

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 797**

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00** (2006.01)

**G01N 27/447** (2006.01)

**G01N 1/40** (2006.01)

**G01N 33/536** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2006 E 06825530 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015 EP 1931979**

54 Título: **Detección microfluídica de analitos**

30 Prioridad:

**04.10.2005 US 723715 P**  
**27.07.2006 US 820566 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.02.2016**

73 Titular/es:

**HEADWAY TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)**  
**682 South Hillview Drive**  
**Milpitas, CA 95035, US**

72 Inventor/es:

**HU, CELINE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 558 797 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**

Detección microfluídica de analitos

**5 Campo de la invención**

La invención se refiere a la microfluídica y la detección de analitos presentes en bajas concentraciones en una muestra.

**10 Antecedentes de la invención**

Los sistemas microfluídicos tienen un gran potencial para su uso en una instalación de laboratorio clínico. Sin embargo, estos dispositivos están limitados por el hecho de que solo tienen capacidad para volúmenes de muestra muy pequeños, normalmente en el orden de pocos microlitros o menos. Cuando las sustancias que se van a analizar se encuentran con una concentración muy baja en una muestra, la sensibilidad puede estar limitada. Una manera de superar esta limitación es utilizando una etapa de amplificación del analito para aumentar la concentración de analito, antes o después de la introducción de la muestra en un dispositivo microfluídico. Por ejemplo, se pueden amplificar cantidades muy pequeñas de ácidos nucleicos utilizando métodos tales como la PCR. Sin embargo, no todos los analitos se pueden amplificar e incluso cuando es posible, la amplificación puede necesitar reactivos adicionales y aumentar la complejidad de los análisis. Serían de mucho valor nuevos métodos que permitieran el ensayo de analitos con un formato microfluídico en muestras de gran volumen y/o que permitieran los análisis sin una etapa de amplificación para ensayos en laboratorios clínicos y otros. La presente invención cumple con estas y otras muchas necesidades.

25 El documento WO 01/69230 describe un método para efectuar la concentración de un analito polar en un campo eléctrico alterno. La solicitud japonesa S57-53419 describe un dispositivo de electroforesis capaz de concentrar un componente determinado en una muestra antes del análisis por electroforesis convencional.

**Breve resumen de la invención**

30 La presente invención proporciona un método para introducir el analito de interés de una muestra en un dispositivo microfluídico, de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

También se describe en el presente documento un método para introducir o aplicar un analito de interés de una muestra en un dispositivo microfluídico proporcionando una o más muestras acuosas en uno o más depósitos de gran volumen, conteniendo las muestras el analito y teniendo un volumen mayor de 10 microlitros, y el analito de interés está cargado o asociado con una molécula cargada, tal como una molécula iónica o una molécula portadora que está cargada. Las siguientes etapas implican que se proporcione un dispositivo microfluídico que comprende un área de análisis, que proporciona uno o más conectores, en el que el depósito(s) de gran volumen y el dispositivo microfluídico están conectados fluidicamente por medio del conector, y realizar la electroforesis del analito desde el depósito de gran volumen al dispositivo microfluídico y a través del área de análisis durante un tiempo suficiente para que dé como resultado una concentración de analito en el área de análisis mayor que la concentración en el depósito de gran volumen y/o en la muestra. El depósito de gran volumen puede ser una placa con micropocillos, un tubo de Eppendorf®, o un tubo de ensayo. El depósito de gran volumen puede ser un pocillo que es parte integral del dispositivo microfluídico. El conector puede ser un tubo capilar. En un aspecto de la invención, el analito de interés es una biomolécula, tal como un péptido, una proteína, un ácido nucleico, un lípido o un azúcar. El analito asociado con una molécula cargada puede ser, por ejemplo, un analito unido a un resto iónico o un analito unido a un anticuerpo que está cargado iónicamente.

50 Como se describe en el presente documento, la muestra se puede mezclar primero con un anticuerpo, y el anticuerpo se une al analito de interés. El anticuerpo se puede modificar con al menos un resto iónico. De manera alternativa, el analito de interés se puede modificar para que tenga carga, por ejemplo con un anticuerpo o un resto iónico.

55 Como se describe en el presente documento, el área de análisis es un sitio de captura y el método implica el movimiento de la(s) molécula(s) cargada(s) a través del sitio de captura, el sitio de captura incluye al menos un agente de captura y esto permite que se capture el analito de interés. El movimiento sobre el área de captura puede ser por electroforesis. El método puede incluir además la detección del analito unido al agente de captura. El agente de captura se puede unir al analito o al resto iónico. El agente de captura puede ser un anticuerpo o un ácido nucleico. La detección puede implicar la detección de un marcador en el anticuerpo, el analito o el resto iónico.

Como se describe en el presente documento, el método implica proporcionar un depósito de agrupamiento, tal que el depósito de gran volumen y el depósito de agrupamiento están unidos fluidicamente por medio del conector.

65 En un aspecto de la invención, la muestra tiene un volumen de desde aproximadamente 20  $\mu$ l a 50 ml, preferentemente desde 50  $\mu$ l a 20 ml. De manera alternativa, la muestra tiene un volumen mayor de

aproximadamente 20  $\mu$ l, preferentemente mayor de aproximadamente 50  $\mu$ l.

5 En un aspecto de la invención, el analito de interés está unido a una micropartícula antes de la electroforesis. La micropartícula puede ser una micropartícula magnética. Preferentemente la micropartícula está revestida con al menos un receptor, anticuerpo o anti-ligando específico para el analito de interés. El método puede incluir la etapa de separación del analito de la micropartícula antes de electroforesis. El anticuerpo puede reconocer el analito. Puede proporcionarse un segundo anticuerpo y se puede unir a un sitio diferente del analito. La detección puede implicar la detección de un marcador en el segundo anticuerpo.

10 En un aspecto más, el resto iónico se puede unir en cualquier etapa antes de la electroforesis por medio de una unión indirecta. La unión indirecta puede ser por medio de una unión a avidina/biotina.

15 Se describe en el presente documento un sistema para introducir o aplicar un analito cargado de una muestra en un dispositivo microfluídico que tiene un área de análisis, en el que el sistema incluye al menos un depósito de gran volumen, unido operativamente a un primer electrodo, al menos un área de análisis, unida operativamente a un segundo electrodo, y al menos un conector para mover las moléculas cargadas desde el depósito de gran volumen, en que el depósito de gran volumen y el área de análisis están en comunicación fluidica. El al menos un conector puede ser un tubo capilar. El dispositivo microfluídico puede incluir un depósito de agrupamiento, con el depósito de gran volumen conectado fluidicamente al depósito de agrupamiento por medio del conector. El área de análisis puede incluir un sitio de captura. El sistema puede incluir múltiples depósitos de gran volumen conectados fluidicamente con depósitos de agrupamiento separados.

**Breve descripción de los dibujos**

25 La Figura 1 ilustra un sistema para concentrar las muestras para la introducción en un dispositivo microfluídico.

30 Las Figuras 2A-C ilustran tres realizaciones del sistema para concentrar analitos. La Figura 2A ilustra una realización en la que los analitos se acumulan en el depósito de agrupamiento. La Figura 2B ilustra una realización en la que los analitos no se acumulan, sino que hay un flujo continuo sobre el dispositivo microfluídico y a través del área de análisis. La Figura 2C ilustra una realización en la que el depósito de gran volumen está integrado en el dispositivo microfluídico.

35 La Figura 3 ilustra un dispositivo microfluídico que es capaz de detectar múltiples analitos de una o varias muestras.

40 La Figura 4 es un diagrama que ilustra una realización de la invención en la que un anticuerpo marcado con un resto iónico se une a un analito de interés en un depósito de gran volumen (LVR) y forma un complejo, y el complejo se somete a electroforesis en un dispositivo microfluídico. El dispositivo microfluídico tiene un agente de captura (un segundo anticuerpo específico para el analito de interés pero que reconoce un epítipo diferente) unido al mismo.

45 La Figura 5 es un diagrama que ilustra una realización de la invención en la que las micropartículas a las que se unen los anticuerpos primarios se utilizan como una fase sólida a la que se une el analito en un depósito de gran volumen. Se añade un segundo anticuerpo, marcado con un resto iónico, y también se une al analito. Los anticuerpos primarios se escinden para liberar el complejo de analito de las micropartículas, y el complejo se somete a electroforesis en un depósito de agrupamiento. El complejo se captura en el dispositivo microfluídico utilizando un agente de captura específico para el resto iónico.

50 La Figura 6 ilustra una realización similar a la que se ilustra en la Figura 5, en la que el analito de interés inicialmente se une a micropartículas. Se une un resto iónico al anticuerpo unido a la micropartícula utilizando una unión de tipo biotina/avidina. El anticuerpo se escinde para liberar el analito de la micropartícula y se introduce en el dispositivo microfluídico por electroforesis. El complejo se captura en el dispositivo microfluídico utilizando un segundo anticuerpo específico del analito.

55 La Figura 7 muestra un diagrama de un formato de ensayo a modo de ejemplo para la detección de ácidos nucleicos o proteínas víricos en una muestra de sangre. Los analitos de múltiples muestras se transportan (por ejemplo, por electroforesis) sobre múltiples sitios de detección en las áreas de análisis.

## Descripción detallada de la invención

### I. Introducción

5 La microfluídica es la ciencia que diseña, fabrica y utiliza dispositivos y procesos que tratan con volúmenes de fluido del orden de nanolitros o picolitros. Normalmente, un dispositivo microfluídico tiene al menos un canal o recipiente con un tamaño menor de 1 mm, en al menos una dimensión. El dispositivo puede tener al menos un canal o recipiente con un tamaño menor de 0,5, 0,2 mm, o 0,1 mm en al menos una dimensión. Los dispositivos microfluídicos pueden tener adicionalmente microbombas, válvulas, reguladores de temperatura, etc.

10 Se conocen varios métodos y estrategias para fabricar dispositivos microfluídicos, incluyendo el microensamblaje, métodos de microfabricación a máquina en masa, métodos de micro-fabricación a máquina en superficie, métodos litográficos de referencia, grabado húmedo, grabado iónico reactivo, grabado con plasma, estereolitografía y métodos de escritura tridimensional química por láser, métodos de litografía suave, métodos de ensamblaje modular, métodos de moldeado de réplicas, métodos de moldeado por inyección, métodos de moldeado en caliente, métodos de ablación por láser, combinaciones de métodos, y otros métodos que se conocen en la técnica. Será evidente para los expertos en la técnica que varias de estas estrategias se pueden adaptar para su uso de acuerdo con la presente invención. Para un revisión general de los dispositivos microfluídicos véase, por ejemplo, Chovan, *et al.* "Microfabricated devices in biotechnology and biochemical processing" Trends Biotechnol. 2002 20:116-22; Anthony *et al.* "DNA array technology and diagnostic microbiology" Expert Rev. Mol. Diagn. 2001 1:30-8; Windman *et al.* "Microfluidics for ultrasmall-volume biological analysis" Adv. Chromatogr. 2003, 42:241-67; y Ng *et al.* "Biochips beyond DNA: technologies and applications" Biotechnol Annu Rev. 2003, 9:1-149; Fiorini y Chiu, 2005, "Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application" Biotechniques 38:429-46; Beebe *et al.*, 2000, "Microfluidic tectonics: a comprehensive construction platform for microfluidic systems." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13488-13493; Rossier *et al.*, 2002, "Plasma etched polymer microelectrochemical systems" Lab Chip 2:145-150; Becker *et al.*, 2002, "Polymer microfluidic devices" Talanta 56:267-287; Becker *et al.*, 2000, "Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications" Electrophoresis 21 :12-26; documento US 6.767.706 B2, por ejemplo, la Sección 6.8 "Microfabrication of a Silicon Device"; Terry *et al.*, 1979, A Gas Chromatography Air Analyzer Fabricated on a Silicon Wafer, IEEE Trans, en Electron Devices, v. ED-26, pp. 1880-1886; Berg *et al.*, 1994, Micro Total Analysis Systems, Nueva York, Kluwer; Webster *et al.*, 1996, Monolithic Capillary Gel Electrophoresis Stage with On-Chip Detector in International Conference On Micro Electromechanical Systems, MEMS 96, pp. 491496; Unger *et al.*, 2000, Science 288:113-16; Pat. de EE. UU N° US 6.960.437 (Nucleic acid amplification utilizing microfluidic devices); Quake y Scherer, 2000, "From micro to nanofabrication with soft materials" Science 290:1536-40; Becker *et al.*, 2000, "Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications" Electrophoresis 21:12-26. También se describen en la técnica microelectrodos adecuados para su uso en los dispositivos microfluídicos. También se describen en la técnica métodos para inmovilizar proteínas, ácidos nucleicos u otras moléculas en una superficie del dispositivo (por ejemplo, en un canal microfluídico).

40 Los dispositivos microfluídicos (a veces denominados "chips") se pueden utilizar en diversas aplicaciones biomédicas y farmacéuticas, que incluyen análisis, preparación y síntesis de compuestos químicos y análisis y manipulación de células, proteínas y ácidos nucleicos. Las ventajas de la miniaturización incluyen el consumo muy reducido de reactivos, tiempos de reacción más cortos, y el potencial de un rendimiento muy alto utilizando el ensayo paralelo masivamente. Sin embargo, un aspecto de esta miniaturización se convierte en un obstáculo significativo que limita la sensibilidad de estos procedimientos. Los chips microfluídicos manejan solo volúmenes mínimos de soluciones de muestra, y puede haber insuficientes moléculas de analito en el volumen muy pequeño que se aplica al chip para que se detecten fácilmente. Por lo tanto, a menudo se utiliza una etapa de amplificación, tal como la PCR, para tratar la muestra para su uso con un dispositivo microfluídico, sea antes o después de la introducción de la muestra en el dispositivo. Sin embargo, esto tiene la desventaja de aumentar el coste y la complejidad, y que permite posibles resultados aberrantes debido a errores de la PCR. Algunos dispositivos microfluídicos se diseñan para recibir un volumen de muestra algo más grande exponiendo la superficie entera del chip a la solución de muestra entrante. Esto permite un volumen de muestra relativamente grande que se va a aplicar ya que se utiliza toda la superficie del chip para recibir la muestra, pero aún así el volumen de la muestra que se puede procesar es limitado. Además, esto limita la detección a una muestra cada vez y se necesita que se ensayen secuencialmente diferentes soluciones de muestra. Para ensayar múltiples muestras, no solo se consume mucho tiempo, sino que tiene la desventaja adicional del riesgo de contaminación cruzada entre las muestras.

60 Los métodos y aparatos que se desvelan en el presente documento superan la limitación de baja capacidad de volumen en los dispositivos microfluídicos utilizando una electroforesis para concentrar y/o controlar el transporte del material analito, de forma que se pueden aplicar para facilitar las reacciones o análisis y se utilizan en un formato de chip típico. El analito se somete a electroforesis por medio de una solución acuosa de tampón sin el uso de geles de exclusión por tamaño, un medio viscoso, filtros, tamices biológicos o similares. El método permite que se apliquen múltiples muestras en múltiples áreas específicas del chip. Debido a que cada muestra se somete a electroforesis por separado hacia una parte diferente del chip para el análisis, las muestras separadas no entran en contacto con la misma superficie. Esto tiene la ventaja de la reducción de la contaminación cruzada.

