



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 744**

51 Int. Cl.:  
**C07K 1/28** (2006.01)  
**G01N 27/447** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01976508 .0**  
96 Fecha de presentación : **23.10.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1341806**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2003**

54 Título: **Método y aparato para separar moléculas biológicas.**

30 Prioridad: **15.12.2000 GB 0030708**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.05.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.05.2010**

73 Titular/es: **Deltadot Limited**  
**Bessemer Building (RSM), Prince Consort Road**  
**South Kensington, London SW7 2BP, GB**

72 Inventor/es: **Sanders, Giles, Hugo, William;**  
**Hassard, John;**  
**Hassard, Stuart y**  
**Sideris, Dimitrios**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 339 744 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

Método y aparato para separar moléculas biológicas.

5 El presente invento se refiere a un método y un aparato para separar moléculas biológicas. Es de aplicación en particular, aunque no exclusivamente, para la separación para fines de identificación de proteínas y moléculas similares.

10 En la separación convencional en grupos de proteínas, de la que es un ejemplo la técnica del SDS-PAGE (Sulfato dodecil sódico-Electroforesis de Gel de Poliacrilamida), se usan diferentes propiedades de las proteínas para separarlas según un mapa bidimensional. Típicamente, las proteínas adquiridas de una muestra son primero separadas de acuerdo con sus puntos de equilibrio isoeléctrico, depositadas para ello sobre un gel en tira de pH graduado. Bajo un campo eléctrico moderado, se permite que las proteínas establezcan sus puntos de equilibrio isoeléctrico dentro de ese gel. El gel en la tira se coloca después sobre el borde de una placa de separación por electroforesis bidimensional convencional, en un sistema de SDS-PAGE. Un intenso campo eléctrico ortogonal hace entonces que las proteínas migren en la segunda dimensión, a través de la placa, de acuerdo con su relación de carga/masa. El SDS (Sulfato dodecil sódico) cambia el estado electroforético e las moléculas de modo que, cuando éstas están sobre la placa, se mueven a una velocidad proporcional a su relación de carga/masa. Las proteínas más pequeñas se mueven más rápidamente que las mayores (por ser mayor su movilidad en el campo constante) y, eventualmente, se llega a una separación bidimensional u ortogonal de las proteínas a través de la superficie de la placa. Al final del procedimiento de separación, cada proteína aparece como una mancha separada sobre el gel.

Para someter a nuevas pruebas las proteínas separadas, las manchas individuales pueden ser “excavadas” del gel, o extraídas de otro modo, e investigadas, por ejemplo en un espectrómetro de masas.

25 Hay una serie de problemas que se plantean con esta técnica conocida, incluyendo el de la lentitud de la separación, lo engorroso de los procedimientos más bien ad hoc requeridos, el hecho de que se precisen muchas manipulaciones, con la consiguiente susceptibilidad a errores sistemáticos, y la imposibilidad de realizar análisis paralelos para comparación.

30 Un objeto del presente invento es suavizar al menos esas dificultades de la técnica anterior.

De acuerdo con un primer aspecto del invento, se proporciona un método para separar moléculas biológicas, que comprende:

35 (a) aplicar un primer campo eléctrico a las moléculas para hacer que éstas migren, en un canal de enfoque lineal común, hacia sus respectivos puntos de equilibrio isoeléctrico, para producir una separación isoeléctrica lineal;

(b) cambiar el estado electroforético de las moléculas; y

40 (c) aplicar un segundo campo eléctrico a la separación isoeléctrica en una dirección a lo largo de la separación isoeléctrica para hacer que las moléculas migren y se separen en un canal de separación lineal común.

De acuerdo con un segundo aspecto, se proporciona un aparato para separar moléculas biológicas, que comprende:

45 (a) un canal de enfoque lineal dispuesto, cuando se aplica un primer campo eléctrico a lo largo de la longitud del canal, para hacer que las moléculas migren hacia sus respectivos puntos de equilibrio isoeléctrico, para producir una separación isoeléctrica lineal; y

50 (b) un canal de separación lineal común en el cual las moléculas migran cuando se aplica un segundo campo eléctrico a la separación isoeléctrica en una dirección a lo largo de la separación isoeléctrica.

Con el aparato y el método del presente invento, se pueden llevar a cabo separaciones precisas y rápidas, esencialmente en una dimensión, sin que para ello se requiera el uso de geles bidimensionales como en la técnica anterior. Esto proporciona una serie de ventajas, concretamente la posibilidad de reconocimiento de un patrón mejorado y más simple, que puede ser efectuado en tiempo real. Esto, a su vez, permite la posibilidad, en ciertas realizaciones, de recoger colectivamente las proteínas u otras moléculas de interés usando un conmutador rápido de alto voltaje, por ejemplo aplicado en una bifurcación o en una polifurcación en el canal de separación. Esto permite el fácil aislamiento de una molécula dada después de que haya sido reconocida por el software.

