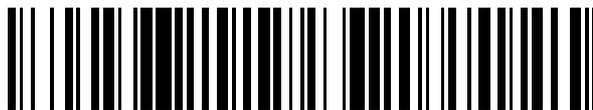


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 692**

21 Número de solicitud: 201230363

51 Int. Cl.:

G01N 27/447 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

12.03.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

31.10.2013

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

10.12.2013

Fecha de la concesión:

22.09.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

29.09.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (100.0%)
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**GARCÍA-RUIZ, Carmen;
LÓPEZ-LÓPEZ, María;
SÁIZ GALINDO, Jorge;
GONZÁLEZ HERRÁEZ, Miguel y
CALCERRADA GUERREIRO, Matías**

74 Agente/Representante:

GUTIÉRREZ DE MESA, José Antonio

54 Título: **CAPILARES MICRO-ESTRUCTURADOS MEDIANTE UN DISEÑO INTELIGENTE PARA ELECTROFORESIS CAPILAR DE ALTO RENDIMIENTO**

57 Resumen:

Esta invención se refiere al desarrollo de capilares micro-estructurados con diseño inteligente para su utilización como componente básico en equipos de electroforesis capilar (CE) de alto rendimiento, que permitan una mejora en la resolución y un aumento en la sensibilidad de detección respecto a los capilares convencionales. Esta invención supone lograr una nueva generación de sistemas CE de alto rendimiento en cuanto a capacidad de separación y detección.

La invención consiste en el diseño de capilares para CE, con multitud de canales de pequeño diámetro organizados en su interior. La organización inteligente de los canales puede ofrecer un aumento de sensibilidad en sistemas de detección óptica. Estos capilares son de aplicación en cualquier equipo de CE convencional y en su interior se puede llevar a cabo la separación tanto de pequeñas moléculas e iones como de grandes macromoléculas.

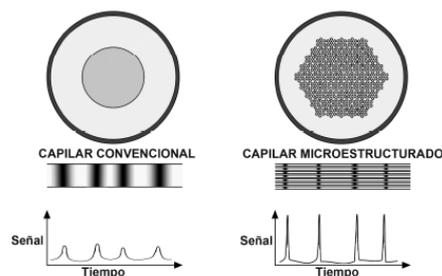


Figura 1

ES 2 427 692 B1

DESCRIPCIÓN

CAPILARES MICRO-ESTRUCTURADOS MEDIANTE UN DISEÑO INTELIGENTE PARA ELECTROFORESIS CAPILAR DE ALTO RENDIMIENTO

5 La presente invención se refiere al uso de capilares micro-estructurados con un
diseño inteligente para electroforesis capilar (CE). Estos capilares permiten (I) mejoras
en la resolución de las separaciones analíticas, debido a la disminución del diámetro
interno de los canales internos en comparación con el de los capilares convencionales, y
(II) aumentos en la sensibilidad de detección por la reducción del ensanchamiento de
10 banda producida en canales más estrechos y por el diseño inteligente de los propios
capilares y la correcta distribución de los canales internos teniendo en cuenta detectores
ópticos.

SECTOR DE LA TÉCNICA

15 La presente invención tiene su campo de aplicación dentro del área de la
Química y la Tecnología Química y utiliza como técnica analítica la CE. En particular,
esta invención se refiere al uso de capilares micro-estructurados para su utilización en
equipos comerciales, caseros y portátiles de CE.

ESTADO DE LA TÉCNICA

20 Es bien sabido que la disminución del diámetro interno del capilar mejora la
resolución de las separaciones analíticas debido a la disminución del calor producido en
el interior del capilar por el efecto Joule [1]. Por esta razón, se suelen emplear capilares
con diámetros internos reducidos para la separación de pequeñas moléculas o iones. Sin
25 embargo, el uso de capilares con canales más pequeños presenta una desventaja
importante porque la sensibilidad de detección se reduce según el diámetro interno
disminuye.

