

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2005.11.16	(73) Titular(es): SEBIA
(30) Prioridade(s): 2004.11.18 FR 0412263	PARC TECHNOLOGIQUE LÉONARD DE VINCI,
(43) Data de publicação do pedido: 2006.05.24	RUE LÉONARD DE VINCI 91090 LISSES FR
(45) Data e BPI da concessão: 2010.06.30 167/2010	(72) Inventor(es): FRÉDÉRIC ROBERT FR JEAN-BAPTISTE CLEMENT FR DENIS SIMONIN FR
	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PROCESSO DE ANÁLISE DE HEMOGLOBINA POR ELECTROFORESE CAPILAR, ESTOJO PARA A ELECTROFORESE CAPILAR E UTILIZAÇÃO DE UM AGENTE DE DIMINUIÇÃO DO CAUDAL NUM TAL PROCESSO**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

“Processo de análise de hemoglobina por electroforese capilar, estojo para a electroforese capilar e utilização de um agente de diminuição do caudal num tal processo”

A invenção presente diz respeito a um processo de separação da hemoglobina por electroforese capilar bem como a composições de tampões úteis para essa separação, e a estojos de análise da hemoglobina por electroforese capilar.

Para analisar a hemoglobina A₂ e as variantes da hemoglobina, nomeadamente, em líquidos biológicos, tal como no sangue, com objectivos analíticos e nomeadamente de diagnóstico, e portanto para separar as hemoglobinas por electroforese, conhece-se a utilização das técnicas de electroforese capilar (EC). Por hemoglobinas, entende-se neste documento qualquer hemoglobina normal ou não, e as variantes destas hemoglobinas. Um dos interesses da electroforese capilar reside no facto de que apenas são necessárias quantidades muito pequenas dos líquidos biológicos a analisar. Além disto, a separação por esta técnica pode ser muito rápida, na medida em que se podem utilizar voltagens muito fortes sem que a amostra sofra um aquecimento muito grande durante a separação.

Deste modo, a técnica de eleição é a análise por isoelectrofocalização capilar (ClEF). Este método permite obter uma resolução elevada entre as diferentes formas de hemoglobina (Hempe) (7). No entanto a sua automatização é difícil e a necessidade de se utilizarem capilares revestidos, também denominados capilares «coated» para suprimir o caudal electro-osmótico, torna-se dificilmente compatível com as análises efectuadas em séries.

Pode ser utilizada uma outra técnica, denominada técnica de «duplo revestimento dinâmico», nomeadamente com os estojos vendidos sob a designação de «Analis HbA₂-CE kit» ou de «CEofix HbA₂-CE kit» da Analis. Esta técnica implica uma primeira lavagem do capilar com uma solução contendo um poliacatião, com um pH de 4,7, seguida por uma segunda lavagem com um tampão de análise contendo um polianião, a um pH de 8,7. Neste método de «double-coating» ou duplo revestimento, a quantidade de cargas negativas presentes sobre a parede interna do capilar é ainda mais elevada do que sobre a existente num capilar nu, de tal modo que o caudal osmótico é ainda mais importante. Este método de *double-coating* dinâmico não permite no entanto uma separação suficiente entre as fracções HbA₂, HbC e HbE. Isto torna impossível a análise quantitativa da fracção HbA₂ em presença dos variantes HbC ou HbE. Além disto, uma vez que as fracções HbS e HbD ocupam a mesma posição na electroforese, é necessária uma análise complementar em meio ácido para determinar o tipo de variante presente na

amostra. Por último, o duplo revestimento deve ser repostado entre cada análise de amostra, o que torna este método pesado e difícil de utilizar para grandes séries de determinações.

De acordo com o WO 97/04.308, em electrocromatografia, utilizam-se poliaminas livres para a separação de enantiómeros. Por outro lado, na US 5.447.612 descreve-se que se podem utilizar determinados sistemas tampão específicos para se manterem os gradientes de pH necessários para a isoelectrofocagem.

Por outro lado, foram descritas separações de hemoglobinas em solução livre, mas elas não respeitam os critérios de precisão, de resolução ou de rapidez que se esperam para racionalizar as análises das hemoglobinas por EC. A US 5.536.382 propõe um método de análise dos constituintes das amostras, e descreve nomeadamente amostras de sangues previamente misturados com um reagente marcado específico. Em FSCE, descreve-se a análise de uma hemoglobina glicada, sendo o reagente marcado específico para a hemoglobina humana A1C. Ishoka (1) (1992) descreve a separação de hemoglobinas utilizando um tampão de borato (100 mM), a um pH de 9,98, com períodos de migração da ordem dos 50 minutos, portanto incompatíveis com a duração das análises das hemoglobinas tal como são feitas hoje em dia. O mesmo tipo de tampão, em condições semelhantes de concentração e de pH (Jenkins) (3), (4) e (5), não permite senão resoluções insuficientes das fracções HbA, HbF e HbS.

Sahin (2) descreve condições de pH mais ácido, mas apenas a obtenção de resultados muito insuficientes para a resolução entre as fracções HbA, HbF, HbS e HbA₂ com concentrações menores (20 mM) em borato, ou com barbital (50 mM), a um pH de 8,5, e igualmente muito insuficientes para a resolução entre as fracções HbA, HbS e HbA₂ para o tampão Tris (1 M) a um pH de 8,0. Para além disto, utilizaram-se associações Tris/Arginina (Shihabi) (6), e ainda que permitam a separação HbA/HbS, as fracções HbC/HbE e HbA₂ não são resolvidas. Por último, as patentes US 5.202.006 e US 5.439.825 que descrevem a utilização do barbital ou do etilbarbital, não permitem obter senão fracas resoluções entre os principais Hbs, que são os HbA, HbF, HbS e HbC.

Subsiste portanto uma necessidade de um método de análise da hemoglobina e nomeadamente da hemoglobina A₂, que permita a análise num só passo, e sem um revestimento duplo, que se possa levar a cabo automaticamente e em série, e que garanta uma resolução satisfatória, nomeadamente entre as formas HbA₂, HbC, HbD, HbE, HbS, HbF e HbA.

A entidade solicitante demonstrou agora que utilizando um tampão de análise zwitteriónico associado a um dispositivo de diminuição da velocidade do caudal, nomeadamente em EC em solução livre, é possível obter-se uma separação largamente melhorada das fracções evocadas acima, num só passo, evitando deste modo as separações complementares, e sem revestimento duplo, o que simplifica

a concretização. De preferência, trata-se de um processo de electroforese capilar em solução livre que se utiliza (FSCE significando «*Free Solution Capillary Electrophoresis*»).