60 El uso de un sistema de separación esencialmente unidimensional, que permita en algunas realizaciones la medición simultánea tanto de la relación de carga/masa molecular como también el punto de equilibrio isoeléctrico, permite la posibilidad de usar múltiples canales en paralelo. Esto proporciona la capacidad para llevar a cabo estudios comparativos en tiempo real, algo que ha sido difícil o imposible con las técnicas anteriores.

65 El canal de enfoque primero o isoeléctrico puede ser realizado en una serie de formas. Es esencialmente un canal lineal, que puede ser recto o curvado. Como posibles realizaciones se incluyen una tira o longitud alargada de material de enfoque isoeléctrico, por ejemplo de un gel que tenga un gradiente del pH previamente definido. Como alternativa, el canal puede ser definido por un canal, estría o túnel que haya sido cortado, desarrollado o formado de otro modo en

## ES 2 339 744 T3

un chip. El canal incluirá, típicamente, algún gel de enfoque isoelectrico que tenga un gradiente del pH previamente definido.

5 El canal de separación es también, esencialmente, un canal lineal que puede ser curvado o recto. Puede estar definido, por ejemplo, por un capilar o por un canal, estría o túnel cortado, desarrollado o formado de otro modo en un chip. Típicamente, el canal contendrá un gel de electroforesis, normalmente sin gradiente del pH.

10 El invento se extiende a cualquier combinación compatible de diferentes características descritas o representadas en relación con las diferentes realizaciones. Se extiende, además, a cualquier combinación compatible de características o conceptos establecidos en la introducción o a los que se haga referencia en cualquiera de las reivindicaciones.

El presente invento puede ser puesto en práctica de una serie de formas y se describirán a continuación varias realizaciones específicas, a modo de ejemplos, con referencia a los dibujos que se acompañan, en los cuales:

15 La Figura 1 representa una primera realización del invento;

La Figura 2 representa una segunda realización;

20 La Figura 3 ilustra la forma en que pueden moverse las proteínas desde el canal de enfoque al canal de separación;

La Figura 4 representa el mecanismo de transferencia en un sistema de un solo chip;

La Figura 5(a) representa la topología del chip en una realización con múltiples canales;

25 La Figura 5(b) representa la fase de separación isoelectrica;

La Figura 5(c) representa la fase de inserción electroforética;

30 La Figura 5(d) representa la fase de separación electroforética;

La Figura 6 representa todavía otra realización, en la que se hace uso de tres canales; y

La Figura 7 representa el sistema de recogida molecular preferido.

35 Pasando en primer lugar a la Figura 1, se ha representado en ella una primera realización del invento, en la cual, como en todas las realizaciones, se consigue la separación molecular esencialmente en una dimensión, en vez en las dos de la técnica anterior. El dispositivo representado comprende un chip 10 de PDMS (polidimetil siloxano), silicio, zafiro, diamante, o alguna combinación de éstos. Sobre o dentro del chip hay un microcanal indicado en general como 12. La anchura del canal puede ser desde una fracción de micrómetro hasta cientos de micrómetros, y su profundidad  
40 tiene una fracción de micrómetro hasta miles de micrómetros. En la realización preferida, sin embargo, el microcanal tiene aproximadamente 50 micrómetros de anchura, y aproximadamente 500 micrómetros de profundidad.

El canal está dividido en dos partes, a saber: la sección de enfoque, indicada en general en 14, y una sección de separación indicada en general en 16. El canal 12 contiene un gel electroforético. Éste tiene, preferiblemente, un pH  
45 uniforme en toda la sección de separación 16, y un pH variable en la sección de enfoque. Es preferible que no haya discontinuidad en el límite entre la sección de enfoque y la sección de separación. Para facilidad de funcionamiento, se prefiere que el gradiente del pH dentro de la sección de enfoque 14 sea lineal, aunque esto no es esencial. Las longitudes relativas de la sección de enfoque y de la sección de separación pueden elegirse de acuerdo con la tarea de separación de que se trate.  
50

Se introduce en el extremo de la sección de enfoque 14 una muestra de la proteína a ser separada, y se permite que las moléculas establezcan sus puntos de equilibrio bajo la influencia de un campo eléctrico moderado, generado por aplicación de una diferencia de potencial entre los electrodos 18, 20 en uno y otro extremo de la sección de enfoque. Las proteínas móviles son reproducidas en imagen (por ejemplo, seguidas bajo el microscopio) hasta que lleguen a  
55 sus puntos de equilibrio 13. En esos puntos, las moléculas son, por definición, eléctricamente neutras con respecto al ambiente que las rodea.