30 La reducción del diámetro interno del capilar disminuye el espacio ocupado por
el canal del capilar. Esto permite la inclusión de nuevos canales dentro de la misma
matriz, creando capilares con multitud de canales. Este concepto se ha estado utilizando
en óptica durante años para la creación de fibras ópticas micro-estructuradas. Sin

embargo, el uso de estas fibras en CE es una idea reciente y de muy escasa aplicación. Se han utilizado fibras de 54 canales de 3,7 μm cada uno incluidas en microchips en dos trabajos científicos. En el primero, se observó una mejora de hasta un 60 % en la resolución de separación de una mezcla de fluoresceína y rodamina 123, en
5 comparación con la separación en un microchip de vidrio convencional [2]. En el segundo, se llevó a cabo la separación de una muestra de ADN, también con mejoras en la resolución en comparación con un microchip de vidrio con el mismo área de sección transversal [3]. En un tercer trabajo, llevado a cabo con fibras de 10 centímetros de longitud con 30, 54, 84 y 168 canales de unos 5 μm de diámetro interno y sin la
10 tecnología de microchip, se llevo a cabo la separación de péptidos marcados con mejoras de resolución de hasta el 82% [4].

A la vista de los trabajos publicados, resulta muy interesante el empleo de este tipo de capilares micro-estructurados para su uso en equipos de CE. Su aplicación puede ser muy amplia, cubriendo campos de análisis muy diferentes; desde el análisis de
15 muestras con pequeñas moléculas e iones hasta con grandes macromoléculas como el ADN y las proteínas.

Si bien se han utilizado fibras micro-estructuradas en separaciones electroforéticas, hasta la fecha no se ha trabajado en el diseño inteligente de capilares micro-estructurados que permita mejoras de sensibilidad de detección sin precedentes.
20

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se describe el diseño inteligente de capilares micro-estructurados para su empleo en CE. Estos capilares micro-estructurados consisten en un único capilar (normalmente de sílice fundida, recubierta de poliimida, aunque
25 pueden realizarse sobre otros materiales) con multitud de canales de pequeño diámetro apilados en su interior y distribuidos de una manera específica.

La resolución de la CE depende del ensanchamiento de los picos obtenidos en un electroforegrama. El ensanchamiento, y por tanto, la pérdida de resolución, se produce
30 por diferentes efectos de transporte indeseables como son: (I) la difusión de los analitos desde zonas más concentradas a menos concentradas, (II) la convección producida por la aplicación de un campo eléctrico, y (III) el flujo térmico debido al movimiento del

líquido a las zonas de menor temperatura. Estos efectos, que afectan a la separación de las bandas y al rendimiento separativo, se minimizan si se reduce el diámetro interno del capilar. Sin embargo, una disminución excesiva del diámetro interno del capilar (menor que una micra) presenta como inconvenientes la necesidad de utilizar una presión

5 extremadamente alta para introducir disoluciones o muestras dentro del capilar y una disminución de la eficacia de detección, debido a que la cantidad de muestra analizada disminuye en proporción a la reducción del área de la sección transversal del canal. La configuración de multitud de canales en el mismo capilar hace que la sensibilidad de detección apenas se vea modificada si el área de la sección transversal se mantiene

10 inalterada en relación con los diámetros internos de los capilares convencionales más comunes (50 y 75 μm). A modo de ejemplo, en la FIG. 1, se muestra de modo esquemático, una posible estructura de un capilar micro-estructurado con multitud de canales. En esta figura, se aprecia como se ha sustituido el canal único de un capilar convencional de 50 μm de diámetro interno por 625 canales de 1 μm de diámetro

15 interno, manteniendo el mismo área de la sección transversal de los canales. Además de la potencial mejora de resolución de separación (picos más separados entre sí) se aprecia una mejora de sensibilidad debido al menor ensanchamiento de banda dentro de los canales del capilar micro-estructurado. Por otro lado, en la FIG. 2 se aprecia de manera esquemática que si se mantiene el diámetro externo del capilar micro-

20 estructurado puede acoplarse fácilmente a cualquier equipo de CE. Aunque en esta figura se haya indicado un sistema de detección sobre el capilar (p.ej. detección óptica o por conductividad), los capilares micro-estructurados también pueden emplearse con sistemas de detección acoplables al final de capilar (p. ej. espectrometría de masas o electroquímicos).

25

El diseño inteligente de capilares micro-estructurados se basa en la correcta distribución y organización de los canales en el interior del capilar de manera que permita conseguir, una maximización del solapamiento entre un bombeo óptico transversal y el analito, y por otro lado, una densidad de potencia de la luz incidente

30 considerablemente mayor en el interior del capilar, de manera que aumente la eficiencia de interacción entre la radiación y el contenido del capilar. Debido a que la detección y el comportamiento óptico dependen del tipo de radiación, es decir, de la longitud de

onda, cada sistema de detección requerirá un diseño del capilar diferente. Como ejemplo, se han realizado diseños para sistemas de detección excitados con radiación monocromática como fluorescencia inducida por laser (LIF) o espectroscopia Raman. El diseño inteligente de capilares micro-estructurados se realiza para conseguir
5 incrementos en la sensibilidad de detección de varios órdenes de magnitud. En algunos de los diseños realizados, el espaciado entre los canales del capilar se hace constante en la dirección de propagación de la luz, fijándose el espaciado de forma que se consiga un aumento de la densidad de potencia de la radiación incidente dentro del capilar. En otros diseños, se disponen los canales del capilar de forma que las reflexiones múltiples en el
10 interior del capilar consigan elevar la interacción entre la luz y el analito.