Deste modo, a invenção presente diz respeito à separação das hemoglobinas por electroforese capilar, em amostras biológicas, processo no qual se faz passar a amostra biológica contendo as hemoglobinas referidas por um capilar contendo um tampão de análise, incluindo pelo menos um passo no qual se introduz a amostra num tubo capilar contendo uma solução de tampão de análise, e em que o tampão seja do tipo zwitteriónico e esteja associado a pelo menos um sistema de diminuição do caudal. A este passo segue-se em geral a separação das hemoglobinas, por migração, e a detecção das diversas variantes.

A título de tampão zwitteriónico, utiliza-se de acordo com a invenção um tampão zwitteriónico tamponizando entre os valores de pH 8 e 10, e incluindo pelo menos uma função amina, e pelo menos uma função ácido, e pelo menos uma função hidroxilo em posição oposta à função ácido. Por função ácido, entende-se neste documento nomeadamente a função ácido carboxílico ou a função ácido sulfónico. Este tampão zwitteriónico pode ser formado por uma ou por duas moléculas: para o caso em que a função amina exista numa primeira molécula que não tem função ácido, esta primeira molécula estará associada a uma segunda molécula que tenha uma função ácido, nomeadamente uma função ácido carboxílico ou sulfónico, ou a de um aminoácido. Pode citar-se, a

título de exemplo, a glicina como aminoácido.

De acordo com a invenção, os agentes de diminuição da velocidade do caudal são do tipo diamina ou poliamina, alifática ou cíclica. Eles são escolhidos de entre as diaminas ou poliaminas alifáticas e/ou as diaminas ou poliaminas cíclicas, por exemplo. Preferem-se as diaminas ou poliaminas alifáticas. A título de diamina alifática, podem citar-se a título de exemplo o 1,3-diaminopropano, o 1,4-diaminobutano, o 1,5-diaminopentano, o 1,6-diaminohexano, a N,N'-dimetil-1,6-hexanodiamina, a N,N,N',N'-tetrametil-1,4-butanodiamina, e os seus derivados e sais aceitáveis. A título de poliaminas alifáticas, podem citar-se a título de exemplo a dietilenotriamina, a espermina, a tetraetilenopentamina, e os seus derivados e sais aceitáveis. Podem utilizar-se os agentes de diminuição da velocidade do caudal em mistura.

A título de sal aceitável, podem citar-se os sais cloridrato ou outros semelhantes. A título de derivados, podem citar-se por exemplo os derivados dos compostos acima nos quais um ou uns átomos de carbono da cadeia alifática seja ou sejam substituído(s) por um uns grupos alquilo, e/ou um hidrogénio(s) das aminas livres seja ou sejam substituído(s) por um ou uns grupos alquilo.

A solução de tampão de análise pode por outro lado conter outros aditivos, nomeadamente outros aditivos que visem melhorar a separação das diferentes hemoglobinas.

Para além disto, a invenção diz respeito à utilização compostos conhecidos pela sua actividade de agentes de diminuição do caudal em electroforese, numa EC em solução livre, associados com pelo menos um tampão zwitteriónico.

Tal como aparece nos exemplos que se seguem, a utilização das associações de acordo com a invenção permite uma resolução muito melhorada da hemoglobina e das variantes da hemoglobina. Ela permite deste modo melhorar a exactidão e a precisão da análise qualitativa e quantitativa das variantes, em relação às análises realizadas com os processos conhecidos. Ela permite igualmente quantificar o HbA₂, mesmo na presença de HbC ou HbE.

As associações entre um tampão zwitteriónico e um agente de diminuição do caudal da invenção são especialmente úteis para a análise de amostras nas quais estejam presentes hemoglobinas normais ou seus variantes do tipo HbA₂, HbC, HbD, HbE, HbS, HbF e/ou HbA, para as detectar ou para as quantificar.

Por último, a invenção tem como objecto estojos (ou kits) de análise por EC da hemoglobina A₂ e das variantes da hemoglobina em amostras biológicas, incluindo pelo menos uma solução de tampão de análise contendo pelo menos um tampão de análise do tipo zwitteriónico e pelo

menos um agente de diminuição do caudal, e eventualmente um modificador de pH. Deste modo, os estojos podem incluir pelo menos um tampão de análise e um agente de diminuição do caudal de acordo com a invenção, e uma ou diversas soluções de lavagem dos capilares e/ou barritas de diluição, e/ou um (ou diversos) diluente(s) da amostra a analisar. Elas podem também comportar além disto, pelo menos uma solução hemolisante. Nestes estojos, o tampão e o ou os agentes de diminuição da velocidade do caudal e diluente(s) ou outros aditivos, podem estar armazenados em separado para serem misturados extemporaneamente, ou estar armazenados já misturados. Este estajo inclui eventualmente, além disto, indicações de utilização para se levar a cabo a análise e/ou um suporte para um programa de identificação.

Durante a leitura da descrição pormenorizada que se segue, dos exemplo e das figuras anexas tornar-se-ão aparentes outras características e vantagens da invenção.

A figura 1 represente um electroforegrama de um sangue humano normal (HbA, HbA₂) analisado por electroforese capilar utilizando uma solução de tampão de acordo com a invenção.

As figuras 2 a 5 representam cada uma delas um electroforegrama de um sangue analisado por electroforese capilar utilizando a mesma solução de tampão. O sangue comporta respectivamente as seguintes variantes: fig. 2

:HbF e HbS ; fig. 3: HbC; fig. 4: HbE; fig. 5: HbS e HbD-Los Angeles.

As figuras 6a, b, c, d representam cada uma delas um electroforegrama de um sangue β -talassémico, analisado por electroforese capilar utilizando quatro soluções de tampão diferentes, baseadas em quatro agentes de diminuição de caudal diferentes.

As figuras 7a, b, c, d representam cada uma delas um electroforegrama de um sangue comportando HbF e HbS, analisado por electroforese capilar utilizando quatro soluções de tampão diferentes baseadas em quatro agentes de diminuição de caudal diferentes.

As condições de realização de uma electroforese capilar, EC, são conhecidas dos técnicos da especialidade. Elas podem incluir habitualmente uma lavagem dos capilares com uma solução de lavagem, uma lavagem com a solução de tampão de análise, uma ou diversas diluições eventuais da amostra, a injeção da amostra, a migração e a detecção. Estes passos podem ser conduzidos por autómatos.

São condições de realização de uma electroforese capilar, por exemplo, as condições de utilização do autómato Capillarys (SEBIA).