Con objeto de permitir que las moléculas se muevan entonces entrando en la sección de separación 16, se debe cambiar su estado electroforético (ya que de otro modo las proteínas no se moverían). Esto puede conseguirse desnaturizando las proteínas (por ejemplo, por calentamiento o por aplicación de un lavado con un detergente tal como el SDS). Típicamente, el detergente estará ya presente en la sección de separación 16 -para asegurar que las moléculas permanezcan en su estado desnaturizado durante la fase de separación- de modo que la adición de un detergente similar a la sección de enfoque 14 no origine ninguna dificultad particular. Como alternativa, o además, puede ser destruido el gradiente del pH dentro de la sección de enfoque. En otra realización (no representada) puede haber un  
60 solo cuerpo de gel, parte del cual tenga un gradiente del pH y parte del cual no lo tenga, actuando esta última parte como el canal de separación.  
65

## ES 2 339 744 T3

Una vez que se haya restituido la movilidad electroforética a las proteínas enfocadas, se establece un alto voltaje entre el electrodo 18, al principio de la sección de enfoque, y otro electrodo 22, al final de la sección de separación. Esto hace que las proteínas se muevan a lo largo del canal con una velocidad proporcional a su relación de carga/masa.

5 Se pueden usar sistemas convencionales para reproducir en imagen las proteínas separadas resultantes, una vez que se haya permitido que continúe la electroforesis durante un tiempo suficiente. Las bandas resultantes pueden ser, por ejemplo, fotografiadas y medidas, ya sea automática o ya sea manualmente. Como alternativa, detectores fijos 23 a lo largo de la longitud de la sección de separación pueden seguir las bandas al moverse a lo largo, permitiendo que las bandas sean identificadas en tiempo real. Preferiblemente, las bandas son reproducidas en imagen usando las 10 técnicas de reproducción en imagen intrínsecamente libres de etiquetas, descritas en nuestra Solicitud de Patente WO-A-9635945, en la cual se describe la detección de los componentes de separación en un canal de separación, usando su absorción de UV intrínseca.

Al final de la fase de separación, las proteínas han sido separadas/identificadas, tanto por su peso molecular (deter- 15 minado por la velocidad de movimiento durante la fase de separación, o por la posición que una banda particular haya alcanzado después de un tiempo conocido) y también su punto isoeléctrico (basado en cada "posición de partida" de la molécula para la fase de separación, es decir, su punto de equilibrio isoeléctrico dentro de la sección de enfoque). Tanto la relación de carga/masa como el punto isoeléctrico, pueden ser extraídos de las mediciones tomadas sobre las 20 bandas moleculares al pasar éstas por debajo de la sección de separación: véanse, por ejemplo, nuestras Solicitudes de Patente PCT/GB01/03281, PCT/GB01/03275, PCT/GB01/03286, en las cuales se describe un método para analizar componentes de tapones de muestra inyectados en un canal de separación en diferentes lugares o en diferentes momentos, como los componentes separados en el canal de separación. El método comporta deducir un mapa de espacio- 25 tiempo a partir de las señales detectadas en múltiples lugares, que permita que los componentes de un tapón de muestra dado sean identificados por un vértice común de sus trayectorias en el mapa de espacio-tiempo.

La Figura 1 representa una transferencia "en serie" de la sección de enfoque a la sección de separación, o dicho 30 en otras palabras, una disposición en la cual el canal de enfoque está contiguo, extremo con extremo, al canal de separación, de modo que las moléculas que salen por el extremo del canal de enfoque se mueven pasando directamente al comienzo del canal de separación.

La matriz de sensores 23 detecta las bandas de moléculas en movimiento, en tiempo real, a medida que van 35 pasando a lo largo de la sección de separación. Puesto que es conocida la posición de cada uno de estos sensores, y es también conocido el tiempo que invierte cada banda en llegar a un sensor respectivo, se puede determinar la velocidad de cada banda. Puesto que la velocidad es proporcional a la relación de carga/masa, el conocimiento de la velocidad hace posible determinar la relación, y por consiguiente el peso molecular, de las moléculas. Tomando 40 medidas de temporización para cada una de las bandas en una diversidad de diferentes sensores, se puede "retroceder al vértice" como se describe en nuestra Solicitud de PCT: PCT/GB01/03286, para determinar el punto de partida para cada banda, o dicho en otras palabras, el punto de enfoque isoeléctrico de cada banda dentro de la sección de enfoque 14. La captación y el análisis de los datos se llevan a cabo en tiempo real mediante un sistema de ordenador asociado (no representado).

La Figura 2 representa una realización alternativa, en la cual las moléculas enfocadas son transferidas lateralmente 45 desde la sección de enfoque al principio de la sección de separación.

