

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
25 juillet 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/057737 A2

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : G01N (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR02/00216
- (22) Date de dépôt international : 18 janvier 2002 (18.01.2002)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) Données relatives à la priorité : 01/00762 19 janvier 2001 (19.01.2001) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : SEBIA [FR/FR]; 23, rue Maximilien Robespierre, F-92130 Issy les Moulineaux (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : NOUADJE, Georges [FR/FR]; 5, square Jean Allemane, F-91000 Evry (FR). ROBERT, Frédéric [FR/FR]; 16, rue des Bergeronnettes, F-91540 Mennecy (FR).
- (74) Mandataire : ERNEST GUTMANN; YVES PLASSER-AUD S.A., 3 rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).
- Publiée :
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR SEPARATING PROTEINS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND BUFFER COMPOSITIONS FOR CAPILLARY ELECTROPHORESIS

(54) Titre : PROCEDE DE SEPARATION DE PROTEINES PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE ET COMPOSITIONS DE TAMPON POUR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

(57) Abstract: The invention relates to a method for capillary electrophoresis in free solution with alkaline an pH, for analysing biological samples comprising protein constituents. Said method is characterised in that it comprises at least one step whereby the sample is introduced into a capillary tube containing an analysis buffer. Said analysis buffer also comprises at least one additive capable of hydrophobic interaction with one or more protein constituents and capable of providing said protein constituent(s) with one or more negative charges and of altering the electrophoretic mobility thereof. The invention also relates to analysis buffer compositions for carrying out said method.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé d'électrophorèse capillaire en solution libre à pH alcalin pour l'analyse d'échantillons biologiques comportant des constituants protéiques, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape où on introduit l'échantillon dans un tube capillaire contenant un tampon d'analyse, ledit tampon d'analyse comportant en outre au moins additif capable d'interaction hydrophobe avec un ou plusieurs constituants protéiques et capable d'apporter à ce ou ces constituants protéiques une ou plusieurs charges négatives et d'en modifier la mobilité électrophorétique. Elle concerne également des compositions de tampon d'analyse pour sa mise en oeuvre.



WO 02/057737 A2

PROCÉDÉ DE SÉPARATION DE PROTÉINES PAR ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE
ET COMPOSITIONS DE TAMPON POUR ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

La présente invention concerne un procédé pour la séparation
5 de protéines et peptides par électrophorèse capillaire ainsi que des
compositions de tampon comportant un additif utile pour cette séparation.

Il est connu d'analyser le taux des protéines dans des liquides
biologiques comme du sérum, avec des visées analytiques et notamment
diagnostiques, et usuellement de séparer des protéines par électrophorèse,
10 tant en électrophorèse sur gel qu'en électrophorèse capillaire. L'un des
intérêts de l'électrophorèse capillaire réside dans le fait que de très petites
quantités des liquides biologiques à analyser sont nécessaires. De plus la
séparation par cette technique peut être très rapide, dans la mesure où de
forts voltages peuvent être utilisés sans que l'échantillon ne s'échauffe trop
15 lors de la séparation.

Pour la séparation des protéines sériques, on effectue
classiquement l'électrophorèse capillaire avec des tampons alcalins.
Usuellement, les profils protéiques obtenus comportent cinq ou six fractions
que sont la fraction albumine, les fractions α_1 - et α_2 -globuline, la fraction
20 β -globuline ou les fractions β_1 - et β_2 -globuline et la fraction γ -globuline.

De telles séparations peuvent être faites, en électrophorèse
capillaire, notamment, à l'aide de tampons d'analyse et techniques tels que
décrits aux brevets US Re 36 011 ou EP 518 475.

Jusqu'ici, en électrophorèse capillaire notamment, la séparation
25 de l'albumine et de l' α_1 -globuline est toutefois insatisfaisante.

La demanderesse a maintenant mis en évidence qu'en utilisant
un additif au tampon d'analyse, additif comportant un pôle anionique à un
pH supérieur à 9 et une partie hydrophobe, il était possible d'obtenir une
séparation améliorée, notamment la séparation albumine/ α_1 -globuline. Ces
30 additifs sont capables d'une part d'interactions hydrophobes avec un ou
plusieurs constituants protéiques et d'autre part capables d'apporter à ce

ou ces constituants protéiques une ou plusieurs charges négatives et d'en modifier la mobilité électrophorétique.

Ainsi l'invention concerne un procédé d'électrophorèse capillaire en solution libre à pH alcalin pour l'analyse d'échantillons comportant des constituants protéiques, dans lequel on introduit l'échantillon dans un tube capillaire contenant un tampon d'analyse, ledit tampon d'analyse comportant en outre au moins un additif capable d'interaction hydrophobe avec un ou plusieurs constituants protéiques et capable d'apporter à ce ou ces constituants protéiques une ou plusieurs charges négatives et d'en modifier la mobilité électrophorétique. Cette étape est en général suivie de la séparation des constituants protéiques par migration et détection des constituants.

L'invention concerne également un procédé de séparation par électrophorèse des constituants protéiques d'échantillons comportant de l'albumine et les fractions α_1 - ; α_2 - ; β - (ou β_1 - et β_2 -) ; et γ -globuline, dans un tampon d'analyse, dans lequel le tampon d'analyse comporte un additif en outre au moins capable d'interaction hydrophobe avec l'albumine.