A título de tampão zwitteriónico útil de acordo com a invenção, podem citar-se os tampões de tipo «Tris»

providos de diversos grupos hidroxilo, e nomeadamente a título de exemplos, os tampões Tris (2-amino-2-[hidroximetil]-1,3-propanodiol), Tricina (N-tris[hidroximetil]metilglicina), TAPS (ácido N-tris[hidroximetil]metil-3-aminopropanossulfónico), TABS (ácido N-tris[hidroximetil]metil-4-aminobutanossulfónico), ou ainda AMPD (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol) ou Bis Tris Propano (1,3-bis[tris(hidroximetil)metilamino]propano), estes dois últimos e o Tris devendo estar associados a um aminoácido.

Também se podem utilizar igualmente outras moléculas que possuem um menor número de grupos hidroxilo, tais como nomeadamente o AMPSO (ácido 3-[(1,1-dimetil-2-hidroximetil)amino]-2-hidroxi-propanossulfónico), a Bicina (N,N-bis[2-hidroxietil]glicina), o HEPBS (ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[4-butanossulfónico]).

Entre os tampões zwitteriónicos enumerados acima, prefere-se a tricina.

Estes tampões são conhecidos e estão disponíveis no mercado. Eles podem por outro lado ser utilizados em misturas.

A título de agente de diminuição do caudal, de entre aqueles que já se listaram, preferem-se o 1,4-diaminobutano (DAB), o 1,5-diaminopentano, o 1,6-diaminohexano, a dietilenotriamina (DETA) e a N,N,N',N'-

tetrametil-1,4-butanodiamina. Os agentes de diminuição de caudal também podem ser utilizados como misturas.

Em associação com a tricina, prefere-se o cloridrato de 1,4-diaminobutano.

Por amostra, de acordo com a invenção, entende-se uma amostra biológica que se pretende analisar, isto é, qualquer líquido biológico contendo glóbulos vermelhos provindo de pacientes sãos ou de doentes. Deste modo, os líquidos biológicos humanos podem ser sangue, normal ou não, lavado, decantado, centrifugado ou total. Para além disto, o sangue pode ser hemolisado.

Para além das amostras biológicas humanas, podem analisar-se amostras com origem animal. As amostras também podem ter origem sintética, e o processo da invenção pode então ter objectivos de controlo de produção, por exemplo.

Pode diluir-se previamente a amostra com uma solução de diluição que seja apropriada, uma solução hemolisante ou uma solução de tampão da análise, por exemplo.

Os processos EC que recorrem às associações tampão zwitteriónico/agente de diminuição da velocidade do caudal, de acordo com a invenção, são especialmente úteis para as análises de sangue e para a separação da hemoglobina e das suas variantes em amostras humanas.

De acordo com a invenção, o pH da solução de tampão de análise está compreendido entre 8 e 11, de preferência entre 8 e 10.

As soluções de tampões de análise de acordo com a invenção podem por outro lado incluir pelo menos um composto que modifique o pH. A título de modificador do pH, pode-se utilizar um composto seleccionado de entre o hidróxido de lítio, o hidróxido de sódio, o hidróxido de potássio, o hidróxido de rubídio, o hidróxido de cézio, o hidróxido de frâncio, um hidróxido de mono-, di-, tri- ou tetra-alquil-amónio com entre 1 e 8 átomos de carbono na parte alquilo.

De acordo com a invenção, os tampões são utilizados nas soluções de tampão para análise, nas seguintes condições e concentrações habituais, a saber da ordem de entre 20 e 500 mM, preferivelmente 100 a 250 mM.

Os agentes de diminuição do caudal são utilizados nas soluções de tampão, em concentrações compreendidas entre cerca de 0,01 e 50 mM, preferivelmente entre cerca de 0,10 e 20 mM.

Além disto, a solução de tampão pode incluir um ou diversos aditivos próprio(s) para modificar a força iónica.

Podem citar-se compostos deste tipo, tais como sais, por exemplo sulfatos, cloretos, bem como as suas misturas.

A solução hemolisante permite levar a cabo a hemólise dos glóbulos vermelhos que contêm a hemoglobina A₂, bem como as variantes da hemoglobina. Ela também é útil para a diluição da amostra antes da análise por EC. Ela pode permitir, consoante a sua composição, uma lise total dos glóbulos vermelhos utilizando uma ligeira movimentação mecânica adicional (vórtex, agitação, ...).

A solução hemolisante inclui um tampão de análise tal como os que já se listaram (tampões zwiteriónicos), os aditivos habituais para a lise celular, como por exemplo o Triton X100 e/ou a saponina, bem como eventualmente outros aditivos com o objectivo de proporcionarem um efeito positivo sobre a resolução entre determinadas hemoglobinas próximas. A título de exemplo, pode citar-se a solução hemolisante «Hydragel hemoglobine» da Sébia.

O pH da solução hemolisante estará compreendido entre 8 e 11, preferivelmente entre 8 e 10.

As soluções de tampão da invenção são preparadas do modo habitual para composições de tampão de análise, a saber, por adição dos constituintes sob forma líquida, ou sólida para diluição, a um suporte aceitável. Do modo habitual, o suporte é água, destilada ou desmineralizada.

Do ponto de vista dos materiais utilizados para os capilares, eles são habituais na electroforese capilar. Deste modo, podem utilizar-se capilares em sílica fundida. O seu diâmetro interno pode variar entre 5 e 2.000 μm . De um modo preferido, utilizam-se de acordo com a invenção capilares com um diâmetro interno inferior a 200 μm , preferivelmente inferior a 100 μm . Utilizam-se de preferência capilares cuja superfície interior não é tratada. O especialista saberá adaptar a natureza do capilar bem como as suas dimensões, às necessidades da análise.

A utilização de capilares nus deste tipo constitui uma das vantagens da invenção.

As hemoglobinas podem ser analisadas a um comprimento de onda de cerca de 200 nm, no sangue hemolisado obtido a partir de sangue lavado, decantado ou centrifugado. No entanto, para evitar interferências com as proteínas plasmáticas, elas são preferivelmente analisadas a um comprimento de onda de cerca de 415 nm, sobre sangue obtido a partir de sangue lavado, decantado, centrifugado ou total.

Exemplos

MATERIAL E MÉTODOS

A) Electroforese capilar

Leva-se a cabo a electroforese capilar de amostras clínicas num aparelho de EC equipado com um capilar em sílica fundida, com um diâmetro interno de 25 micron.

Leva-se a cabo a detecção sob condições óptimas a cerca de 415 nm.

Colocam-se as amostras num aparelho Capillarys (SEBIA) e elas são automaticamente injectadas por injeção hidrodinâmica. A separação das amostras é levada a cabo em menos de 8 minutos, aplicando um campo eléctrico de cerca de 550 V/cm. Lava-se o capilar antes de cada análise, com soda cáustica 0,25 M, e em seguida com a solução de tampão de análise.