Ventajas principales del invento.

Las ventajas principales del invento son las siguientes:

15

- La utilización de capilares micro-estructurados descritos permitiría un mayor rendimiento de separación que los capilares convencionales.
- A diferencia de los capilares convencionales de diámetros internos pequeños, la sensibilidad de la detección no se ve reducida con el uso de los capilares
20 descritos en esta invención.
- La utilización de los capilares descritos supone un aumento de la sensibilidad de detección de varios órdenes de magnitud.
- Los capilares descritos pueden utilizarse en cualquier equipo de CE (comercial, casero o portátil).
- 25 - El uso de los capilares descritos no limita el número de aplicaciones analíticas a desarrollar. Mediante los capilares micro-estructurados pueden llevarse a cabo el análisis de todo tipo de muestras y son compatibles con cualquier detector utilizado en CE, hecho que amplía enormemente su campo de aplicación.

30

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Esquema mostrando un capilar de 50 μm de diámetro interno y el diseño de un capilar micro-estructurado. El capilar micro-estructurado consiste en 625 canales de 1 μm de diámetro interno cada uno con un área de la sección transversal total del conjunto de canales equivalente al de un capilar de 50 μm de diámetro interno. En la figura se ilustra la mejora potencial en la separación de una muestra cualquiera empleando un capilar micro-estructurado en comparación con un capilar normal.

FIG. 2. Esquema mostrando la ubicación del capilar micro-estructurado en un equipo de CE. Componentes: (1) capilar micro-estructurado con diseño inteligente, (2) fuente de alto voltaje, (3) detector, (4) electrodos, (5) viales conteniendo el medio de separación.

MODO DE REALIZACIÓN

En una realización preferida del diseño de la presente invención, de acuerdo a la FIG. 1, el número de canales del capilar micro-estructurado sería de 625 con un diámetro interno único de cada canal de 1 μm , siendo el área de sección transversal equivalente a la de un capilar de 50 μm de diámetro interno. El diámetro externo sería de en torno a 360 μm . En esta realización preferida la distribución de los canales del capilar se diseña para una longitud monocromática de 488 nm, empleada frecuentemente en LIF. En este ejemplo, el espaciado entre los canales es un valor cercano a un múltiplo de 488 nm dividido por el doble del “índice efectivo” dentro del capilar. Otra realización preferida puede ser que transversalmente la fibra se comporte como un resonador de forma circular (omnidireccional), mediante la creación de discontinuidades del índice con simetría radial.

Otras realizaciones preferidas comprenden las posibles combinaciones de diferentes valores de áreas de sección transversal de los canales internos de los capilares con los posibles diseños específicos del ordenamiento de los canales internos para otras longitudes de onda.

En CE, el uso de los capilares descritos en la presente invención sería dependiente del sistema de detección usado y de la aplicación que se realice. Debido a

que cada diseño de los capilares es específico para una o varias longitudes de onda concretas, es necesario seleccionar un capilar determinado dependiendo de la detección que se vaya a utilizar. El capilar a usar también es dependiente del tipo de aplicación que se quiera llevar a cabo debido a las características de los analitos a determinar como
5 son su naturaleza (neutra, catiónica o aniónica) y tamaño molecular.

De manera general, cuando se usen los capilares de la presente invención con sistemas de detección ópticos, es necesario eliminar una porción de unos milímetros del recubrimiento del capilar para crear una ventana de detección y posibilitar la detección
10 sobre el propio capilar. En cualquier caso, es necesario emplazar el capilar en el equipo de CE en el que se va a utilizar. Este procedimiento depende de cada equipo. En los equipos comerciales de CE el capilar se coloca habitualmente en un cartucho previamente a su ubicación en el interior del equipo. Sin embargo, en equipos de CE caseros o portátiles la instalación del capilar es más flexible.

