presente divulgación es también el uso de materiales biológicos con un contenido reducido en proteínas y componentes traza, por ejemplo en estudios analíticos o preparativos.

En particular, en el análisis de componentes traza, además de proteínas como componente principal, la presente invención posibilita ventajosamente una realización sencilla con escasos errores que puedan estar condicionados especialmente por la complejidad del sistema.

30 Ejemplos:

Ejemplo 1

35 Partículas de óxido de hierro con un recubrimiento de gel de sílice mesoporoso en presencia de polietilenglicol

Se separan 10 ml de partículas de óxido de hierro (por ejemplo perlas de MagSi-S de la empresa MagnaMedics) con una concentración de 20 mg/ml en un campo magnético y entonces se dispersan en 30 ml de polietilenglicol (peso molecular medio de 400), 10 ml de isopropanol y 2 ml de agua con agitación intensa. A esta mezcla se le añaden 2 ml de una disolución de amoniaco al 25% en peso y 0,75 ml de ortosilicato de tetraetilo (TEOS). El recubrimiento tiene lugar en el plazo de 6 horas con agitación uniforme.

40 Las partículas que contienen óxido de hierro recubiertas se lavan con 40 ml de agua. La concentración final de partículas de gel de sílice libres de grupos ácidos asciende a 20 mg/ml.

45 Ejemplo 2

La preparación de las muestras para la determinación de hidrocortisona en suero humano liofilizado

50 Materiales:

- Suero humano liofilizado con hidrocortisona,
- perlas magnéticas 300 mg/ml en acetonitrilo según el ejemplo 1
- 55 - mezcla de disolventes orgánicos, al 100% en acetonitrilo
- placas de microtitulación de tipo UV con fondo plano
- 60 - lectores de microplacas;

1. Se incorpora de nuevo suero liofilizado humano a 1,5 ml de agua esterilizada, de modo que la concentración final de hidrocortisona asciende a 0,277 µg/ml.

65 2. Se pasan 30, 40, 60 y 80 µl de suero incorporado a placas de microtitulación (formato permeable a UV).

ES 2 662 968 T3

3. Al suero se le añaden 25 μl de una disolución de partículas MagnaMedics y a continuación la mezcla de disolventes orgánicos. A este respecto, el volumen de la mezcla de disolventes orgánicos asciende a 2 veces el volumen del suero.

- 5 4. A continuación se mezcla la disolución concienzudamente y se incuba la mezcla básica de reacción durante 2 min a temperatura ambiente.
5. Antes de la recogida magnética se trata la muestra durante 5 s con ultrasonidos.
- 10 6. Las partículas magnéticas se acumulan completamente en un separador magnético.
7. Se absorbe el sobrenadante y se mide a 242 nm en forma de placas de microtitulación.

Resultados:

- 15 Como control negativo se usa una muestra de suero que no contiene hidrocortisona para determinar el nivel de referencia. A este respecto, la densidad óptica (DO) medida se correlaciona directamente con la concentración de hidrocortisona.

Suero con hidrocortisona suministrada de manera aditiva	30	40	60	80	Suero sin hidrocortisona suministrada de manera aditiva
Agua esterilizada (μl)	70	60	40	20	0
Partículas magnéticas (μl)	25	25	25	25	25
Acetonitrilo (μl)	200	200	200	200	200
Volumen de transferencia (μl)	200	200	200	200	200
DO a 242 nm	0,3554	0,4229	0,6590	0,8571	0,0948
	0,3371	0,3670	0,5410	0,6841	0,0687
DO promedio	0,3462	0,3949	0,6000	0,7706	0,8175
DO corregida	0,2644	0,3131	0,5182	0,6888	-
Cantidad de hidrocortisona medida (μg)	8,31	11,08	16,62	22,16	-

20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la separación selectiva de proteínas de materiales biológicos líquidos que, con respecto a la cantidad total, contienen un porcentaje de menos del 10% en peso de un componente traza, que se seleccionan de un grupo de compuestos tales como inmunosupresores antiinflamatorios, antiarrítmicos, biomarcadores no proteicos, drogas, sustancias dopantes, micotoxinas, antidepresivos, antiepilépticos, antipsicóticos, antibióticos, caracterizado por las etapas de
5
a) añadir al menos un disolvente orgánico polar, al material biológico líquido, teniendo el disolvente un momento dipolar en el intervalo de desde 1,6 hasta 4,0 Debye y
10
b) añadir partículas de gel de sílice magnéticas al material biológico líquido para la adsorción de las proteínas,
15
c) eliminar magnéticamente las partículas de gel de sílice con las proteínas adsorbidas del material biológico líquido y obtener un residuo líquido, quedando los componentes traza en el líquido y analizándose posteriormente.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las partículas de gel de sílice presentan al menos uno o varios núcleos magnéticos.
20
3. Procedimiento según la reivindicación 1 y 2, caracterizado porque las partículas de gel de sílice presentan un diámetro en el intervalo de desde 20 nm hasta 500 µm.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el material biológico líquido son líquidos corporales acuosos de un ser humano o animal.
25
5. Procedimiento según la reivindicación 1 o 4, caracterizado porque el material biológico líquido comprende plasma, suero, saliva, lágrimas, líquido cefalorraquídeo, líquido tisular, líquido amniótico, líquido folicular, sangre completa, sangre hemolizada, orina, líquido cerebroespinal.
30
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque los componentes traza son solubles en el al menos un disolvente orgánico polar.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la concentración de los componentes traza presenta un valor de concentración mínimo de 100 pg/l.
35
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la adición de al menos un disolvente orgánico polar al material biológico líquido asciende a de 1,5 a 4 veces las partes en peso del al menos un disolvente orgánico polar.
40
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la adición de las partículas de gel de sílice al material biológico líquido supone de 0,05 a 0,4 veces las partes en peso de las partículas de gel de sílice con respecto a una parte en peso del material biológico líquido.
45
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque la eliminación de las proteínas adsorbidas a las partículas de gel de sílice del líquido tiene lugar mediante fuerza de compresión, fuerza centrífuga y/o un campo magnético.
- 50 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque los componentes traza comprenden biomarcadores no proteicos, en particular estrógenos, carotenoides y citocinas.