Tampões de análise:

Os produtos químicos utilizados são de grau de pureza 'para análise'.

- Prepara-se o tampão de Tricina 200 mM - 1,4-diaminobutano 15 mM (A) dissolvendo 35,84 g de Tricina em cerca de 900 mL de água desmineralizada, e adicionando a esta solução 2,32 g de cloridrato de 1,4-diaminobutano (DAB). Ajusta-se o pH a 9,37,

a 22°C utilizando cerca de 38,3 mL de NaOH 5 M e ajusta-se o volume da solução de tampão a 1 L com água desmineralizada.

- Prepara-se o tampão de Tricina 200 mM - 1,5-diaminopentano 15 mM (B) dissolvendo 35,84 g de Tricina em cerca de 900 mL de água desmineralizada, e adicionando a esta solução 2,62 g de cloridrato de 1,5-diaminopentano. Ajusta-se o pH a 9,40, a 22°C utilizando cerca de 38,4 mL de NaOH 5 M e ajusta-se o volume da solução de tampão a 1 L com água desmineralizada.
- Prepara-se o tampão de Tricina 200 mM - dietilenotriamina 20 mM (C) dissolvendo 35,84 g de Tricina em cerca de 900 mL de água desmineralizada, e adicionando a esta solução 2,06 g de dietilenotriamina (DETA). Ajusta-se o pH a 9,40, a 22°C utilizando cerca de 32,4 mL de NaOH 5 M e ajusta-se o volume da solução de tampão a 1 L com água desmineralizada.
- Prepara-se o tampão Tricina 200 mM - N,N,N',N'-Tetrametil-1,4-butanodiamina 8 mM (D) dissolvendo 35,84 g de Tricina em cerca de 900 mL de água desmineralizada, e adicionando a esta solução 1,15 g de N,N,N',N'-Tetrametil-1,4-butanodiamina. Ajusta-se o pH a 9,19, a 22°C utilizando cerca de 34,7 mL de NaOH 5 M e ajusta-se o

volume da solução de tampão a 1 L com água desmineralizada.

B) Amostras clínicas:

Para a EC, dilui-se o sangue humano, decantado ou centrifugado, a 1/6, na solução hemolisante. Esta havia sido preparada dissolvendo 1,00 g de Triton X100, 2,50 g de saponina, 3,63 g de Tris em cerca de 900 mL de água desmineralizada. Ajustava-se o pH a 8,70 à 22°C e ajustava-se o volume da solução a 1 L com água desmineralizada. Os produtos químicos utilizados são de graus de pureza 'para análise'.

Exemplos 1 a 5

Prepara-se uma solução de tampão de análise Tricina/DAB•2HCl tal como se descreveu acima.

Levou-se a cabo a electroforese de acordo com o método descrito acima, separando um sangue humano.

Exemplo 1: análise de um sangue humano normal com HbA a título de pico principal, e HbA₂, fracção menos importante. (Figura 1)

Exemplo 2: análise de um sangue humano de um doente que evidencia uma fracção HbA menos forte, uma fracção HbF aumentada, uma fracção HbS forte e uma fracção

HbA₂ normal. Trata-se de uma HbS heterozigótica que origina a doença denominada drepanocitose. (Figura 2)

Exemplo 3: análise de um sangue humano de um doente que apresenta uma situação heterozigótica A/C. A fracção HbC sai logo antes da fracção HbA₂, relativamente à qual está bem resolvida. Esta resolução de qualidade permite quantificar A₂, o que permite por sua vez orientar o diagnóstico de um caso de β-talassémia, isto é, em que a fracção HbA₂ aparece aumentada. (Figura 3)

Exemplo 4: análise de um sangue humano que apresenta uma situação heterozigótica A/E. A fracção HbE sai logo após a fracção HbA₂, em relação à qual ela está completamente resolvida. Não existe portanto qualquer problema para quantificar HbA₂ em presença de HbE. (Figura 4)

Exemplo 5: análise de uma mistura de um sangue que apresenta características heterozigóticas A/S com um sangue que apresenta características heterozigóticas A/D Los Angeles. As fracções HbS e HbD estão parcialmente resolvidas, o que permite distingui-las uma da outra sem que seja necessária mais nenhuma análise complementar. (Figura 5)

Exemplo 6: análise de um sangue humano β-talassémico, isto é, apresentando uma percentagem da função HbA₂ aumentada e apresentando uma pequena fracção HbF.

Preparam-se tal como se descreveu acima quatro soluções de tampões de análise A, B, C e D.

Levou-se a cabo a electroforese seguindo o método descrito acima.

A figura 6a) mostra o resultado com o tampão A (Tricina/DAB•2HCl). A figura 6b) mostra o resultado com o tampão B (Tricina/1,5-diaminopentan•2HCl). A figura 6c) mostra o resultado com o tampão C (Tricina/DETA). A figura 6d) mostra o resultado com o tampão D (Tricina/N,N,N',N'-tetrametil-1,4-butanodiamina).

Comparando estas quatro figuras é possível observar-se, em todos os casos, uma boa separação de cada uma das fracções, bem como uma boa focagem das pequenas fracções HbF e HbA₂.

Exemplo 7: análise de um sangue humano apresentando características heterozigóticas drepanocitárias (HbS/HbA).

Prepararam-se tal como descrito acima quatro soluções de tampões de análise (A: Tricina/DAB•2HCl; B: Tricina/1,5-diaminopentano•2HCl; C: Tricina/DETA; D: Tricina/N,N,N',N'-tetrametil-1,4-butanodiamina).

Levou-se a cabo a electroforese seguindo o método descrito acima.

A ordem das figuras corresponde aos tampões já descritos. Observam-se também nesta situação perfis comparáveis qualquer que seja o tampão utilizado.

Bibliografia

1. Noriaki Ishioka et al., Biomedical Chromatography, vol. **6**, 224-226 (1992).
2. Ahmet Sahin et al., Journal of Chromatography A, **709** (1995) 121-125.
3. Margaret A. Jenkins, Michael D. Guerin, Journal of Chromatography B, **682** (1996) 23-34.
4. Margaret A. Jenkins, Jean Hendy, Ian L. Smith, J. CAP. ELEC. **004:3** (1997) 137-143.
5. Margaret A. Jenkins, Sujiva Ratnaike, Clinica Chimica Acta **289** (1999) 121-132.
6. Zak K. Shihabi et al., Electrophoresis, **21** (2000), 749-752.
7. James M. Hempe, Randall D. Craver, Electrophoresis, **21** (2000) 743-748.