La présente invention concerne également un procédé de séparation électrophorétique, par électrophorèse capillaire à pH alcalin en solution libre, des constituants protéiques d'un échantillon liquide, procédé dans lequel on fait passer l'échantillon comportant lesdits constituants dans un capillaire contenant un tampon d'analyse comportant en outre au moins un additif, l'additif étant un composé comportant un pôle anionique à un pH supérieur à 9 et une partie hydrophobe.

Ainsi, les composés utiles comme additif pour tampon d'analyse en électrophorèse capillaire de l'invention sont notamment capables d'interaction hydrophobe avec l'albumine ; ces composés peuvent être par exemple des surfactants anioniques tels que ceux utilisés en MECC (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography), mais à une concentration inférieure à leur concentration micellaire critique. Dans la présente invention, nous utilisons ces composés en EC en solution libre : il

y a apport de charges négatives sur l'albumine par interaction hydrophobe entre les résidus hydrophobes de l'albumine et la partie hydrophobe de ces composés, d'où une diminution de la mobilité de l'albumine par rapport à celle des autres protéines. Une des conséquences est la séparation améliorée de l'albumine et de la fraction α_1 .

Enfin, l'invention concerne des compositions d'électrolyte pour l'électrophorèse capillaire comportant au moins un tampon et un additif capable d'interaction hydrophobe avec l'albumine, dans un support acceptable.

Comme cela apparaît dans les exemples, l'utilisation d'additifs selon l'invention permet une séparation améliorée des fractions albumine et α_1 -globuline. Elle permet en outre un meilleur retour à la ligne de base entre ces deux fractions qu'avec les tampons usuels.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description détaillée, des exemples et figures annexées.

La figure 1 représente un électrophérogramme d'un sérum humain normal analysé par électrophorèse capillaire en utilisant un tampon glycine.

La figure 2 représente un électrophérogramme d'un sérum humain normal analysé par électrophorèse capillaire en utilisant le même tampon glycine avec un additif selon l'invention.

La figure 3 représente un électrophérogramme d'un sérum humain normal analysé par électrophorèse capillaire en utilisant un tampon borate.

La figure 4 représente un électrophérogramme d'un sérum humain normal analysé par électrophorèse capillaire en utilisant le même tampon borate avec un additif selon l'invention.

La figure 5 représente un électrophérogramme d'un sérum humain normal, obtenu par électrophorèse sur gel d'agarose.

La figure 6 représente un électrophérogramme d'un sérum d'un patient présentant un syndrome inflammatoire aigu, réalisé en électrophorèse capillaire avec un tampon glycine.

5 La figure 7 représente un électrophérogramme d'un sérum d'un patient présentant un syndrome inflammatoire aigu réalisé en électrophorèse capillaire en utilisant le même tampon glycine avec un additif selon l'invention.

10 La figure 8 représente un électrophérogramme d'un sérum d'un patient présentant un syndrome inflammatoire aigu réalisé en électrophorèse capillaire avec un tampon borate.

La figure 9 représente un électrophérogramme d'un sérum d'un patient présentant un syndrome inflammatoire aigu réalisé en électrophorèse capillaire en utilisant le même tampon borate avec un additif selon l'invention.

15 La figure 10 représente un électrophérogramme du sérum d'un patient présentant un syndrome inflammatoire aigu, obtenu par électrophorèse sur gel d'agarose.

20 La figure 11 illustre pour diverses longueurs de la chaîne carbonée d'un alkylsulfonate additionné à un tampon borate usuel, la mobilité de la fraction α_1 -globuline et celle de la fraction albumine.

A titre d'additif pour tampon utile selon l'invention et capable d'interaction avec la partie hydrophobe de l'albumine, on peut citer les composés comportant un pôle anionique à pH supérieur à 9 et une partie hydrophobe. La partie hydrophobe peut être composée d'au moins une chaîne alkyle, ramifiée ou non, de 4 à 22 atomes de carbone, notamment 4 à 20 atomes de carbone, et/ou d'au moins une combinaison de 1 à 10 cycles, aromatiques ou non. On préfère des combinaisons de 1 à 4 cycles. Comme cela sera facilement compris du spécialiste, cette partie hydrophobe pourra comporter des résidus ou fonctions qui ne modifient pas
25
30 essentiellement son caractère hydrophobe, comme un ou plusieurs groupements hydroxy ou amine, par exemple.

Le pôle anionique peut être constitué par un ou plusieurs des groupes ou fonctions chimiques de la liste suivante : sulfonates, carboxylates, sulfates, phosphates, carbonates.

On peut ainsi citer notamment les surfactants anioniques du type cholate, les C₆-C₂₂-alkyl-mono-, di- ou tri-alkylsulfonates, le tétradécènesulfonate, les naphthalènesulfonates, les C₆-C₂₂-alkyl-mono-, di- ou tri- carboxylates, les C₆-C₂₂ alkylcarboxysulfonates, les naphthalèncarboxylates, les C₄ à C₁₄ alkylsulfates, les C₄ à C₁₄-alkylcarbonates, les benzènesulfonates et les benzèncarboxylates.