En la Figura 2 se ha representado un chip 24 que tiene un canal de separación 26 del patrón de líneas. El principio 50 del canal de separación define una parte de carga de canal 28 que está dispuesta para tener situada próxima a la misma una tira 30 de enfoque isoeléctrico, que se puede encontrar en el comercio, que tiene un gradiente del pH previamente definido a lo largo de su longitud. En uso, se colocan las moléculas a ser separadas sobre la tira, y se permite que migren a sus posiciones de equilibrio bajo la influencia de un campo eléctrico (no representado). Una vez 55 que se ha conseguido el equilibrio, se retira la tira del campo y se coloca sobre el chip adyacente a la sección de carga 28. Las moléculas enfocadas son entonces transferidas lateralmente sobre la sección de carga, y puede tener lugar la electroforesis del modo normal, a lo largo de la sección de separación 26.

La transferencia de las moléculas desde la tira de enfoque a la sección de carga puede realizarse de una diversidad 60 de formas. Como se ve mejor en la Figura 3, las moléculas pueden ser movidas lateralmente por electroforesis, simplemente aplicando para ello un campo de impulsos coros en la dirección de la flecha 32. Como alternativa, se pueden transferir las moléculas a su través por lavado y/o secado.

Como antes, con objeto de permitir movimiento de las moléculas dentro de la sección de separación, se ha de 65 cambiar el estado de electroforesis de las moléculas. Esto podría hacerse como se ha descrito en lo que antecede. Como alternativa, si hay presente suficiente detergente (tal como el SDS) dentro de la parte de carga 28, ese puede ser, por sí solo, suficiente para desnaturalizar las proteínas. También se pueden usar otras técnicas para conseguir ese resultado.

Exactamente de la misma forma que en la primera realización, las proteínas son reproducidas en imagen a medida 65 que se van separando a lo largo de la sección de separación 26. Los pesos moleculares de las proteínas son establecidos midiendo para ello la velocidad en una multitud de puntos, y se reconstruyen mediante una, o una combinación, de las técnicas antes mencionadas. Se usa después el algoritmo PCT/GB01/03286 para establecer desde dónde empiezan las proteínas dentro de la sección de carga 28. Obtenemos así la velocidad de las proteínas, que es una medida de su

## ES 2 339 744 T3

peso molecular, y también el punto de partida, el cual es una medida del potencial isoelectrico en el cual encontro originalmente el equilibrio la proteina.

5 En la Figura 4 se ha representado esquemáticamente un mecanismo de transferencia lateralmente, bastante similar pero esta vez realizado en un solo chip. Aquí, una sección de carga 34 de un canal de separación 36 está dispuesta adyacente a un canal de enfoque corto 38, el cual contiene un gel que tiene un pH que varía a lo largo de su longitud. Se carga primero dentro del canal de enfoque 38 una muestra de las moléculas a ser separadas, y se permite que las moléculas se muevan yendo a sus posiciones de equilibrio bajo la influencia de un campo eléctrico generado por una diferencia de potencial aplicada entre los electrodos 40, 42. Una vez logrado el equilibrio, se mueven lateralmente las moléculas al canal de separación mediante un impulso de voltaje aplicado a los electrodos laterales 44, 46. Se aplica después un voltaje de separación entre los electrodos de separación 48, 50, que hace que las moléculas migren bajando por el canal de separación 36 hacia el electrodo 50. Al igual que antes, puede haber necesidad de un paso intermedio para cambiar el estado electroforético de las moléculas, para asegurar que las mismas se muevan a lo largo del canal de separación.

15 En realizaciones alternativas, puede ser conveniente replicar los canales de separación numerosas veces en un solo chip, de modo que se puedan llevar a cabo múltiples separaciones en paralelo. Esto proporciona una producción mucho mayor, y también permite comparaciones directas de dos o de muchas muestras. Por ejemplo, una muestra podría ser la de un paciente con sospecha de cáncer, la otra una muestra como punto de referencia. O bien, una podría ser una muestra moderada con droga, y otra la de punto de referencia. Análogamente, se pueden estudiar los cambios relativos inducidos por los cambios en un régimen farmacogenético dado. En un chip típico de 40 mm x 40 mm, podría haber, por ejemplo, 128 de tales canales, siendo tanto la anchura de canal para el canal electroforético (sección de separación) como la del canal isoelectrico (sección de enfoque), ambas de 50 micrómetros en sentido transversal.

25 En la Figura 5(a) se ha representado una realización específica que sirve de ejemplo de este tipo, en la cual tanto la sección de enfoque como la sección de separación están contenidas en un solo chip. Se comprenderá, sin embargo, que tanto la realización de la Figura 1 como la realización de la Figura 2 podrían ser también fabricadas con múltiples microcanales paralelos.