65 Se describen en el presente documento métodos y dispositivos para análisis microfluídico de uno o más analitos a

partir de una muestra de gran volumen. Debido a que se aumenta la capacidad de volumen de muestra de un dispositivo por los métodos desvelados en el presente documento, se reduce la concentración detectable mínima (la concentración de analito más baja que el ensayo puede medir fiablemente) de un ensayo utilizando el dispositivo.

- 5 Los métodos y dispositivos que se describen en el presente documento permiten al investigador o clínico extraer el analito de un gran volumen de muestra, detectar e identificar el analito. Este método es adecuado para su uso con una amplia diversidad de analitos, incluyendo proteínas específicas y secuencias de polinucleótidos. Además de la capacidad para analizar múltiples muestras en un único chip simultáneamente, las realizaciones del método permiten concentrar una muestra grande en el chip sin un flujo continuo de la muestra al depósito de concentración o el chip.

La Figura 1 se proporciona para ayudar a comprender la invención. Se apreciará que la Figura 1 es para ilustrar y no se pretende que limite la invención de ninguna manera. El sistema que se muestra en la Figura 1 incluye un depósito de gran volumen (LVR) 100 en el que se puede introducir una muestra que contiene un analito, un depósito de agrupamiento 300 integrado en el dispositivo microfluídico 600 (a veces denominado "chip"), un conector 200 a través del cual se transporta electroforéticamente un analito del depósito de gran volumen al depósito de agrupamiento, y un área de análisis 700 en el que se puede detectar un analito. En general, el área de análisis es un canal microfluídico por el que puede fluir el fluido que contiene el analito y/o que puede contener una solución acuosa de tampón por medio del cual se puede transportar el analito. De manera alternativa, el área de análisis puede ser un pocillo o una cámara que comprende agentes de captura inmovilizados. En algunas realizaciones al menos una parte de la carcasa o el material que rodea el área de análisis es transparente, para facilitar la detección de la señal del área de análisis (por ejemplo, las emisiones fluorescentes). Como con el conector, la solución acuosa por la cual se transporta el analito en el área de análisis no contiene generalmente geles de exclusión, un medio viscoso, filtros, tamices, etc. para la separación del analito. Los electrodos 400 y 500 se colocan de forma que cuando se aplica un potencial eléctrico a los electrodos (es decir, una carga positiva se aplica a un electrodo y una carga negativa se aplica al otro) el analito cargado se transporta por medio de la solución a la región apropiada del dispositivo (por ejemplo, el depósito de agrupamiento). Se pueden colocar opcionalmente electrodos adicionales 800 para transportar el analito por el área de análisis 700. En algunas realizaciones, no se incluyen electrodos del depósito de agrupamiento 500. Los electrodos se pueden integrar en el LVR o el depósito de agrupamiento o pueden ser electrodos externos situados en la cámara del depósito en contacto con la muestra u otra solución. La batería 900 es cualquier suministro eléctrico o fuente de corriente eléctrica adecuada para electroforesis (por simplicidad, en la Figura 1 solamente se muestra un LVR conectado a la batería).

El área de captura normalmente incluye "agentes de captura" asociados con el sustrato en el área de análisis del dispositivo. Los agentes de captura (que se tratan en detalle posteriormente) son agentes que se unen específicamente al analito, una molécula portadora, un resto iónico, u otra molécula asociada con el analito). Los ejemplos de agentes de captura incluyen anticuerpos y polinucleótidos. Normalmente los agentes de captura se inmovilizan en un "sitio de captura" del área de análisis (una superficie física del dispositivo microfluídico que puede modificarse por la unión de al menos un agente de captura, preferentemente al menos dos y más preferentemente una matriz de moléculas de agentes de captura). De manera alternativa, en otras realizaciones, el área de análisis no incluye un agente de captura y la muestra se analiza (detecta) según fluye a través de un detector.

En la operación del sistema, una solución de muestra (por ejemplo, un líquido acuoso que contiene, o se sospecha que contiene el analito) se introduce en un depósito de gran volumen 100. El depósito o depósitos de gran volumen pueden estar integrados en el dispositivo microfluídico 600, no integrados sino conectados físicamente con el dispositivo microfluídico, o no integrados ni conectados sino situados cerca del dispositivo. Por ejemplo, el depósito o depósitos de gran volumen pueden ser uno o más recipientes separados, tales como cualquiera de diversos recipientes para albergar líquidos, incluyendo pero sin limitarse a: un tubo de ensayo, un tubo de microcentrífuga, un pocillo de una placa de micropocillos, una placa de cultivo tisular, y similares. La capacidad de líquido del depósito de gran volumen puede variar desde aproximadamente 10  $\mu$ l a aproximadamente 100 ml, y puede ser de al menos 10, al menos 25, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 500, al menos 1000 o al menos 5000 microlitros. La capacidad de líquidos del LVR está más a menudo en un intervalo de aproximadamente 100  $\mu$ l a aproximadamente 2 ml. Se pueden asociar uno o más depósitos de gran volumen con un único chip. En algunas realizaciones se asocian 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 175, 200, 250 o más depósitos de gran volumen con un único dispositivo. Por ejemplo, si se utiliza una placa de microtitulación que tiene 100 pocillos, el número de depósitos de gran volumen puede ser 100.

De acuerdo con la invención, el analito se transporta electroforéticamente por medio del conector 200 al depósito de agrupamiento 300. Electroforesis se refiere al movimiento de moléculas o partículas en solución cargadas en respuesta a un campo eléctrico. La movilidad del analito se basa en (1) una carga neta de la molécula de analito por sí misma y/o (2) una carga neta de un resto iónico asociado con el analito, como se describe posteriormente. Una carga neta es la carga iónica de combinación que tiene una molécula, esta puede ser positiva, negativa o neutra. Como se señaló anteriormente, el analito se puede someter a electroforesis por medio de una solución acuosa de tampón sin el uso de geles de exclusión por tamaño, un medio viscoso, filtros, tamices biológicos o similares. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "electroforesis por medio de una solución acuosa" se utiliza para

significar que no se utiliza ningún medio de exclusión por tamaño o filtros.

El conector 200 a través del cual viaja el analito puede tener cualquiera de diversas formas y se puede hacer de cualquier material compatible con el analito y que no interfiera con el movimiento del analito cargado y/o la electroforesis. Los métodos para conectar las fuentes externas o los tubos para los dispositivos microfluídicos se conocen y se pueden utilizar para conectar en la presente invención. En algunas realizaciones, el conector tiene múltiples regiones con diferentes dimensiones. Para la conexión entre el depósito de gran volumen y el depósito de agrupamiento o el área de análisis, el conector 200 puede tener secciones de diámetro decreciente. Esto se puede formar conectando tubos o canales rectos o ahusados de diámetros en disminución y de diferentes materiales. En algunas realizaciones en las que el LVR no está integrado en el chip, una parte del conector puede comprender una porción de tubo en el que se transporta el analito desde el depósito de gran volumen a un canal en el dispositivo microfluídico, y una parte del conector puede comprender un canal microfluídico en el chip ("parte de canal microfluídico del conector") transportándose entonces el analito a través del canal al depósito de agrupamiento 300. Los canales se pueden fabricar para que tengan varias formas y dimensiones utilizando, por ejemplo, el moldeado de elastómeros bien desarrollado, fotolitografía o métodos de micro-fabricación. En algunas realizaciones el conector está completamente fuera del chip. En una realización, el depósito de gran volumen está integrado en el dispositivo y el conector 200 es un canal microfluídico integrado en el dispositivo microfluídico.

Para los tubos, hay también una amplia diversidad de tamaños y materiales que se pueden seleccionar. Se pueden encontrar ejemplos de métodos para formar estos tipos de conectores, por ejemplo, en Douglas Smith, *Engineering and Science*, publicado por California Institute of Technology, 2003 volumen LXVI, Número 2, páginas 8-18; Skelley AM *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*. 25 de Ene de 2005; 102(4):1041-6; Manz, A. y Becker, H., "Microsystem Technology in Chemistry and Life Sciences" publicado por Springer-Verlag, 1999. Los tubos a modo de ejemplo incluyen tubos de acero inoxidable, agujas, tubos hechos de material plástico tal como polipropileno, politetrafluoroetileno, Teflon, polivinilcloruro, PEEK™ o PEEKsil™, silicio o vidrio fundido. Los tubos adecuados tienen habitualmente un diámetro interno de varios milímetros a micrómetros, que incluyen pero sin limitación aproximadamente 10 mm, 9 mm, 8 mm, 7 mm, 6 mm, 5 mm, 4 mm, 3 mm, 2 mm, 1 mm, 0,5 mm, 0,1 mm, 90 μm, 80 μm, 70 μm, 60 μm, 50 μm, 40 μm, 30 μm, 20 μm, 10 μm, 9 μm, 8 μm, 7 μm, 6 μm, 5 μm, 4 μm, 3 μm, 2 μm, 1 μm. A menudo las dimensiones internas de un conector están en el intervalo de 5 mm a 50 μm.

El depósito de agrupamiento 300, si está presente, está integrado en el dispositivo microfluídico y normalmente tiene una capacidad desde aproximadamente 0,1 pl a aproximadamente 2 μl, incluyendo, pero sin limitación a 1 pl a 1 μl, y 10 pl a 0,5 μl. El depósito de agrupamiento está en comunicación fluidica con el área de análisis del dispositivo, de modo que se puede transportar un analito desde el depósito de agrupamiento al área de análisis cuando las compuertas o válvulas adecuadas están abiertas. La relación de volúmenes en el depósito de gran volumen y el depósito de agrupamiento puede variar considerablemente, pero en algunas realizaciones, las relaciones son desde aproximadamente 100:1 a 1000:1, incluyendo pero sin limitación, más de 100:1, más de 200:1, más de 300:1, más de 500:1, más de 800:1, y más de 1000:1.

Para generar el campo eléctrico necesario para transportar el analito desde el depósito de gran volumen al depósito de agrupamiento, se sitúan electrodos para generar tal campo. Normalmente los electrodos se sitúan en cada uno de los depósitos (es decir el LVR y el depósito de agrupamiento). La localización del electrodo en el LVR puede variar, pero preferentemente está a alguna distancia de la apertura del conector 200, y preferiblemente en el sitio o distancia más lejana de la apertura. Los electrodos se pueden unir o colocar de cualquier manera que permita que se genere un campo eléctrico para electroforesis cuando la corriente se conecta y esté presente una solución para completar un circuito. Por ejemplo y sin limitación, los electrodos se pueden insertar en el líquido de un depósito. De manera alternativa, el electrodo puede estar integrado en la cámara o dispositivo microfluídico (por ejemplo, incorporado en la pared de un depósito o cámara). Los microelectrodos se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente internacional WO 04044575A2; Rongsheng *et al.*, 2005, *Anal. Chem* 77:4338-47; Abad-Villar *et al.*, 2005, *Electrophoresis* 26:3602-3608).

Además, la polaridad de los electrodos en el dispositivo o sistema pueden cambiarse (por ejemplo, de una carga negativa a una positiva) durante el funcionamiento del dispositivo. Un analito cargado migra desde un electrodo(s) de carga similar hacia un electrodo(s) de carga opuesta. Por lo tanto, por ejemplo, un analito cargado negativamente se puede transportar por electroforesis desde un LVR que tiene un electrodo cargado positivamente (ánodo) a un depósito de agrupamiento que tiene un electrodo cargado negativamente (cátodo). El analito se puede transportar entonces desde el depósito de agrupamiento a un área de análisis desconectando la corriente del electrodo del LVR, cambiando la polaridad del electrodo del área de agrupamiento a positiva, y conectando un electrodo colocado en o más allá del área de análisis, de modo que el analito se transporta por o a través del área de análisis. La velocidad de migración depende de la fuerza del campo, la carga neta, el tamaño y forma de las moléculas y también la fuerza iónica, viscosidad y temperatura del medio en el que se mueven las moléculas.

Las Figuras 2A-C ilustran otras realizaciones del sistema. La Figura 2A ilustra una realización en la que el analito se acumula en un depósito de agrupamiento 300. En esta realización, el electrodo 500 del dispositivo microfluídico 600 puede cambiar de positivo a negativo según se necesite. Por ejemplo, cuando un analito cargado negativamente se

concentra o acumula en el depósito de agrupamiento 300, el electrodo 500 está cargado positivamente. Luego con el fin de realizar la electroforesis del analito hacia el área de análisis 700, el electrodo 500 está cargado negativamente y el electrodo 800 en el área de análisis está cargado positivamente. La Figura 2B ilustra una realización en la que los analitos no se acumulan en un depósito de agrupamiento 300, sino que fluyen continuamente sobre el dispositivo microfluídico 600 y a través o hacia el área de análisis 700. La Figura 2C ilustra una realización en la que el depósito de gran volumen 100 está integrado en el dispositivo microfluídico 600, y está conectado con el depósito de agrupamiento por el conector 200.

Los reactivos que se utilizan para la captura y análisis del analito se pueden pre-colocar en los canales del dispositivo microfluídico (por ejemplo, agentes de captura inmovilizados en el sustrato del área de análisis), se pueden introducir desde el depósito de gran volumen junto con el analito, o se pueden introducir en el chip. Por ejemplo, los reactivos se pueden introducir en el depósito de agrupamiento, área o canales de análisis, por métodos conocidos en la técnica en cualquier punto apropiado para el ensayo. Los métodos de introducción variarán con el diseño específico del dispositivo. Como ilustración, los reactivos se pueden introducir en el área de análisis por medio de un canal de entrada en comunicación fluida con el área de análisis abriendo una válvula que separa el canal de entrada y el área de análisis.

## **II. El analito**

El analito (o “analito de interés”) es una molécula, un complejo de moléculas o partícula que se mide o detecta utilizando los métodos de la invención. Como se ha señalado anteriormente, un analito tiene una carga neta y/o se puede asociar con una molécula cargada, de modo que el analito se puede concentrar electroforéticamente como se describe en el presente documento. En una realización, el analito se asocia con uno o más restos iónicos, que portan una carga. De manera alternativa, el analito se puede asociar con una molécula cargada uniéndose a una molécula portadora cargada, tal como un anticuerpo, un receptor, un ligando, un sustrato, o un antígeno. La molécula portadora puede estar cargada intrínsecamente o se puede modificar para que esté cargada uniéndola a un resto iónico.

Ejemplos de analitos incluyen, pero sin limitación, proteínas, complejos de proteínas, virus, ácidos nucleicos, metales pesados, fármacos, esteroides, y pesticidas, y carbohidratos. Preferentemente, los analitos son biomoléculas (una clase de molécula que se produce en o por una célula) tales como proteínas, péptidos, polinucleótidos (por ejemplo, ARN o ADN), azúcares, lípidos, glucolípidos, glucoproteínas, y similares. Ejemplos particulares de analitos incluyen biomoléculas de organismos patógenos tales como virus o bacterias, biomoléculas asociadas con enfermedad, toxinas, fármacos, moléculas pequeñas, priones, ácidos nucleicos que contienen mutaciones, anticuerpos y antígenos. Los analitos que se pueden analizar utilizando el método de la invención pueden tener o no una carga neta en las condiciones (por ejemplo, el pH) del ensayo. Un polinucleótido es un ejemplo de un analito que está cargado por sí mismo. Un analito cargado o no, se puede modificar por unión con al menos un resto iónico, para aumentar su carga. Por ejemplo, un analito se puede modificar por unión a una molécula portadora que porta un resto iónico (por ejemplo un anticuerpo que porta un resto iónico de ácido nucleico). Se describen posteriormente ejemplos de restos iónicos.