15

El uso de los capilares como soporte separativo se desprende y es específico de la aplicación. Sin embargo, de manera general, es necesario pre-acondicionar los capilares previamente a su uso. Tras el acondicionamiento de los canales del capilar, se rellenan con un tampón de separación y posteriormente se introduce la muestra cuyos
20 analitos se quieren determinar. La introducción de la muestra se puede realizar de manera hidrodinámica o electrocinética. Por último, la separación se realiza introduciendo los extremos del capilar en viales rellenos del medio de separación y aplicando una diferencia de potencial entre ambos extremos.

25 **APLICACIÓN INDUSTRIAL**

La utilización de los capilares micro-estructurados con un diseño inteligente permite el análisis de todo tipo de muestras de interés que puedan analizarse mediante la técnica de CE. Estas aplicaciones comprenden el diagnóstico clínico, control de calidad de
30 alimentos, análisis de ADN, análisis forenses y análisis de fármacos y drogas, entre muchas otras.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Daniel C. Harris, *Análisis Químico Cuantitativo*, 3ª Edición, Editorial Reverté (Barcelona, España) 2007.
- 5 [2] Y. Sun, Y. Chian Kwok, N. Trung Nguyen, *Electrophoresis* 28 (2007) 4765-4768.
- [3] Y. Sun, N. Trung Nguyen Y. Chian Kwok, *Anal. Bioanal. Chem* 394 (2009) 1707-1710.
- [4] B. Rogers, G. T. T. Gibson, R. D. Oleschuk, *Electrophoresis* 32 (2011) 223-229.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Capilares micro-estructurados para electroforesis capilar **caracterizados** por comprender entre 5 y 625 canales de diámetro homogéneo apilados en su interior.
2. Capilares según la reivindicación 1 **caracterizados** por comprender entre 5 y 100 canales apilados en su interior.
- 10 3. Capilares micro-estructurados según la reivindicación 1 y 2, **caracterizado** por comprender canales internos de entre 5-30 μm de diámetro interno.
- 15 4. Capilares micro-estructurados según la reivindicación 1 y 2, **caracterizado** por comprender distancias entre canales de entre 1-20 μm en existencia/ausencia de núcleo dopado.
5. Uso de capilares según las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4 **para** el análisis de compuestos con concentraciones iguales o menores a 10^{-6} M.
- 20 6. Uso de capilares micro-estructurados según las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4 en electroforesis capilar **para** su utilización con los distintos sistemas de detección posibles.
- 25 7. Uso de capilares micro-estructurados según la reivindicación 1, 2, 3 y 4 **para** su utilización en cualquier equipo de CE (comercial, casero o portátil).
- 30 8. Uso de capilares micro-estructurados según las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4 **caracterizado** porque amplifica la señal producida al emplear sistemas de detección excitados con radiación monocromática como LIF y espectroscopia Raman.

9. Uso de capilares micro-estructurados según la reivindicación 1, 2, 3 y 4 **para** el análisis de iones, moléculas y macromoléculas (de tamaños comprendidos entre 1 y 2500 Å) contenidas en muestras forenses, biológicas, de alimentos, medioambientales, farmacéuticas y médicas mediante CE.