Lisboa, 24 de Agosto de 2010.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de separação das hemoglobinas em amostras biológicas por electroforese capilar em solução livre (FSCE), processo este no qual se faz passar a amostra que contém as hemoglobinas referidas por um capilar contendo um tampão de análise, e que inclua pelo menos um passo durante o qual se introduz a amostra num tubo capilar contendo uma solução de pelo menos um tampão de análise, **caracterizado por** as hemoglobinas serem a hemoglobina A₂ e as hemoglobinas C, D, E, S, F e/ou A, e **também por** o tampão ser do tipo zwitteriónico e estar associado a pelo menos um agente de diminuição da velocidade do caudal seleccionado de entre as diaminas alifáticas, as poliaminas alifáticas, os seus derivados e sais aceitáveis; e as suas misturas.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** incluir além disso a separação das hemoglobinas por migração, e a detecção destas hemoglobinas.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou a 2, **caracterizado por** a amostra ser uma amostra de sangue, normal ou não, lavado, decantado, centrifugado ou total.

4. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado por** a amostra ser uma amostra de sangue hemolisado.

5. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado por** o tampão zwitteriónico ser formado por uma ou por duas moléculas, e incluir pelo menos uma função amina, pelo menos uma função ácido, e pelo menos uma função hidroxilo em posição oposta à da função ácido.

6. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado por** o tampão zwitteriónico ser seleccionado de entre a Tricina, o TAPS, o TABS, o AMPSO, a Bicina ou o HEPBS, ou ser uma associação de Tris, AMPD ou Bis Tris Propano com um aminoácido.

7. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado por** o tampão ser a Tricina.

8. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado por** o referido agente de diminuição da velocidade do caudal ser seleccionado de entre o 1,3-diaminopropano, o 1,4-diaminobutano, o 1,5-diaminopentano, o 1,6-diaminohexano, a dietilenotriamina, a espermina, a N,N'-dimetil-1,6-hexanediamina, a tetraetilenopentamina, a N,N',N',N'-tetrametil-1,4-butanodiamina e os seus derivados ou sais aceitáveis, bem como as suas misturas.

9. Processo de acordo com uma das

reivindicações 1 a 8, **caracterizado por** o agente de diminuição da velocidade do caudal que se referiu ser seleccionado entre o 1,4-diaminobutano, o 1,5-diaminopentano, o 1,6-diaminohexano, a dietilenotriamina, a N,N,N',N'-tetrametil-1,4-butanediamina e os seus derivados ou sais aceitáveis, bem como as suas misturas.

10. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado por** o agente de diminuição da velocidade do caudal que se referiu ser o 1,4-diaminobutano.

11. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado por** o agente de diminuição da velocidade do caudal que se referiu ser o 1,4-diaminobutano sob a forma de cloridrato.

12. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado por** a concentração em tampão na solução de tampão estar compreendida entre 20 mM e 500 mM.

13. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizado por** a concentração em tampão na solução de tampão estar compreendida entre 100 mM e 250 mM.

14. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado por** a concentração em

agente de diminuição da velocidade do caudal na solução de tampão estar compreendida entre 0,01 e 50 mM.

15. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 14, **caracterizado por** a concentração em agente de diminuição da velocidade do caudal na solução de tampão estar compreendida entre 0,10 mM e 20 mM.

16. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 15, **caracterizado por** a solução de tampão comportar também um modificador de pH.

17. Processo de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado por** o agente modificador do pH ser seleccionado de entre o hidróxido de lítio, o hidróxido de sódio, o hidróxido de potássio, o hidróxido de rubídio, o hidróxido de cézio, o hidróxido de frâncio, um hidróxido de um mono-, di-, tri- ou tetra-alquil-amónio contendo entre 1 e 8 átomos de carbono na sua parte alquílica.

18. Processo de acordo com uma das reivindicações 1, a 17, **caracterizado por** o capilar ser nu.

19. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 18, **caracterizado por** o capilar ser em sílica fundida.

20. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 19, **caracterizado por** o pH da solução de

tampão de análise estar compreendido entre 8 e 10.

21. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 20, **caracterizado por** a amostra ser previamente diluída com uma solução de diluição apropriada, uma solução hemolisante ou uma solução de tampão de análise.

22. Utilização de um agente de diminuição da velocidade do caudal seleccionado de entre as diaminas alifáticas, as poliaminas alifáticas, os seus derivados e os seus sais aceitáveis, bem como as misturas destes, num processo de electroforese capilar em solução livre, para se separarem hemoglobinas, em associação com pelo menos um tampão zwitteriónico numa solução de tampão, sendo as hemoglobinas a hemoglobina A₂ e as hemoglobinas C, D, E, S, F e/ou A.

23. Utilização de acordo com a reivindicação 22, na qual o tampão zwitteriónico esteja presente numa concentração de entre cerca de 20 e 500 mM, e o agente de diminuição da velocidade do caudal esteja presente numa concentração de entre cerca de 0,01 a 50 mM.

24. Estojo para análise da hemoglobina por electroforese capilar em solução livre, comportando pelo menos uma solução de tampão de análise contendo (1) pelo menos um tampão de análise do tipo zwitteriónico e (2) pelo menos um agente de diminuição da velocidade do caudal

seleccionado de entre as diaminas alifáticas, as poliaminas alifáticas, os seus derivados e os seus sais aceitáveis, bem como misturas destes.

25. Estojo para análise de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado por** comportar além disto um modificador do pH.

26. Estojo para análise de acordo com a reivindicação 24 ou a 25, **caracterizado por** comportar além disto uma solução hemolisante.

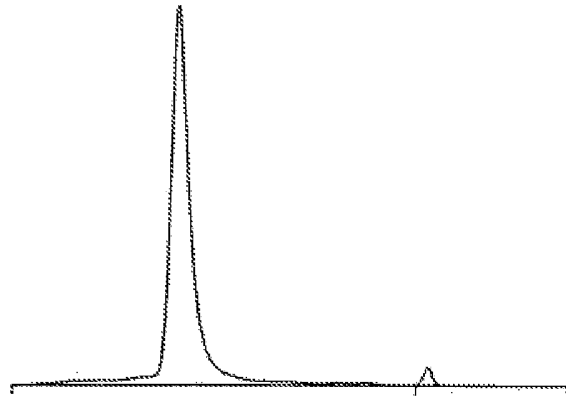
Lisboa, 24 de Agosto de 2010.