## **III. La solución de muestra y pre-muestra**

Como se utiliza en el presente documento, la “solución de muestra” es el líquido acuoso que contiene el analito que está presente en el depósito de gran volumen al principio de la electroforesis (es decir, el “material de partida”). En general, la solución de muestra se genera por el procesamiento de una “pre-muestra” que contiene el analito. Tal procesamiento se lleva a cabo, por ejemplo, para purificar parcialmente o concentrar el analito, eliminar impurezas que interferirían en la electroforesis o el ensayo, y similares. Los ejemplos de las etapas de procesamiento específicas incluyen centrifugación (para eliminar los residuos, o para fraccionar la pre-muestra), precipitación, filtración, cromatografía, sonicación, o cualquier otro proceso que dé como resultado un analito libre en la solución. En una realización, el proceso incluye la concentración del analito utilizando perlas, tal como perlas magnéticas, que se tratan para unirse al analito. Además, se pueden añadir reactivos a la solución de muestra para ajustar el pH, la fuerza iónica y/o la composición de la solución para facilitar la electroforesis, por ejemplo, añadiendo agentes tamponantes, ácidos, bases o sales. La adición puede implicar, por ejemplo, diluir el líquido que contiene el analito con una solución apropiada tal como el agua o un tampón (por ejemplo, una solución salina tamponada), resuspender el analito en una solución apropiada, disolver sólidos (por ejemplo, sales) en la solución, y similares. Además, se puede modificar el analito de la solución de muestra asociándolo con uno o más restos iónicos, y opcionalmente con una o más moléculas portadoras.

La fuente del analito puede ser cualquiera de una amplia diversidad de materiales, incluyendo por ejemplo, un fluido biológico, célula, o tejido, muestra ambiental (por ejemplo, suelo o agua) o un producto sintético. Los ejemplos de pre-muestras biológicas incluyen, por ejemplo, sangre, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, extractos celulares, extractos tisulares, extractos de cultivos tisulares, extractos de cultivos celulares, raspados bucales, y cultivos bacterianos o víricos. Otros ejemplos de pre-muestra incluyen agua de lago o de río, fluidos del proceso alimentario, preparaciones de alimentos fabricados, extractos de frutas y verduras, y cosméticos. La pre-muestra puede ser un líquido o un sólido. Si es un sólido, la pre-muestra se disuelve, solubiliza o suspende en un líquido (por

ejemplo, un líquido acuoso) y se pueden eliminar los materiales insolubles. La Tabla 1 muestra, como ilustración y sin limitación, muestras y pre-muestras a modo de ejemplo.

**Tabla 1: Muestras y pre-muestras a modo de ejemplo**

Pre-muestra	Muestra	Analito
Sangre	suero*	anticuerpo anti-VIH**
orina	orina filtrada*	hCG**
agua de río	agua filtrada*	antígenos de bacteria del cólera **
PBMC	ADN genómico	fragmento de ADN**

\* En cada caso, se modifica para ajustar la fuerza iónica/pH  
 \*\* En cada caso opcionalmente se modifica para asociarlo con un resto iónico.

5

#### **IV. Asociación del analito con un resto iónico**

Un resto iónico es una estructura molecular que porta una carga. El resto iónico puede ser aniónico (por ejemplo, polianiónico) o catiónico (por ejemplo, policatiónico). Se apreciará que la carga neta de una molécula cargada dependerá en parte del entorno, particularmente del pH y la composición en sales de la solución de muestra. Sin embargo, el resto iónico preferentemente tiene una carga neta de al menos +5 o al menos -5. Aunque el resto iónico puede tener una densidad de carga baja o media, preferentemente el resto iónico tiene una densidad de carga alta. La densidad de carga es la cantidad de carga/por unidad de volumen de una solución, material, etc. debida a la presencia de entidades con carga en el material. Un material que tiene una densidad de carga alta tiene más carga por unidad de volumen, y es más probable que atraiga entidades que tienen una carga opuesta, y repela entidades que tienen la misma carga. Normalmente, tener una densidad de carga mayor resultará probablemente en tiempos de migración más rápidos de una entidad cargada durante la electroforesis.

Los ejemplos de restos iónicos incluyen, como ilustración y sin limitación, ácidos nucleicos y sus análogos naturales y sintéticos (por ejemplo, ARN, ADN, PNA), poli-aminas tales como polilisina, poli-glutamato, poli-aspartato, glucanos sulfatados y proteínas modificadas químicamente tales como la albúmina sérica bovina succinilada. Otros restos iónicos incluyen el ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, ácido polietilacrílico, ácido polipropilacrílico, ácido polibutilacrílico, ácido polimaleico, sulfato de dextrano, heparina, ácido hialurónico, polisulfatos, polisulfonatos, ácido polivinil fosfórico, ácido polivinil fosfónico, copolímeros de ácido polimaleico, ácido polihidroxibutírico y mezclas de polímeros.

#### **V. Asociación del analito con un resto iónico**

Antes de la electroforesis, el analito puede modificarse para asociarse con un resto iónico. La combinación del analito y el resto iónico normalmente tiene una carga neta mayor que la del analito solo. El analito se puede modificar directamente con el resto iónico o indirectamente utilizando una molécula portadora que porta un resto iónico. Las moléculas portadoras incluyen anticuerpos que se unen al analito, polinucleótidos y otras moléculas como se analiza posteriormente.

#### **A. Asociación directa de un resto iónico y el analito**

En algunos casos, un resto iónico se asocia directamente, sea covalente o no covalentemente, con el analito. Por ejemplo, un resto iónico de ácido nucleico puede asociarse no covalentemente con un analito de ácido nucleico basándose en una complementariedad de secuencia (parcial o completa). El analito se puede modificar también covalentemente para aumentar su carga iónica sea química o enzimáticamente. Los ejemplos de modificaciones químicas incluyen la conversión de grupos amino de una proteína en grupos carboxilo para aumentar la carga neta negativa de la proteína utilizando reactivos tales como anhídridos (por ejemplo, anhídrido succínico o anhídrido tetrahidroftálico). También se pueden convertir otros grupos de una proteína tales como grupos tiol o histidilo, en grupos cargados negativamente tales como grupos carboxilo, utilizando reactivos tales como el yodoacetato. Además, estos grupos funcionales se pueden convertir en varios grupos activos distintos para facilitar la asociación de restos iónicos. Estos y otros reactivos de modificación y métodos de modificación se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, "Chemical Modification of Proteins" por Gary E. Means y Robert E. Feeney; "Bioconjugate Techniques" por Greg T. Hermanson; y "Chemical Reagents for Protein Modification" por Roger L. Lundblad).

Ciertos restos iónicos, tales como ácidos nucleicos, poli-lisina, poli-arginina, poli-glutamato, poli-aspartato y glucanos sulfatados, tienen grupos funcionales (tales como grupos amino o carboxilo) que pueden facilitar la asociación covalente con el analito. Además, los restos iónicos se pueden derivar por diseño para que tengan grupos funcionales convenientes para la conjugación con los analitos.

Además, se conocen varios agentes de reticulación disponibles en el mercado que se pueden utilizar para unir moléculas portadoras y restos iónicos (por ejemplo, reactivos homo-bifuncionales que unen de manera cruzada grupos amino-amino o sulfhidrilo-sulfhidrilo, y similares). Estos y otros métodos de reticulación son bien conocidos por los facultativos en el campo y la selección se puede basar en las necesidades específicas del ensayo.



**B. Asociación de un resto iónico y el analito indirectamente por medio de una molécula portadora o complejo portador**

- 5 Un analito también se puede asociar con un resto iónico indirectamente, por medio de una molécula portadora o complejo portador. Una molécula portadora es una molécula que se une específicamente al analito. Por lo tanto, el analito y la molécula portadora juntos constituyen una “pareja de unión específica” o complejo portador. En esta realización, el resto iónico se une o conjuga con la molécula portadora en vez de, o además de, el analito. Los ejemplos de parejas de unión incluyen pero sin limitación, parejas de anticuerpo-antígeno, parejas de ligando-receptor, y otros complejos ligando: anti-ligando. Normalmente la molécula portadora es un anticuerpo que se une específicamente al analito.

Tabla 2: Parejas de unión específica a modo de ejemplo

Analito	Molécula Portadora
antígeno (por ejemplo, una proteína)	anticuerpo
anticuerpo	antígeno
cadena de polinucleótido	cadena de polinucleótido complementaria
ligando (por ejemplo, hormona)	receptor (por ejemplo, receptor hormonal)
inmunoglobulina	Proteína A
enzima	cofactor enzimático o sustrato
carbohidrato	lectina

- 15 La molécula portadora se puede asociar con un resto iónico utilizando cualquiera de diversos métodos para asociar moléculas algunos de los cuales se han tratado anteriormente. Los métodos seleccionados dependerán en parte de la naturaleza del analito, resto iónico y molécula portadora. Por ejemplo, se pueden unir uno o más restos iónicos a moléculas portadoras utilizando procesos químicos convencionales. Por ejemplo, los restos iónicos tales como ácidos nucleicos, poli-lisina, poli-arginina, poli-glutamato, poli-aspartato y glucanos sulfatados tienen grupos
- 20 funcionales (tales como amino o carboxilo) que facilitan la reticulación con anticuerpos u otras moléculas portadoras, o se pueden derivar para que porten tales grupos funcionales. Algunas moléculas portadoras potenciales, tales como los ácidos nucleicos y las proteínas tienen grupos funcionales (tales como amino [por ejemplo, lisina, arginina], carboxilo [por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico] o sulfhidrilo [por ejemplo, cisteína]) que facilitan la reticulación con restos iónicos, o se pueden derivar para que porten tales grupos funcionales. Las moléculas
- 25 portadoras se pueden asociar con el resto o restos iónicos utilizando diversos enlazadores bifuncionales. Las moléculas portadoras pueden modificarse químicamente para tener grupos funcionales específicos para la reticulación. Por ejemplo, los glucanos sulfatados se pueden oxidar para tener grupos funcionales aldehído, que se pueden utilizar para que reaccionen con grupos amino. Los oligonucleótidos se sintetizan con un grupo sulfhidrilo o amino primario en un extremo. En los grupos funcionales amino o sulfhidrilo, el oligonucleótido se puede reticular
- 30 con los grupos amino o sulfhidrilo de las moléculas del anticuerpo utilizando reactivos de reticulación que están disponibles.

- El resto iónico también se puede asociar con la molécula portadora (y por tanto con el analito) indirectamente, por medio de una o más moléculas intermedias. Por ejemplo, si el analito es un antígeno, “AntígenoA”, se puede asociar
- 35 indirectamente con un resto iónico, por ejemplo, uniendo el AntígenoA a un anticuerpo monoclonal anti-AntígenoA (AAA-mAb) (“molécula portadora”) y uniendo el AAA-mAb con un segundo anticuerpo marcado iónicamente (anti-AAA-mAb). Se reconocerá que este tipo de marcaje de tipo anticuerpo secundario es rutinario en los inmunoensayos. El complejo de moléculas que comprenden el analito y el resto iónico (en este ejemplo, AntígenoA + AAA-mAb + resto iónico anti-AAA-mAb) se puede denominar un “complejo portador”. Aunque se describen
- 40 asociaciones antígeno-anticuerpo en este ejemplo, el método no está limitado a anticuerpos. Se puede utilizar cualquier pareja de unión específica en la que una de las partes sea el analito.

- También se pueden asociar una molécula portadora y un resto iónico por medio de una pareja de unión específica cuando uno o ambos miembros de la pareja de unión específica se conjugan con un marcador. Por ejemplo, una
- 45 molécula portadora puede estar biotinilada y marcada utilizando un resto iónico conjugado con avidina. El marcador es avidina o biotina y permite la unión del resto iónico por medio del marcador en cualquier etapa del proceso. En otra realización, una molécula de anticuerpo portadora se asocia con un resto iónico (ácido nucleico) de la siguiente manera: Una molécula de avidina cargada se prepara añadiendo 1, 2 o 3 oligonucleótidos biotinilados en sus cuatro
- 50 sitios de unión a biotina, dejando al menos un sitio de biotina que permanece sin ocupar. Una molécula portadora biotinilada (por ejemplo, anticuerpo anti-analito) se une en el complejo oligonucleótido-avidina-biotina. Otros ejemplos de marcadores incluyen sin limitación un marcador de poli-histidina, marcador de glutatión y fluoresceína. Los anticuerpos con afinidad específica para los marcadores están disponibles para su adquisición o se pueden producir si se necesita.

Cualquiera de los métodos descritos anteriormente en el contexto de marcaje iónico de una molécula portadora, se pueden utilizar para marcar iónicamente una proteína, ácido nucleico, u otro componente del complejo portador.

- 5 Una molécula que se une directamente (por ejemplo, covalentemente) a un resto iónico se puede denominar "marcada iónicamente". El complejo del analito, asociado con resto(s) iónico(s), molécula(s) portadora(s), si está presente, y cualquiera de otras moléculas que se utilizan para asociar el resto(s) iónico(s) y el analito se puede denominar "complejo Analito-Resto iónico (IM)".
- 10 Se apreciará que la asociación del analito y restos iónicos es suficientemente estable en las condiciones de electroforesis de concentración y, opcionalmente, las etapas analíticas de concentración posteriores, para que los dos permanezcan asociados según se lleva a cabo el ensayo.

#### **VI. Asociación de un resto iónico con un analito inmovilizado**

- 15 En un aspecto, la invención proporciona un método de la invención que utiliza, en parte, la tecnología de electroforesis de concentración descrita anteriormente. De acuerdo con el método, el analito:

- 20 a) se une a una fase sólida o inmovilizada  
 b) se asocia con un resto iónico  
 c) se libera de la fase sólida o inmovilizada  
 d) se somete a electroforesis en el dispositivo microfluídico  
 e) se une o detecta en un área de análisis utilizando un agente de captura que reconoce específicamente
- 25 i) el analito o  
 ii) el resto iónico.

Las etapas (a) y (b) pueden tener lugar en cualquier orden y las etapas (b) y (c) pueden tener lugar en cualquier orden, siempre que (c) se produzca después de (a). Por ejemplo, el orden puede ser  $a \rightarrow b \rightarrow c$ ;  $b \rightarrow a \rightarrow c$ ; o  $a \rightarrow c \rightarrow b$ .

- 30 Las etapas (a) - (c) se describen posteriormente, como ilustración y no como limitación. Las realizaciones particulares de este método se muestran en la Figura 5, y se tratan en el texto correspondiente. Este método incluye dos etapas de concentración específicas del analito independientes y proporciona un método de ensayo altamente sensible.

#### **35 a. El analito se une a una fase sólida o inmovilizada**

El analito se puede unir a una fase sólida o inmovilizada (lo que se usa de manera intercambiable en el presente documento) de cualquier manera convencional, tratando la solución de muestra con un compañero de unión específico (SBP) del analito inmovilizado en una fase sólida. La fase sólida puede ser, como ilustración y no como limitación, una superficie del depósito de gran volumen, una superficie de un pocillo de una placa de microtitulación, o la superficie de una micropartícula. En una realización preferida, se utilizan micropartículas. En una realización, se utilizan micropartículas magnéticas.