30 En la Figura 5, se han usado números de referencia idénticos a los que se usaron en la Figura 4. En consecuencia, las áreas moteadas 48, 50 representan los electrodos de electroforesis, con los números 44, 46 para los electrodos laterales (los electrodos 40, 42 usados para crear el equilibrio isoelectrico no se han representado). La referencia 38 designa el microcanal de enfoque, con su gel isoelectrico graduado, y la 34 el microcanal de separación adyacente con su gel de electroforesis. Como alternativa, puede haber un solo microcanal en el chip para cada uno, con parte del microcanal ocupada con gel que tiene un gradiente de pH y una parte adyacente con gel que no tiene gradiente del pH, formando esta última, por supuesto, el canal de separación. Las moléculas son entonces simplemente movidas lateralmente de una parte del gel a la otra.

40 Como se ha ilustrado en la Figura 5(b), en primer lugar se insertan las proteínas 52 dentro del microcanal de enfoque 38, y se permite que alcancen el equilibrio mientras se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos 40, 42 (Figura 4).

45 A continuación, como se ha ilustrado en la Figura 5(c), al alcanzar las bandas de proteína el equilibrio, se aplica el voltaje a través de los electrodos laterales 44, 46, para mover las proteínas lateralmente al interior del microcanal de separación 34.

Finalmente, como se ha representado en la Figura 5(d), se aplica un voltaje a través de los electrodos de electroforesis, que hace que las proteínas migren a lo largo de los canales de separación, donde son seguidas y reproducidas en imagen (no representado).

50 En las realizaciones de ya sean de un único canal o ya sean de múltiples canales, se puede llevar a cabo el reconocimiento del patrón en tiempo real, siendo recogidas automáticamente las moléculas seleccionadas al final del canal de separación, de acuerdo con los resultados del análisis. Esto se puede conseguir, preferiblemente, proporcionando un extremo bifurcado en uno o en todos los canales de separación, como se ha ilustrado en la Figura 7, siendo recogidas las muestras seleccionadas por medio de un conmutador de alto voltaje que es hecho actuar automáticamente, de acuerdo con los resultados del procedimiento de análisis que está siendo llevado a cabo en tiempo real.

60 En la Figura 7 se ha representado esquemáticamente el mecanismo de recogida preferido. La parte extrema del microcanal de separación está bifurcada, e incluye un primer camino 64 y un segundo camino 66. Cuando una banda particular que haya de ser recogida llega a la bifurcación, desplazándose en la dirección de la flecha 62, se aplica un alto voltaje de recogida entre los electrodos 70 y 72, para hacer que las moléculas pasen bajando por el interior del canal 66. Una vez que se haya recogido la muestra requerida, se conmuta el voltaje de recogida a través de los electrodos 68 y 70, haciendo con ello que todas las moléculas siguientes pasen bajando por el canal 64. Puede entonces aislarse en tiempo real una proteína de muestra dada, de interés, después del reconocimiento automático por el software.

65 Los conceptos generales antes considerados pueden ser generalizados al uso de más de un canal de separación. Por ejemplo, como se ha ilustrado en la Figura 6, las moléculas 79 para separación se colocan inicialmente en un

## ES 2 339 744 T3

primer canal 80, y se permite que se separen. Una vez que se haya completado la separación en ese canal, se mueven las moléculas atravesando a un segundo canal 82, moviéndose entonces las moléculas en ese canal. Finalmente, se mueven las moléculas atravesando a un tercer canal 84, donde se repite el proceso. La posición y/o la velocidad de las moléculas dentro de los canales 80, 82, 84 pueden detectarse en tiempo real mediante los detectores 86. Por supuesto, podrían contemplarse más canales. Los mecanismos mediante los cuales se mueven las moléculas dentro de los canales individuales serán típicamente diferentes, para permitir un estudio independiente de varios aspectos de la configuración o de la estructura molecular. Los pueden diferir en una diversidad de formas, de acuerdo con las separaciones requeridas o con los aspectos moleculares que estén siendo estudiados. Como características de los canales que difieren, se podrían incluir: los campos eléctricos, los campos magnéticos, los gradientes del pH, los gradientes de la concentración química, los gradientes de la temperatura, los gradientes de la densidad, etc. Esto permite usar varias propiedades diferentes de las moléculas, para permitir una selectividad y una resolución todavía mayores.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para separar moléculas biológicas, que comprende:

5 (a) aplicar un primer campo eléctrico a las moléculas para hacer que éstas migren, en un canal de enfoque lineal común, hacia sus respectivos puntos de equilibrio isoelectrico, para producir una separación isoelectrica lineal;

(b) cambiar el estado electroforético de las moléculas; y

10 (c) aplicar un segundo campo eléctrico a la separación isoelectrica en una dirección a lo largo de la separación isoelectrica, para hacer que las moléculas migren y se separen en un canal de separación lineal común.

