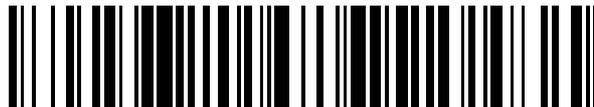


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 380**

51 Int. Cl.:

**G01N 27/447** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2010** **E 10168635 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016** **EP 2407777**

54 Título: **Extracción de analitos separados por isotacoforesis**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.11.2016**

73 Titular/es:

**MOLECULAR CONTROL AG (100.0%)**  
**Mühlenstrasse 8**  
**9030 Abtwil, CH**

72 Inventor/es:

**SCHOCH, RETO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 592 380 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

Extracción de analitos separados por isotacoforesis

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere en general al campo de los sistemas y métodos de electroforesis analítica. De manera más específica, esta invención se centra en la isotacoforesis altamente selectiva y el transporte electrocinético para la extracción de moléculas cargadas.

**Antecedentes de la invención**

10 En los sistemas de análisis centralizados usados en la actualidad, las muestras se recogen y se envían a un laboratorio central para su análisis, p.ej. en diagnósticos clínicos, ciencias de la vida, biodefensa, industrias alimentarias y del agua, y detección agrícola y ambiental. Esto conduce a costes significativos y largos periodos de tiempo hasta obtener el resultado. En contraste, los dispositivos portátiles de preparación de muestras pueden introducir un cambio no solamente en la instrumentación, sino en todo el procedimiento de medida llevando a cabo las medidas en cualquier momento y lugar. La preparación de las muestras es el elemento limitante para tales dispositivos, ya que en general este proceso se realiza manualmente, pero también se ha automatizado mecanizando los métodos de procesamiento manuales por medio de sistemas robóticos. Los instrumentos disponibles comercialmente, por tanto, son grandes, caros y complejos, con un uso significativo de reactivos y consumibles.

20 La microfluídica ofrece un uso reducido de reactivos, una especificidad incrementada y solidez, integración y automatización, posibilidad de análisis en paralelo, dispositivos rentables fabricados mediante moldeo por inyección, y diseños de canal controlado. Los dispositivos "laboratorio en un chip", por tanto, son especialmente interesantes para módulos portátiles de preparación de muestras así como para instrumentos de laboratorio rentables y automatizados.

25 Para el transporte y la separación de moléculas cargadas en capilares y microcanales se emplea a menudo la electroforesis, y ha hallado aplicaciones generalizadas. Sin embargo, la sensibilidad y selectividad para manejar y separar con exactitud sustancias en tubos es limitada, por lo que se requieren métodos eficaces de preconcentración de muestras.

30 Una aproximación para preconcentrar una muestra es la isotacoforesis (ITP), que permite la separación simultánea de varios analitos. La ITP usa un gradiente impuesto de movilidad electroforética para crear zonas de analitos concentrados con interfases no dispersantes en un canal elongado. Los iones de analitos a apilar y separar se introducen en general entre un electrolito líder (LE) y uno terminal (TE) con una movilidad efectiva respectivamente mayor y menor que las de los analitos. Bajo la influencia de un campo eléctrico, los iones del analito se redistribuyen en zonas secuenciales por orden de movilidad efectiva decreciente (partiendo del LE al TE). Tras los transitorios iniciales, las separaciones basadas en ITP en general dan como resultado zonas contiguas adyacentes de analitos que se mueven a una velocidad idéntica hacia delante en el canal de separación principal.

35 Para la separación de componentes cargados, la patente de EE.UU. Nº 6.685.813 de Williams se basa en la titulación de analitos. El método implica cargar un microcanal con una muestra, colocada entre un TE que tiene una concentración seleccionada de una especie titulable, y un LE. Cuando se aplica una tensión a lo largo del microcanal, los componentes cargados se apilan mediante ITP, y los iones de hidroxilo o de hidrógeno electrolíticos migran hacia el TE, titulando las especies en él que después adelantan a los componentes cargados de la muestra y así se separan mediante electroforesis zonal.

40 Hay varias solicitudes de patentes sobre ITP basadas en la preconcentración de analitos combinada con su separación mediante electroforesis y su análisis. La publicación de solicitud de patente de EE.UU. Nº 2006/0254915 de Hirokawa describe un método de electroforesis en microchip para la preconcentración y separación de muestras en dos etapas individuales. La concentración de las muestras se lleva a cabo mediante ITP, seguida de la separación mediante el uso de electroforesis zonal o electroforesis en gel. De forma similar, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. Nº 2002/0189946 de Wainright y Williams se centra en un esquema de inyección simple de dos electrodos con apilamiento isotacoforético, seguido de separación electroforética zonal en el mismo canal. Además, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. Nº 2005/0133370 de Park *et al.* describe métodos y dispositivos para separar espacialmente al menos primeros y segundos componentes por medio de un espaciador, cuyos componentes se apilan mediante ITP y se inyectan en diferentes segmentos del canal para su separación mediante su movilidad en él.

55 De manera más específica, la patente de EE.UU. Nº 5.817.225 de Hinton describe una unidad electroforética para la purificación, concentración y fraccionamiento por tamaño de ácidos nucleicos contaminados por ácidos orgánicos mediante el uso de químicas de LE y TE específicas. La solicitud de patente internacional WO 2009/079028 A1 de Young también emplea geles para la concentración de proteínas y ADN mediante el uso de ITP. El método se centra en co-purificar y concentrar simultáneamente ácidos nucleicos y proteínas de interés con carga neta positiva y negativa en un único volumen, que se colocan inicialmente en el centro de un gel de forma que la ITP funcionará en

dos direcciones hacia el electrodo positivo y negativo al aplicar una tensión.

Santiago ha descrito en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2008/0197019 A1 un método para detectar directamente analitos que son en sí mismos indetectables mediante el uso de compuestos espaciadores directamente detectables. Estas moléculas cargadas se concentran y se separan en zonas mediante el uso de ITP, y se usa un desplazamiento entre las zonas de los compuestos espaciadores directamente detectables para determinar la presencia del analito que no es directamente detectable.

Dos solicitudes de patentes internacionales describen parcialmente el uso de ITP para la concentración y separación de moléculas en sus sistemas. El documento WO 2008/082876 A1 de Balgley proporciona un método para llevar a cabo la separación y el análisis multidimensional sin conexión de una muestra, que incluye la separación de la muestra biomolecular heterogénea en una diversidad de fracciones mediante el uso de un mecanismo de ITP capilar parcial. El documento WO 2008/053047 A2 de Weber se centra en un tipo específico de electroforesis de flujo libre (FFE), ITP de flujo libre (FF ITP), llevada a cabo en una cámara de electroforesis casi cuadrática para separar diferentes analitos.

Sin embargo, hasta ahora no se han descrito kits para la extracción basada en ITP de las fracciones específicas de una muestra compleja mediante el uso de electrolitos a medida y módulos desechables, que se pueden integrar en dispositivos portátiles o manuales o automatizar para instrumentos de laboratorio rentables.

### Sumario de la invención

Según un aspecto de la invención (reivindicación 1), se proporciona un método para preconcentrar y aislar una diversidad n de analitos cargados ( $A_i$ , con  $i = 1$  a n) contenidos en una muestra mediante isotacoforesis, y cada uno de dichos analitos  $A_i$  tiene una movilidad electroforética efectiva  $\mu_{A_i}$ , y dichas movilidades electroforéticas efectivas  $\mu_{A_i}$  obedecen la relación completamente ordenada  $\mu_{A_1} > \mu_{A_2} > \text{etc.} > \mu_{A_n}$ , por medio de un aparato que comprende:

- un canal de separación principal (C) con un extremo proximal (P) y un extremo distal (D),
- medios para cargar una porción de muestra suplementada en un segmento interno de dicho canal de separación principal localizado entre dicho extremo proximal y dicho extremo distal,
- medios para aplicar un campo eléctrico ( $\hat{E}$ ) entre dicho extremo proximal (P) y dicho extremo distal (D),
- una diversidad n de canales de extracción ( $E_i$ , con  $i = 1$  a n) que están orientados de manera transversal con respecto a dicho canal de separación principal (C) y que tienen uniones respectivas con dicho canal de separación principal localizadas en sitios diferentes del mismo, y cada canal de extracción tiene una parte de extracción que conduce fuera del canal de separación principal,
- medios para detectar zonas enfocadas dentro de dicho canal de separación (C) y/o medios para medir una velocidad de flujo a lo largo de un eje longitudinal de dicho canal de separación bajo la influencia de un campo eléctrico ( $\hat{E}$ ) aplicado a lo largo de dicho eje mediante dichos medios para aplicar un campo eléctrico,
- medios para aplicar un flujo transversal a lo largo de cada uno de dichos canales de extracción ( $E_i$ ) para extraer cualquiera de dichos analitos localizados en la unión respectiva del canal de extracción ( $E_i$ ) y del canal de separación principal (C),

y dicho método comprende las etapas de:

- cargar un electrolito líder (LE) en una región distal del canal adyacente a dicho extremo distal y un electrolito terminal (TE) en una región proximal del canal adyacente a dicho extremo proximal, y dicho electrolito líder (LE) tiene una movilidad electroforética efectiva  $\mu_{LE} > \mu_{A_1}$  y dicho electrolito terminal (TE) tiene una movilidad electroforética efectiva  $\mu_{TE} < \mu_{A_n}$ ,
- añadir una muestra suplementada a dicha región proximal (P) del canal,
- dicha muestra suplementada comprende una mezcla de dicha muestra y un número n-1 de compuestos espaciadores ( $S_k$ , con  $k = 1$  a n-1), y cada uno de dichos compuestos espaciadores ( $S_k$ ) tiene una movilidad electroforética efectiva  $\mu_{S_k}$ , y dichas movilidades electroforéticas efectivas  $\mu_{S_k}$  obedecen la relación completamente ordenada  $\mu_{A_k} > \mu_{S_k} > \mu_{A_{k+1}}$ ,
- aplicar un campo eléctrico axial entre dicho extremo proximal (P) y dicho extremo distal (D), y de ese modo se provoca una preconcentración y separación de dichos analitos y espaciadores formando zonas de espaciadores enfocadas y zonas de analitos enfocadas respectivas que fluyen a lo largo de dicho eje longitudinal,
- cada uno de dichos compuestos espaciadores ( $S_k$ ) en dicha muestra suplementada que tienen una concentración inicial ( $c_{0,S_k}$ ) seleccionada de tal manera que corresponda sustancialmente, como su concentración preconcentrada ( $c_{S_k}$ ) en la zona de espaciador enfocada respectiva, a un volumen de dicho

canal de separación principal encerrado entre un par asociado de canales de extracción adyacentes ( $E_k$ ) y ( $E_{k+1}$ ),

- detectar la posición y/o medir la velocidad de dichas zonas enfocadas,
- opcionalmente detener el proceso desconectando dicho campo eléctrico ( $\hat{E}$ ) cuando la zona enfocada de cada analito ( $A_i$ ) se localiza en la unión respectiva con el canal de extracción ( $E_i$ ),
- aplicar un flujo transversal de la parte de la muestra suplementada localizada en la unión del canal de separación principal y del canal de extracción respectivo, por lo que se transfiere cada analito preconcentrado ( $A_i$ ) del canal de separación principal para el aislamiento de dicho analito.

Se entenderá que el volumen de la porción del canal de separación principal encerrado entre un par asociado de canales de extracción adyacentes  $E_k$  y  $E_{k+1}$  viene dado por la longitud multiplicada por la sección transversal media de dicha porción del canal. En el caso preferido de un canal de separación principal que tiene una sección transversal constante, el volumen vendrá dado simplemente por la longitud multiplicada por la sección transversal. En cualquier caso, en general será una relación conocida entre el volumen de una región del canal y la longitud de la misma.

Si las moléculas de analito están contenidas en células, se puede añadir un tampón de lisis a la muestra para liberar los analitos en la disolución para el procesamiento posterior.

Según una realización, la adición de la muestra suplementada a la región proximal del canal se lleva a cabo cargando la muestra suplementada en un segmento del canal localizado entre el electrolito líder y el electrolito terminal (reivindicación 2).

Según otra realización, la adición de la muestra suplementada a la región proximal del canal se lleva a cabo preparando primero una mezcla de la muestra suplementada y el electrolito terminal y después cargando la mezcla en la región proximal del canal (reivindicación 3).

Como se sabe en general en el campo de la isotacoforesis, existen varias técnicas para detectar la presencia de un analito. Dependiendo de los analitos, esto implicará preferiblemente la detección de fluorescencia o algún tipo de detección eléctrica. Según una realización ventajosa (reivindicación 4), la presencia y opcionalmente la concentración presente de un analito ( $A_i$ ) se detecta eléctricamente como una meseta de corriente o resistencia entre:

- dos compuestos espaciadores adyacentes ( $S_{i-1}$ ) y ( $S_i$ ) para  $i = 2$  a  $n-1$ ;
- el electrolito líder (LE) y el compuesto espaciador adyacente ( $S_1$ ) para  $A_1$ ;
- el compuesto espaciador adyacente ( $S_{n-1}$ ) y el electrolito terminal (TE) para  $A_n$ .