- 45 Las micropartículas útiles para la purificación se conocen bien en la técnica. Las micropartículas son en general partículas esféricas que tienen normalmente un diámetro desde aproximadamente 0,05  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$ , sobre las que se puede unir, o que pueden revestirse con, una SBP (por ejemplo, anticuerpo, polinucleótido). Las micropartículas se pueden fabricar utilizando materiales tales como cristal, silicato de zirconio, silicio, oro, poliestireno, látex, y PMMA, y pueden tener características físicas como que sean magnéticas o magnetizables, coloreadas, biodegradables y fluorescentes. Las micropartículas se pueden revestir con un agente de unión, o pueden incluir grupos reactivos (por ejemplo, amino, carboxilo, cianúrico) que permitan la unión covalente con un compañero de unión (por ejemplo, anticuerpo, polinucleótido, avidina). Además, las micropartículas se pueden adquirir con SBP unidas (por ejemplo, micropartículas revestidas con estreptavidina, anticuerpos contra IgG e IgM humanas, y anticuerpos anti-biotina, en por ejemplo, Indicia Biotechnology (Oullins Francia); micropartículas con grupos de unión: avidina, estreptavidina, proteína A, albúmina, biotina, PEG, y colágeno en, por ejemplo, Kisker Biotechnology (Steinfurt Alemania). Otras fases sólidas, tales como placas de microtitulación también se pueden adquirir con, o derivarse para que tengan, compañeros de unión unidos covalentemente (por ejemplo, placas de microtitulación con estreptavidina o anticuerpos anti-IgG unidos en BD Biosciences (Bedford MD)).

- 60 El analito se puede unir al agente de unión inmovilizado poniendo en contacto la solución que contiene el analito con la SBP inmovilizada en condiciones en las que el analito se une a la SBP. Por ejemplo, las micropartículas se pueden añadir a una solución de pre-muestra. Tras la unión del analito a las micropartículas se puede preparar una fracción rica en analito segregando las micropartículas utilizando la centrifugación, separación magnética, o filtración con sus etapas de lavado apropiadas. La eliminación de contaminantes no unidos utilizando otras fases sólidas (por ejemplo, pocillos de microplaca) se pueden conseguir eliminando el sobrenadante no unido, y otros métodos bien conocidos.
- 65

**b. El analito se asocia con un resto iónico**

El analito se puede asociar con un resto iónico utilizando cualquier método adecuado, tal como los que se han descrito en las secciones previas. Como se ha indicado anteriormente, el analito se puede asociar con el resto iónico antes o después de la unión a la fase inmovilizada, y se puede asociar por medio del agente de unión o directamente. Por lo tanto, los agentes de unión que se utilizan en el presente documento unen el analito a una fase inmovilizada tal como una micropartícula o un sustrato. El resto iónico se puede asociar con la fase sólida antes. En este caso, la asociación del resto iónico y el analito se facilita uniéndose a la fase sólida.

**c. El analito se libera de la fase sólida o inmovilizada**

Los analitos unidos se pueden liberar de las micropartículas (u otra fase sólida) utilizando diversas estrategias. Por ejemplo, un analito se puede desplazar utilizando agentes específicos que compiten con el analito por la unión con la SBP inmovilizada. De manera alternativa, el analito se puede eluir con reactivos no específicos tales como los agentes desnaturizantes (por ejemplo, la urea), pH extremo, temperatura, tampones de alta fuerza iónica y similares para destruir la unión. Esto se puede hacer utilizando cambios de tampón, cambios en el campo eléctrico, pH, adición de un tampón de elución, o cualquier método conocido en la técnica.

De manera alternativa, los agentes de unión que tienen el analito unido a los mismos se pueden liberar como un complejo incorporando un enlace que se pueda escindir o romper en la unión entre los agentes de unión y la fase sólida (tal como la micropartícula o el sustrato). Además, los agentes de captura que se utilizan para capturar el analito durante el análisis en el chip microfluídico pueden incorporar un enlace que se pueda escindir o romper entre los agentes de captura y la superficie de captura del chip microfluídico. Aunque los agentes de unión y agentes de captura pueden ser el mismo tipo de moléculas, sus papeles son diferentes. El agente de captura se utiliza cuando se captura el analito durante el análisis (es decir, se inmoviliza en el área de análisis). En cualquier caso, los enlaces incluyen puentes disulfuro, dióles, secuencias de enzimas de restricción, y enlaces que se pueden disociar por productos químicos o enzimas. Por ejemplo, el agente de unión se puede escindir utilizando proteasas o nucleasas (por ejemplo, proteasas o nucleasas específicas de la secuencia). Si se utiliza un enlazador que contiene un puente disulfuro para anclar los anticuerpos a la fase sólida, el complejo de unión se puede liberar utilizando agentes reductores tales como el mercaptoetanol o el ditiotreitól. Una molécula de unión de ácido nucleico se puede escindir con nucleasas.

Se proporcionan los siguientes ejemplos como ilustración y no se pretende que limiten la invención.

**1. Analito ácido nucleico**

En una realización, el analito es un ácido nucleico. Los analitos de ácido nucleico son poli-iónicos por sí mismos, por tanto, aunque puede haber circunstancias en las que su unión con un resto iónico adicional puede ser ventajosa, puede no ser necesario unir un resto iónico para movilizar estas moléculas con un campo eléctrico. Sin embargo, puede ser ventajoso concentrar inicialmente los analitos y/o eliminar los contaminantes antes de la electroforesis. Esto se puede hacer, por ejemplo, utilizando agentes de unión al ácido nucleico con secuencias complementarias que se conjugan a micropartículas magnéticas. Las micropartículas magnéticas se pueden añadir a una muestra que contiene el analito de ácido nucleico en el depósito de gran volumen. Después de que las moléculas de analito se unen a las micropartículas, se aplica un campo magnético para agrupar las micropartículas en un punto específico en el depósito de gran volumen. Entonces se eliminan los contaminantes y sustancias de interferencia. Se utilizan condiciones de desnaturización tales como baja fuerza iónica, urea, betaína, pH o temperatura altos, o una combinación de estos factores, para destruir la hibridación separando de esta manera las cadenas de ácido nucleico y liberando los analitos unidos de las micropartículas. La electroforesis conduce los ácidos nucleicos analitos al segundo depósito. Una vez que se concentran en el segundo depósito, los analitos de ácido nucleico se someten a electroforesis en el dispositivo microfluídico hacia los sitios de captura específica que tienen agentes de captura que son complementarios al extremo 5' de los analitos de ácido nucleico. Los analitos de ácido nucleico se unen y se pueden detectar utilizando un agente de detección de ácidos nucleicos marcado que es complementario del extremo 3' de los analitos de ácido nucleico.

**2. Analito antígeno**

En otro ejemplo, se pueden asociar analitos que pueden actuar como antígenos con un sustrato sólido utilizando anticuerpos como agentes de unión. Los anticuerpos con afinidad para, por ejemplo, un analito proteico se conjugan con micropartículas. Las micropartículas se agrupan tal como por medios magnéticos (si son micropartículas magnéticas) o por campo de centrifuga en un punto específico del depósito de gran volumen y se elimina el sobrenadante que contiene cualquier molécula que no esté unida, contaminante o sustancia de interferencia. Los analitos proteicos se liberan de la micropartícula como un complejo. Esto se puede conseguir utilizando enlazadores escindibles (por ejemplo como se describe en el presente documento). También se pueden utilizar las proteasas apropiadas con condiciones de reacción optimizadas para conseguir la liberación deseada sin la degradación no deseable del analito. Además, se puede concebir modificar técnicamente sitios proteolíticos específicos en los componentes de anclaje, sea el enlazador o el anticuerpo, para proteasas con necesidades de sitio de escisión

rigurosas. Estas proteasas se pueden utilizar entonces para escindir el complejo de unión. En una realización, un analito de una muestra de sangre se detecta de acuerdo con los métodos de la invención utilizando una etapa de pre-concentración en la que se añaden micropartículas magnéticas revestidas con agentes de unión con afinidad para el analito a la muestra de sangre en un depósito de gran volumen.

5

### **VII. Electroforesis de concentración del analito**

Algunas o todas las etapas de asociación del analito con un resto iónico (así como las etapas anteriores de procesamiento de la muestra) se pueden llevar a cabo en el depósito de gran volumen. De manera alternativa, alguna o todas las etapas se pueden llevar a cabo en uno o más recipientes diferentes y el analito (y cualquier molécula asociada) se puede transferir al depósito de gran volumen (por ejemplo, por pipeteo). Como resultado, el complejo Analito-IM se puede localizar en el depósito de gran volumen.

10

La capacidad de líquido del depósito de gran volumen puede variar ampliamente. Los volúmenes típicos son desde aproximadamente 1 microlitro a aproximadamente 100 mililitros. Preferentemente, la capacidad del LVR (y el volumen de muestra) es mayor de aproximadamente 5 microlitros, incluso más preferentemente, mayor de aproximadamente 10 microlitros, tal como mayor de 50 microlitros, mayor de 100 microlitros y mayor de 1 mililitro. En algunas realizaciones, la capacidad del LVR o el volumen de muestra, está entre aproximadamente 1 microlitro y 20 mililitros. (Se apreciará que el volumen de muestra será menor que la capacidad del LVR, aunque será habitualmente al menos un 25 %, más a menudo al menos un 50 %, y a menudo al menos un 75 % del volumen del LVR). En algunas realizaciones, la muestra tiene un volumen de aproximadamente 10 microlitros a aproximadamente 100 mililitros, más a menudo de 25 microlitros a 5 ml, incluso más a menudo de 50 microlitros a 5 ml o 100 microlitros a 25 ml. La capacidad del LVR puede ser aproximadamente 50 microlitros, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 300  $\mu$ l, 500  $\mu$ l, 800  $\mu$ l, 1 mililitro, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml y 90 ml. En general, se puede utilizar un volumen que se espera que se pueda concentrar razonablemente por electroforesis en una cantidad razonable de tiempo. Esto se puede determinar por la cantidad de tiempo que tarda el analito cargado en moverse en el volumen de muestra la distancia más larga.

15

20

25

La transferencia electroforética del analito cargado o el complejo de analito-IM se consigue generando un campo eléctrico que se extiende desde el depósito de gran volumen por medio del conector al dispositivo microfluídico (por ejemplo, un depósito de agrupamiento o un área de análisis). Una disposición a modo de ejemplo del sistema se ilustra en las Figuras 1-3. El dispositivo que se muestra en las Figuras 1 y 3 muestra una multiplicidad de conectores para conectar múltiples muestras de una multiplicidad de depósitos de gran volumen con el dispositivo microfluídico y/o una multiplicidad de depósitos de agrupamiento.

30

35

Se coloca al menos un electrodo en, o está integrado en, cada depósito de gran volumen y se coloca al menos un electrodo en, o se integra en, el dispositivo microfluídico. Se aplica el campo eléctrico con una fuerza tal que el analito se dirija desde los depósitos de gran volumen al dispositivo microfluídico a una velocidad seleccionada. La posición de los electrodos y el campo eléctrico aplicado en el depósito se puede determinar para facilitar el mejor rendimiento del dispositivo microfluídico, por ejemplo, para alcanzar una detección sensible en poco tiempo. Como ejemplo, los electrodos de los depósitos de gran volumen se pueden colocar en un punto que ofrezca la mayor simetría y distancia en relación a la apertura de los conectores que conducen al dispositivo microfluídico. Esta colocación de electrodos probablemente ofrece un campo eléctrico relativamente uniforme para conducir todos los analitos del depósito. La colocación de uno o más electrodos en el dispositivo microfluídico dependerá de la operación que se pretenda en el dispositivo. El electrodo(s) se puede colocar cerca de los depósitos de agrupamiento si se desean depósitos de agrupamiento. Se puede colocar cerca del área de análisis si se desea conducir los analitos al área de análisis directamente sin utilizar depósitos de agrupamiento. Los electrodos se pueden colocar también en ambos lugares de modo que los campos eléctricos se pueden aplicar para conducir los analitos secuencialmente, primero a los depósitos de agrupamiento y luego al área de análisis.

40

45

50

El uso de un depósito de agrupamiento en el dispositivo microfluídico permite la sincronización y un mejor control de los movimientos de los analitos hacia el área de análisis. El depósito de agrupamiento está integrado en el chip. El depósito de agrupamiento se construye de tal manera que esté en comunicación fluida con el área de análisis (cuando cualquiera de las válvulas que interrumpen el flujo de fluido en el dispositivo está abierta). El volumen del depósito de agrupamiento es menor que el volumen del depósito de gran volumen, y es normalmente menor de aproximadamente 1 microlitro, incluyendo pero sin limitación, desde aproximadamente 0,1 pl a aproximadamente 2  $\mu$ l, 1 pl a 1  $\mu$ l, y 10 pl a 0,5  $\mu$ l, preferentemente menor de 1 microlitro, a veces menor de 0,1 microlitros, y a veces menor de 1 picolitro.

55

Los conectores que se muestran pueden ser tubos capilares. Para facilitar la electroforesis, se llena un conector con medio de conducción tal como un tampón bajo en sales de forma que se pueda establecer un campo eléctrico. Cuando se aplica el campo eléctrico, el analito (o complejo) cargado se transporta y se dirige al dispositivo microfluídico sea directamente a través del área de análisis o hacia un depósito de agrupamiento en el dispositivo microfluídico para concentrar el analito antes de su análisis posterior. El potencial eléctrico del electrodo que se asocia con el depósito de gran volumen y el depósito de agrupamiento se selecciona para conseguir la velocidad de transporte del analito deseada.

60

65

La duración de la electroforesis depende de factores tales como la concentración y cantidad de analito de interés en la muestra, las condiciones electroforéticas (corriente, tensión, fuerza iónica de los tampones, etc.), el volumen de la muestra inicial, la carga del analito, la sensibilidad del método de detección, y el tampón que se utilice. La electroforesis se lleva a cabo durante un tiempo suficiente para transportar una cantidad del analito de interés.

5 Cuando se transfiere el suficiente analito, se puede interrumpir la electroforesis, y si se desea, el depósito de gran volumen y el conector se pueden retirar.

10 En una realización, la electroforesis se lleva a cabo hasta que la concentración de analito en el depósito de agrupamiento es de al menos 2 veces la concentración del depósito de gran volumen. A veces la diferencia de concentración es al menos de 3 veces, y a veces al menos de 5 veces, 10 veces, 25 veces o 100 veces o mayor.

15 Se pueden conectar más de un depósito de gran volumen y más de un depósito de agrupamiento para conseguir la mejor configuración para el ensayo con el fin de transportar el analito con facilidad y eficacia. Con muestras muy grandes, puede ser más eficaz utilizar múltiples depósitos de gran volumen en serie. En esta realización se conectan por conectores LVR de volúmenes decrecientes en secuencia, con los electrodos configurados de forma que un analito se transporte en serie de un LVR al próximo y finalmente al chip. Esto permite que se apliquen tensiones de tal manera que los analitos se transfieran con velocidad y minimizando la tensión necesaria para transportar analitos en el chip microfluídico. Una tensión menor es ventajosa porque reduce cualquier problema con la electrolisis, calentamiento y/o gases en el dispositivo microfluídico.

20 En algunas realizaciones el analito se transporta de los depósitos de agrupamiento a uno o más depósitos intermedios antes de transportarlo al área de análisis. Esto permite múltiples ensayos (por ejemplo, ensayos que se llevan a cabo en diferentes soluciones o con reactivos incompatibles) para llevarse a cabo fácilmente. Por ejemplo, los contenidos de un depósito de agrupamiento se pueden dividir y una porción se utiliza para la detección de un ácido nucleico y el otro para la detección de una proteína. Utilizando depósitos intermedios también se puede permitir el uso de un mayor volumen de muestra.