Les di- et tri-carboxylates, di- et tri-sulfonates et carboxysulfonates ci-dessus sont ainsi des combinaisons de une ou plusieurs fonctions carboxylates ou sulfonates sur des chaînes alkyles de 6 à 22 atomes de carbone. A titre d'exemple non limitatif, on peut citer l'acide 1,2,3-nonadécane-tricarboxylique qui comporte trois fonctions carboxylates et une chaîne en C₁₉, l'acide 2-méthyl-2-sulfooctadécanoïque qui comporte une fonction carboxylate et une fonction sulfonate et une chaîne en C₁₈, et l'acide 1,12-dodécane-dicarboxylique qui comporte deux fonctions carboxylate et une chaîne en C₁₂.

Plus précisément, on peut citer les C₆ à C₁₀-alkylsulfonates parmi les C₆-C₂₂-alkyl-mono-, di- ou tri-alkylsulfonates et les C₆ à C₁₄ alkylcarboxylates parmi les C₆-C₂₂-alkyl-mono-, di- ou tri- carboxylates.

Dans les dénominations ci-dessus, les radicaux alkyle sont de préférence linéaires.

Des tampons biologiques sont utilisables comme additif selon l'invention. On peut citer notamment les tampons zwitterioniques du type Good comme le CAPS (acide 3-cyclohexylamino-1-propane-sulfonique) et le CHES (acide 2-(N-cyclohexylamino)éthanesulfonique).

D'autres tampons biologiques zwitterioniques sont utilisables selon l'invention. Les tampons acide aminés ne sont toutefois pas considérés comme faisant partie de la présente invention.

Parmi les additifs cités ci-dessus, on préfère les C₆ à C₁₀ alkylsulfonates et parmi les C₆ à C₁₀ alkylsulfonates, on préfère particulièrement l'octanesulfonate.

5 Ces composés sont connus en soi et disponibles dans le commerce. Ils peuvent être sous forme acide ou sous forme de sels.

Par échantillon selon l'invention, on entend l'échantillon biologique à analyser, préalablement dilué avec une solution de dilution appropriée ou du tampon d'analyse, par exemple, ou pur.

10 Comme échantillon, on peut analyser tout liquide biologique de patients sains ou malades. Ainsi, les liquides biologiques humains peuvent être du sérum normal ou pas, et aussi du sang hémolysé, du plasma, de l'urine ou du fluide cérébro-spinal. Outre les échantillons biologiques humains, on peut analyser des échantillons d'origine animale. Les échantillons peuvent aussi être des protéines synthétiques, et le procédé
15 de l'invention peut alors avoir des visées de contrôle de production par exemple.

Les additifs selon l'invention sont particulièrement utiles pour les analyses de sérum, et la séparation de protéines sériques, dans des échantillons humains.

20 Dans les échantillons de sérum, les protéines sériques à séparer sont l'albumine et les fractions α_1 - ; α_2 - ; β (ou β_1 - et β_2 -) ; et γ -globuline.

A titre de tampon d'analyse, on peut utiliser tout tampon d'analyse connu, adapté à la séparation souhaitée, et utile en électrophorèse en général, et en électrophorèse capillaire en particulier. A
25 titre d'exemples, on peut citer les tampons borate, phosphate et carbonate, les tampons à base d'acide aminé et les tampons dits biologiques.

Comme tampon biologique, on peut citer les tampons connus sous les noms de Bis-TRIS (2-bis[2-hydroxyéthyl]amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol), ADA (acide N-[2-acétamido]-2-iminodiacétique), ACES (acide 2-[2-acétamino]-2-aminoéthanesulfonique), PIPES (acide 1,4-
30 pipérazinediéthanesulfonique), MOPSO (acide 3-[N-morpholino]-2-

hydroxypropanesulfonique), Bis-TRIS PROPANE (1,3-
 bis[tris(Hydroxyméthyl)méthylaminolpropane]), BES (acide N,N-
 bis[2hydroxyéthyl]-2-aminoéthanesulfonique), MOPS (acide 3-[N-
 morpholino]propanesulfonique), TES (acide 2-[2-hydroxy-1,1-
 5 bis(hydroxyméthyl)éthylamino]éthanesulfonique), HEPES (acide N-[2-
 hydroéthyl]piperazine-N'-(2-éthanesulfonique)), DIPSO (acide 3-N,N-bis[2
 hydroxyéthyl]amino-2-hydroxypropanesulfonique), MOBS (acide 4-N-
 morpholinobutanesulfonique), TAPSO (acide 3[N-tris-hydroxyméthyl-
 méthylamino]-2-hydroxypropane sulfonique), TRIS (2-amino-2-
 10 [hydroxyméthyl]-1,3-propanediol), HEPPSO (acide N-[2-
 hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-hydroxypropanesulfonique]), POPSO (acide
 piperazine-N,N'-bis[2-hydroxypropanesulfonique], TEA (triéthanolamine),
 EPPS (acide N-[2-hydroxyéthyl]-piperazine-N'-[3-propane-sulfonique]),
 TRICINE (N-tris[hydroxyméthyl]méthylglycine), GLY-GLY (diglycine),
 15 BICINE (N,N-bis[2-hydroxyéthyl]-glycine), HEPBS (acide N-[2-
 hydroxyéthyl]piperazine-N'-[4-butanesulfonique]), TAPS (acide N-
 tris[hydroxyméthyl]méthyl-3-aminopropanesulfonique), AMPD (2-amino-2-
 méthyl-1,3-promanediol), TABS (acide N-tris[hydroxyméthyl]méthyl-4-
 amino butane sulfonique), AMPSO (acide 3-[(1,1-diméthyl-2-
 20 hydroxyéthyl)amino]-2-hydroxypropanesulfonique), CHES (acide 2-(N-
 cyclohexylamino)éthanesulfonique), CAPSO (acide 3-[cyclohexylamino]-2-
 hydroxy-1-propanesulfonique), AMP (2-amino-2-méthyl-1-propanol), CAPS
 (acide 3-cyclohexylamino-1-propane-sulfonique) ou CABS (acide 4-
 [cyclohexylamino]-1-butanesulfonique), de préférence AMPD, TABS,
 25 AMPSO, CHES, CAPSO, AMP, CAPS ou CABS.