Hay varias maneras de recoger los analitos después de haberlos separado mediante isotacoforesis. Según una realización, la etapa de aplicar un flujo transversal se lleva a cabo hasta que cada analito ( $A_i$ ) ha alcanzado una zona de recogida localizada en un extremo de la parte de extracción del canal de extracción ( $E_i$ ) respectivo (reivindicación 5). Según otra realización, la etapa de aplicación de un flujo transversal se interrumpe cuando cada analito se ha acumulado en una zona del canal de extracción ( $E_i$ ) respectivo desplazado desde el canal de separación principal (C), seguido de una etapa de reaplicación del campo eléctrico ( $\hat{E}$ ), y así se provoca que cualquier analito residual presente en el canal de separación principal (C) se elimine de él hacia el extremo distal (D), seguido de la desconexión del campo eléctrico ( $\hat{E}$ ) y la reaplicación del flujo transversal hasta que cada analito ( $A_i$ ) haya alcanzado una zona de recogida localizada en el extremo distal de la parte de extracción del canal de extracción ( $E_i$ ) respectivo (reivindicación 6). Además, los analitos se pueden extraer en un tampón de extracción (EB) que es diferente del electrolito líder (LE).

En muchas aplicaciones será preferible que el electrolito líder (LE) y el electrolito terminal (TE) tengan sustancialmente el mismo valor de pH; además, dependiendo del tipo de analitos, el electrolito líder y terminal pueden estar provistos de una matriz de cribado y/o un agente para la reducción del flujo electroosmótico (reivindicación 7).

Se entenderá que existen varios métodos para determinar las movilidades electroforéticas efectivas. Según una realización, la movilidad electroforética efectiva ( $\mu_{Ai}$ ) de un analito dado ( $A_i$ ) se determina por medio de isotacoforesis o electroforesis (reivindicación 8).

Según una realización preferida (reivindicación 9), la etapa de seleccionar la concentración inicial ( $c_{0,Sk}$ ) de cada uno de dichos compuestos espaciadores ( $S_k$ ) se lleva a cabo de manera repetitiva y comprende las etapas de:

- a) proporcionar una mezcla de dichos compuestos espaciadores ( $S_k$ ) con concentraciones iniciales de comienzo ( $c'_{0,Sk}$ ) respectivas,

- b) comenzar un proceso isotacoforético con dicha mezcla, provocando de ese modo una separación y preconcentración de dichas zonas de espaciadores que fluyen a lo largo de dicho eje longitudinal,
- c) determinar la longitud asociada ( $d_{Sk}$ ) de cada zona de espaciador,
- 5 d) determinar una medida de desviación ( $m_k$ ) para cada una de dichas longitudes ( $d_{Sk}$ ) frente a la distancia ( $d_{Ek}$ ) entre el par asociado de canales de extracción adyacentes ( $E_k$ ) y ( $E_{k+1}$ ),
- e) usar dichas medidas de desviación ( $m_k$ ) para calcular un grupo de concentraciones iniciales refinadas ( $c''_{0,Sk}{}^{(r)}$ ),
- f) repetir las etapas a) a e) usando dichas concentraciones iniciales refinadas ( $c''_{0,Sk}{}^{(r)}$ ) en vez de dichas concentraciones iniciales de comienzo ( $c'_{0,Sk}$ ) hasta que ninguna de dichas medidas de desviación ( $m_k$ ) supere un umbral de tolerancia predefinido,
- 10 g) usar dichas concentraciones iniciales refinadas ( $c''_{0,Sk}{}^{(r)}$ ) como las concentraciones iniciales ( $c_{0,Sk}$ ) para preparar dicha muestra suplementada.

En principio, el método anteriormente definido para seleccionar la concentración inicial ( $c_{0,Sk}$ ) de cada uno de dichos compuestos espaciadores ( $S_k$ ) se puede llevar a cabo con una mezcla de compuestos espaciadores que no contienen ningún analito. Sin embargo, en muchos casos será ventajoso añadir los analitos cargados ( $A_i$ ) a la mezcla de compuestos espaciadores para detectar la zona de separación entre dos compuestos espaciadores por medio de una señal del analito que se acumula en ella. En particular, la etapa para determinar la longitud asociada ( $d_{Sk}$ ) de cada zona de espaciador se puede llevar a cabo detectando zonas de analitos enfocadas que separan dichas zonas de espaciadores enfocadas, p.ej. por medio de la detección de fluorescencia de dichos analitos (reivindicación 10).

20 Según otro aspecto de la invención (reivindicación 11), se proporciona un aparato para preconcentrar y aislar una diversidad n de analitos cargados ( $A_i$ , con  $i = 1$  a n) contenidos en una muestra mediante isotacoforesis, y cada uno de dichos analitos ( $A_i$ ) tiene una movilidad electroforética efectiva  $\mu_{Ai}$ , y dichas movilidades electroforéticas efectivas  $\mu_{Ai}$  obedecen la relación completamente ordenada  $\mu_{A1} > \mu_{A2} > \text{etc.} > \mu_{An}$ , y dicho aparato comprende:

- un canal de separación principal (C) con un extremo proximal (P) y un extremo distal (D),
- 25 - medios para añadir una muestra suplementada en un segmento interno de dicho canal de separación principal localizado entre dicho extremo proximal (P) y dicho extremo distal (D),
- medios para aplicar un campo eléctrico ( $\hat{E}$ ) entre dicho extremo proximal (P) y dicho extremo distal (D),
- una diversidad n de canales de extracción ( $E_i$ , con  $i = 1$  a n) que están orientados de manera transversal con respecto a dicho canal de separación principal (C) y que tienen uniones respectivas con dicho canal de separación principal localizadas en sitios diferentes del mismo, y cada canal de extracción tiene una parte de extracción que conduce fuera del canal de separación principal,
- 30 - medios para detectar zonas de espaciadores enfocadas y zonas de analitos enfocadas dentro de dicho canal de separación (C) y/o medios para medir una velocidad de flujo a lo largo de un eje longitudinal de dicho canal de separación bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado mediante dichos medios para aplicar un campo eléctrico,
- 35 - medios para aplicar un flujo a lo largo de cada uno de dichos canales de extracción para extraer cualquiera de dichos analitos localizados en la unión respectiva del canal de extracción (C) y del canal de separación principal,
- un electrolito líder (LE) contenido en una región distal del canal adyacente a dicho extremo distal y un electrolito terminal (TE) contenido en una región proximal del canal adyacente a dicho extremo proximal, y dicho electrolito líder (LE) tiene una movilidad electroforética efectiva  $\mu_{LE} > \mu_{A1}$  y dicho electrolito terminal (TE) tiene una movilidad electroforética efectiva  $\mu_{TE} < \mu_{An}$ ,
- 40 - una muestra suplementada contenida en dicha región proximal (P) del canal,
- dicha muestra suplementada comprende una mezcla de dicha muestra y un número n-1 de compuestos espaciadores ( $S_k$ , con  $k = 1$  a n-1), y cada uno de dichos compuestos espaciadores ( $S_k$ ) tiene una movilidad electroforética efectiva  $\mu_{Sk}$ , y dichas movilidades electroforéticas efectivas  $\mu_{Sk}$  obedecen la relación completamente ordenada  $\mu_{Ak} > \mu_{Sk} > \mu_{Ak+1}$ ,
- 45 - cada uno de dichos compuestos espaciadores ( $S_k$ ) en dicha muestra suplementada que tienen una concentración inicial ( $c_{0,Sk}$ ) seleccionada de tal manera que corresponda sustancialmente, como su concentración preconcentrada ( $c_{Sk}$ ) en la zona de espaciador enfocada respectiva, a un volumen de dicho canal de separación principal encerrado entre un par asociado de canales de extracción adyacentes ( $E_k$ ) y ( $E_{k+1}$ ).
- 50

En una realización del aparato, cada canal de extracción ( $E_i$ ) comprende una zona de recogida localizada en un extremo de la parte de extracción del mismo (reivindicación 12). En particular, la zona de recogida se puede configurar como un depósito, como una gotícula que se forma en el extremo de un canal de extracción, o como un canal de inyección que conduce a un canal de separación principal adicional en el que los analitos se preconcentran y se aíslan adicionalmente.

En una realización adicional, cada canal de extracción ( $E_i$ ) comprende además una parte de inyección que conduce al canal de separación principal (reivindicación 13). Preferiblemente, tal parte de inyección tendrá una sección transversal que es más pequeña que una sección transversal de la parte de extracción correspondiente. Además, dichas partes de inyección y/o extracción pueden estar provistas de una constricción en una región adyacente a dicho canal de separación principal (C). Si los analitos se tienen que extraer en un tampón diferente del electrolito líder (LE) para el análisis posterior, el aparato puede comprender además una diversidad de secciones de tampón de extracción (EB), cada una de las cuales tiene un canal que conduce a la unión de una parte de extracción o parte de inyección del canal de extracción y del canal de separación principal (reivindicación 14).

Según una realización ventajosa, los medios para detectar las zonas enfocadas comprenden electrodos dispuestos en el canal de separación principal (C) y/o en los canales de extracción ( $E_i$ ) y/o en las zonas de recogida (reivindicación 15).

La presente invención proporciona sistemas y métodos para extracciones sólidas y repetibles de al menos un analito específico (que tiene en general una abundancia baja) de una muestra compleja. Los analitos se separan a una distancia dada entre sí mediante el uso de compuestos espaciadores, y estas especies cargadas se enfocan mediante ITP en un microcanal entre un electrolito líder y un electrolito terminal que pueden contener una matriz de cribado para incrementar la resolución de la separación. Las zonas de ITP preconcentradas y autoenfocadas se desplazan hacia delante, y una vez que llegan a su sitio predeterminado, tal como se controla continuamente, se transfieren simultáneamente a los canales de extracción mediante un flujo de fluido aplicado de manera perpendicular al canal de separación principal. Los analitos se dispensan en depósitos, se generan gotículas para su análisis detallado, o se reinyectan en un canal de separación principal adicional en el que los analitos se preconcentran y se aíslan adicionalmente para conseguir puridades de extracción incrementadas.

Los presentes métodos permiten la realización de módulos de preparación de muestras miniaturizados, portátiles y automatizados, que se pueden integrar en instrumentos para el diagnóstico en el punto de asistencia, en ciencias de la vida, biodefensa, industrias alimentarias y del agua, y detección agrícola y ambiental. Además, estos instrumentos se pueden fabricar de manera rentable, y es interesante para la industria de descubrimiento de fármacos y para laboratorios de investigación y desarrollo que trabajan con electroforesis 2D en gel. Para tales campos de aplicación, estos métodos están diseñados para el fraccionamiento de muestras en zonas diferentes, para permitir la separación de las proteínas de los ácidos nucleicos, el fraccionamiento de las proteínas por tamaño o carga, o el fraccionamiento de los ácidos nucleicos por la longitud, por ejemplo.

Los métodos, el aparato y los electrolitos necesarios se pueden proporcionar en forma de un kit para llevar a cabo la separación, la preconcentración y el aislamiento de los analitos, en el que el aparato incluye dispositivos de microfluídica desechables o semidesechables con canales integrados. Para fines de envío, estos canales pueden estar secos, prerrellenados con electrolitos a medida a la concentración final o en forma de una disolución de reserva concentrada, o los electrolitos pueden estar presentes en forma liofilizada. Los electrolitos se pueden proporcionar en forma de cantidades prerrellenadas para una o múltiples medidas. Esto permite al usuario llevar a cabo medidas de campo, en el laboratorio o en cualquier otro lugar añadiendo la cantidad necesaria de electrolitos a medida o agua.

Antes de iniciar el enfoque mediante ITP y el proceso de extracción, en una realización, la muestra se introduce en el canal de separación principal entre la región proximal del canal y la región distal del canal a través de canales de inyección específicos. En otra realización, el extremo proximal del canal de separación principal se rellena de TE, muestra y espaciadores antes de aplicar el campo eléctrico, lo que permite una inyección continua de muestra y espaciadores durante el proceso de ITP.

En la primera etapa, el campo eléctrico se aplica a lo largo del canal de separación principal, lo que da como resultado la limitación de cada analito con dos espaciadores predefinidos, uno anterior y uno posterior, excepto para los primeros y últimos analitos, que pueden estar limitados por un espaciador y el LE y TE, respectivamente. Los analitos y espaciadores se pueden seleccionar según el protocolo proporcionado en la descripción detallada de esta invención, de forma que se preconcentran y separan en zonas alternantes y adyacentes según el mecanismo de ITP. Los electrolitos pueden contener una matriz de cribado que incrementa la resolución de la separación e impide que entren burbujas y partículas grandes en los canales, y/o se puede integrar una membrana porosa en los depósitos y/o canales para fines de filtración. Además, se añade en general un agente para la supresión del flujo electroosmótico a los electrolitos para incrementar el predominio del transporte electroforético.