#### **VIII. Transporte del analito, analito cargado, o complejo analito-IM al área de análisis**

30 Para la detección y análisis del analito, el analito (que puede estar asociado con un resto iónico y/o parte de un complejo de analito) se transporta desde el depósito de gran volumen o el depósito de agrupamiento al área de análisis del dispositivo. En realizaciones preferidas el área de análisis comprende múltiples agentes de captura (que pueden ser el mismo o diferentes, y que pueden estar dispuestos o no en una matriz ordenada) que se unen al analito o el complejo analito-IM (y que pueden unirse a la molécula portadora, resto iónico, u otro componente del complejo).

40 Una vez que el analito y/o el complejo que comprende el analito se ha sometido a electroforesis desde el LVR al chip microfluídico, el analito/complejo se puede transportar al sitio de captura utilizando cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, microbombas, acción de capilaridad, y/o electroforesis. En una realización preferida, se utiliza la electroforesis. Se apreciará que la electroforesis que sale del depósito de agrupamiento a través de la matriz necesitará que se forme un campo eléctrico entre el electrodo del depósito de agrupamiento y el electrodo del o cerca del área de análisis. De manera alternativa, si no se utiliza un depósito de agrupamiento, el campo eléctrico se forma entre el electrodo del LVR y el electrodo del o cerca del área de análisis.

#### **45 IX. Área de análisis y detección del analito**

50 El analito se puede detectar, cuantificar o analizar en el área de análisis del chip. En una realización, el análisis se hace sin inmovilizar el analito en el área de análisis (por ejemplo, utilizando dispersión de luz, citometría de flujo, o detección fluorescente u otros métodos de detección que se llevan a cabo en solución). Por ejemplo, los analitos se pueden marcar con fluoróforos y analizarse en el área de análisis con aparatos que se utilizan habitualmente en los citómetros de flujo para analizar entidades fluorescentes excitando los fluoróforos con láser de longitud de onda adecuada y medir la luz fluorescente emitida. Se apreciará que, de acuerdo con el diseño de la mayoría de los dispositivos microfluídicos, el área de análisis habitualmente es un canal o una cámara del chip.

55 De manera alternativa, la detección implica la unión del analito con un agente de captura inmovilizado en el área de análisis. Un agente de captura es una molécula que puede capturar un analito o complejo de analito uniéndose específicamente al analito o un miembro del complejo. Los miembros del complejo que se pueden unir al agente de captura incluyen el analito, la molécula portadora, el complejo molécula portadora/analito, un resto iónico, un segundo anticuerpo (si se utiliza) y un marcador. Por lo tanto, el agente de captura puede ser, por ejemplo, uno o más anticuerpos, ácidos nucleicos, receptores y/o ligandos.

65 El agente de captura se puede inmovilizar en el dispositivo microfluídico en un sitio de captura utilizando cualquiera de los métodos que se conocen en la técnica. Por ejemplo, se puede unir uno o más agentes de captura de anticuerpos por medio de la parte Fc del anticuerpo. El agente de captura se puede unir al sitio de captura por una unión covalente o no covalente, pero, preferentemente, la unión será lo suficientemente fuerte para que el movimiento de líquido por encima del sitio de captura no desprenda los agentes de captura. Los diversos reactivos y

condiciones de la reacción que se utilizan se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, "Chemical Modification of Proteins" por Gary E. Means y Robert E. Feeney, "Bioconjugate Techniques" por Greg T. Hermanson y "Chemical Reagents for Protein Modification" por Roger L. Lundblad). Se pueden encontrar métodos ilustrativos de unión de agentes de captura a los sitios de captura en los sustratos de la fase sólida por ejemplo en las Patentes de EE. UU. 5.629.213, 5.688.642, 5.585.275, y la Solicitud de Patente Internacional WO 9745730.

Una vez unidos al sitio de captura, los agentes de captura pueden capturar el analito o un miembro del complejo de analito según se mueve sobre el sitio de captura. El agente de captura y el analito o complejo de analito se unen normalmente por una interacción no covalente, pero se puede utilizar una unión covalente. Para los analitos de ácido nucleico o restos iónicos de ácido nucleico, los agentes de captura pueden ser, por ejemplo, ácidos nucleicos complementarios. Para los analitos proteicos, los agentes de captura pueden incluir anticuerpos, ligandos, lectinas y receptores específicos para el analito proteico. Los analitos de carbohidratos y lípidos se pueden capturar utilizando anticuerpos como agentes de captura. Las moléculas de anticuerpo portadoras se pueden capturar utilizando anticuerpos, antígenos u otras moléculas que se unen específicamente a los anticuerpos. Por ejemplo, si la molécula portadora es un anticuerpo humano, el agente de captura puede ser un anticuerpo anti-humano de cabra.

Las condiciones para la captura se pueden manipular para permitir la captura específica de un miembro diana del complejo de analito. Las condiciones tales como el tampón, la velocidad de movimiento sobre el sitio de captura, la temperatura y el tiempo de captura se pueden escoger para permitir la unión de solamente un analito específico o para unir también variantes tales como ácidos nucleicos con cambios de bases únicos o variantes de proteínas. De manera alternativa, el agente de captura se puede escoger para que solamente se una a un analito específico o a las variantes.

Los agentes de captura se pueden dirigir a una localización específica o sitio de captura de un dispositivo microfluídico por cualquier método conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, los agentes de captura se pueden dirigir y asociarse a un sitio de captura específico utilizando dispositivos de bombeo, o reactivos de fotolitografía y fotorreactivos.

A menudo el analito se detecta basándose en una señal de un marcador detectable. Un marcador se refiere a un átomo (por ejemplo, un radionúclido), molécula (por ejemplo, fluoresceína), o complejo, que se usa o se puede utilizar para detectar (por ejemplo, debido a una propiedad física o química), que indica la presencia de una molécula o que es capaz de unirse a otra molécula a la que está unida covalentemente o asociada de otra manera. El término "marcador" también se refiere a moléculas unidas covalentemente o asociadas de otra manera (por ejemplo, una biomolécula tal como una enzima) que actúa sobre un sustrato para producir una señal física, molécula o complejo detectable. Los marcadores detectables adecuados para su uso en la presente invención incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunológicos, eléctricos, ópticos, químicos o físicos y similares. Un marcador detectable, cuando se utiliza, se puede añadir a cualquier componente del complejo final que se pueda unir al agente de captura. Por ejemplo, el marcador puede unirse a una molécula portadora, un analito, un resto iónico, o un agente de unión. Los detectores (por ejemplo, lectores de fluorescencia, espectrofotómetros, etc.) para su uso en un entorno microfluídico se conocen bien en la técnica.

Se apreciará que se pueden detectar múltiples analitos en la misma muestra. Por ejemplo, como se ilustra en las Figuras 3 y 7, se pueden asociar regiones específicas del área de análisis con restos de captura específicos para analitos particulares.

#### **X. Especificidad del ensayo**

La especificidad del ensayo se puede proporcionar en una cualquiera o más de las etapas de los métodos que se describen en el presente documento. Por ejemplo, una o más etapas pueden implicar la unión a clases generales de moléculas y una o más etapas pueden requerir la unión específica solo al analito de interés. Cuando se desea especificidad, se puede utilizar un anticuerpo específico modificado iónicamente, se puede utilizar una molécula portadora específica, se puede utilizar un agente de unión específico, se puede utilizar una molécula de detección específica, y/o se puede utilizar un agente de captura específico en el dispositivo microfluídico. Por lo tanto, por ejemplo, inicialmente el analito de la muestra se puede concentrar utilizando micropartículas revestidas con moléculas de unión específica. De manera alternativa, las micropartículas se pueden revestir con moléculas de unión que se unen a una clase general de moléculas que incluye el analito. Las clases de moléculas generales incluyen: proteínas fosforiladas, glucoproteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, lípidos, azúcares, dominios de receptor compartidos, motivos compartidos, motivos de ácidos nucleicos o aminoácidos conservados, portadores compartidos, y epítomos compartidos.

#### **XI. Anticuerpos que se utilizan en el ensayo**

El lector apreciará que los anticuerpos pueden desempeñar varios papeles en el método de la invención. Por ejemplo, un anticuerpo también puede ser el analito, como se describe en el Ejemplo posterior. El término "anticuerpo" se refiere a inmunoglobulinas que comprenden dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos (que incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fabc y Fv). Los fragmentos se

- pueden producir por técnicas de ADN recombinante, o por separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. El término “anticuerpo” también incluye una o más cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos que están conjugados químicamente con, o se expresan como, proteínas de fusión con otras proteínas, anticuerpos de cadena sencilla, y anticuerpos biespecíficos. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Nueva York (1988); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1999, que incluyen los suplementos hasta 2005); Songsivilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992). Los anticuerpos pueden ser mono o policlonales. Sin embargo, en algunas realizaciones se utilizan anticuerpos monoclonales para asegurar la unión a un epítipo específico de la proteína.
- En algunas realizaciones, se unen dos o más anticuerpos al analito (u otro componente del complejo analito-IM) simultáneamente en algún punto del ensayo. En tales condiciones, los anticuerpos bien se unen a diferentes epítopos del analito, un segundo anticuerpo se une al primer anticuerpo, o un segundo anticuerpo se une al complejo de anticuerpo/analito. En otras realizaciones, un primer anticuerpo se puede retirar antes de la adición de un segundo anticuerpo.
- Dependiendo de la función que cumplan, los anticuerpos pueden estar marcados iónicamente y/o se pueden modificar para incluir un marcador detectable para la detección posterior. Como se utiliza en el presente documento, un “marcador detectable” tiene el significado habitual en la técnica y se refiere a un átomo (por ejemplo, radionúclido), una molécula (por ejemplo, fluoresceína), o complejo, que se usa o se puede utilizar para detectar (por ejemplo, debido a una propiedad física o química), indicar la presencia de una molécula o para hacer posible la unión de otra molécula a la que está unida covalentemente o asociada de otra manera. El término “marcador” también se refiere a moléculas unidas covalentemente o asociadas de otra manera (por ejemplo, una biomolécula tal como una enzima) que actúan sobre un sustrato para producir un átomo, molécula o complejo detectable. Los marcadores detectables adecuados para su uso en la presente invención incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos, químicos o físicos y similares.

## **XII. Aparatos y sistemas**

- Se describen en el presente documento un aparato y sistema para llevar a cabo los métodos que se describen en el presente documento. En una realización el dispositivo microfluídico tiene un depósito de agrupamiento en comunicación fluida con un área de análisis que comprende agentes de captura que se unen a (i) el analito, (ii) un anticuerpo, (iii) un ácido nucleico (es decir, moléculas portadoras o elementos del complejo analito-IM). Como se ha señalado anteriormente, el área de análisis es normalmente una región de un canal microfluídico y los agentes de captura se inmovilizan en al menos la superficie del canal. El depósito de la muestra tiene una capacidad de fluido como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, de 0,1 pl a aproximadamente 2 µl). El dispositivo comprende además un primer microelectrodo asociado con el depósito de agrupamiento y un segundo microelectrodo asociado con el área de análisis. Los electrodos se colocan tal que la aplicación de una carga positiva a un electrodo y una carga negativa en el otro electrodo da como resultado un campo eléctrico suficiente para la electroforesis de una molécula cargada desde el depósito de agrupamiento hacia el área de análisis. Por lo tanto, un electrodo se puede situar en el depósito de agrupamiento y el segundo se sitúa en el área de análisis distal a (con respecto al depósito de agrupamiento) los agentes de captura inmovilizados.
- En una realización, el dispositivo comprende múltiples unidades de depósito de agrupamiento y área de análisis, como se ha descrito anteriormente. Cada combinación de depósito de agrupamiento y área de análisis se denomina “unidad operativa”.
- En una realización, al menos un área de análisis del dispositivo comprende agentes de captura que se unen a las moléculas de uno o más organismos patógenos. En una realización, al menos uno, y opcionalmente todos los organismos patógenos, son virus. En una realización, al menos uno, y opcionalmente todos los organismos patógenos, son bacterias. En una realización, las moléculas de los organismos patógenos son ácidos nucleicos, proteínas, o toxinas.
- En una realización relacionada, la presente divulgación proporciona un sistema que comprende un dispositivo microfluídico de la presente divulgación y comprende además un depósito de gran volumen y/o un conector y/o una fuente de corriente eléctrica y/o se puede utilizar un sistema de control implementado por ordenador para activar o cambiar la polaridad de los electrodos (400, 500) según se necesite para la concentración, el transporte y/o el análisis. El sistema utiliza la electroforesis para concentrar un analito cargado y para introducir o aplicar la muestra en un dispositivo microfluídico. La electroforesis se utiliza para mover y concentrar un analito cargado desde un depósito de gran volumen en un depósito de agrupamiento o en un dispositivo microfluídico. Una disposición general para el sistema o aparato se ilustra en las Figuras 1 y 2. El sistema incluye en general un dispositivo microfluídico 600, al menos un depósito de gran volumen 100, al menos un depósito de agrupamiento 300, un conector 200, y al menos dos electrodos 400 y 500 (u 800) para la electroforesis. En una realización, el dispositivo microfluídico también incluye un pocillo de efluente para la recolección de cualquier efluente sobrante del análisis de la muestra (por ejemplo, véase la Figura 3).

Los múltiples conectores 200 entre los depósitos de gran volumen 100 y los depósitos de agrupamiento 300 que utilizan tubos capilares se muestran en la Figura 1. Los capilares 200 están llenos de fluido, tal como tampones de baja salinidad que tienen el fin de conectar los electrodos (400 y 500) para formar un campo eléctrico. Esto permite que un analito cargado se someta a electroforesis desde un depósito de gran volumen 100 a un depósito de agrupamiento 300 (véase la Figura 3).

Los electrodos 400 y 500 se pueden conectar a los depósitos (100, 300) y/o el dispositivo microfluídico 600 utilizando cualquier medio conocido en la técnica para producir un campo eléctrico adecuado. Se entiende que los materiales, muestras, tampones y fabricación de todos los componentes se proporcionan de forma que sean compatibles para la electroforesis de materiales. Los electrodos (400, 500) están unidos operativamente a los depósitos (100, 300). Unidos operativamente significa que el electrodo se coloca en o cerca del depósito de forma que la aplicación de una tensión o un potencial genera un campo eléctrico a través del cual se transportan moléculas cargadas. En una realización, el electrodo está insertado en el material del depósito o el dispositivo (por ejemplo, contenido en el sustrato). Además, cuando están presentes más de dos electrodos (400, 500), se puede utilizar un sistema de control implementado por ordenador para cambiar la polaridad de los electrodos (400, 500) según se necesite para la concentración, el transporte y/o el análisis. El sistema de control se puede configurar para responder a un detector que mide la presencia y/o posición del analito en el área de análisis.

En una realización, el sistema comprende una multiplicidad de unidades operativas en comunicación fluida con un depósito de gran volumen diferente. En una realización, el sistema comprende una multiplicidad de unidades operativas, cada una con un depósito de agrupamiento y un electrodo asociado, y un sistema de control que aplica una carga de la misma magnitud y duración a cada uno de los electrodos.

Se puede utilizar una instrumentación conocida en la técnica para aplicar el voltaje, controlar el transporte, caudal y dirección del líquido en el dispositivo, instrumentos de detección para detectar o notar el analito de interés, procesadores, por ejemplo, ordenadores para la instrucción de los instrumentos de control, recepción de datos de los detectores, y para analizar el almacenamiento e interpretación de los datos, y proporcionar los datos e interpretaciones en un formato de informe fácilmente accesible.

### **XIII. Realizaciones ilustrativas**

Las realizaciones de los métodos se describirán ahora en referencia a las Figuras 4-6.