RESUMO

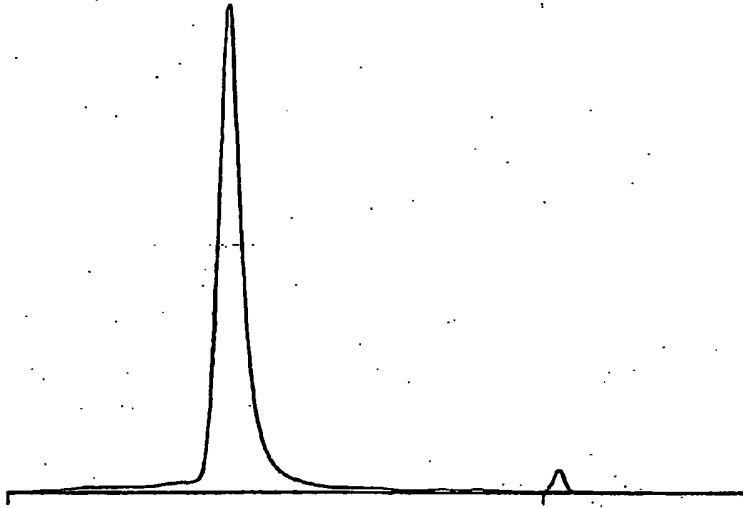
“Processo de análise de hemoglobina por electroforese capilar, estojo para a electroforese capilar e utilização de um agente de diminuição do caudal num tal processo”

A invenção diz respeito a um processo de electroforese capilar em solução livre com um pH alcalino para a análise de amostras contendo hemoglobina, no qual se faz passar a amostra por um capilar contendo o tampão de análise, incluindo pelo menos um passo no qual se introduz a amostra num tubo capilar contendo uma solução do tampão de análise, caracterizado por o tampão ser do tipo zwitteriónico estando associado a pelo menos um agente de diminuição do caudal.

Ela diz igualmente respeito à utilização de agentes de diminuição do caudal em EC, associado(s) a pelo menos um tampão zwitteriónico, bem como a um estojo para análises de hemoglobina por electroforese capilar.

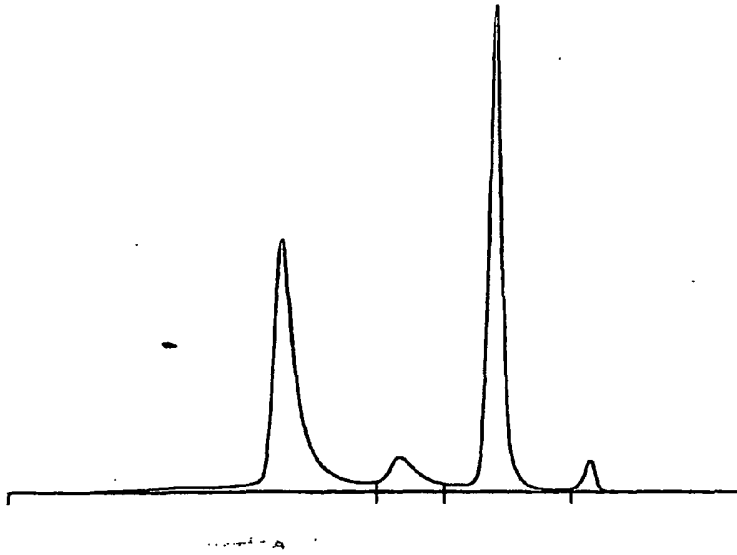


	%
HbA	98,2
HbA2	1,8



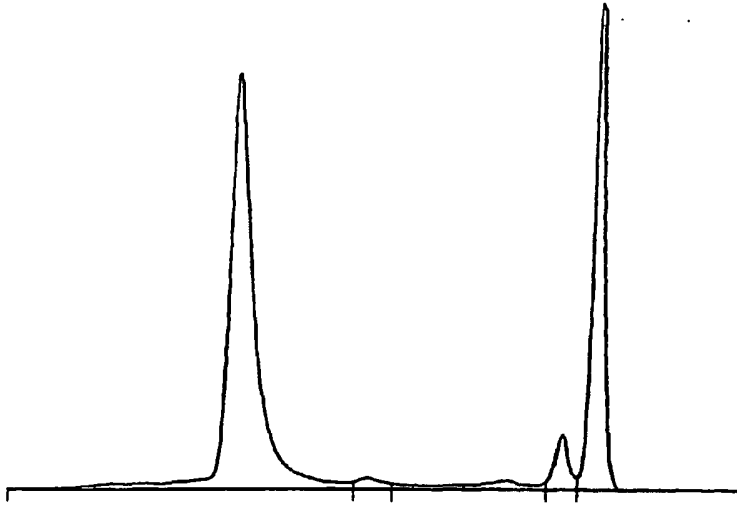
	%
HbA	98,2
HbA2	1,8

FIG 1



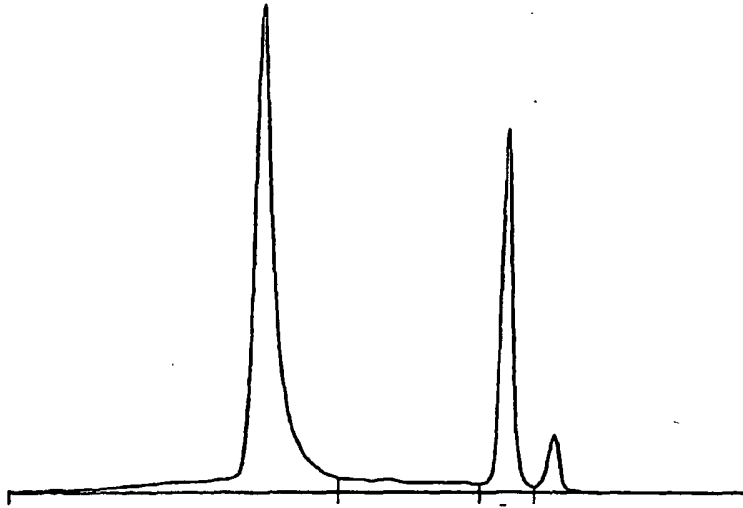
	%
HbA	44,0
HbF	7,1
HbS	46,5
HbA2	2,4

FIG 2



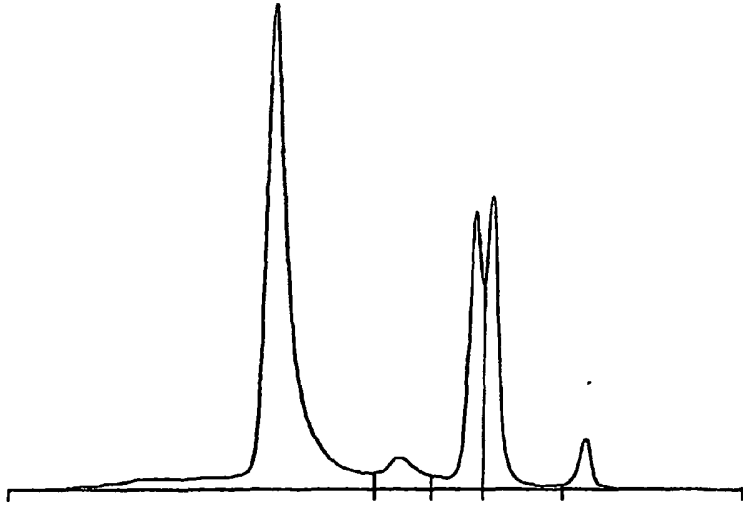
	%
HbA	60,9
HbF	1,6
MetHb	3,9
HbA2	4,0
HbC	29,6