La química de electrolitos de los espaciadores se concibe de forma que la composición, fuerza iónica, y valor de pH conduzcan a una ITP en modo de meseta con longitudes predefinidas de las mesetas. En contraste, los analitos se enfocan en general en ITP en modo de pico, ya que están presentes a concentraciones inferiores (en general con

una abundancia baja), aunque también pueden alcanzar zonas de meseta.

Debido a las longitudes de meseta conocidas de los espaciadores (EC. 5), se ajusta la distancia entre los analitos individuales, y estas distancias corresponden a los espaciamientos entre canales de los canales de extracción. Así, las zonas de analitos enfocadas de ITP estarán justamente frente a su canal de extracción correspondiente una vez que se desconecte el campo eléctrico de ITP. La colocación exacta de las zonas de ITP frente a sus canales de extracción correspondientes se controla mediante la detección de las zonas enfocadas.

En la segunda etapa, se aplica un flujo electrocinético o accionado por presión a lo largo de los canales de extracción, a través del canal de separación principal, y por lo tanto se inyectan los analitos enfocados en los canales de extracción correspondientes solamente. Este proceso de transferencia se aplica solo brevemente hasta que las zonas de analitos están dentro de los canales de extracción. La pureza y el rendimiento de la extracción se pueden incrementar optimizando las anchuras de los canales de extracción en la intersección o integrando electrodos correctores para optimizar las líneas del campo eléctrico o de flujo, como describió Rongsheng *et al.* (*Anal. Chem.*, 2005, 77, 4338).

Después, se vuelve a aplicar el campo eléctrico a lo largo del canal de separación principal para transportar las restantes moléculas cargadas de este canal al depósito de residuos. Posteriormente, se reinicia el flujo de fluidos a través de los canales de extracción para transportar las moléculas de analito a los depósitos de extracción que están localizados al final de los canales. En vez de transportar los analitos a los depósitos, se pueden generar gotículas dispensando continuamente el líquido sobre una superficie que está localizada en la interfase del chip. Además, los analitos se pueden reinyectar en un canal de separación principal adicional en el que los analitos se preconcentran y se aíslan adicionalmente para conseguir purezas de extracción incrementadas.

#### Breve descripción de los dibujos

Las características y objetivos anteriormente mencionados, y otros, de esta invención y la manera de llevarlos a cabo serán más evidentes, y esta invención se entenderá mejor, con referencia a la siguiente descripción de diversas realizaciones de esta invención consideradas junto con los dibujos adjuntos, en los que:

- 25 FIG. 1A es un diagrama esquemático de un chip microfluídico ejemplar, que muestra las concentraciones de los electrolitos durante el enfoque mediante ITP, que no está dibujado a escala;
- FIG. 1B muestra la nomenclatura de las dimensiones del canal, en la que  $d_{Sk}$  es igual a  $d_{Ek}$ ;
- 30 FIGS. 2A a D son diagramas esquemáticos de las intersecciones de los canales, estructurados geoméricamente para conseguir una distribución óptima de las líneas del campo eléctrico o de flujo a través del canal de separación principal;
- FIGS. 3A a C son ilustraciones esquemáticas de las etapas para el apilamiento isotacoforético para el caso  $n = 4$ , en el que la muestra se introduce en el canal de separación principal en la FIG. 3A, seguido de la extracción de los analitos en los canales de extracción correspondientes;
- 35 FIGS. 4A a C son ilustraciones esquemáticas de las etapas para el apilamiento isotacoforético para el caso  $n = 4$ , en el que la muestra se inyecta continuamente desde el depósito de TE, seguido de la extracción de los analitos en los canales de extracción correspondientes;
- 40 FIGS. 5A a C son un protocolo para la extracción de analitos en tampones de extracción (EB) a medida para el caso  $n = 4$ ; en la primera etapa (FIG. 5A), se aplican vacíos altos y bajos para llenar los canales de extracción con los tampones correspondientes, y después se usa un flujo electrocinético en la FIG. 5B para llenar completamente el canal de separación principal con LE; La FIG. 5C muestra un primer plano del área indicada mediante la línea discontinua de la FIG. 5B.
- FIG. 6 es una ilustración esquemática de cómo se pueden generar gotículas en la interfase del chip; el líquido del microcanal se dispensa continuamente sobre una superficie hasta que se alcanza un volumen específico de gotícula;
- 45 FIG. 7A es un diagrama esquemático de los electrodos de detección en el canal de separación principal o los depósitos, que se usan para controlar el proceso de ITP;
- FIG. 7B muestra la corriente medida con los electrodos 30 y 31, 32 y 33, 33 y 34, 35 y 36, o 36 y 37 para el caso  $n = 4$ , una vez que los tres espaciadores han pasado por estos electrodos; los analitos 1-4 se enfocan en ITP en modo de pico, lo que no da como resultado una corriente constante durante su paso.
- 50 FIG. 7C igual que la FIG. 7B, pero los analitos 1 y 3 se enfocan en ITP en modo de meseta, lo que da como resultado una meseta de corriente detectable.
- FIGS. 8A a C son imágenes de fluorescencia del enfoque de BSA y ConA entre los LE, TE y espaciador

descritos; y

FIG. 8D muestra la extracción de BSA en el canal de extracción  $E_1$ , y ConA está preconcentrada adicionalmente en posición anterior entre el espaciador y TE (no ilustrado).

### Descripción detallada de la invención

5 La presente invención describe sistemas y métodos para extraer analitos (que tienen en general una abundancia baja) de mezclas de muestras complejas para instrumentos automatizados de laboratorio y dispositivos manuales. Emplea la ITP basada en el apilamiento mediante el uso de espaciadores, que se modifican específicamente para coincidir con la geometría de los canales de extracción, lo que permite la extracción sólida y simultánea de varios  
10 analitos. El rendimiento y la pureza de extracción se pueden optimizar mediante un control temporal exacto de la etapa de extracción y mediante un diseño optimizado de la geometría de las intersecciones de los microcanales. Después de la extracción de los analitos, se pueden transportar a los depósitos de extracción, dispensarlos directamente en gotículas para su análisis posterior, o reinyectarlos en un canal de separación principal adicional en el que los analitos se preconcentran y aíslan adicionalmente para conseguir purezas de extracción incrementadas.

15 Los métodos y sistemas de esta invención se pueden usar en varios campos, tales como el diagnóstico en el punto de asistencia, ciencias de la vida, biodefensa, industrias alimentarias y del agua, y detección agrícola y ambiental. Los analitos a extraer pueden ser, p.ej., moléculas cargadas tales como aminoácidos, péptidos, proteínas, glicoproteínas, biomarcadores, hormonas, metabolitos, orgánulos, membranas, liposomas, lípidos, sacáridos y derivados de los mismos, anticuerpos, complejos de anticuerpos, ácidos nucleicos, complejos de ácido nucleico -  
20 proteína, aditivos alimentarios, patógenos, virus, fármacos, metales pesados, toxinas, productos químicos industriales tóxicos, explosivos, armas químicas, armas biológicas, iones, y/o similares. La muestra que contiene los analitos puede ser una muestra clínica obtenida de un fluido corporal o muestra de tejido, o puede ser de una fuente ambiental, por ejemplo. Además, el analito a extraer puede ser compatible con un inmunoensayo, secuenciación de proteínas, espectrometría de masas, geles, PCR, amplificación isotérmica, reacciones de hibridación, micromatrices, unión proteína-ADN. La muestra se puede tratar con un tampón de lisis, si las moléculas de analito están contenidas  
25 en células. Esto liberará los analitos a la disolución para su procesamiento posterior.

El ensayo de ITP se diseña para apilar varios analitos en zonas específicas que están separadas entre sí por moléculas espaciadoras. La FIG. 1A ilustra el proceso de ITP, durante el cual los analitos ( $A_1$  a  $A_n$ ) y los espaciadores ( $S_i$  a  $S_{n-1}$ ) se redistribuyen por sí mismos en zonas secuenciales según su movilidad electroforética efectiva. Este proceso obedece la función de regulación de Kohlrausch (KRF),

$$30 \quad KRF(x) = \sum \frac{|z_j|c_j(x,t)}{\mu_j}, \quad (1)$$

en la que  $z$  es la valencia iónica de la especie  $j$ ,  $c$  es la concentración de la especie  $j$ ,  $x$  es la posición en el canal de separación principal,  $t$  es el tiempo, y  $\mu$  es la movilidad electroforética efectiva de la especie  $j$ . La movilidad electroforética efectiva se define como:

$$35 \quad \mu = \frac{v}{\hat{E}}, \quad (2)$$

en la que  $v$  es la velocidad media observable y  $\hat{E}$  el campo eléctrico en las condiciones experimentales específicas. La movilidad electroforética efectiva es diferente de la movilidad electroforética completamente ionizada, que se considera más una propiedad del material. Esto da como resultado una disminución por etapas de las concentraciones del analito y de los iones espaciadores (partiendo de LE a TE). Los espaciadores se modifican para alcanzar la ITP en modo de meseta, y la longitud de la meseta en las condiciones de ITP  $d_{Sk}$  corresponde en un  
40  $\pm 20\%$  a la distancia de separación entre canales  $d_{Ek}$  como se muestra en la FIG. 1B, así:

$$d_{Ek} = d_{Sk} (\pm 20\%) \quad (3)$$

La concentración preconcentrada del espaciador  $S_k$  enfocado en ITP en modo de meseta se puede calcular con la EC. (1), y el estado de electroneutralidad (Khurana y Santiago, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 279):

$$45 \quad c_{Sk} = c_{LE} \left( \frac{\mu_{Sk}}{\mu_{LE}} \right) \left( \frac{\mu_{LE} + \mu_G}{\mu_{Sk} + \mu_G} \right), \quad (4)$$

en la que  $G$  es el contraión común. En condiciones de KRF estacionarias y una sección transversal constante del canal de separación principal, la longitud de la meseta de cada zona de espaciador depende de la longitud del tapón inyectado  $d_m$  (FIG. 3A):

$$d_{Sk} = \frac{c_{0,Sk} d_{In}}{c_{Sk}} = \left( \frac{\mu_{LE}}{\mu_{Sk}} \right) \left( \frac{\mu_{Sk} + \mu_G}{\mu_{LE} + \mu_G} \right) \frac{c_{0,Sk} d_{In}}{c_{LE}}, \quad (5)$$

en la que  $c_{0,Sk}$  es la concentración inicial del espaciador  $S_k$ . Con eso, se puede calcular la longitud de la meseta de cada zona de espaciador según la EC. (5) como una función de la concentración de espaciador inicial  $c_{0,Sk}$ . Para el esquema de inyección continua (FIG. 4) como se describe más adelante, la longitud de inyección se puede aproximar como:

$$d_{In} = \mu_{Sk} \dot{E} t_{ITP}, \quad (6)$$

en la que  $t_{ITP}$  es el tiempo durante el cual se lleva a cabo el enfoque isotacoforético.

La ITP en modo de meseta se alcanza cuando las moléculas cargadas están presentes a una concentración inicial suficientemente elevada para formar zonas enfocadas con un perfil de concentración en meseta (localmente uniforme) en el estado estacionario. De manera diferente, para las concentraciones iniciales bajas (y tiempos cortos de enfoque) de las moléculas cargadas, la anchura de la zona puede ser del orden de la anchura de la interfase. Este régimen de ITP se ha denominado modo de pico, en el que los perfiles de concentración de las zonas enfocadas son aproximadamente gaussianos en vez de en forma de meseta, véase la FIG. 1A. La anchura de la interfase en la ITP en modo de pico está regida por el gradiente del campo eléctrico y la dispersión en el límite líder-terminal.

En esta invención de ITP, los espaciadores se diseñan para alcanzar el modo de meseta, y las moléculas de analito están presentes en general a concentraciones inferiores, formando picos enfocados. Las distancias de separación entre los picos de analitos está principalmente determinada, por lo tanto, por la concentración de los espaciadores que separan los analitos a una distancia definida entre sí, y la longitud de la meseta puede ser de entre 20  $\mu\text{m}$  y 50 mm. Las concentraciones típicas son las siguientes: intervalo mM para LE y TE,  $\mu\text{M}$  para los espaciadores, y nM o inferior para las moléculas de analito.

Para la selección del LE, TE y los espaciadores, su movilidad electroforética efectiva es lo más importante, ya que describe su orden de enfoque durante la ITP. La movilidad electroforética efectiva de un ión cambia con sus valores de  $\text{pK}_a$ , y depende además de varios parámetros tales como el pH del tampón, la fuerza iónica, el tipo de ión, la valencia del ión y la matriz de cribado. La movilidad electroforética efectiva de cientos de sustancias aniónicas ha sido simulada por Hirokawa *et al.* (*J. Chrom.*, 1983, 271, D1). Estos resultados se incluyen en la base de datos gratuita Peakmaster de Jaros *et al.* (*Electrophoresis*, 2004, 25, 3080).