En la realización que se ilustra en la Figura 4, se utiliza una molécula de anticuerpo portadora marcada iónicamente para dar propiedades iónicas al analito. Un anticuerpo 1 con un resto iónico 2 fijado a él, se une específicamente al analito 3 de la muestra en un depósito de gran volumen produciéndose un complejo anticuerpo/analito 4. Los anticuerpos marcados iónicamente y los complejos se transportan electroforéticamente hacia un depósito de agrupamiento. Los complejos se transportan entonces a un área de análisis que tiene un sustrato 5 que tiene unidos los agentes de captura 6. Los agentes de captura 6 son segundos anticuerpos específicos para el analito 3. Los anticuerpos agentes de captura 6 se unen a un epítipo del analito 3 diferente del que se unía al primer anticuerpo 1, o puede unirse específicamente al complejo anticuerpo/analito 4, pero no se une a ninguno de los primeros anticuerpos 1 libres. Se puede unir un marcador detectable directamente a cualquiera de las moléculas (sitios potenciales 7) en cualquier punto antes o después de la captura del analito 3. En otras realizaciones, el complejo analito/IM unido a un agente de captura se detecta utilizando un tercer anticuerpo marcado que se une a un sitio diferente del analito 3 o al complejo anticuerpo/analito (4).

La especificidad del ensayo se puede dar por la especificidad del primer anticuerpo 1, la especificidad del agente de captura 6, o ambos. Otras realizaciones pueden incluir un marcador de detección específica del analito que se utiliza en combinación con un agente de captura 6 que se une al primer anticuerpo 1 o al resto iónico 2.

En la realización que se ilustra en la Figura 5, el analito 3 se asocia con una carga uniéndolo a micropartículas magnéticas 8 en el depósito de gran volumen. En esta realización, las micropartículas 8 están revestidas con un anticuerpo agente de unión 11. Estos se añaden a la muestra en un tampón apropiado para permitir que los analitos 3 se unan a los anticuerpos agentes de unión 11. Si se desea, las sustancias de interferencia, contaminantes y/o no deseadas se eliminan tras la concentración magnética de las micropartículas 8 en un área específica del depósito. Se pueden llevar a cabo etapas adicionales para reducir más las sustancias no deseadas. Un segundo anticuerpo 1 que tiene un resto iónico 2 unido, se añade al complejo anticuerpo/analito en el depósito de gran volumen. El segundo anticuerpo 1 se une posiblemente por medio de un epítipo diferente del analito 3. De manera opcional el orden de adición del anticuerpo 1 frente a las micropartículas revestidas con un anticuerpo agente de unión 11 puede invertirse. Tras formarse la unión del complejo analito/anticuerpo (3/11/1/2), se retira cualquier anticuerpo 1 en exceso, sustancias de interferencia, contaminantes y/o no deseadas tras la concentración magnética de las micropartículas 8 en un área específica del depósito. Se pueden llevar a cabo etapas adicionales de lavado para reducir más las sustancias no deseadas. El complejo analito/anticuerpo (3/11/1/2) se separa de la micropartícula 8 utilizando un agente de escisión adecuado. Este complejo (3/11/1/2) se somete entonces a electroforesis para concentrar el analito 3 en un depósito de agrupamiento. Tras la concentración, el complejo se somete a electroforesis sobre el sitio de captura 5 del dispositivo microfluídico. En esta realización, los agentes de captura 6



unidos al sitio de captura 5 se unen específicamente al resto iónico 2 (por ejemplo, si el resto iónico 2 es una molécula de ácido nucleico, el agente de captura 6 es una molécula de ácido nucleico complementaria). Se puede unir un marcador 7 detectable a cualquiera de las moléculas implicadas, incluyendo el analito 3, la molécula de anticuerpo de unión 11 de la partícula 8, el segundo anticuerpo 1, o el resto iónico 2. La especificidad en esta reacción se puede proporcionar en cualquier etapa, incluyendo la unión al agente de unión 11 en la micropartícula 8, la unión del segundo anticuerpo 1 o ambos. En una realización, el agente de captura 6 puede ser un tercer anticuerpo que se une a un epítipo diferente del analito 3 o que se une específicamente al complejo anticuerpo/analito (1/3 u 11/3) y no se une con anticuerpos libres (1 u 11).

La realización que se ilustra en la Figura 6 es similar a la de la Figura 5, e implica la unión de un resto iónico 2 más tarde en el proceso y se puede utilizar en los casos en los que el resto iónico 2 puede interferir con una etapa de unión o purificación anterior. En esta realización, una pareja avidina/biotina (13/14), o una pareja de unión específica similar, se utiliza para unir el resto iónico 2 al anticuerpo 11 como una pareja marcador/agente de unión. El analito 3 se inmoviliza primero en micropartículas magnéticas 8 revestidas con los agentes de unión 11 específicos. En la ilustración de la Figura 6, los agentes de unión son anticuerpos 11 que se unen específicamente al analito 3, modificados con un marcador biotina 13. El resto iónico 2 conjugado con avidina (o agente de unión al marcador) se mezcla con las micropartículas 8 que se unen al anticuerpo agente de unión 11 por medio de un enlace avidina/biotina 13/14. En cualquier punto del proceso, las micropartículas magnéticas 8 se pueden concentrar en un área específica del depósito de gran volumen aplicando un campo magnético para permitir lavados, cambios de tampón, y/o separación del analito 3 de las micropartículas.

Antes de la electroforesis para concentrar el analito 3 en el depósito de agrupamiento, los anticuerpos agentes de unión 11 se escinden de las micropartículas 8, por ejemplo por adición de una proteasa específica. El complejo analito 3/ anticuerpo 11 y cualquier otra molécula cargada de la muestra se concentran entonces en el depósito de agrupamiento utilizando electroforesis. Tras la concentración, el complejo se mueve sobre un sitio de captura 5. El analito 3 se captura por los agentes de captura 6 específicos en el sitio de captura 5. En esta realización, el sitio de captura 4 se reviste con anticuerpos agentes de captura 6 que se unen específicamente al analito 3 en un epítipo diferente del que reconoce el primer anticuerpo 11. Se puede unir un marcador de detección 7 a cualquiera de los componentes, incluyendo el anticuerpo agente de unión 11, el analito 3, o el resto iónico 2.

La Tabla 3 proporciona ejemplos, como ilustración y sin limitación, de combinaciones de analitos, restos iónicos, moléculas portadoras, y agentes de captura que se pueden utilizar en los métodos de la invención.

Tabla 3: Ejemplos de combinaciones de analito/resto iónico/molécula portadora/agente de captura

	Analito	Resto iónico	molécula portadora	agente de unión	agente de captura
	polipéptido	ácido nucleico	anticuerpo	anticuerpo	anticuerpo
Véase la realización con ácido nucleico	ácido nucleico	(analito)	ninguno o ácido nucleico	ácido nucleico comp.	ácido nucleico comp.
	anticuerpo	poli-lisina	ninguno o segundo anticuerpo	antígeno	antígeno
	carbohidrato	ácido nucleico	anticuerpo	lectina	anticuerpo

### Ejemplos

Esta es una descripción genérica de un biochip que se utiliza para la detección de una enfermedad infecciosa. El chip contiene electrodos, pocillos de muestra, áreas de detección específica, canales y válvulas. Se pueden cargar múltiples muestras y llevarlas a través de áreas de detección para la identificación y cuantificación utilizando electroforesis. Las diferentes muestras se pueden cargar simultáneamente o secuencialmente y la carga se puede controlar por válvulas microfluídicas. Los reactivos habituales que se utilizan en la detección pueden introducirse a través de los canales del dispositivo.

#### Ejemplo 1: ensayo VIH/VHB/VHC

La Figura 3 ilustra un dispositivo microfluídico 600 para detectar la presencia de antígenos de VIH, VHB y/o VHC (analitos proteicos) en una muestra. El dispositivo microfluídico tiene los electrodos 500 y 800 para su uso, junto con el electrodo del LVR 400, en la electroforesis. Se introduce una muestra biológica sospechosa de contener VIH, VHB o VHC en el depósito de gran volumen (no mostrado) y se mezcla con anticuerpos específicos para los analitos proteicos de VIH, VHB o VHC. Los anticuerpos tienen unido un resto iónico. Se permite que se formen los complejos anticuerpo/analito y, se someten los complejos a electroforesis sobre los sitios de captura (700a, 700b y 700c) en el área de análisis 700 (opcionalmente tras la concentración en el depósito de agrupamiento 300). Los reactivos y las moléculas que no se unen fluyen hacia la cámara de eluyente 1000, y se pueden eliminar. El sitio de captura de VIH 700a tiene anticuerpos agentes de captura específicos para un analito proteico de VIH. El sitio de captura VHB 700b

tiene anticuerpos agentes de captura específicos para un analito proteico de VHB y el sitio de captura VHC 700c tiene anticuerpos agentes de captura específicos para un analito proteico de VHC. La presencia de VIH, VHB y/o VHC se puede identificar por una señal de un marcador detectable en los sitios específicos de captura (700a, 700b o 700c) para el analito vírico. La Figura 3 ilustra realizaciones en las que el analito se transporta electroforéticamente desde el depósito de gran volumen hacia el área de análisis a través de un depósito de agrupamiento (arriba) o sin área de agrupamiento (abajo).

La Figura 7 es una representación esquemática de un chip que ilustra una realización del ensayo en referencia a un ensayo de sangre para virus infecciosos tales como el VIH, VHB y VHC. El límite actual de sensibilidad para los ensayos clínicos aprobados por la FDA para el VIH es aproximadamente de 50 copias víricas por ml para el ensayo de Roche UltraSensitive AMPLICOR VIH-1 MONITOR®, v1.5 que utiliza tecnología PCR o Versant VIH 3.0 de Bayer que utiliza tecnología de ADN-b. Esto significa que para una muestra típica, se necesita 1 ml completo de muestra para proporcionar suficiente ARN vírico para la detección. Es impráctico cargar el 1 ml completo de solución de muestra en o sobre el chip. Incluso utilizando etapas preparatorias para la concentración de la muestra, tales como centrifugación, precipitación en etanol o la captura del ARN diana con micropartículas seguido por elución, el volumen final de muestra estará en el intervalo de decenas o cientos de microlitros (µl). Aunque las áreas de ensayo en los chips microfluídicos habitualmente varían desde unos pocos a varios cientos de micrómetros, el volumen que se puede manejar incluso en un gran chip estará en el intervalo de unos cuantos nanolitros (nl). Sería necesario un tiempo significativo para que la solución de muestra entera que se ha preparado, se mueva por el chip a través del área de detección y permitir el tiempo suficiente para que se unan los analitos que se ponen en contacto con los agentes de detección en un área de análisis específica. Esto da como resultado entonces un tiempo de cambio inaceptablemente alto para obtener los datos del ensayo. Por esta razón, en la práctica actual que utiliza un chip para la detección normalmente se utilizan los productos de reacciones PCR que tienen altas concentraciones de analitos para su aplicación en un chip.

Sin embargo, utilizando los métodos y aparatos que se desvelan en el presente documento, la electroforesis puede transportar un ARN o ADN vírico a partir de una gran muestra en el área de análisis de un chip con la opción de pasar a través de un depósito de agrupamiento que dé como resultado la concentración de la muestra a un nivel que se pueda utilizar para su detección en el chip. La Figura 7 muestra un diagrama de un formato de ensayo a modo de ejemplo para la detección de ácidos nucleicos o proteínas víricas en una muestra de sangre. La Figura 7 presenta un chip 600 que permite el transporte de analitos en múltiples muestras (que se localizan en los depósitos de agrupamiento 300) por electroforesis con un campo eléctrico que se aplica en la dirección de las flechas entre los electrodos (400, 800) por encima de múltiples sitios de detección 700 en las áreas de análisis. Los sitios de detección 700 están marcados con "VIH", "VHB" y "VHC" para indicar la presencia de agentes de captura específicos para las proteínas o ácidos nucleicos de estos virus, o a restos de unión, etc. que se asocian específicamente con uno de los virus. En este ejemplo, se van a ensayar cuatro muestras de manera simultánea. En una realización alternativa, el analito se transporta desde el depósito de agrupamiento de manera distinta que electroforéticamente (por ejemplo, utilizando bombas peristálticas).

#### **Ejemplo 2: Ensayo de VIH/VHB/VHC para analitos de ácido nucleico vírico**

Para detectar los analitos de ácido nucleico vírico en muestras de pacientes, se añade un detergente iónico o no iónico a la muestra del paciente para destruir la envoltura vírica y exponer los ácidos nucleicos en el depósito de gran volumen. Si se utiliza un detergente no iónico y las muestras tienen un contenido iónico bajo, se puede utilizar la electroforesis para conducir los ácidos nucleicos víricos directamente al área de análisis 700. De manera alternativa, los ácidos nucleicos víricos se dirigen por electroforesis al depósito de agrupamiento 300 en primer lugar. Posteriormente, estos ácidos nucleicos víricos se suministran desde el depósito de agrupamiento al área de análisis 700 por electroforesis u otros medios tales como las microbombas.

Si se utilizan detergentes iónicos, se utiliza una preparación adicional de la muestra de la siguiente manera. Se añaden micropartículas magnéticas conjugadas con ácidos nucleicos o análogos complementarios (agentes de unión) a la muestra que contiene el analito de ADN o ARN vírico. El ARN o ADN vírico se une a los agentes de unión de las micropartículas. Tras las etapas de lavado para retirar el exceso de detergentes, se disocian los ácidos nucleicos víricos de las micropartículas utilizando un agente desnaturante tal como la urea o calor. Luego se suministran los ácidos nucleicos víricos al área de análisis 700 o se concentran en el depósito de agrupamiento 300 utilizando electroforesis.

Tras la concentración en el depósito de agrupamiento 300, se utiliza entonces la electroforesis para pasar los analitos de ácido nucleico sobre los sitios de captura específicos (700a, 700b y 700c) del dispositivo microfluídico 600 en una localización específica. Los agentes de captura son ácidos nucleicos o sus análogos con secuencias complementarias a los analitos de ácido nucleico vírico específico. Los analitos de ácido nucleico se unen en un área de detección específica para el virus y se detectan aplicando marcadores fabricados de ácidos nucleicos o sus análogos con secuencias complementarias a una sección de las secuencias víricas distintas de las que se usan para la captura. Los agentes de detección del ácido nucleico se conjugan con entidades detectables tales como colorantes fluorescentes o enzimas, que se pueden detectar por sustratos de fluorescencia o quimioluminiscencia. Una muestra se identifica como que contiene el virus específico cuando se detecta un marcador en el área

específica del dispositivo microfluídico (700a, 700b o 700c).