Du point de vue du pH du liquide biologique dans le tampon
 d'analyse, y compris l'additif, celui-ci peut varier entre 2 et 12. Néanmoins,
 en électrophorèse capillaire à pH alcalin, le pH est compris entre 8 et 12,
 de préférence entre 9 et 11, et de façon plus particulièrement préférée a
 30 une valeur d'environ 10.

Les tampons d'analyse selon l'invention peuvent en outre comporter au moins un composé modifiant le pH. A titre de modificateur de pH, on peut utiliser un composé choisi parmi l'hydroxyde de lithium, l'hydroxyde de sodium, l'hydroxyde de potassium, l'hydroxyde de rubidium, l'hydroxyde de césium, l'hydroxyde de francium, un hydroxyde de mono-, di-, tri- ou tétra-alkyl ammonium ayant de 1 à 8 atomes de carbone dans la partie alkyle.

Selon l'invention, les tampons d'analyse sont utilisés dans les conditions et concentrations usuelles, à savoir de l'ordre de 10 à 500 mM, de préférence 20 à 400 mM.

Les additifs selon l'invention sont utilisés dans des concentrations allant de 0,1 mM à 500 mM, sans toutefois excéder leur concentration micellaire critique dans le tampon d'analyse.

Cette valeur de concentration micellaire critique intervient pour les additifs qui sont des surfactants.

Lorsque l'octanesulfonate est utilisé, sa concentration dans le tampon est de l'ordre de 1 à 5 mM, et de préférence 1 à 4 mM. De façon préférée, la concentration peut être d'environ 2,5 mM.

Dans les procédés de l'invention, le tampon d'analyse peut en outre comporter du sulfate de sodium.

Les compositions de tampon de l'invention sont préparées de façon usuelle pour des compositions de tampon d'analyse, à savoir par adjonction des constituants sous forme liquide, ou solide à diluer, à un support acceptable. De façon usuelle, le support est de l'eau, distillée ou déminéralisée.

Du point de vue des matériaux utilisés pour les capillaires, ceux-ci sont usuels en électrophorèse capillaire. Ainsi, on peut utiliser des capillaires de silice fondue. Leur diamètre interne peut aller de 5 à 2 000 μm . De façon préférée, on utilise selon l'invention des capillaires de diamètre interne inférieur à 200 μm , de préférence inférieur à 100 μm . On utilise de préférence des capillaires à surface intérieure non traitée. Le

spécialiste saura adapter la nature du capillaire et sa taille aux besoins de l'analyse.

Exemples

MATERIEL ET METHODES

5 A) Electrophorèse capillaire (méthode A)

L'électrophorèse capillaire d'échantillons cliniques est réalisée sur un appareil d'EC équipé d'un capillaire en silice fondue de diamètre interne 25 microns. La détection est réalisée à 200 nm. Les échantillons sont placés dans le passeur d'échantillons de l'appareil et injectés
10 automatiquement par injection hydrodynamique (50 mbars pendant 7 s). La séparation des échantillons est réalisée en moins de 10 minutes en appliquant un champ électrique d'environ 400 V/cm. Le capillaire est lavé
avant chaque analyse par la soude 0,5 M, puis par le tampon d'analyse.

Tampons d'analyse :

15 Les produits chimiques utilisés sont de grade analytique.

Le tampon glycine 150 mM est préparé en dissolvant 11,26 g de glycine (masse molaire 75,07 g/mol) dans 1 l d'eau déminéralisée. La concentration finale est de 150 mM et le pH est ajusté à 10,0 par addition de pastilles de soude (masse molaire : 40,0 g/mol).

20 Le tampon borate 150 mM est préparé en dissolvant 9,3 g d'acide borique (masse molaire : 61,83 g/mol) dans 1 l d'eau déminéralisée, et 5,1 g de soude (masse molaire : 40,0 g/mol). La concentration finale est de 150 mM et le pH de 10,0.