En los párrafos siguientes se describe un procedimiento general para la selección de los electrolitos y espaciadores. La diferencia de movilidades efectivas entre el LE y TE debería ser tan grande como sea posible, de 10 a  $70 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , que permite hacer funcionar el ensayo de ITP lo suficientemente rápido (unos cuantos minutos) a aproximadamente 10 a  $500 \text{ V cm}^{-1}$ . La diferencia de movilidad efectiva entre el LE y TE depende además del número de analitos que se tienen que extraer, ya que se ha considerado una diferencia de movilidades efectivas de al menos  $2 \text{ a } 5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  entre dos zonas de meseta para conseguir un pico de analito enfocado claramente. Así, un ensayo de ITP para la extracción de seis analitos se debería diseñar con una diferencia mínima de movilidades efectivas entre el LE y TE de aproximadamente  $18 \text{ a } 30 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

A continuación, se tiene que determinar el pH del sistema tampón en el que se llevará a cabo la extracción, y se tienen que considerar los puntos isoeléctricos (pI) de las moléculas de analito para esta etapa. El valor de pH del tampón del LE y TE se selecciona de forma que todas las moléculas de analito estén cargadas negativamente o positivamente, y que en general tenga un valor de pH entre 3 y 10. Además, la selección del valor de pH del tampón permite la exclusión específica de la migración de moléculas contaminantes si están cargadas de manera opuesta a las moléculas de analito, y/o se puede elegir el valor del pH y la composición y concentración de la matriz de cribado de forma que las moléculas contaminantes y las moléculas de analito tengan movilidades electroforéticas efectivas diferentes. El LE y TE no tienen que tener el mismo valor de pH, pero se recomienda por simplicidad. El segundo parámetro importante para la determinación de un electrolito de ITP es su fuerza iónica. Khurana y Santiago (*Anal. Chem.*, 2008, 80, 6300) han descrito que el enfoque en modo de pico óptimo se consigue si el LE tiene una conductividad de  $0,8 \text{ S m}^{-1}$  y el TE  $0,03 \text{ S m}^{-1}$ .

Hasta ahora, se ha determinado el pH y la fuerza iónica de los electrolitos, y ahora se tienen que establecer sus composiciones químicas, para cuyo proceso se recomienda el programa gratuito Peakmaster. Se puede elegir un ácido y una base de la base de datos Peakmaster y añadirlos a la lista de constituyentes de electrolitos de fondo del programa, para cuyos componentes se pueden calcular parámetros del sistema tales como el pH resultante, la fuerza iónica, la conductividad y la capacidad tamponadora. Las concentraciones del ácido y de la base se pueden cambiar hasta obtener los parámetros deseados del sistema para el LE y TE. Debido a que  $0,8 \text{ S m}^{-1}$  y  $0,03 \text{ S m}^{-1}$  son las fuerzas iónicas óptimas para el LE y TE, como se describió anteriormente, las concentraciones finales serán de alrededor de 100 mM y aproximadamente 10 mM, respectivamente.

La movilidad electroforética efectiva de los analitos se puede hallar potencialmente en la bibliografía, pero, para el diseño exacto del ensayo de ITP, la movilidad efectiva de cada analito se tiene que determinar experimentalmente. Esto se puede llevar a cabo con diversos experimentos, de los cuales se describen dos en la presente memoria. El primero es un método electroforético, en el que se inyecta el analito y una molécula de referencia con una movilidad electroforética efectiva exactamente conocida en un canal de separación. Para fines de calibración, ambas moléculas están marcadas de manera fluorescente, de forma que se pueden investigar con un microscopio de fluorescencia. Después de la inyección, las dos moléculas se separarán según su movilidad efectiva, y debido a que se conoce la movilidad efectiva de la molécula de referencia, se puede calcular fácilmente la del analito.

El segundo método para la determinación de la movilidad electroforética efectiva de un analito se basa en la ITP. En el primer experimento repetitivo, se lleva a cabo la ITP con el LE, TE (como se determinó anteriormente) y el analito, y se verifica que la molécula de analito se enfoca entre el LE y TE. Para fines de calibración, la molécula de analito se puede marcar de manera fluorescente para la detección óptica. Después, el TE se sustituye con otro TE que tiene una movilidad efectiva mayor mediante la selección de otro ión la base de datos Peakmaster, o cambiando el valor del pH del TE para afinar su movilidad electroforética efectiva, y se repite el experimento. Si el analito está enfocándose, la movilidad efectiva del TE todavía es demasiado baja y se tiene que incrementar de nuevo. Una vez que el analito ya no se preconcentra, se puede concluir que la movilidad electroforética efectiva del analito tiene que estar entre este TE y el TE previo. Cuanto menores sean los incrementos de la movilidad del TE, más exacta será la determinación de la movilidad electroforética efectiva del analito.

Finalmente, las moléculas espaciadoras se añaden en Peakmaster al TE a concentraciones bajas, en general  $\mu\text{M}$  a  $\text{mM}$ , según la EC. (5). Primero, se añade el espaciador 1 con una movilidad electroforética efectiva entre el analito 1 y 2 (verificada mediante la función de cálculo de Peakmaster) a la lista de constituyentes. Después, se puede añadir el espaciador 2 que tiene una movilidad efectiva entre el analito 2 y 3, el espaciador 3 tiene que tener una movilidad efectiva entre el analito 3 y 4, y así sucesivamente. Después de cada iteración se tiene que controlar que todavía se cumplan los parámetros del sistema del TE.

Una vez que se han determinado el LE, TE y las moléculas espaciadoras, se tiene que verificar experimentalmente que de hecho tienen la movilidad efectiva y el orden de enfoque esperados. Se podrían dar desplazamientos de la movilidad si se usa una matriz de cribado, ya que la matriz de cribado no se ha considerado durante el proceso de simulación con Peakmaster. En general, una matriz de cribado es ventajosa si dos analitos tienen casi la misma movilidad electroforética efectiva en disolución libre pero tienen tamaños diferentes, lo que permite incrementar su diferencia de movilidades electroforéticas efectivas mediante un mecanismo de exclusión por tamaño por medio de una optimización de la composición y concentración de la matriz de cribado. La matriz de cribado puede ser de polisacáridos tales como hidroxipropil-, hidroxietil-, (hidroxipropil)metil-celulosa, un gel de agarosa, o un polímero tal como un copolímero en bloque (que contiene oligómeros repetitivos de dos o más polímeros diferentes), un polímero lineal, un polímero ramificado o un polímero reticulado.

Se añade en general un agente para la supresión del flujo electroosmótico a los electrolitos, lo que permite un rendimiento más alto debido a que el transporte electroforético se hace más dominante. Los agentes para la supresión del flujo electroosmótico se pueden seleccionar del grupo que consiste en polivinilpirrolidonas, polietilenglicoles, poli(óxidos de etileno), polilactamas, derivados de poli(acrilamida sustituidos), derivados de metilhidroxietilo hidrosolubles de celulosa y poli(alcohol vinílico).

La movilidad electroforética efectiva del LE, TE y espaciadores se ha verificado experimentalmente, y ahora se tiene que ajustar la concentración de las moléculas espaciadoras. La EC. (5) se ha usado para una primera aproximación de la concentración necesaria de espaciador, y este parámetro se tiene que afinar experimentalmente. Esto se puede llevar a cabo por medio de medidas de calibración fluorescentes, por ejemplo: la distancia de separación entre dos analitos fluorescentes corresponde a la longitud de la meseta ( $d_{Sk}$ ) del compuesto espaciador ( $S_k$ ), cuyo parámetro se ajusta por medio de un incremento o disminución de la concentración inicial de espaciador  $c_{0,Sk}$  hasta que se cumple  $d_{Ek} = d_{Sk}$ .

Los canales se pueden fabricar de vidrio, plástico (en particular polímeros orgánicos o de condensación), resinas (tales como PDMS - polidimetilsiloxano), silicio, o se pueden emplear también otros materiales. Para el vidrio, se pueden usar tecnologías de microfabricación para la estructuración de los canales, mientras se usa en general el moldeo por inyección o el fresado de precisión para los materiales plásticos.

Debido al proceso de fabricación de los canales de vidrio mediante el uso de grabado húmedo, la anchura  $w$  de todos los canales es en general mayor que su altura  $h$ :  $w > h$ . La altura es en general menor de  $\sim 400 \mu\text{m}$ , y la anchura menor de  $\sim 1 \text{ mm}$ . En contraste, si se emplean métodos de fabricación diferentes, la altura puede ser igual o incluso mayor que la anchura, y puede alcanzar hasta  $\sim 1 \text{ mm}$ . Para procedimientos de extracción sólidos y repetibles, la longitud de la meseta de los espaciadores  $d_{Sk}$  es mayor de dos veces la anchura del canal de separación principal  $w_M$ :

$$d_{Sk} > 2w_M \quad (7)$$

La geometría de las intersecciones de los canales de extracción de ITP se optimiza para alcanzar purezas y

rendimientos de extracción más altos. Como se muestra en la FIG. 1B, las partes de inyección y extracción de los canales de extracción se pueden diseñar con anchuras diferentes,  $w_{E,li}$  y  $W_{E,Ei}$ , respectivamente. Además, las geometrías potenciales de las intersecciones se muestran en la FIG. 2A-D, en la que las líneas representan las líneas del campo eléctrico o las líneas de flujo para el flujo electrocinético o accionado por presión, respectivamente.

5 La introducción de constricciones en los canales de extracción justo antes y/o después de la intersección conduce a líneas de campo/flujo optimizadas a lo largo del canal de separación principal, lo que da como resultado purezas y rendimientos de extracción mayores.

El enfoque y la extracción de los analitos se pueden llevar a cabo con muchos protocolos, de los que se muestran dos ejemplares de acuerdo con la invención en la FIG. 3 y FIG. 4. En la FIG. 3A, el depósito 10 se rellena con TE, el depósito 12 con la muestra que contiene los analitos y los espaciadores, y todos los depósitos restantes con LE que puede contener una matriz de cribado. Después, se aplica un vacío al depósito 11 para rellenar los canales tal como se muestra. A continuación, se aplica un campo eléctrico del orden de 10 a 500 V cm<sup>-1</sup> a lo largo del canal de separación principal entre los depósitos 10 y 13, de forma que el analito y las moléculas espaciadoras se apilan entre el LE y TE como se muestra en la FIG. 3B. Inmediatamente tras la aplicación del campo eléctrico, las zonas apiladas están entre la posición 14 y 15, y después viajan hacia delante hasta que están frente a sus canales de extracción correspondientes. Finalmente, las zonas de analitos se transfieren a los canales de extracción mediante un flujo electrocinético o accionado por presión, como se muestra en la FIG. 3C mediante las flechas.

La matriz de cribado tiene principalmente dos funciones: (1) Incrementa la diferencia de las movilidades electroforéticas efectivas entre los analitos de interés. La separación se basa simplemente en la movilidad electroforética si los electrolitos no contienen una matriz de cribado, mientras una matriz de cribado conduce a un mecanismo de exclusión por tamaño. (2) Impide que entren burbujas y partículas grandes en los canales, lo que incrementa la solidez del método. Además, se puede integrar una membrana porosa en los depósitos o los canales para la filtración de la muestra y los electrolitos, en la que los poros pueden tener un tamaño de nano- o micrometros.

Otro protocolo ejemplar para el apilamiento y la extracción de los analitos se muestra en la FIG. 4, en la que el depósito 20 se rellena primero con TE que contiene los analitos y los espaciadores. Todos los otros depósitos excepto el 21 se rellenan de LE que puede contener una matriz de cribado, y se aplica un vacío al depósito 21, lo que da como resultado el llenado de los canales como se muestra en la FIG. 4A. En la siguiente etapa, se aplica el campo eléctrico de ITP de aproximadamente 10 a 500 V cm<sup>-1</sup> entre los depósitos 20 y 22, lo que conduce a un apilamiento instantáneo de la muestra cerca de la posición 23. Estas zonas se desplazan hacia delante, se paran una vez que están frente a sus canales de extracción correspondientes, y se extraen en estos canales mediante el uso de un flujo electrocinético o accionado por presión como se muestra en la FIG. 4C mediante las flechas.