**Ejemplo 3: ensayo VIH/VHB/VHC para analitos de anticuerpo**

5 Se llevó a cabo un ejemplo para detectar anticuerpos contra VIH, VHB o VHC de la siguiente manera:

Se conjugó un antígeno vírico específico como agente de unión para cada anticuerpo con micropartículas magnéticas por medio de un enlace escindible tal como un ADN bicatenario con un sitio de restricción. De manera alternativa, se pueden utilizar anticuerpos anti-Fc humanos modificados con restos iónicos. Las micropartículas se mezclaron con las muestras de sangre de pacientes humanos en un depósito de gran volumen para capturar cualquier anticuerpo contra los antígenos víricos específicos. Tras las etapas de lavado para reducir impurezas no deseadas, el complejo se libera de las micropartículas por escisión con una enzima de restricción. El complejo se conduce entonces por electroforesis a un depósito de agrupamiento. Tras la concentración en el depósito de agrupamiento, el complejo se conduce a los sitios de análisis (700a, 700b, 700c). Como ejemplo, para detectar los complejos, los agentes de captura con afinidad específica para una de las entidades del complejo se conjugan en la superficie del chip en cada sitio específico (700a, 700b y 700c) para recapturar los complejos y, por lo tanto, identificar la presencia de anticuerpos contra los antígenos víricos específicos de la muestra. Por ejemplo, si se utilizan antígenos víricos como agente de unión sobre las perlas magnéticas en la etapa de preparación de la muestra, el agente de captura puede ser un anticuerpo anti humano específico. Por el contrario, si se utiliza primero el anticuerpo anti-humano específico como agente de unión, el antígeno vírico se puede utilizar para recapturar el complejo del anticuerpo del paciente y el anticuerpo anti-humano. Los complejos recapturados se detectan por agentes marcadores que tienen afinidad por el complejo. Los agentes con afinidades por el complejo pueden ser anticuerpos diferentes contra los anticuerpos humanos o el antígeno vírico según sea apropiado. Se pueden marcar con colorantes fluorescentes o enzimas tal como la peroxidasa de rábano rústico o fosfatasa alcalina. De manera alternativa, el primer agente de unión puede modificarse para portar tanto los restos iónicos como los marcadores o secuencias complementarias específicas para la detección. Por ejemplo, los restos iónicos de oligonucleótidos se pueden conjugar con el primer agente de unión para proporcionar cargas iónicas y una secuencia que se una a un oligonucleótido marcado complementario de este. De manera alternativa, el primer agente de unión puede estar biotinilado o marcado con entidades tales como poli-histidina y detectarse por la avidina o un anticuerpo anti-poli histidina conjugado con marcadores.

**Ejemplo 4: ensayo VIH/VHB/VHC para analitos mixtos**

Los métodos se pueden utilizar para detectar analitos mixtos a partir de varias fuentes, por ejemplo proteínas de una fuente y ácidos nucleicos de una fuente diferente. Este ensayo detecta un ácido nucleico que codifica tat de VIH, una proteína de la cápsida de VHB, y un anticuerpo contra un antígeno específico de VHC en el mismo dispositivo microfluídico o incluso en la misma muestra de paciente. Los agentes de captura que se proporcionan en el sitio de captura incluyen un ácido nucleico complementario del ácido nucleico de VIH en un sitio de captura 700a, un anticuerpo que se une específicamente a la proteína de la cápsida del VHB en un segundo sitio de captura 700b, y un antígeno VHC como agente de captura que se une específicamente a un anticuerpo contra este antígeno en un tercer sitio de captura 700c. De manera alternativa, los métodos se pueden utilizar para detectar múltiples analitos de la misma fuente (por ejemplo, un antígeno específico del agente patógeno, un ADN específico del agente patógeno y anticuerpos específicos del agente patógeno) en una muestra de un paciente.

45 Aunque la presente invención se ha descrito en detalle en referencia a realizaciones específicas, los expertos en la técnica reconocerán que hay modificaciones o mejoras que están dentro del ámbito y espíritu de la invención, como se expone en las reivindicaciones siguientes. La cita de publicaciones y documentos de patente no se conciben como una admisión de que ninguno de estos documentos sea una técnica anterior pertinente, ni constituye ninguna admisión de los contenidos o la fecha de publicación de los mismos. La invención que se ha descrito ahora por medio de la descripción escrita y los ejemplos, los expertos en la técnica reconocerán que la invención se puede practicar en diversas realizaciones y que la descripción y ejemplos anteriores tienen fines de ilustración y no limitación de las reivindicaciones siguientes.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para introducir un analito de interés de una muestra en un dispositivo microfluídico, que comprende:

5 proporcionar una muestra acuosa en un depósito de gran volumen, conteniendo dicha muestra el analito y teniendo un volumen mayor de 1 microlitro, en donde el analito de interés está cargado o se ha asociado a una molécula cargada;  
 10 someter el analito a electroforesis por medio de un conector desde el depósito de gran volumen a un depósito de agrupamiento colocado en el dispositivo microfluídico durante el tiempo suficiente para que dé como resultado una concentración más alta del analito en el depósito de agrupamiento que la concentración en la muestra, en donde el depósito de agrupamiento comprende un microelectrodo localizado en él; y  
 15 transportar el analito desde el depósito de agrupamiento a un área de análisis situada en el dispositivo microfluídico durante un tiempo suficiente para que dé como resultado una concentración de analito mayor en el área de análisis que la concentración en la muestra, en donde el área de análisis comprende un sitio de captura que comprende un agente de captura, comprendiendo además dicho método el transporte del analito a través del sitio de captura en condiciones en las que el analito de interés es capturado por el agente de captura;  
 20 en donde dicho analito está unido covalentemente a un resto iónico o está asociado a una molécula marcada estando unido a una molécula portadora seleccionada de entre el grupo que consiste en un anticuerpo, un receptor, un ligando y un antígeno, y dicha molécula portadora está cargada iónicamente o está modificada para ser cargada iónicamente.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además proporcionar al menos otra muestra acuosa en un depósito de gran volumen fluidicamente conectado al dispositivo microfluídico y que comprende además al menos otra área de análisis para dicha otra muestra.

25 3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el depósito de gran volumen es una cámara que no está integrada en dicho dispositivo microfluídico.

30 4. El método de la reivindicación 3, en el que dicho depósito de gran volumen es un pocillo de una placa de micropocillos o un tubo de ensayo.

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho conector es un tubo capilar.

35 6. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha molécula portadora es un anticuerpo que se une específicamente a dicho analito de interés, en donde dicho anticuerpo está modificado con al menos un resto iónico o está modificado para asociarse a al menos un resto iónico.

40 7. El método de la reivindicación 6 en el que el resto iónico se selecciona de entre el grupo que consiste en:

45 ácidos nucleicos, poli-aminas, glucanos sulfatados y proteínas succiniladas, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, ácido polietilacrílico, ácido polipropilacrílico, ácido polibutilacrílico, ácido polimaleico, sulfato de dextrano, heparina, ácido hialurónico, polisulfatos, polisulfonatos, ácido polivinil fosfórico, ácido polivinil fosfónico, copolímeros de ácido polimaleico, ácido polihidroxibutírico y mezclas de polímeros.

8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho analito de interés es una biomolécula.

50 9. El método de la reivindicación 8, en el que dicha biomolécula se selecciona de entre el grupo que consiste en un péptido, una proteína, un ácido nucleico, un lípido y un azúcar.

10. El método de la reivindicación 9, en el que dicho analito de interés es un ácido nucleico.

55 11. El método de la reivindicación 1, en el que dicho transporte es por electroforesis.

12. El método de la reivindicación 1, que comprende además la detección del analito unido al agente de captura.

60 13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha muestra tiene un volumen de entre 1 microlitro y 20 mililitros.

14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha muestra tiene un volumen mayor de aproximadamente 20  $\mu$ l.

65 15. El método de la reivindicación 14, en el que dicha muestra tiene un volumen mayor de aproximadamente 50  $\mu$ l.

16. El método de la reivindicación 12, en el que dicha detección comprende la detección de un marcador en el

anticuerpo, el analito o el resto iónico.

17. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la inmovilización de dicho analito de interés en una micropartícula antes de la electroforesis.

5

18. El método de la reivindicación 17, en el que dicha micropartícula es una micropartícula magnética.

19. El método de la reivindicación 17, en el que dicha micropartícula está revestida con al menos un receptor, un anticuerpo o un anti-ligando que se unen específicamente a dicho analito de interés o a un grupo de moléculas que incluyen dicho analito de interés.

10

20. El método de la reivindicación 17, que comprende además la etapa de separar el analito de la micropartícula antes de la electroforesis.

15

21. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la relación de volúmenes entre el depósito de gran volumen y el depósito de agrupamiento es desde 100:1 a 1000:1.