FIG 3



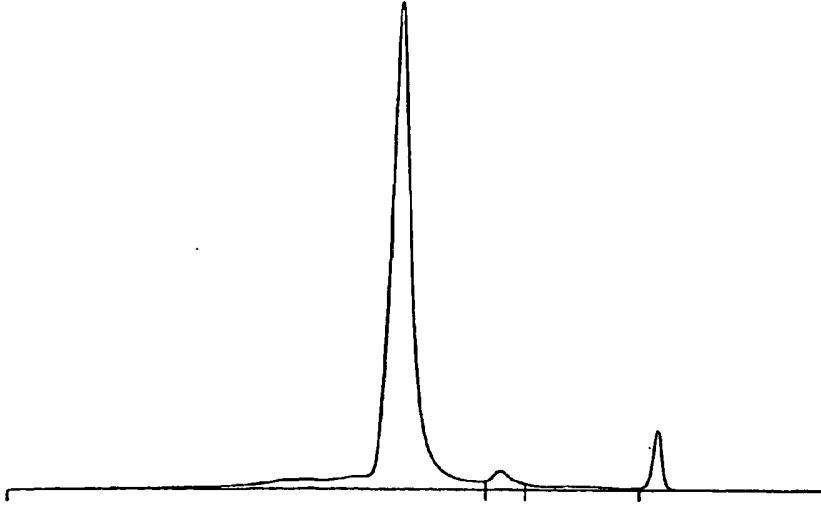
	%
HbA	65,2
MetHb	7,4
HbE	23,5
HbA2	3,9

FIG 4



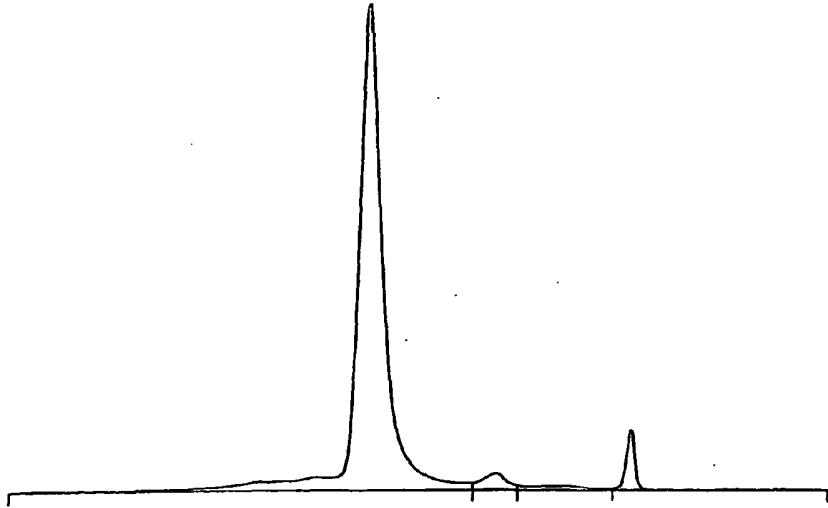
	%
HbA	55,6
HbF	4,8
HbD	18,4
HbS	18,2
HbA2	3,0