Si los analitos se tienen que extraer en un tampón diferente del LE para su análisis posterior, se puede aplicar un procedimiento de relleno de microcanales como se demuestra en la FIG. 5. La red de microcanales de la FIG. 4 se usa en la FIG. 5, pero también se puede aplicar el mismo esquema al dispositivo de la FIG. 3. Primero, los depósitos 32 a 35 se rellenan con el tampón de extracción (EB) deseado, el depósito 31 con LE, y el depósito 30 con TE que contiene los analitos y los espaciadores. Después, se aplica un vacío bajo a los depósitos 36 a 43, y un vacío alto al depósito 44. Esto permite rellenar los canales de extracción con el tampón de extracción como se muestra mediante las flechas blancas en la FIG. 5A, y una pequeña cantidad del tampón de extracción se transporta en el canal de separación principal al depósito 44. Para superar este llenado heterogéneo del canal de separación principal, se aplica un flujo electrocinético en la FIG. 5B desde el depósito 31 hasta el depósito 44, de forma que todo el canal de separación principal se está llenando con LE solamente. La FIG. 5C muestra un primer plano de la unión indicada mediante la línea discontinua de la FIG. 5B.

Para ambos esquemas, después de haber transferido las zonas de analitos a los canales de extracción, se vuelve a aplicar un campo eléctrico a lo largo del canal de separación principal, cuya longitud varía entre 1 mm y 50 cm, para transportar las moléculas de analito restantes al depósito de residuos 13, 22 o 31. Después, se aplica el flujo a lo largo de los canales de extracción para transferir completamente las zonas de analitos a los depósitos de extracción. Este proceso permite reducir la entrada de moléculas contaminantes a los canales de extracción. En vez de transportar los analitos a los depósitos de extracción, también se pueden dispensar en gotículas como se muestra en la FIG. 6. Para esta etapa, se dispensa continuamente líquido desde el microcanal de extremo abrupto sobre una superficie hasta que se alcanza el volumen deseado de gotícula. Se pueden generar simultáneamente varias gotículas a través de múltiples canales de extracción, y las gotículas se pueden colocar en una matriz específica para su análisis posterior, tal como mediante espectrometría de masas, microscopía crioelectrónica, AFM, láseres infrarrojos, tecnologías basadas en campos evanescentes, formación de imágenes mediante resonancia de plasmones superficiales, o detecciones ópticas, por ejemplo.

En otra realización, los analitos extraídos se pueden reinyectar según la FIG. 3 en un canal de separación principal adicional en el que los analitos se preconcentran y aíslan adicionalmente. Con ello, los analitos se purifican de manera secuencial, donde en el primer módulo de extracción se eliminan las moléculas por abundancia alta, y en el segundo módulo de extracción se lleva a cabo el aislamiento selectivo de los analitos, por ejemplo. Esto se puede conseguir mediante el uso de diferentes sistemas tampón de ITP (pH, fuerza iónica, movilidad electroforética efectiva) para el primer y segundo módulos de extracción.

Para parar las zonas enfocadas mediante ITP una vez que están frente a sus canales de extracción, se tiene que monitorizar el proceso de ITP. Se pueden aplicar diferentes métodos de detección tales como detección eléctrica, electroquímica, fluorescente, absorbancia termo-óptica, radioquímica, o detección de absorbancia UV, por ejemplo, y se describe un esquema de detección eléctrica en la presente memoria. El método puede emplear diferentes números de electrodos como se muestra en la FIG. 7, tal como, por ejemplo, dos electrodos para detectar un cambio en la conductividad de la zona enfocada, o tres electrodos para medir un cambio en la conductividad y calcular la velocidad de las zonas de ITP. La FIG. 7B muestra la corriente medida una vez que han pasado tres moléculas espaciadoras por los electrodos 30 y 31, 32 y 33, 33 y 34, 35 y 36, o 36 y 37. Tal como se muestra en las FIGS. 7A y B,  $d_{Ek}$  es proporcional al intervalo de tiempo  $t_{Sk}$  de los compuestos espaciadores. La FIG. 7B muestra la señal eléctrica de una muestra que contiene  $n = 4$  analitos que se enfocan en ITP en modo de pico, lo que no da como resultado una corriente constante durante su paso. En contraste, los analitos 1 y 3 se enfocan en ITP en modo de meseta en la FIG. 7C, lo que conduce a una meseta de corriente directamente detectable durante los intervalos de tiempo  $t_{A1}$  y  $t_{A3}$ . Los dos electrodos 30 y 31 están localizados justo a la entrada de un canal de extracción, de forma que el proceso de ITP se puede desconectar inmediatamente tras la llegada de los analitos de interés. De otra manera, los tres electrodos 32 a 34 pueden estar localizados entre los canales de extracción para medir la velocidad a la que están migrando los analitos hacia delante, lo que permite cronometrar la terminación del campo eléctrico de ITP y el proceso de extracción posterior. Además, los electrodos se pueden colocar directamente en los depósitos 35 a 37 para detectar los cambios de conductancia en el canal de separación principal.

*Ejemplo: Separación y extracción de albúmina de suero bovino (BSA) y Concanavalina A (ConA)*

BSA tiene numerosas aplicaciones bioquímicas y muchas funciones. Se ha afirmado que la ConA desnaturalizada podría reducir la probabilidad de que una persona contraiga ciertas enfermedades, tales como diabetes dependiente de insulina o enfermedades autoinmunitarias. Debido a la importancia bioquímica y biológica de BSA y Concanavalina A, se diseña un ensayo de extracción mediante ITP en la presente memoria.

Para la selección del sistema tampón primero se especifica el pH de la disolución, para cuya etapa se tiene que considerar el punto isoeléctrico 4,7 de BSA y 6,5 de ConA. Se elige un pH fisiológico de 7,4, de forma que BSA y ConA están cargados negativamente. A continuación, se tiene que medir la movilidad electroforética efectiva de BSA y ConA, y se elige el segundo método descrito anteriormente mediante el cual se incrementa gradualmente la movilidad efectiva del TE. Para el LE, se elige un anión con una movilidad electroforética efectiva elevada: ácido clorhídrico (véase la base de datos Peakmaster). Para ajustar el pH a 7,4, se selecciona el contraión de tamponamiento TRIS, y para tener una conductividad de  $\sim 0,8 \text{ S m}^{-1}$  como se describió anteriormente, esto conduce a las siguientes concentraciones (calculadas con Peakmaster): TRIS 120 mM - HCl 100 mM. El flujo electro-osmótico se inhibe mediante la adición de un 1% de poli(n-vinilpirrolidona) (PVP), PM 1.000.000 al LE.

El TE tiene que tener una movilidad electroforética efectiva baja, y por lo tanto se selecciona TAPS de la base de datos Peakmaster. Para el contraión de tamponamiento se elige TRIS, y para conseguir una conductividad de  $\sim 0,03 \text{ S m}^{-1}$ , como se describió anteriormente, se calculan las concentraciones siguientes con Peakmaster: TRIS 5 mM - TAPS 20 mM (pH 7,6). Para la determinación de la movilidad electroforética efectiva de BSA y ConA mediante el incremento gradual de la movilidad efectiva del TE, se usa BSA y ConA conjugadas con Alexa Fluor 488 para las investigaciones mediante fluorescencia y se añaden al TE a decenas hasta centenas de nM, respectivamente. Todos los productos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich, excepto PVP que fue de Polysciences, y las proteínas fluorescentes BSA y ConA se adquirieron de Invitrogen.

Las medidas se llevaron a cabo en un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse TE300, equipado con una lámpara de mercurio de 100 W, un objetivo 10x Plan Fluor (A.N. 0,3), y un cubo de filtro verde (excitación a 465-496 nm, emisión a 515-555 nm, umbral dicróico a 505 nm). Las imágenes se capturaron con la Moticam 2300 controlada con el programa informático Motic Life.

Se usaron chips microfluídicos con dos canales de extracción  $E_1$  y  $E_2$ , y se aplicó el protocolo de la FIG. 4. Los microcanales tuvieron una profundidad de 20  $\mu\text{m}$  y una anchura de 30 a 80  $\mu\text{m}$ . Para la generación de un flujo accionado por presión para el procedimiento de llenado o de intercambio de disoluciones, se usó una bomba de vacío. La tensión se generó con un convertor DC/DC G60R de EMCO High Voltage Corporation, controlado con la herramienta de adquisición de datos USB-6008 de National Instruments y el programa informático Matlab de MathWorks. El campo eléctrico resultante de  $\sim 100 \text{ V cm}^{-1}$  se aplicó con electrodos de platino que se insertaron en los depósitos.

Primero se llevan a cabo experimentos con BSA para medir su movilidad electroforética efectiva, y los LE y TE se usan como se describió previamente. BSA se está enfocando con el sistema de electrolitos TRIS-HCl y TRIS-TAPS, y por lo tanto se incrementa la movilidad efectiva del TE. Se prepara un nuevo TE con una movilidad efectiva mayor según la base de datos Peakmaster: TRIS 9 mM - HEPES 15 mM (pH 7,4). Como se muestra en la FIG. 8A, BSA todavía se está preconcentrando mediante ITP, y se incrementa de nuevo la movilidad efectiva de TE. Con TRIS 12 mM - ácido caproico 10 mM, el enfoque ya no se observa, y la movilidad electroforética efectiva de BSA está así entre la del ácido caproico y la del HEPES, a aproximadamente  $-23 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . A continuación, se investiga ConA y se aplica el mismo procedimiento usado para BSA. ConA se va a preconcentrar con TRIS-TAPS (FIG. 8B) pero no con TRIS-HEPES, y por lo tanto se estima que la movilidad electroforética efectiva de BSA es

aproximadamente  $-7,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

5 Basándose en estos resultados, se diseña el TE con el espaciador para la separación de BSA y ConA. Debido a que ConA se va a enfocar con TAPS y BSA con HEPES, se diseña el siguiente TE con Peakmaster: TRIS 5 mM - TAPS 20 mM - HEPES 70  $\mu\text{M}$  (pH 7,6). La concentración de HEPES se elige de forma que la distancia de separación entre BSA y ConA corresponda a la distancia de separación entre canales  $d_{E1}$  de 600  $\mu\text{m}$  según la EC. (5). La FIG. 8C muestra el enfoque y la separación simultánea de estas dos proteínas fluorescentes.

10 Para transferir las proteínas a los canales de extracción, el proceso de ITP se para tras la llegada de las zonas enfocadas a las intersecciones correspondientes canal de ITP - canal de extracción. Después, se aplica un campo eléctrico a lo largo de toda la longitud de los canales de extracción, de forma que BSA y ConA se transportan a los canales de extracción como se muestra en la FIG. 8D para BSA. Esta etapa de extracción se termina una vez que las proteínas llegan a los depósitos de extracción. Para incrementar la pureza de extracción se puede usar un protocolo diferente, mediante el cual el campo eléctrico se desconecta inmediatamente después de que las biomoléculas se hayan transferido completamente a los canales de extracción. Después, el campo eléctrico de ITP se vuelve a aplicar hasta que el canal de separación principal queda sin analitos, y solamente entonces se vuelve a aplicar el flujo a lo largo de los canales de extracción para transferir completamente las zonas de biomoléculas a los depósitos de extracción.