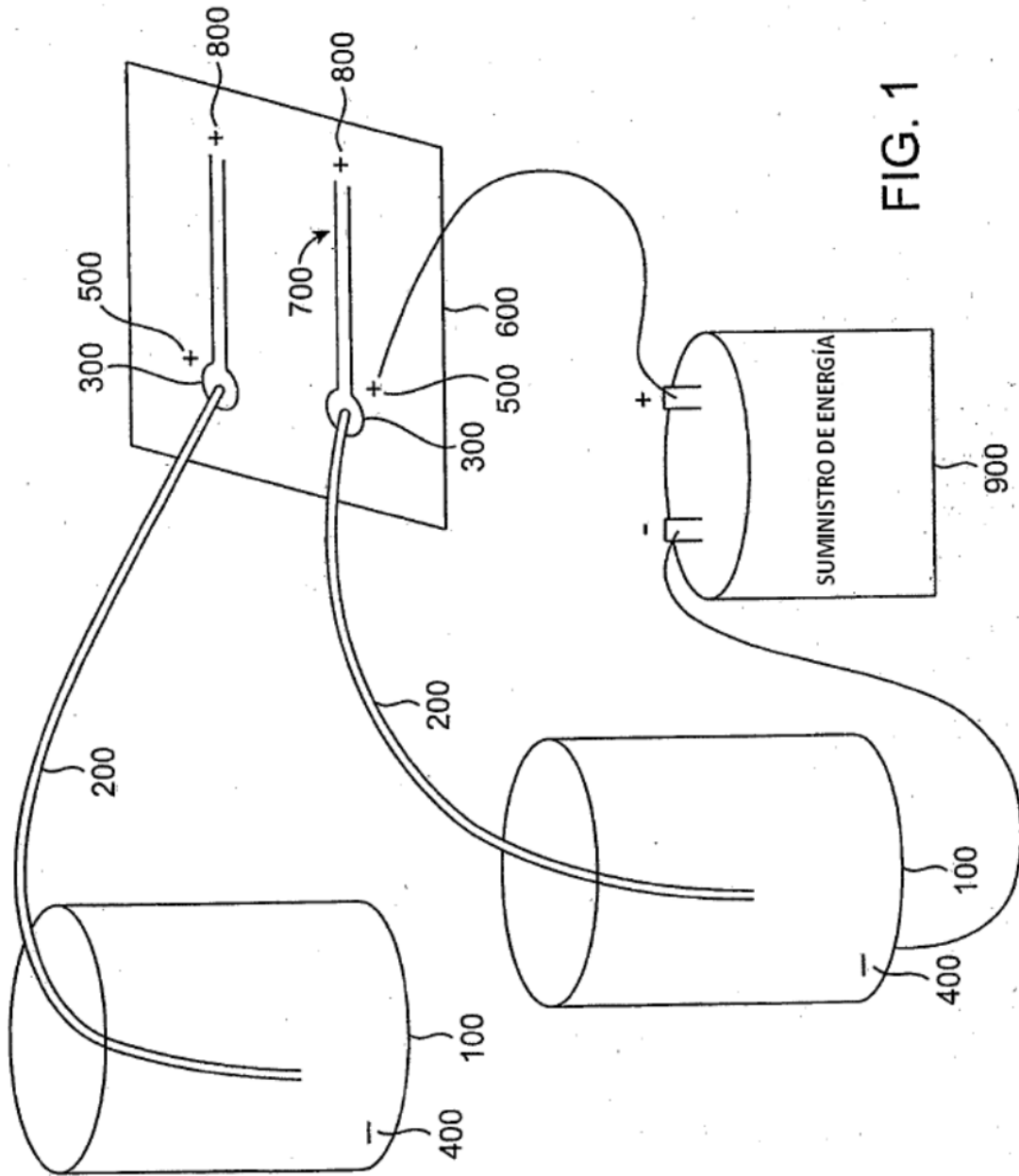


FIG. 1

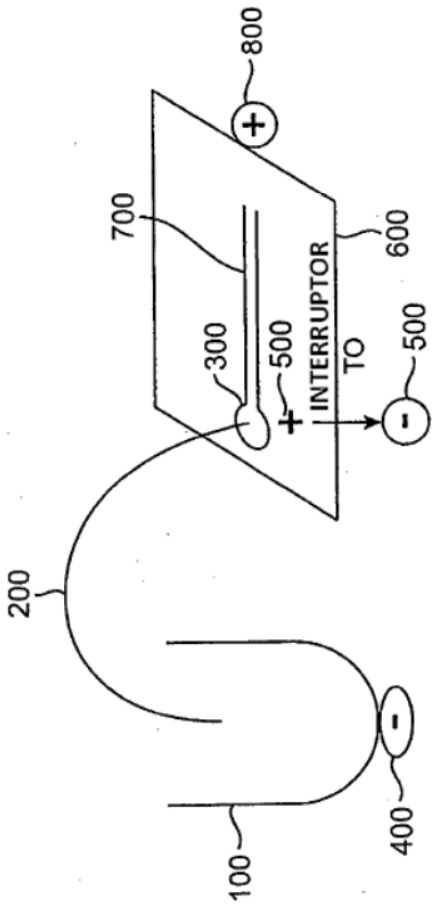


FIG. 2A

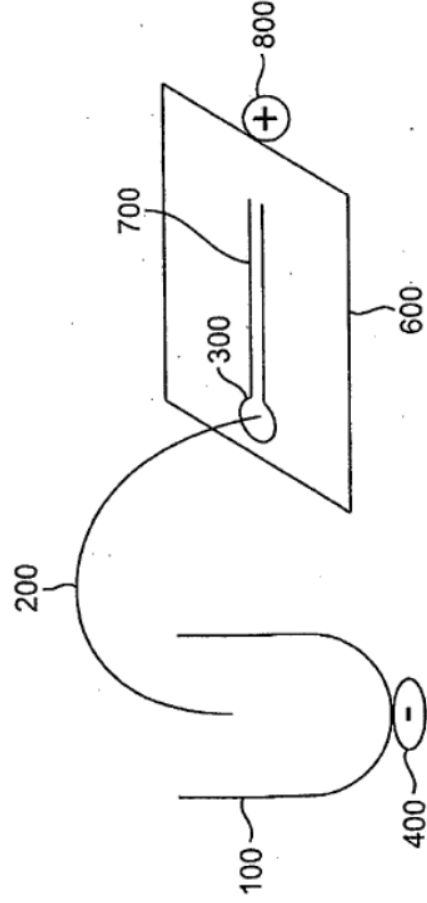


FIG. 2B

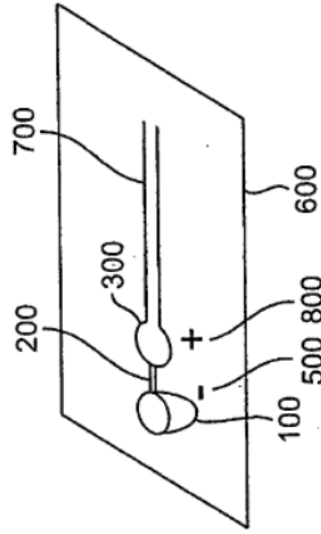


FIG. 2C

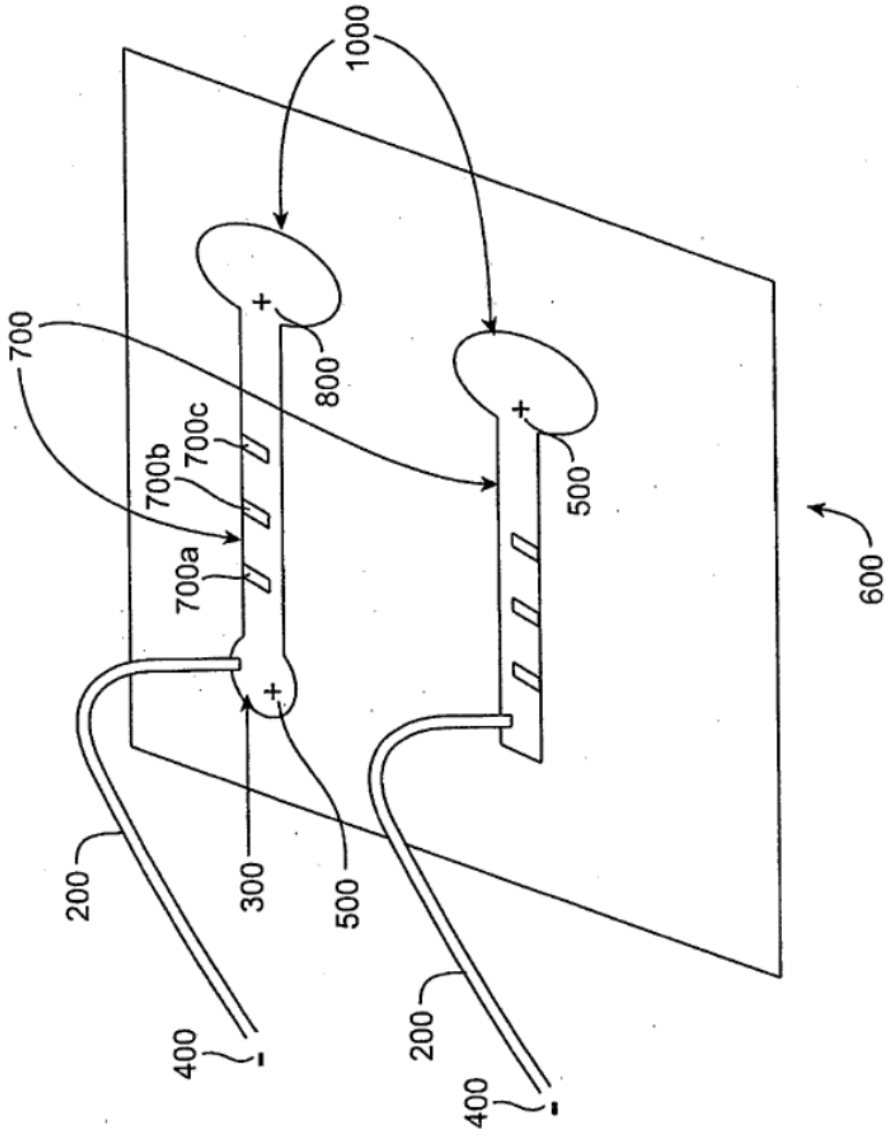


FIG. 3



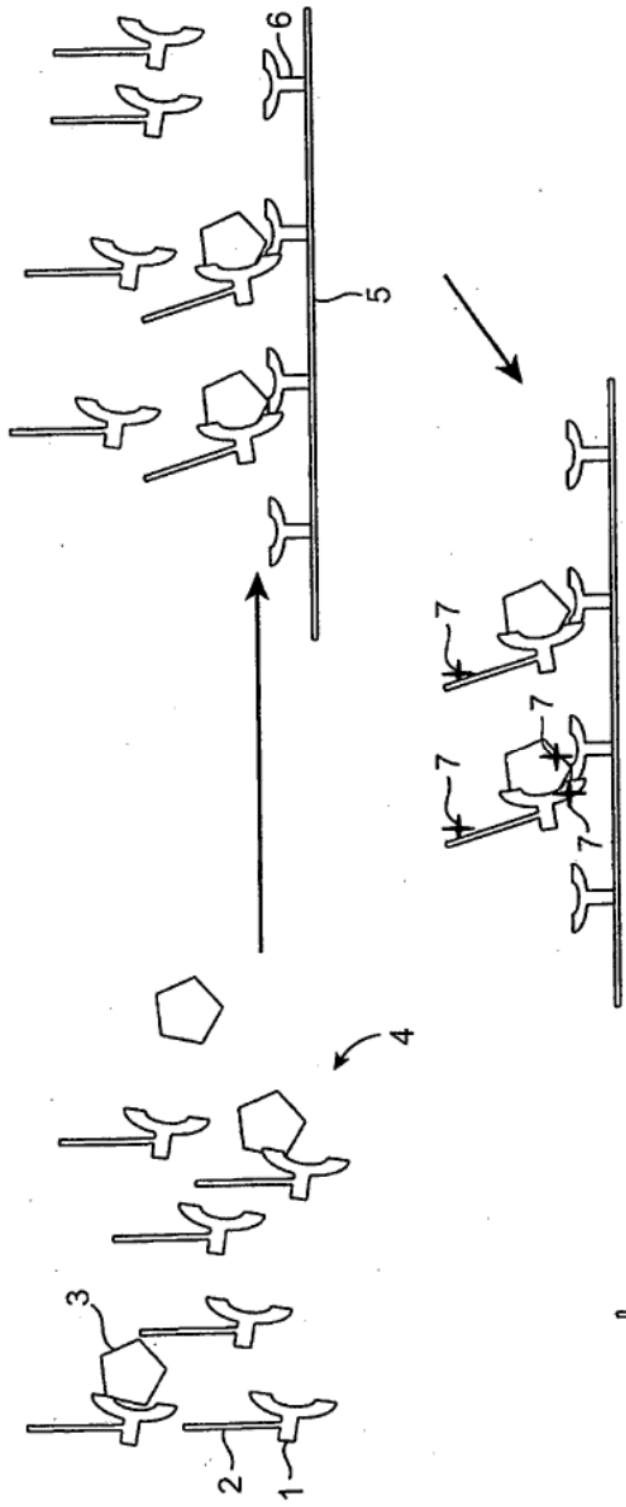


FIG. 4

Anticuerpos con resto iónico añadido

Analito de interés

Agente de captura

Sitios potenciales de marcado para la detección

- 2
- 1
- 3
- 6
- 7

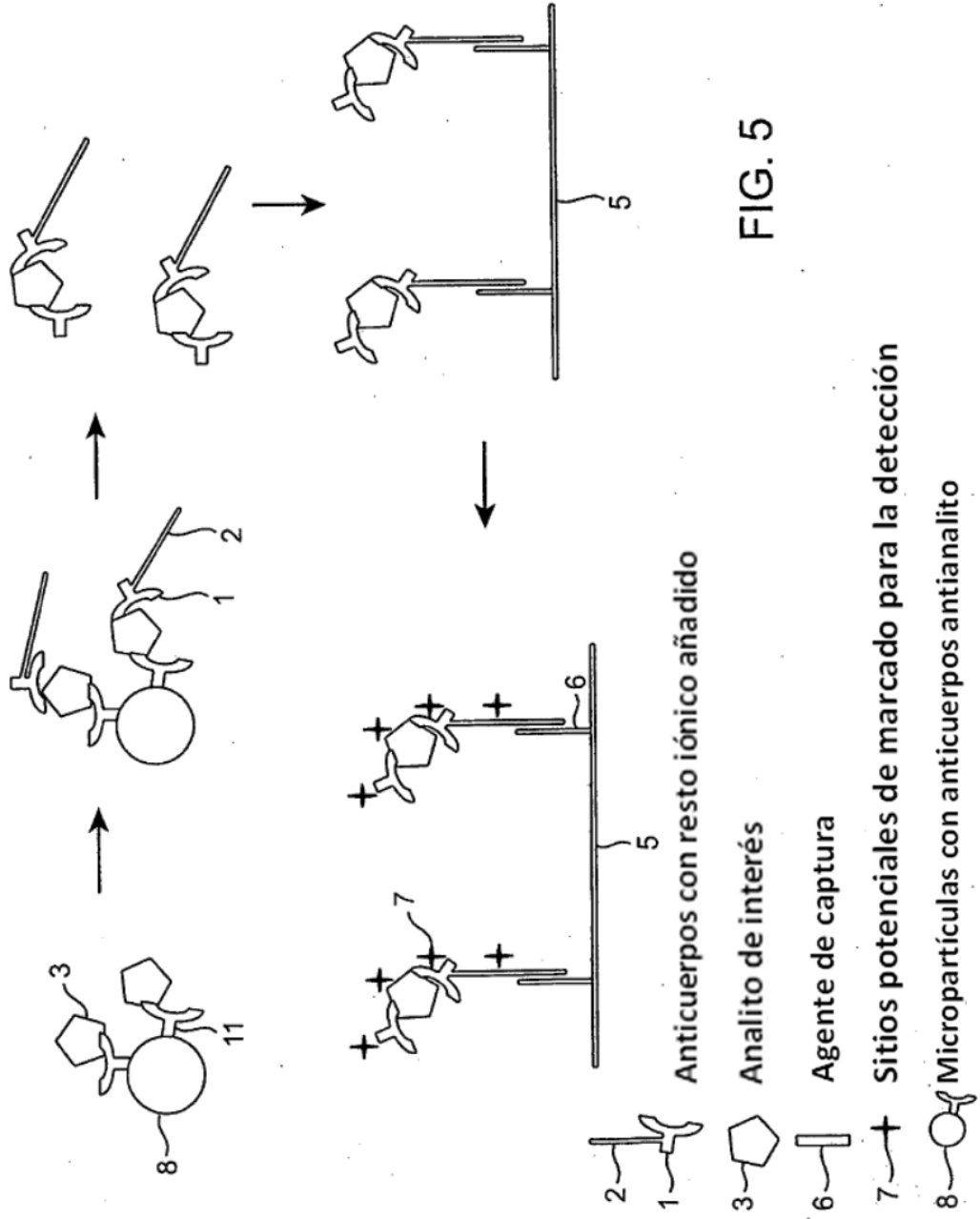


FIG. 5

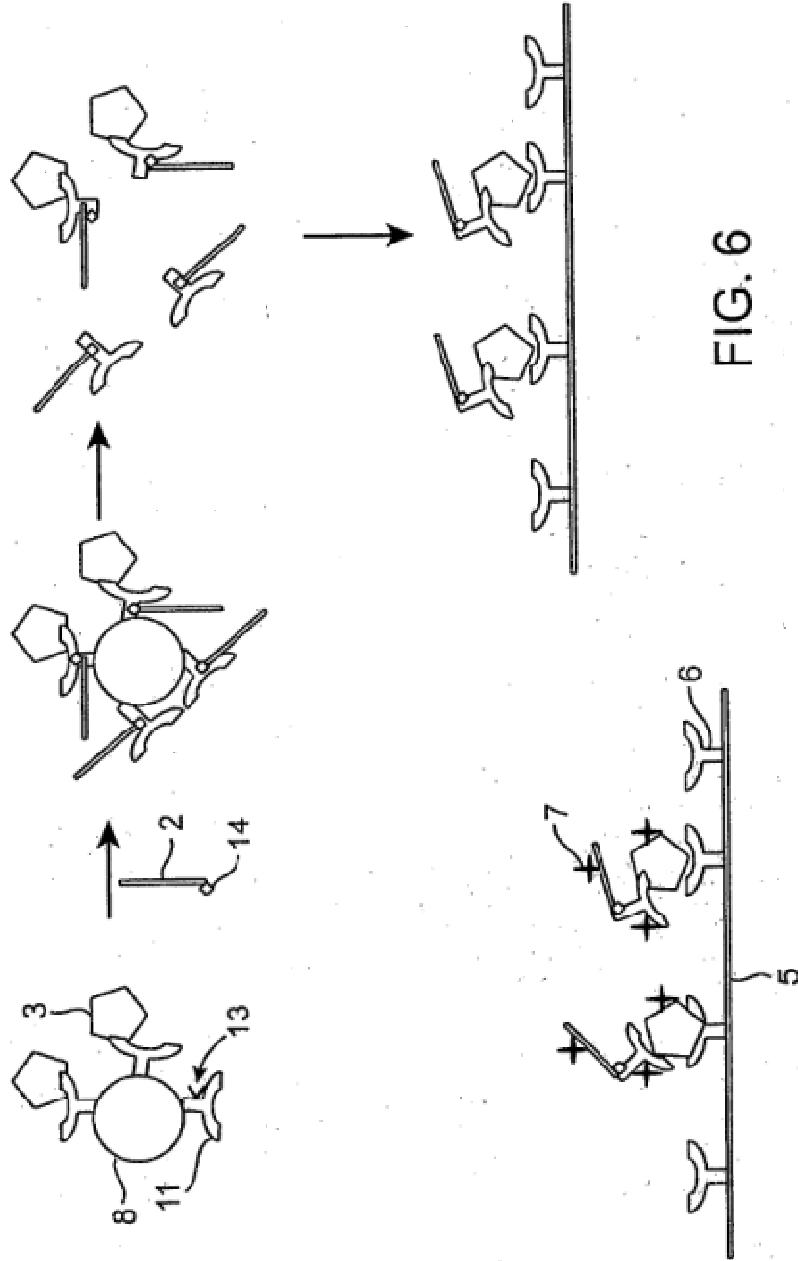


FIG. 6

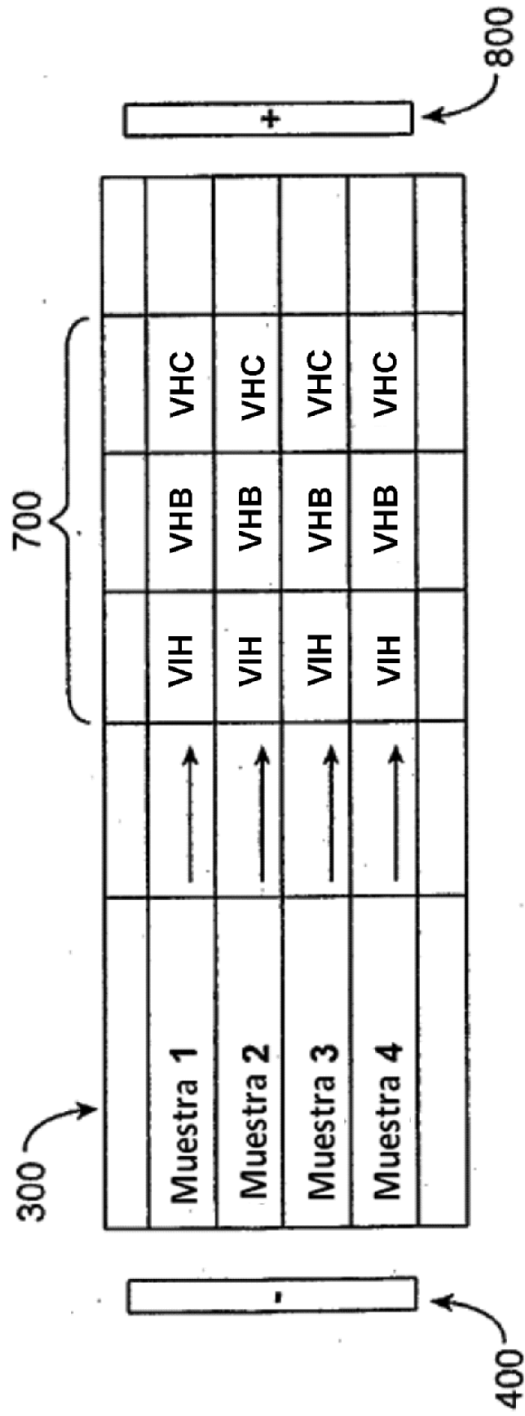


FIG. 7