B) Electrophorèse sur gel d'agarose (méthode B)

25 L'analyse comparative de protéines sériques est réalisée sur gel d'agarose. 10 µL de sérum ont été chargés dans chaque puits de l'applicateur à membrane décrit dans les brevets EP 0 493 996, US 5,464,515, US 5,405,516. L'applicateur ainsi chargé a ensuite été appliqué à la surface d'un gel d'agarose pendant 30 s. La séparation de
30 ces échantillons appliqués sur ce gel d'agarose a été obtenue par électrophorèse pendant 7,5 minutes environ et à une puissance de 20 W,

sur un instrument permettant de réguler la température à 20°C. Après migration, le gel a été séché et coloré à l'amidoschwarz. Après coloration, le gel est décoloré et séché à nouveau. Les gels sont alors analysés par densitométrie ce qui permet d'obtenir les profils protéiques.

5 C) Echantillons cliniques :

Pour l'EC, les sérums humains sont dilués au 1/10^{ème} dans le tampon d'analyse.

Exemple 1 (comparatif)

10 Un tampon d'analyse glycine est préparé comme ci-dessus. On a analysé du sérum normal.

L'électrophorèse a été réalisée selon la méthode A ci-dessus.

15 Comme cela apparaît sur la figure 1, l'électrophérogramme obtenu présente, de gauche à droite, cinq pics successifs attribués respectivement aux fractions γ , β , α_2 , α_1 -globuline et albumine.

Exemple 2

20 Au tampon d'analyse de l'exemple 1, on ajoute de l'octanesulfonate à une concentration de 2,5 mM.

L'électrophorèse a été réalisée comme à l'exemple 1.

25 Comme cela apparaît sur la figure 2, l'électrophérogramme obtenu présente, de gauche à droite, cinq pics successifs attribués respectivement aux fractions γ , β , α_2 , α_1 -globuline et albumine. Par comparaison avec le résultat de l'exemple 1, la séparation entre les deux fractions α_1 -globuline et albumine est nettement améliorée et le retour à la ligne de base est meilleur.

Exemple 3 (comparatif)

30 On opère comme à l'exemple 1, le tampon d'analyse utilisé étant un tampon borate préparé comme indiqué ci-dessus.

L'électrophorèse a été réalisée comme à l'exemple 1.

Comme cela apparaît sur la figure 3 l'électrophérogramme obtenu présente, de gauche à droite, six pics successifs attribués respectivement aux fractions γ -, β_2 -, β_1 -, α_2 -, α_1 -globuline et albumine.

Exemple 4

5 Au tampon de l'exemple 4, on ajoute de l'octanesulfonate à une concentration de 2,5 mM.

L'électrophorèse a été réalisée comme à l'exemple 1.

Comme cela apparaît sur la figure 4, l'électrophérogramme obtenu présente, de gauche à droite, six pics successifs attribués
10 respectivement aux fractions γ -, β_2 -, β_1 -, α_2 -, α_1 -globuline et albumine. La séparation entre les deux fractions α_1 - et albumine est nettement améliorée et le retour à la ligne de base est meilleur.

Exemple 5 (comparatif)

On obtient l'électrophérogramme de la figure 5 en analysant le
15 même sérum qu'aux exemples précédents par la méthode B ci-dessus. Par comparaison avec le résultat obtenu aux exemples 2 et 4, on constate que ces modes de réalisation permettent d'obtenir une résolution pratiquement comparable à la résolution obtenue sur gel d'agorose.

Exemple 6 (comparatif)

20 Un tampon d'analyse glycine 150 mM a été préparé.

Du sérum à fortes α_1 - et α_2 -globulines a été analysé.

L'électrophorèse a été réalisée comme à l'exemple 1.

Comme cela apparaît sur la figure 6, l'électrophérogramme obtenu présente, de gauche à droite, cinq pics successifs attribués
25 respectivement aux fractions γ -, β -, α_2 -, α_1 -globuline et albumine.

Exemple 7

Au tampon d'analyse de l'exemple 7, on ajoute de l'octanesulfonate à une concentration de 2,5mM.

L'électrophorèse a été réalisée comme à l'exemple 6.

30 Comme cela apparaît sur la figure 7, l'électrophérogramme obtenu présente, de gauche à droite, cinq pics successifs attribués

respectivement aux fractions γ , β , α_2 , α_1 -globuline et albumine. Par comparaison avec le résultat de l'exemple 6, la séparation entre les deux fractions α_1 -globuline et albumine est nettement améliorée et le retour à la ligne de base est meilleur.

5 Exemple 8 (comparatif)

On opère comme à l'exemple 6, le tampon utilisé étant un tampon borate 150 mM.

L'électrophorèse a été réalisée comme à l'exemple 6.

10 Comme cela apparaît sur la figure 8 l'électrophérogramme obtenu dans les mêmes conditions présente, de gauche à droite, six pics successifs attribués respectivement aux fractions γ , β_2 , β_1 , α_2 , α_1 -globuline et albumine.

Exemple 9

15 Au tampon de l'exemple 8, on ajoute de l'octanesulfonate à une concentration de 2,5 mM.

L'électrophorèse a été réalisée comme à l'exemple 6.