15

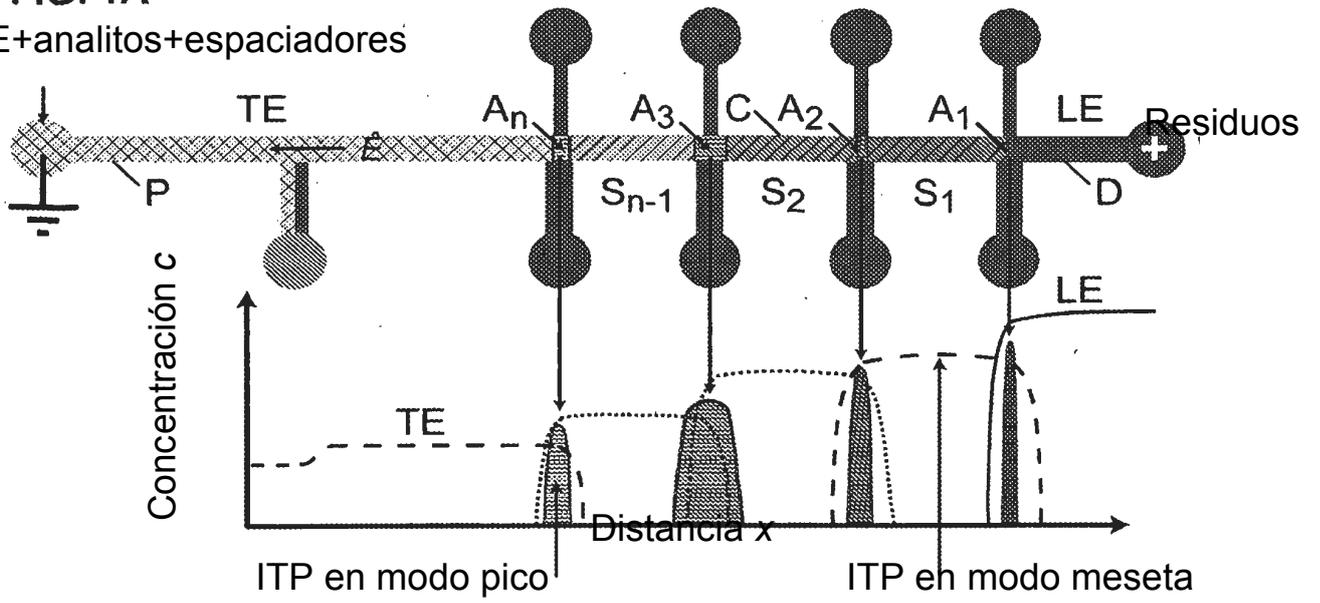
**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preconcentrar y aislar una diversidad n de analitos cargados ( $A_i$ , con  $i = 1$  a n) contenidos en una muestra mediante isotacoforesis, y cada uno de dichos analitos  $A_i$  tiene una movilidad electroforética efectiva  $\mu_{A_i}$ , y dichas movilidades electroforéticas efectivas  $\mu_{A_i}$  obedecen la relación completamente ordenada  $\mu_{A_1} > \mu_{A_2} > \dots > \mu_{A_n}$ , por medio de un aparato que comprende:
- 5 - un canal de separación principal (C) con un extremo proximal (P) y un extremo distal (D),
  - medios para cargar una porción de muestra suplementada en un segmento interno de dicho canal de separación principal localizado entre dicho extremo proximal y dicho extremo distal,
  - medios para aplicar un campo eléctrico ( $\hat{E}$ ) entre dicho extremo proximal (P) y dicho extremo distal (D),
  - 10 - una diversidad n de canales de extracción ( $E_i$ , con  $i = 1$  a n) que están orientados de manera transversal con respecto a dicho canal de separación principal (C) y que tienen uniones respectivas con dicho canal de separación principal localizadas en sitios diferentes del mismo, y cada canal de extracción tiene una parte de extracción que conduce fuera del canal de separación principal,
  - medios para detectar zonas enfocadas dentro de dicho canal de separación (C) y/o medios para medir una velocidad de flujo a lo largo de un eje longitudinal de dicho canal de separación bajo la influencia de un campo eléctrico ( $\hat{E}$ ) aplicado a lo largo de dicho eje mediante dichos medios para aplicar un campo eléctrico,
  - 15 - medios para aplicar un flujo transversal a lo largo de cada uno de dichos canales de extracción ( $E_i$ ) para extraer cualquiera de dichos analitos localizados en la unión respectiva del canal de extracción ( $E_i$ ) y del canal de separación principal (C),
  - 20 y dicho método comprende las etapas de:
    - cargar un electrolito líder (LE) en una región distal del canal adyacente a dicho extremo distal y un electrolito terminal (TE) en una región proximal del canal adyacente a dicho extremo proximal, y dicho electrolito líder (LE) tiene una movilidad electroforética efectiva  $\mu_{LE} > \mu_{A_1}$  y dicho electrolito terminal (TE) tiene una movilidad electroforética efectiva  $\mu_{TE} < \mu_{A_n}$ ,
    - 25 - añadir una muestra suplementada a dicha región proximal (P) del canal,
    - dicha muestra suplementada comprende una mezcla de dicha muestra y un número n-1 de compuestos espaciadores ( $S_k$ , con  $k = 1$  a n-1), y cada uno de dichos compuestos espaciadores ( $S_k$ ) tiene una movilidad electroforética efectiva  $\mu_{S_k}$ , y dichas movilidades electroforéticas efectivas  $\mu_{S_k}$  obedecen la relación completamente ordenada  $\mu_{A_k} > \mu_{S_k} > \mu_{A_{k+1}}$ ,
    - 30 - aplicar un campo eléctrico axial entre dicho extremo proximal (P) y dicho extremo distal (D), y de ese modo se provoca una preconcentración y separación de dichos analitos y espaciadores formando zonas de espaciadores enfocadas y zonas de analitos enfocadas respectivas que fluyen a lo largo de dicho eje longitudinal,
    - 35 - cada uno de dichos compuestos espaciadores ( $S_k$ ) en dicha muestra suplementada tiene una concentración inicial ( $c_{0,S_k}$ ) seleccionada de tal manera que corresponda sustancialmente, como su concentración preconcentrada ( $c_{S_k}$ ) en la zona de espaciador enfocada respectiva, a un volumen de dicho canal de separación principal encerrado entre un par asociado de canales de extracción adyacentes ( $E_k$ ) y ( $E_{k+1}$ ),
    - 40 - detectar la posición y/o medir la velocidad de dichas zonas enfocadas,
    - opcionalmente detener el proceso desconectando dicho campo eléctrico ( $\hat{E}$ ) cuando la zona enfocada de cada analito ( $A_i$ ) se localiza en la unión respectiva con el canal de extracción ( $E_i$ ),
    - aplicar un flujo transversal de la parte de la muestra suplementada localizada en la unión del canal de separación principal y del canal de extracción respectivo, por lo que se transfiere cada analito preconcentrado ( $A_i$ ) del canal de separación principal para el aislamiento de dicho analito.
    - 45
2. El método según la reivindicación 1, en el que dicha adición de una muestra suplementada a la región proximal del canal comprende cargar dicha muestra suplementada en un segmento del canal entre dicho electrolito líder (LE) y dicho electrolito terminal (TE).
3. El método según la reivindicación 1, en el que dicha adición de una muestra suplementada a la región proximal del canal comprende cargar una mezcla de dicha muestra suplementada y dicho electrolito terminal en dicha región proximal del canal.

4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la presencia de un analito ( $A_i$ ) y opcionalmente la concentración presente del mismo se detecta eléctricamente como una meseta de corriente o resistencia entre:
- dos compuestos espaciadores adyacentes ( $S_{i-1}$ ) y ( $S_i$ ) para  $i = 2$  a  $n-1$ ;
- 5
- el electrolito líder (LE) y el compuesto espaciador adyacente ( $S_1$ ) para  $A_1$ ;
  - el compuesto espaciador adyacente ( $S_{n-1}$ ) y el electrolito terminal (TE) para  $A_n$ .
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha etapa de aplicación de un flujo transversal se lleva a cabo hasta que cada analito ( $A_i$ ) ha alcanzado una zona de recogida localizada en un extremo de la parte de extracción del canal de extracción ( $E_i$ ) respectivo.
- 10
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha etapa de aplicación de un flujo transversal se interrumpe cuando cada analito ( $A_i$ ) se ha acumulado en una zona del canal de extracción ( $E_i$ ) respectivo desplazado desde dicho canal de separación principal (C), seguido de una etapa de reaplicación de dicho campo eléctrico ( $\hat{E}$ ), y así se provoca que cualquier analito residual presente en el canal de separación principal (C) se elimine de él hacia dicho extremo distal (D), seguido de la desconexión de dicho campo eléctrico ( $\hat{E}$ ) y la
- 15
- reaplicación de dicho flujo transversal hasta que cada analito ( $A_i$ ) haya alcanzado una zona de recogida localizada en un extremo de la parte de extracción del canal de extracción ( $E_i$ ) respectivo.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el electrolito líder (LE) y el electrolito terminal (TE) tienen sustancialmente el mismo valor de pH, y opcionalmente contienen una matriz de cribado y un agente para la supresión del flujo electroosmótico.
- 20
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la movilidad electroforética efectiva ( $\mu_{Ai}$ ) de un analito dado ( $A_i$ ) se determina por medio de isotacoforesis o electroforesis.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la etapa de seleccionar la concentración inicial ( $c_{0,S_k}$ ) de cada uno de dichos compuestos espaciadores ( $S_k$ ) comprende las etapas de:
- 25
- a) proporcionar una mezcla de dichos compuestos espaciadores ( $S_k$ ) con concentraciones iniciales de comienzo ( $c'_{0,S_k}$ ) respectivas,
  - b) comenzar un proceso isotacoforético con dicha mezcla, provocando de ese modo una separación y preconcentración de dichas zonas de espaciadores que fluyen a lo largo de dicho eje longitudinal,
  - c) determinar la longitud asociada ( $d_{S_k}$ ) de cada zona de espaciador,
  - d) determinar una medida de desviación ( $m_k$ ) para cada una de dichas longitudes ( $d_{S_k}$ ) frente a la distancia ( $d_{E_k}$ ) entre el par asociado de canales de extracción adyacentes ( $E_k$ ) y ( $E_{k+1}$ ),
  - e) usar dichas medidas de desviación ( $m_k$ ) para calcular un grupo de concentraciones iniciales refinadas ( $c''_{0,S_k}^{(r)}$ ),
  - f) repetir las etapas a) a e) usando dichas concentraciones iniciales refinadas ( $c''_{0,S_k}^{(r)}$ ) en vez de dichas concentraciones iniciales de comienzo ( $c'_{0,S_k}$ ) hasta que ninguna de dichas medidas de desviación ( $m_k$ ) supere un umbral de tolerancia predefinido,
  - g) usar dichas concentraciones iniciales refinadas ( $c''_{0,S_k}^{(r)}$ ) como las concentraciones iniciales ( $c_{0,S_k}$ ) para preparar dicha muestra suplementada.
- 30
- 35
10. El método según la reivindicación 9, en el que dicha etapa a) incluye añadir dichos analitos cargados ( $A_i$ ) a dicha mezcla, y en el que dicha etapa de determinación de la longitud asociada ( $d_{S_k}$ ) de cada zona de espaciador se lleva a cabo detectando zonas de analitos enfocadas que separan dichas zonas de espaciadores enfocadas.
- 40
11. Un aparato para preconcentrar y aislar una diversidad  $n$  de analitos cargados ( $A_i$ , con  $i = 1$  a  $n$ ) contenidos en una muestra mediante isotacoforesis, y cada uno de dichos analitos ( $A_i$ ) tiene una movilidad electroforética efectiva  $\mu_{Ai}$ , y dichas movilidades electroforéticas efectivas  $\mu_{Ai}$  obedecen la relación completamente ordenada  $\mu_{A1} > \mu_{A2} > \text{etc.} > \mu_{An}$ , y dicho aparato comprende:
- 45
- un canal de separación principal (C) con un extremo proximal (P) y un extremo distal (D),
  - medios para añadir una muestra suplementada en un segmento interno de dicho canal de separación principal localizado entre dicho extremo proximal (P) y dicho extremo distal (D),
  - medios para aplicar un campo eléctrico ( $\hat{E}$ ) entre dicho extremo proximal (P) y dicho extremo distal (D),
  - una diversidad  $n$  de canales de extracción ( $E_i$ , con  $i = 1$  a  $n$ ) que están orientados de manera transversal

- con respecto a dicho canal de separación principal (C) y que tienen uniones respectivas con dicho canal de separación principal localizadas en sitios diferentes del mismo, y cada canal de extracción tiene una parte de extracción que conduce fuera del canal de separación principal,
- 5 - medios para detectar zonas de espaciadores enfocadas y zonas de analitos enfocadas dentro de dicho canal de separación (C) y/o medios para medir una velocidad de flujo a lo largo de un eje longitudinal de dicho canal de separación bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado mediante dichos medios para aplicar un campo eléctrico,
  - 10 - medios para aplicar un flujo a lo largo de cada uno de dichos canales de extracción para extraer cualquiera de dichos analitos localizados en la unión respectiva del canal de extracción (C) y del canal de separación principal,
  - un electrolito líder (LE) contenido en una región distal del canal adyacente a dicho extremo distal y un electrolito terminal (TE) contenido en una región proximal del canal adyacente a dicho extremo proximal, y dicho electrolito líder (LE) tiene una movilidad electroforética efectiva  $\mu_{LE} > \mu_{A1}$  y dicho electrolito terminal (TE) tiene una movilidad electroforética efectiva  $\mu_{TE} < \mu_{An}$ ,
  - 15 - una muestra suplementada contenida en dicha región proximal (P) del canal,
  - dicha muestra suplementada comprende una mezcla de dicha muestra y un número n-1 de compuestos espaciadores ( $S_k$ , con  $k = 1$  a n-1), y cada uno de dichos compuestos espaciadores ( $S_k$ ) tiene una movilidad electroforética efectiva  $\mu_{S_k}$ , y dichas movilidades electroforéticas efectivas  $\mu_{S_k}$  obedecen la relación completamente ordenada  $\mu_{A_k} > \mu_{S_k} > \mu_{A_{k+1}}$ ,
  - 20 - cada uno de dichos compuestos espaciadores ( $S_k$ ) en dicha muestra suplementada que tienen una concentración inicial ( $c_{0,S_k}$ ) seleccionada de tal manera que corresponda sustancialmente, como su concentración preconcentrada ( $c_{S_k}$ ) en la zona de espaciador enfocada respectiva, a un volumen de dicho canal de separación principal encerrado entre un par asociado de canales de extracción adyacentes ( $E_k$ ) y ( $E_{k+1}$ ).
- 25 12. El aparato según la reivindicación 11, en el que cada canal de extracción ( $E_i$ ) comprende una zona de recogida localizada en un extremo de la parte de extracción del mismo.
13. El aparato según la reivindicación 12, en el que cada canal de extracción ( $E_i$ ) comprende además una parte de inyección que conduce al canal de separación principal.
- 30 14. El aparato según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que comprende además una diversidad de secciones de tampón de extracción (EB), y cada una de dichas secciones de tampón de extracción tiene un canal que conduce a la unión de una parte de extracción o parte de inyección del canal de extracción y del canal de separación principal.
15. El aparato según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que dichos medios para detectar las zonas enfocadas comprenden electrodos dispuestos en dicho canal de separación principal (C) y/o en dichos canales de extracción ( $E_i$ ) y/o en dichas zonas de recogida.
- 35