2. Un método según la reivindicación 1, en el cual el canal de enfoque es adyacente a por lo menos una parte inicial del canal de separación.

3. Un método según la reivindicación 1, en el cual el canal de enfoque es contiguo, extremo con extremo, al canal de separación, de modo que las moléculas que salen por el extremo del canal de enfoque se mueven entrando por el comienzo del canal de separación.

4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual se cambia el estado electroforético de las moléculas por desnaturalización.

5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual se cambia el estado elfito de las moléculas por exposición de las mismas a un detergente.

6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se cambia el estado electroforético de las moléculas por calentamiento.

7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye medir o determinar la velocidad de las moléculas al migrar éstas en el canal de separación.

8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que incluye determinar, a partir del movimiento de las moléculas dentro del canal de separación, sus respectivas relaciones de carga/masa y puntos de equilibrio isoelectrico.

9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que incluye analizar el movimiento de las moléculas en el canal de separación y recoger automáticamente una muestra de las moléculas de interés, dependiendo del resultado del análisis.

10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual las moléculas son proteínas.

11. Aparato para separar moléculas biológicas, que comprende:

45 (a) un canal de enfoque lineal (14, 30, 38, 80) dispuesto para, cuando se aplica un primer campo eléctrico a lo largo de la longitud del canal, hacer que las moléculas migren hacia sus respectivos puntos de equilibrio isoelectrico, para producir una separación isoelectrica lineal; y

50 (b) un canal de separación lineal común (16, 26, 36, 82), en el cual migran las moléculas cuando se aplica un segundo campo eléctrico a la separación isoelectrica en una dirección a lo largo de la separación isoelectrica.

12. Aparato según la reivindicación 11, en el cual el canal de enfoque (30, 38, 80) está dispuesto adyacente a por lo menos una parte inicial (28, 34) del canal de separación (26, 36, 82).

55 13. Aparato según la reivindicación 12, que incluye medios de transferencia para transferir las moléculas lateralmente desde el canal de enfoque al canal de separación.

14. Aparato según la reivindicación 13, en el cual los medios de transferencia comprenden electrodos (44, 46) para crear un campo eléctrico.

60 15. Aparato según la reivindicación 13, en el cual los medios de transferencia comprenden medios de secador.

65 16. Aparato según la reivindicación 11, en el cual el canal de enfoque (14) es contiguo, extremo con extremo, al canal de separación (16), de modo que las moléculas que salen por el extremo del canal de enfoque se mueven entrando por el comienzo del canal de separación.

17. Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en el cual el aparato incluye un chip (10), estando definido el canal de separación por un canal en el chip.

## ES 2 339 744 T3

18. Aparato según la reivindicación 17, en el cual el canal de enfoque está también definido por un canal en el chips (10).
- 5 19. Aparato según la reivindicación 17, en el cual el canal de enfoque está definido por una tira de enfoque isoe-  
léctrico (30).
20. Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, que incluye medios (23) para medir o determinar la velocidad de las moléculas al migrar éstas a lo largo del canal de separación.
- 10 21. Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, que incluye medios para determinar, a partir del movimiento de las moléculas dentro del canal de separación, sus respectivas relaciones de carga/masa y puntos de equilibrio isoelectrico.
- 15 22. Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, que incluye medios para analizar el movimiento de las moléculas a lo largo del canal de separación, y medios (66, 68, 70) para recoger automáticamente una muestra de las moléculas de interés.
- 20 23. Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 22, que incluye una pluralidad de canales de separación lineal adyacentes (34).
24. Aparato según la reivindicación 23, que incluye una pluralidad correspondiente de canales de enfoque lineal adyacentes (38).
25. Aparato según la reivindicación 11, que incluye una pluralidad de canales de enfoque (38) y una pluralidad correspondiente de canales de separación adyacentes (34), contenidos todos en un solo chip.
- 30 26. Aparato según la reivindicación 25, que incluye electrodos laterales primero y segundo (44, 46) para generar un campo eléctrico para transferir simultáneamente las moléculas en cada canal de enfoque lateralmente adentro de un canal de separación adyacente correspondiente.
27. Aparato según la reivindicación 12, que incluye un canal de separación más (84) adyacente al citado canal de separación (82).
- 35 28. Aparato según la reivindicación 12, en el cual el canal de enfoque y el canal de separación están dispuestos sobre un gel común.
29. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el cual el segundo campo eléctrico se extiende en toda la longitud de la separación isoelectrica.
- 40 30. Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 28, en el cual el segundo campo eléctrico se extiende en toda la longitud de la separación isoelectrica.