20 Comme cela apparaît sur la figure 9, l'électrophérogramme obtenu dans les mêmes conditions présente, de gauche à droite, six pics successifs attribués respectivement aux fractions γ , β_2 , β_1 , α_2 , α_1 -globuline et albumine. La séparation entre les deux fractions α_1 - et albumine est améliorée par un meilleur retour à la ligne de base. On observe que la fraction α_1 est composée de deux pics, dont l'un, qui correspond à l'orosomucoïde était, en l'absence d'octanesulfonate, confondu avec le pic de l'albumine.

25 Exemple 10 (comparatif)

30 On obtient l'électrophérogramme de la figure 10 en analysant le même sérum qu'aux exemples 6 à 9 par la méthode B ci-dessus. Par comparaison avec le résultat obtenu aux exemples 7 et 9, on constate que ces modes de réalisation permettent d'obtenir une résolution pratiquement comparable à la résolution obtenue sur gel d'agarose.

Exemple 11

On a mesuré la mobilité (mn^{-1}) comparée de l' α_1 -globuline et de l'albumine, dans un tampon borate (150 mM) à pH 10, par la méthode A ci-dessus. On a ajouté des alkylsulfonates de longueur (n) de chaîne alkyle croissante (n représente 4, 6, 8 et 10 respectivement pour C₄, C₆, C₈ et C₁₀ et n=0 correspond à un tampon sans alkylsulfonate) à une concentration de 2,5 mM au tampon borate. Les mobilités des fractions alpha-1 et albumine ont été calculées et reportées sur le graphique de la figure 11. On observe une nette diminution de la mobilité de l'albumine (■) par rapport à celle de la fraction alpha-1 (◆) à partir d'une chaîne en C6.

REVENDEICATIONS

1. Procédé d'électrophorèse capillaire en solution libre à pH alcalin pour l'analyse d'échantillons comportant des constituants protéiques, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape où :
5 on introduit l'échantillon dans un tube capillaire contenant un tampon d'analyse, ledit tampon d'analyse comportant en outre au moins un additif capable d'interaction hydrophobe avec un ou plusieurs constituants protéiques et capable d'apporter à ce ou ces constituants protéiques une
10 ou plusieurs charges négatives et d'en modifier la mobilité électrophorétique.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comporte en outre la séparation des constituants par migration et la détection de ces constituants.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'échantillon est biologique.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'échantillon est un échantillon de sérum, du sang hémolysé, plasma, urine ou liquide céphalo-rachidien.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les constituants sont des protéines sériques.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les constituants sont l'albumine et les fractions α_1 -, α_2 -, β - ou (β_1 - et β_2 -) et γ -globuline.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que ledit additif comporte un pôle anionique à un pH supérieur à 9 et une partie hydrophobe.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ledit additif comporte une partie hydrophobe composée d'au moins une chaîne alkyle, ramifiée ou non, de 4 à 22 atomes de carbones, et/ou
30 d'au moins une combinaison de 1 à 10 cycles, aromatiques ou non, et un

pôle anionique constitué par un ou plusieurs groupes choisi(s) parmi les sulfonates, carboxylates, sulfates, phosphates et carbonates.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que ledit additif est choisi parmi les surfactants anioniques du type cholate, les C₆ à C₂₂-alkyl-mono-, di- ou tri-sulfonates, le tétradécènesulfonate, les naphthalènesulfonates, les C₆ à C₂₂-alkyl-mono-, di- ou tri-carboxylates, les C₆-C₂₂-alkylcarboxysulfonates, les naphthalèncarboxylates, les C₄ à C₁₄-alkylsulfates, les C₄ à C₁₄-alkylcarbonates; les benzènesulfonates, les benzèncarboxylates et les tampons biologiques zwitterioniques.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que ledit additif est choisi parmi les surfactants anioniques du type cholate, les C₆ à C₂₂-alkyl-mono-, di- ou tri-sulfonates, le tétradécènesulfonate; les naphthalènesulfonates, les C₆ à C₂₂-alkyl-mono-, di- ou tri-carboxylates, les C₆-C₂₂-alkylcarboxysulfonates, les naphthalèncarboxylates, les C₄ à C₁₄-alkylsulfates, les C₄ à C₁₄-alkylcarbonates, les benzènesulfonates et les benzèncarboxylates.

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'additif est un C₆ à C₁₀ alkylsulfonate.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'additif est l'octanesulfonate.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que la concentration en additif dans le tampon est comprise entre 0,1 mM et 500 mM, sans excéder le cas échéant la concentration micellaire critique dudit additif dans ledit tampon.

14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que la concentration dudit additif dans ledit tampon est comprise entre 1 mM et 5 mM.

15. Procédé selon l'une des revendication 1 à 14, caractérisé en ce que la concentration d'additif dans le tampon est de l'ordre de 2,5 mM.

16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que le pH dudit tampon d'analyse est compris entre 9 et 11.

17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que le capillaire est en silice fondue.

5 18. Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que le tampon d'analyse comprend en outre au moins un modificateur de pH.

19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que le modificateur de pH est choisi parmi l'hydroxyde de lithium, l'hydroxyde de sodium, l'hydroxyde de potassium, l'hydroxyde de rubidium, l'hydroxyde de césium, l'hydroxyde de francium, un hydroxyde de mono-, di-, tri- ou tétra-alkyl ammonium ayant de 1 à 8 atomes de carbone dans la partie alkyle.