**FIG. 1A**  
TE+analitos+espaciadores



**FIG. 1B**

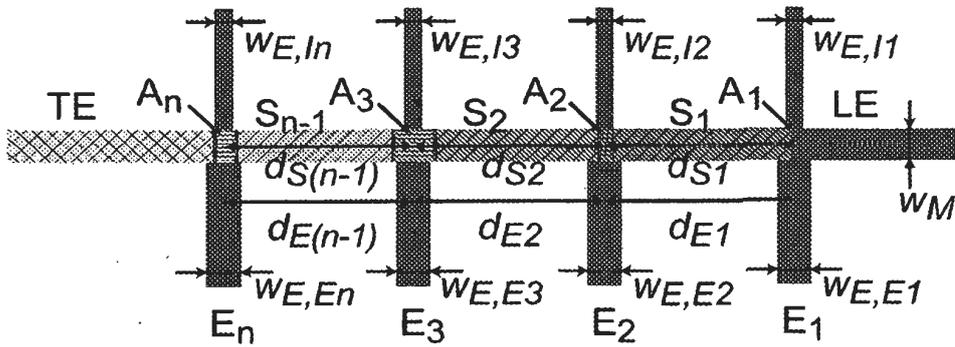


FIG. 2A

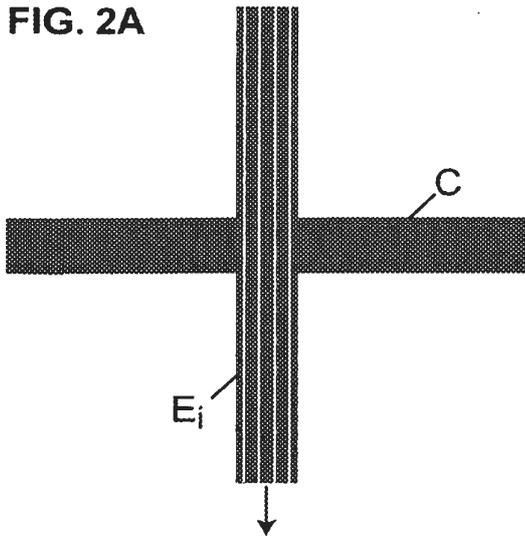


FIG. 2B

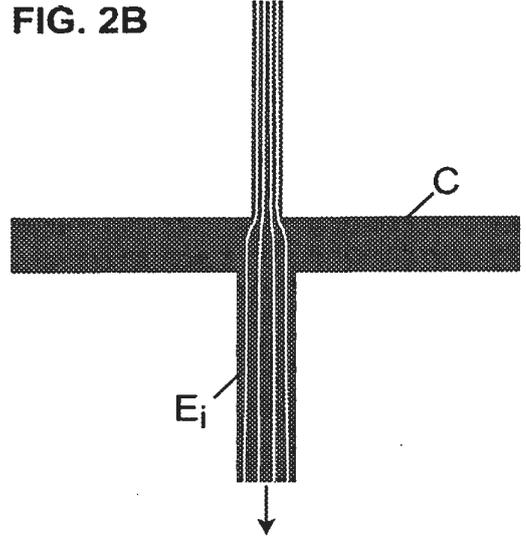


FIG. 2C

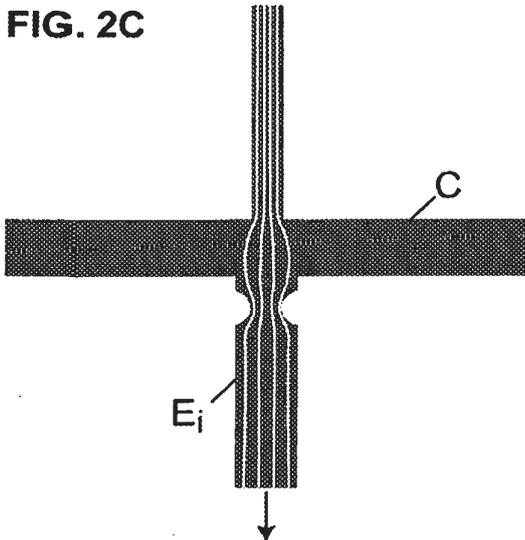
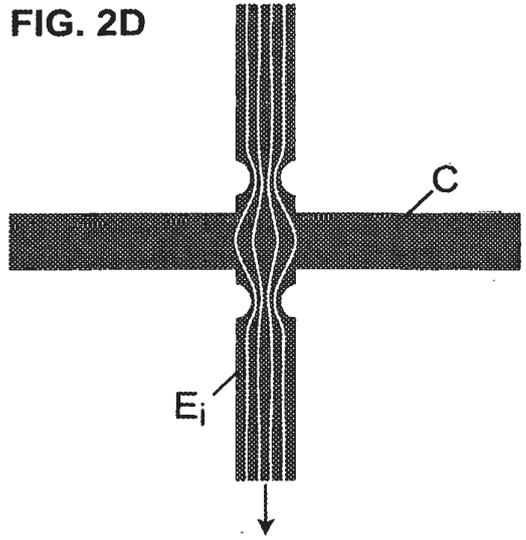


FIG. 2D



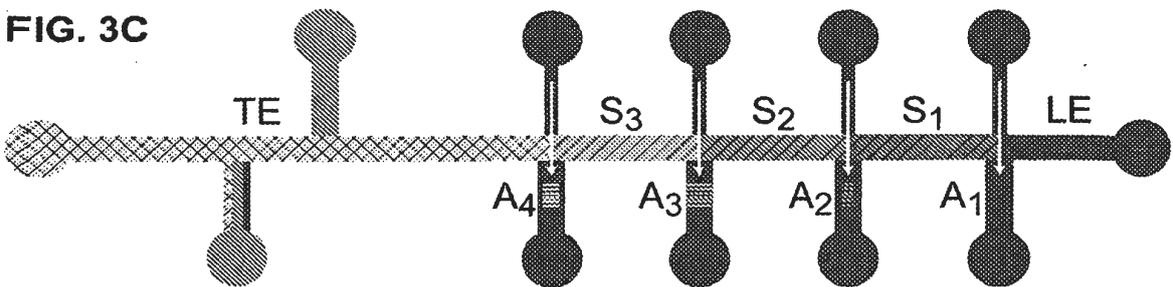
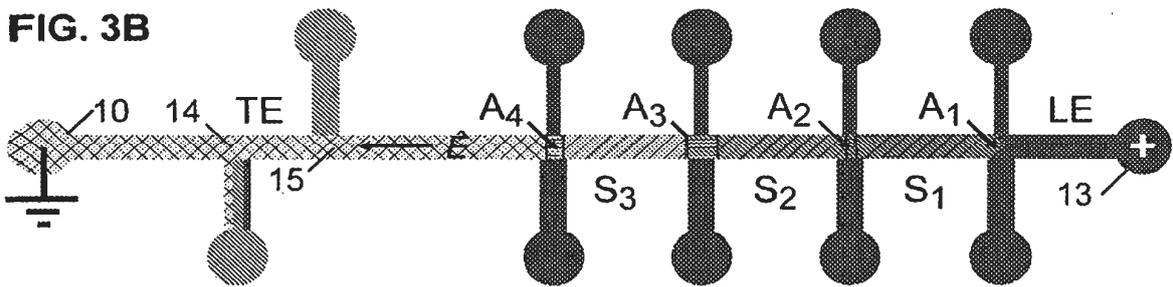
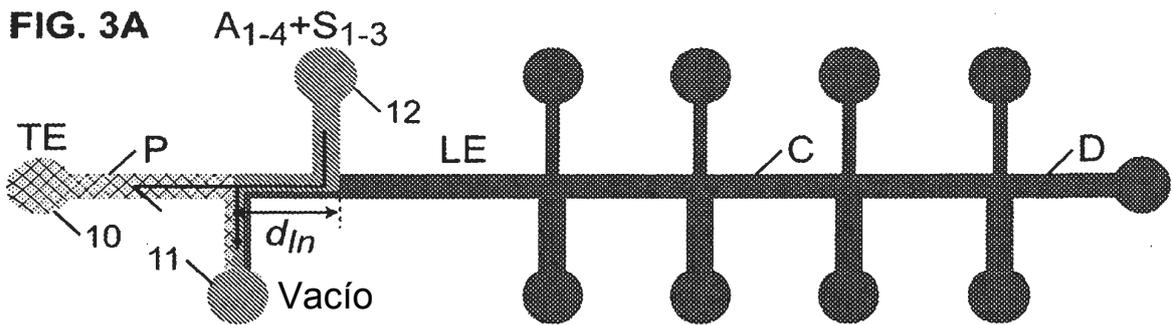


FIG. 4A

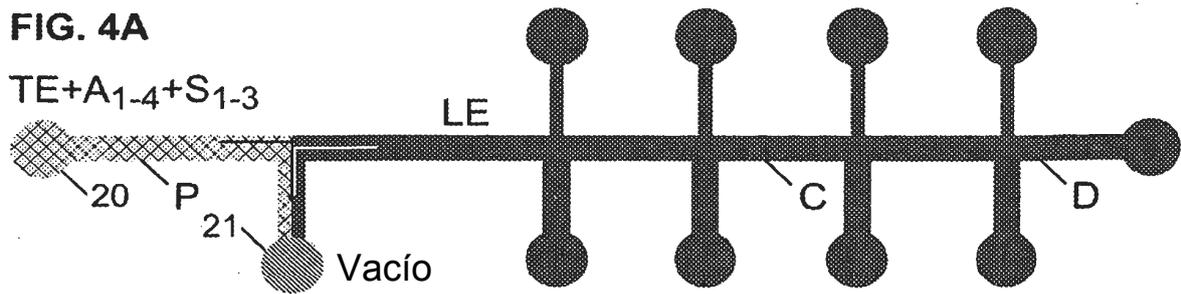


FIG. 4B

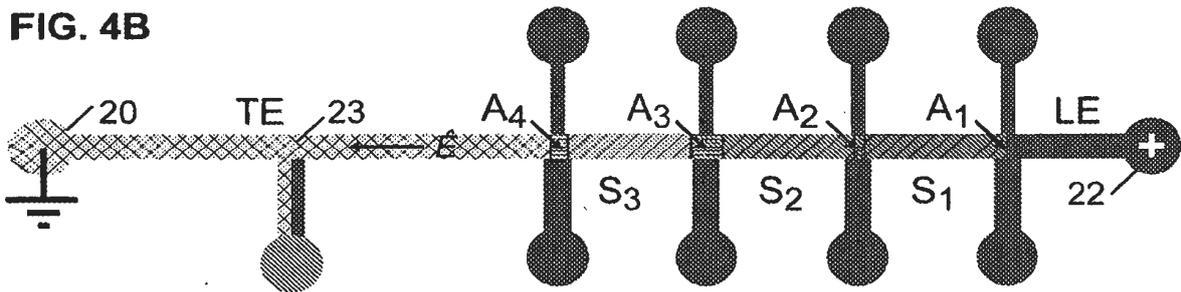
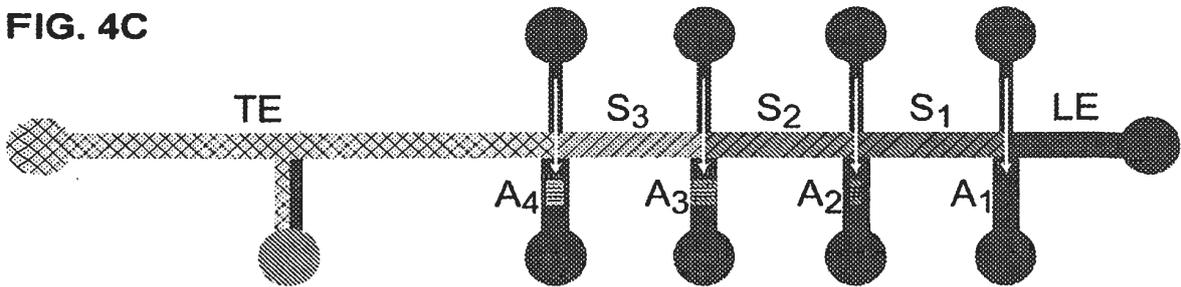