45

50

55

60

65

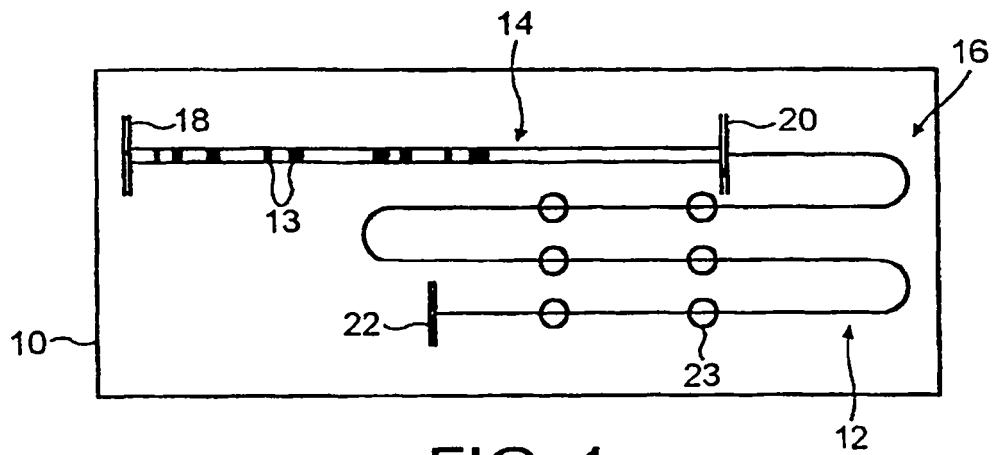


FIG. 1

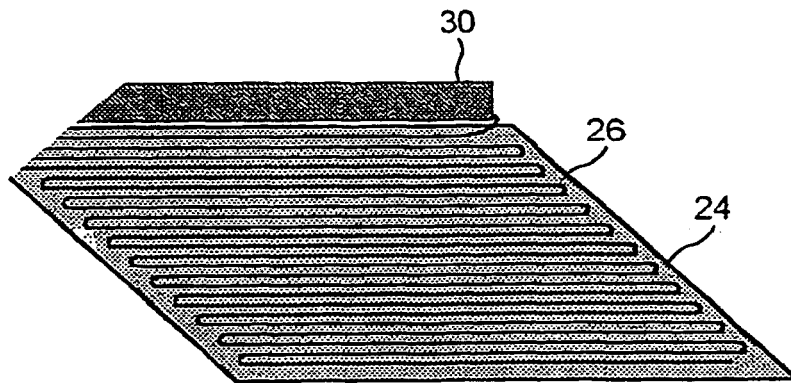


FIG. 2

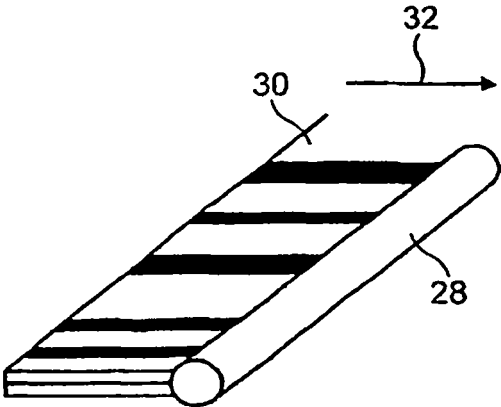


FIG. 3

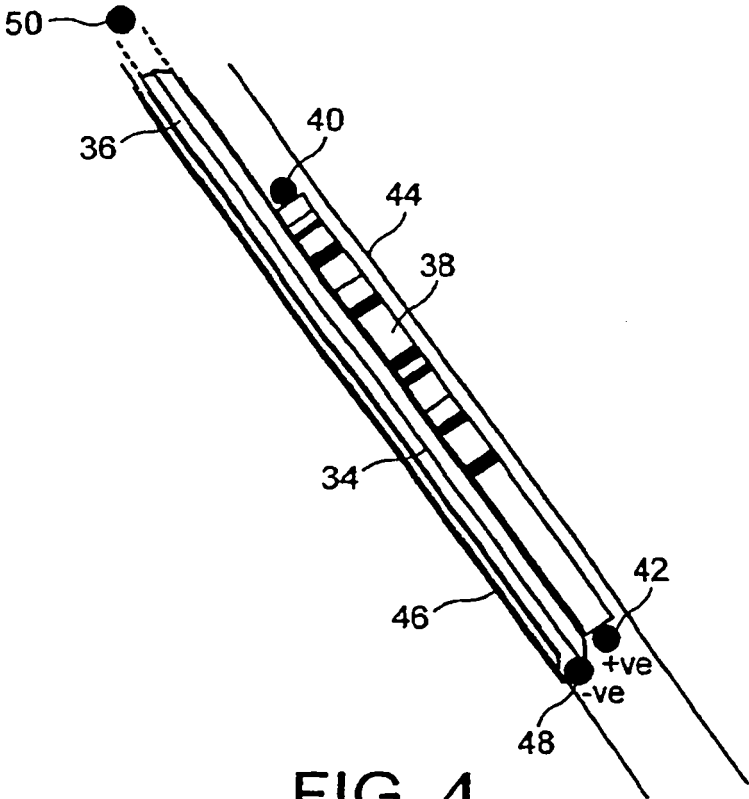


FIG. 4

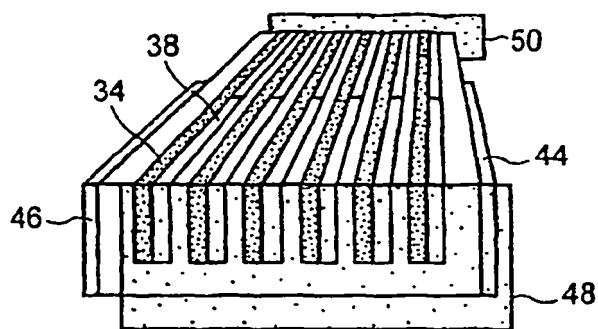