FIG 5



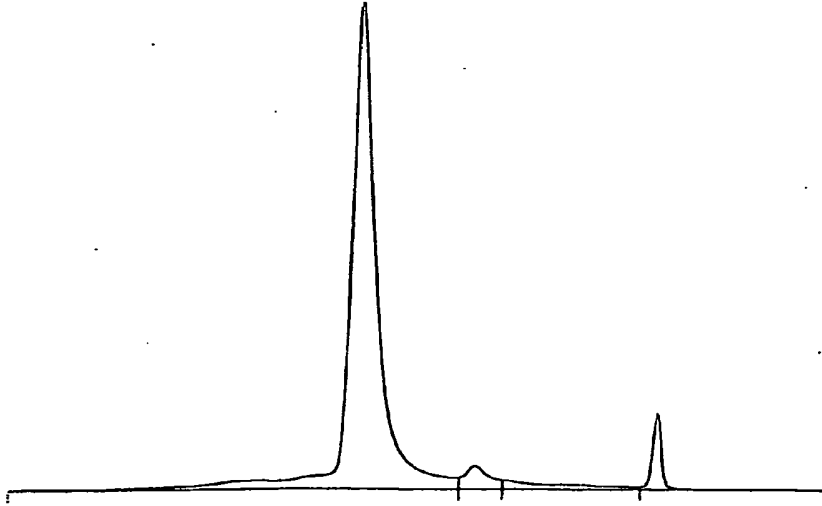
	%
HbA	90,3
HbF	3,2
MethHb	2,2
HbA2	4,3

FIG 6A



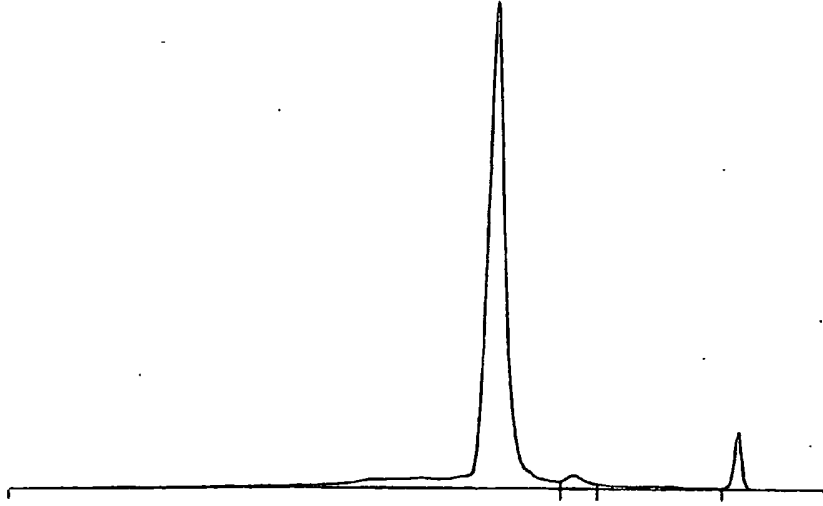
	%
HbA	90,4
HbF	3,3
MethHb	2,0
HbA2	4,3

FIG 6B



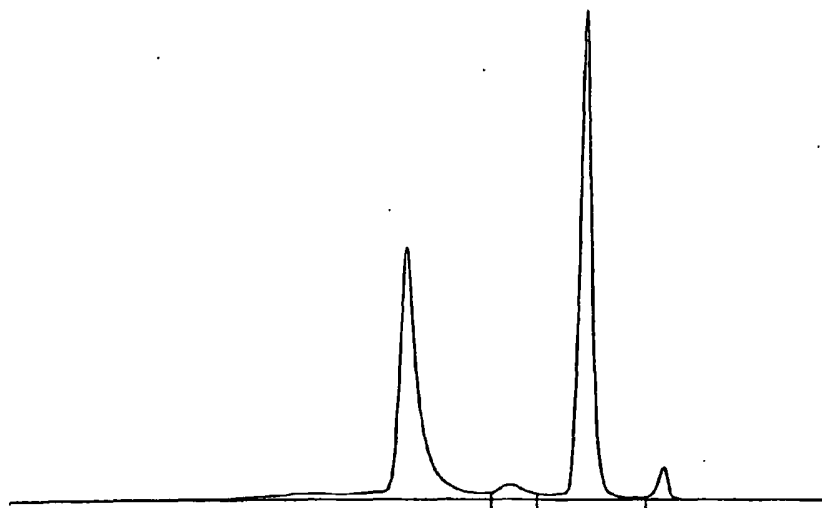
	%
HbA	88,2
HbF	3,9
MetHb	3,4
HbA2	4,5

FIG 6C



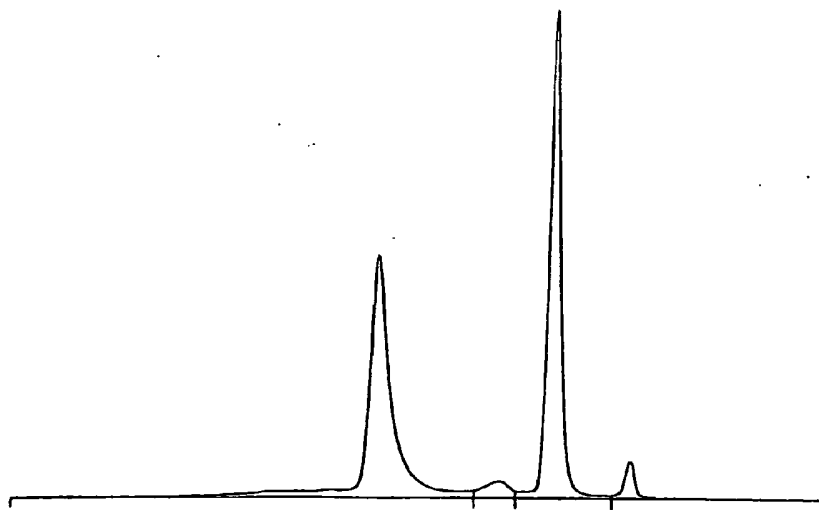
	%
HbA	91,6
HbF	2,6
MetHb	1,9
HbA2	3,9

FIG 6D



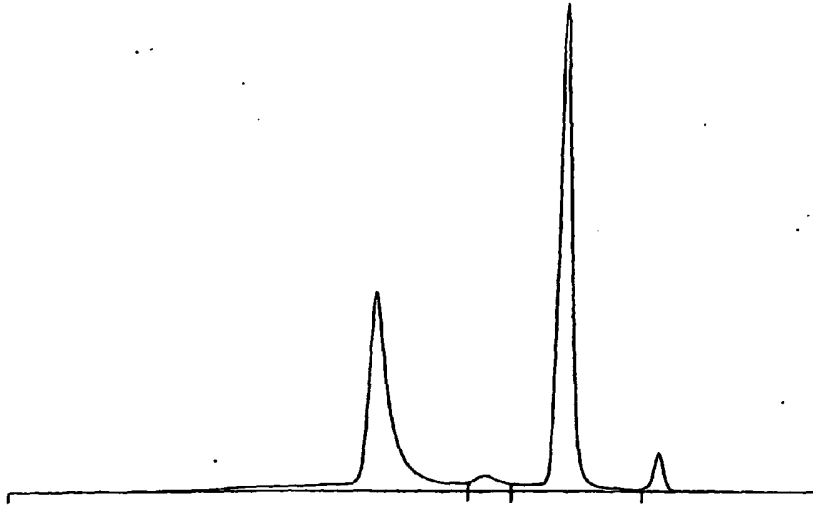
	%
HbA	46,2
HbF	3,3
HbS	47,7
HbA2	2,8

FIG 7A



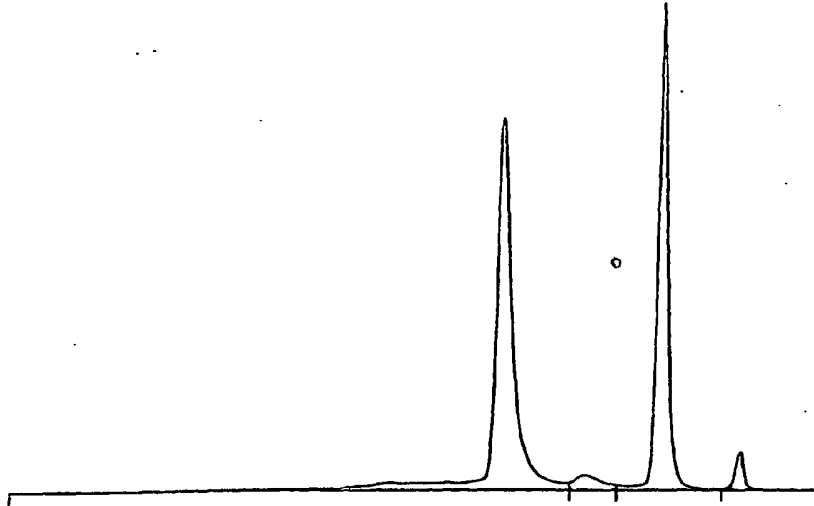
	%
HbA	46,4
HbF	3,5
HbS	47,1
HbA2	3,0

FIG 7B



	%
HbA	42,1
HbF	3,7
HbS	51,3
HbA2	2,9

FIG 7C



	%
HbA	55,5
HbF	3,1
HbS	38,8
HbA2	2,6

FIG 7D