FIG. 4C



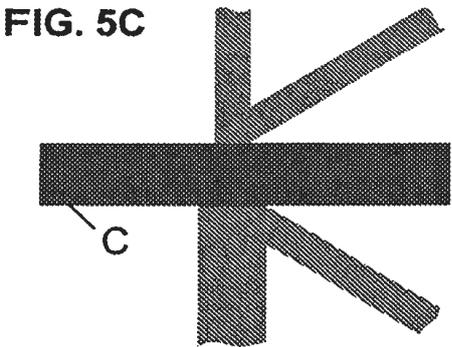
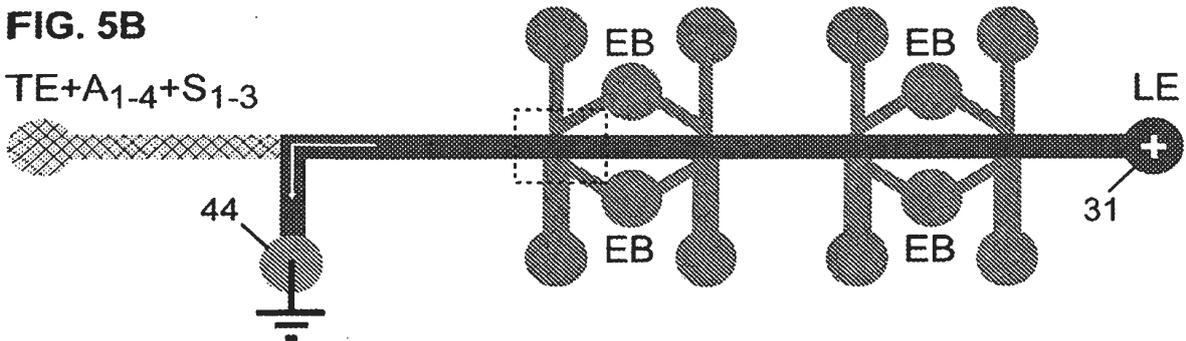
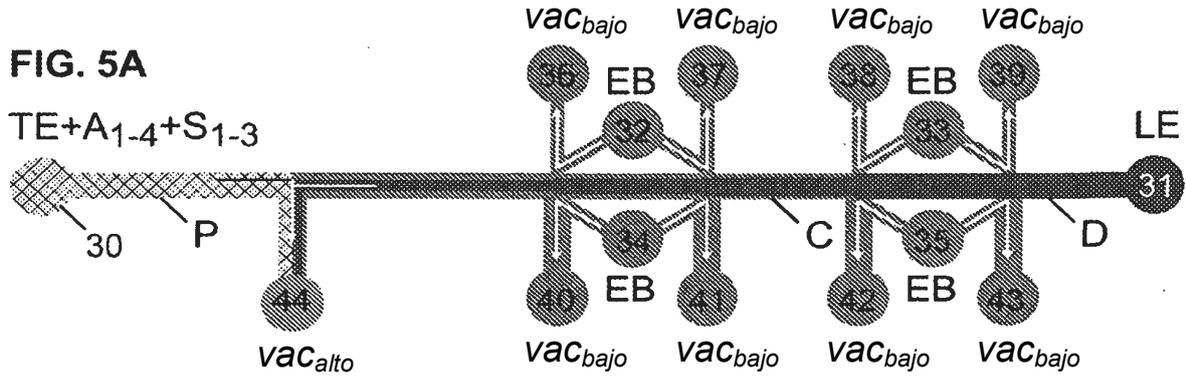


FIG. 6

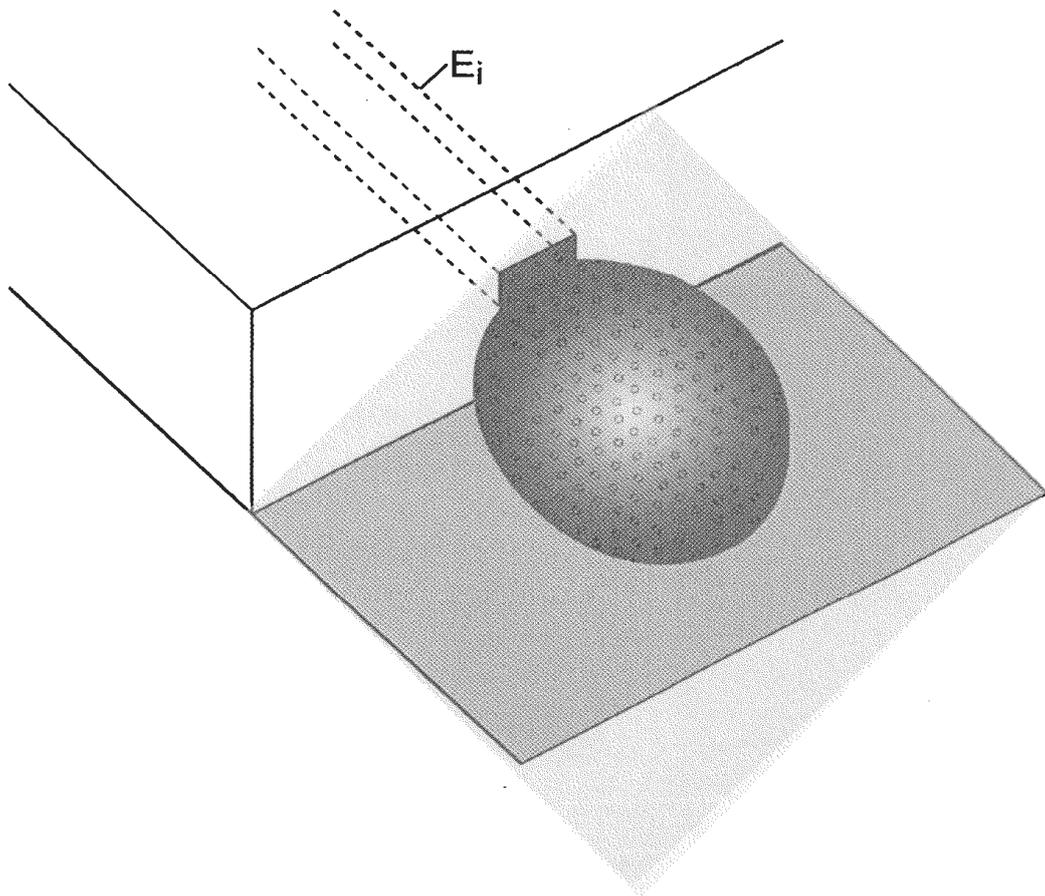


FIG. 7A

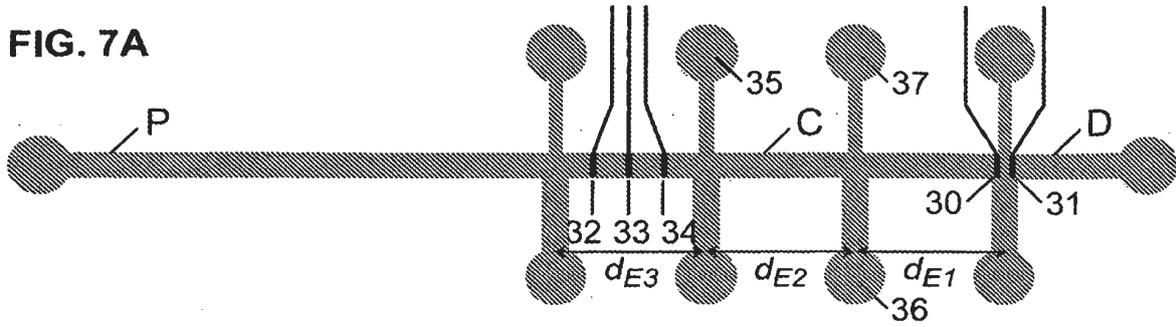


FIG. 7B

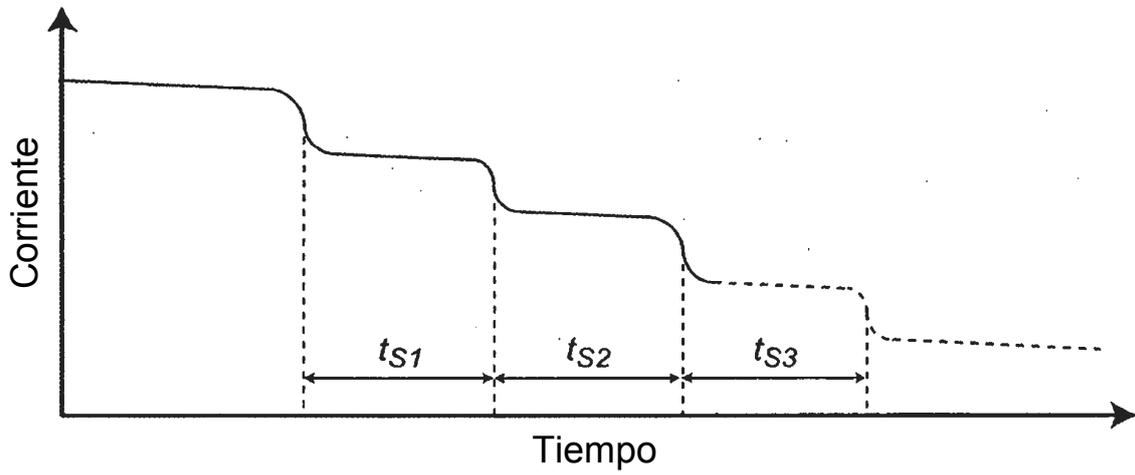


FIG. 7C

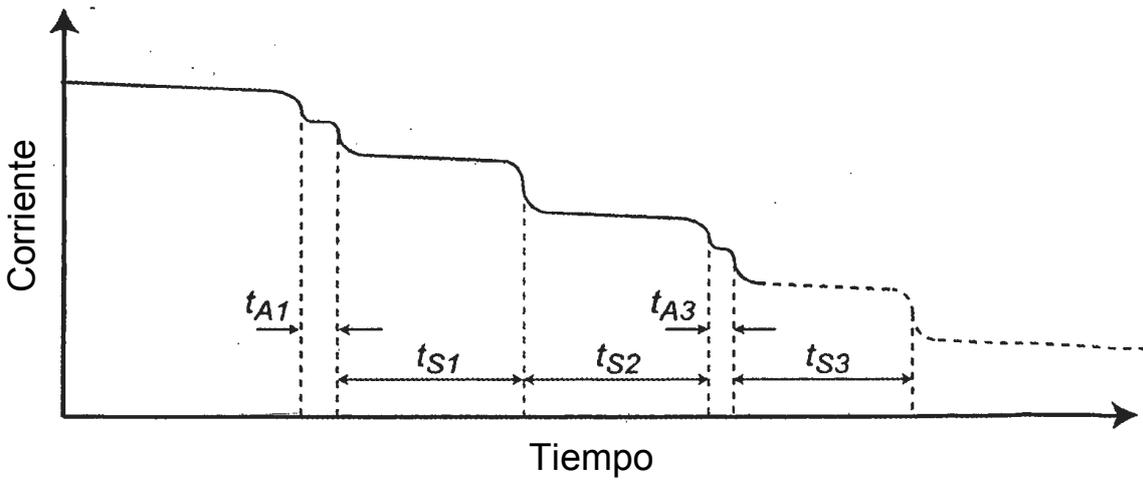


FIG. 8A

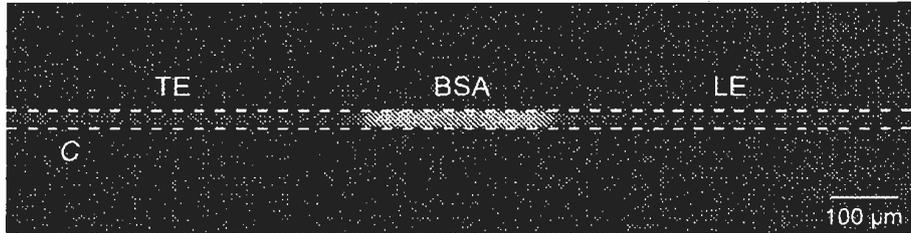


FIG. 8B

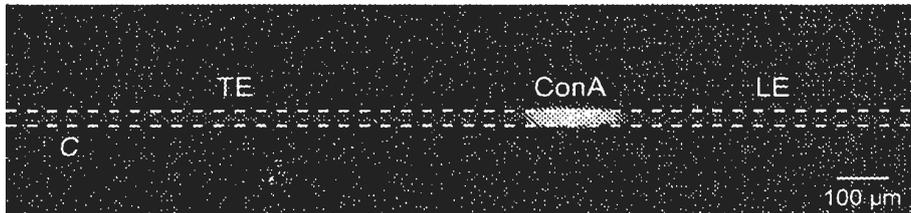


FIG. 8C



FIG. 8D