20. Procédé de séparation par électrophorèse des constituants protéiques d'échantillons comportant de l'albumine et les fractions α_1 - ; α_2 - ; β - ou β_1 - et β_2 - ; et γ -globuline, dans un tampon, procédé dans lequel on fait passer l'échantillon comportant lesdits constituants dans un capillaire contenant un tampon d'analyse comportant en outre au moins un additif capable d'interaction hydrophobe avec l'albumine.

21. Procédé de séparation électrophorétique, par électrophorèse capillaire à pH alcalin en solution libre, des constituants protéiques d'un échantillon liquide, procédé dans lequel on fait passer l'échantillon comportant lesdits constituants dans un capillaire contenant un tampon d'analyse comportant en outre au moins un additif, l'additif étant un composé comportant un pôle anionique chargé négativement à un pH supérieur à 9 et une partie hydrophobe.

22. Procédé selon l'une des revendications 1 à 21, caractérisé en ce que le tampon d'analyse comporte en outre du sulfate de sodium.

23. Composition d'électrolyte pour électrophorèse capillaire, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un tampon et en outre au moins un additif capable d'interaction hydrophobe avec l'albumine dans un support acceptable.

24. Composition pour électrophorèse capillaire, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un tampon d'analyse et un additif comportant une partie hydrophobe composée d'au moins une chaîne alkyle, ramifiée ou non, de 4 à 22 atomes de carbones, et/ou d'au moins une combinaison de 1 à 10 cycles, aromatiques ou non, et un pôle anionique constitué par un ou plusieurs groupes choisi(s) parmi les sulfonates, carboxylates, sulfates, phosphates et carbonates.

25. Composition pour électrophorèse capillaire selon la revendication 24, caractérisée en ce que ledit additif est choisi parmi les surfactants anioniques du type cholate, les C₆ à C₂₂-alkyl-mono-, di- ou tri-sulfonates, le tétradécènesulfonate, les naphthalènesulfonates, les C₆ à C₂₂-alkyl-mono-, di- ou tri-carboxylates, les C₆-C₂₂-alkyl carboxysulfonates, les naphthalèncarboxylates, les C₄ à C₁₄-alkylsulfates, les C₄ à C₁₄-alkylcarbonates; les benzènesulfonates, les benzèncarboxylates et les tampons biologiques zwitterioniques.

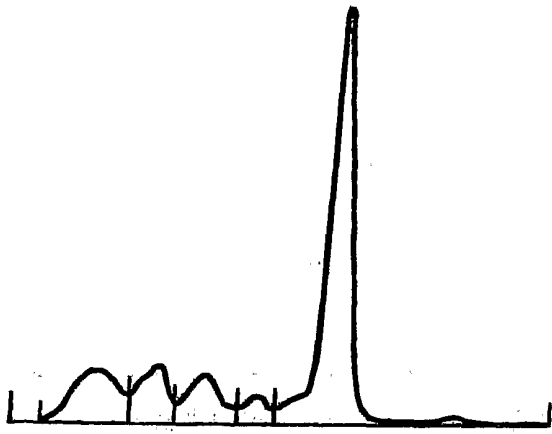
26. Composition pour électrophorèse capillaire selon la revendication 24, caractérisée en ce que ledit additif est choisi parmi les surfactants anioniques du type cholate, les C₆ à C₂₂-alkyl-mono-, di- ou tri-sulfonates, le tétradécènesulfonate, les naphthalènesulfonates, les C₆ à C₂₂-alkyl-mono-, di- ou tri-carboxylates, les C₆-C₂₂-alkyl carboxysulfonates, les naphthalèncarboxylates, les C₄ à C₁₄-alkylsulfates, les C₄ à C₁₄-alkylcarbonates, les benzènesulfonates et les benzèncarboxylates.

27. Composition selon l'une des revendications 23 à 26, caractérisé en ce que l'additif est un C₆ à C₁₀-alkylsulfonate.

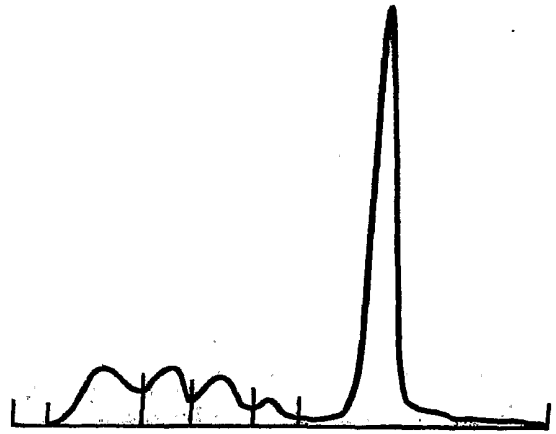
28. Composition selon l'une des revendications 23 à 27, caractérisée en ce que l'additif est l'octanesulfonate.