FIG. 5a

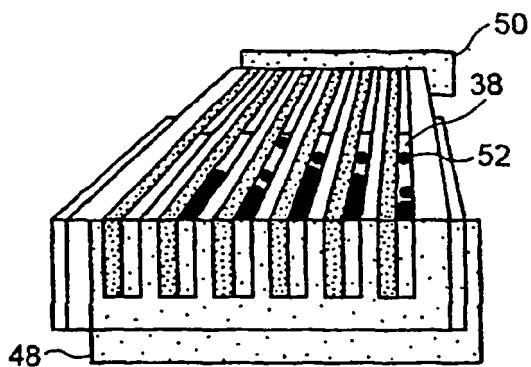


FIG. 5b

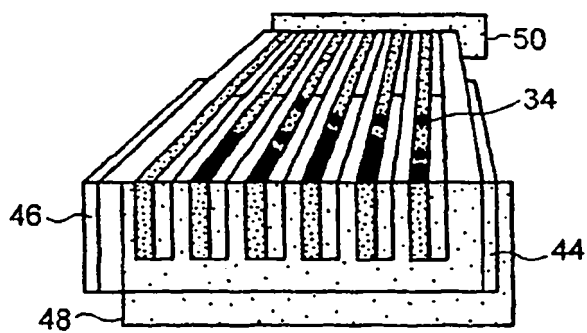


FIG. 5c

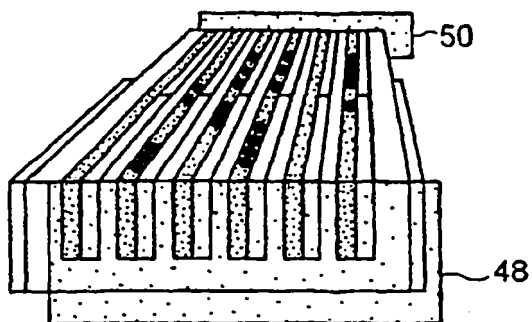


FIG. 5d

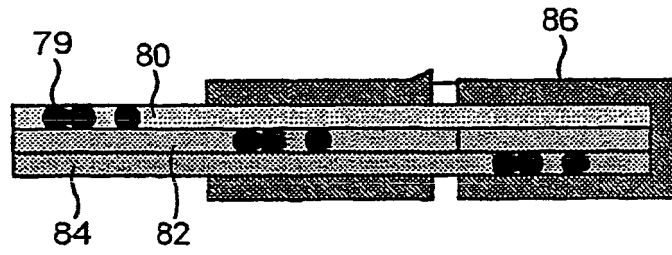


FIG. 6

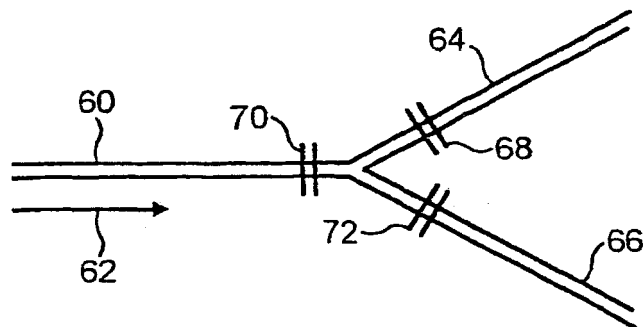


FIG. 7