1/3

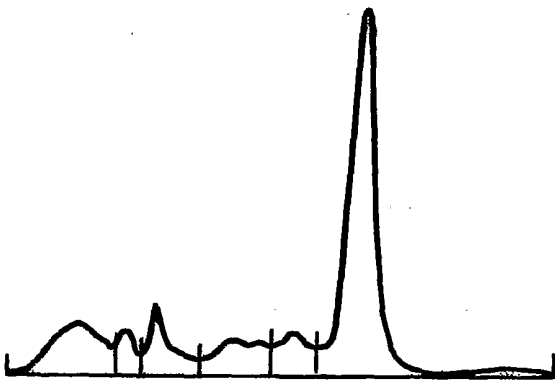
FIG_1



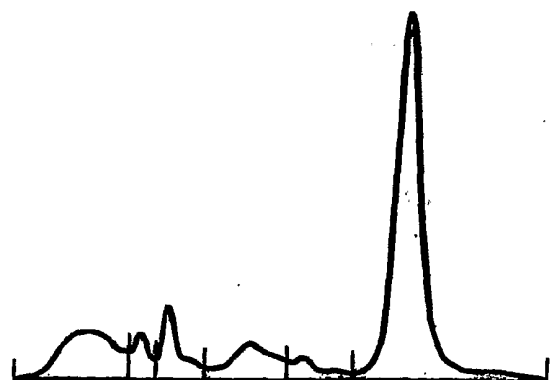
FIG_2



FIG_3



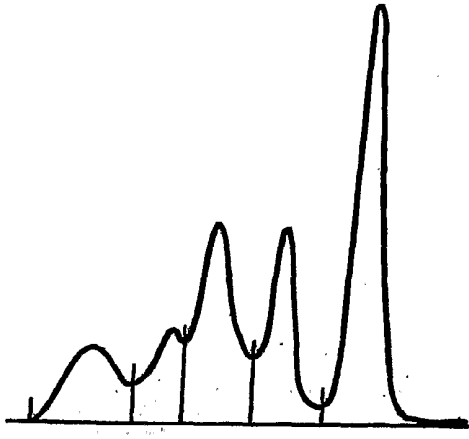
FIG_4



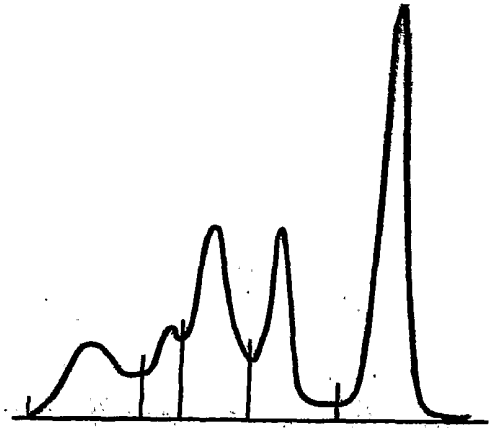
FIG_5



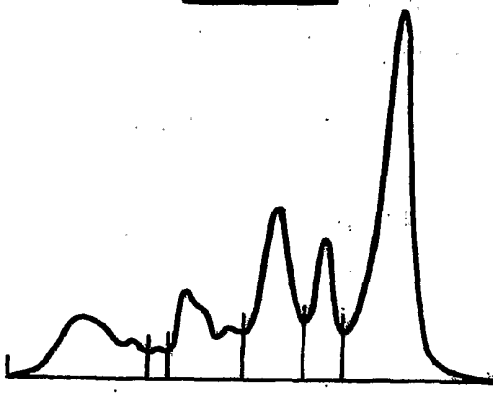
FIG_6



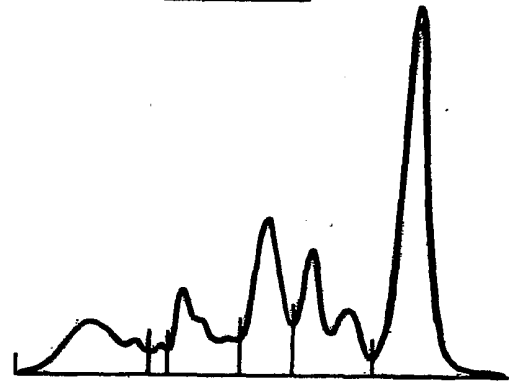
FIG_7



FIG_8



FIG_9



FIG_10

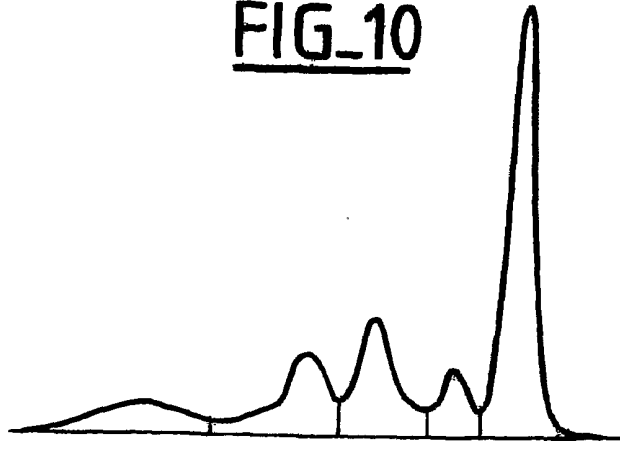


FIG. 11