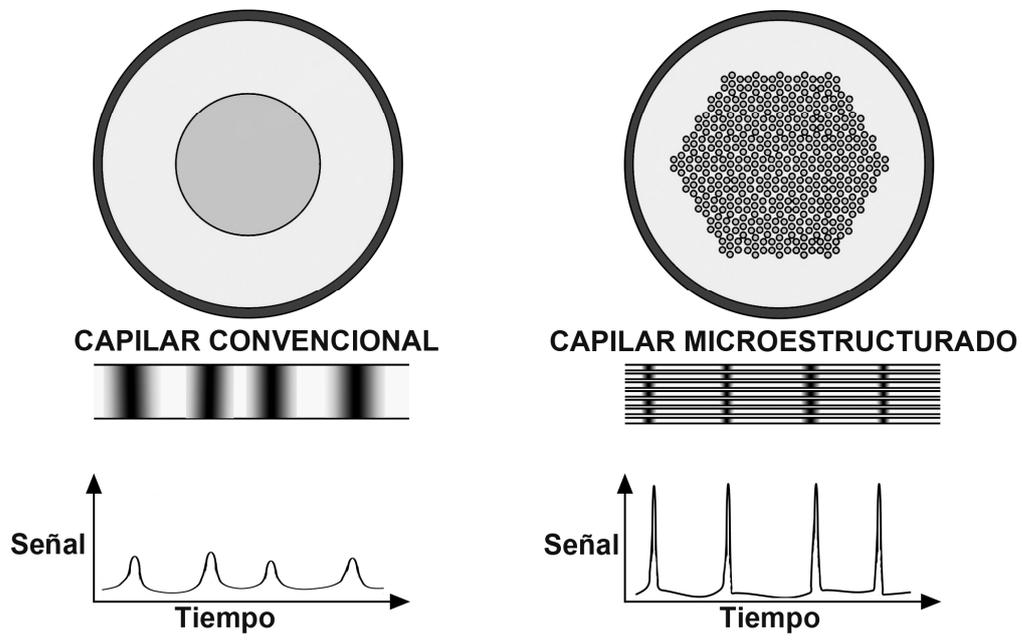


Figura 1

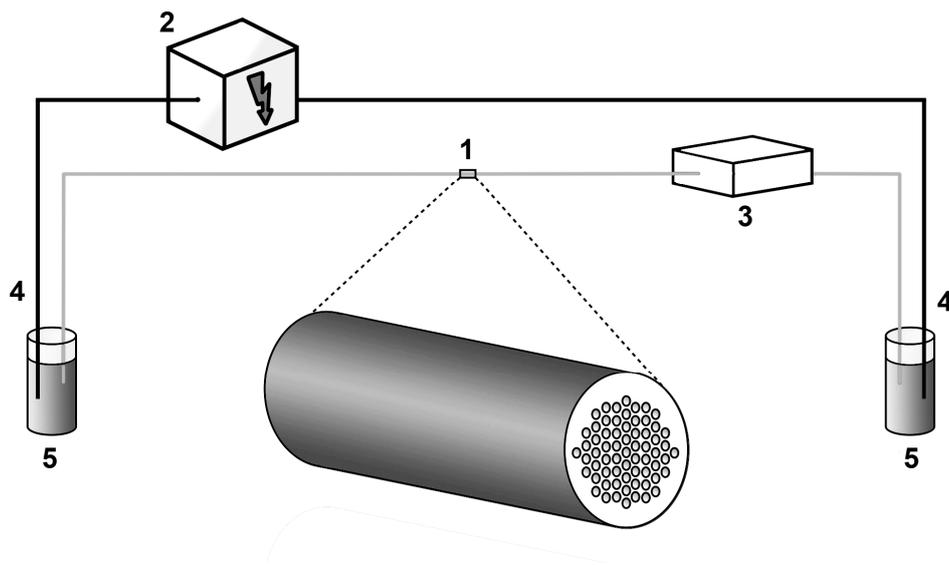


Figura 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201230363

②² Fecha de presentación de la solicitud: 12.03.2012

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **G01N27/447** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ROGERS B. et al. "Bundled capillary electrophoresis using microstructured fibres" ELECTROPHORESIS (20 enero 2011) Vol. 32, N.º. 2, páginas 223 - 229; DOI: 10.1002/elps.201000442; todo el documento.	1-9
X	SUN Y. et al. "Faster and improved microchip electrophoresis using a capillary bundle" ELECTROPHORESIS (10 diciembre 2007) Vol. 28, N.º. 24, páginas 4765 - 4768; DOI: 10.1002/elps.200700259; todo el documento.	1-9
X	SUN Y. et al. "Enhanced electrophoretic DNA separation in photonic crystal fiber" Analytical and Bioanalytical Chemistry (junio 2009) Vol. 394, N.º. 6, páginas 1707 - 1710; todo el documento.	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
26.11.2013

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, bases de texto completo TXT, XPESP/ELSEVIER, INSPEC/IEE, MEDLINE/NLM, Compendex/EI, BIOSIS, EMBASE/ELSEVIER, XPI3E/IEEE,

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.11.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-9	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-9	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ROGERS B. et al. "Bundled capillary electrophoresis using microstructured fibres" ELECTROPHORESIS, Vol. 32, N°. 2, páginas 223 - 229; DOI: 10.1002/elps.201000442.	20.01.2011
D02	SUN Y. et al. "Faster and improved microchip electrophoresis using a capillary bundle" ELECTROPHORESIS, Vol. 28, N°. 24, páginas 4765 - 4768; DOI: 10.1002/elps.200700259.	10.12.2007
D03	SUN Y. et al. "Enhanced electrophoretic DNA separation in photonic crystal fiber" Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 394, N°. 6, páginas 1707 - 1710.	Junio 2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-9, son capilares microestructurados para electroforesis capilar que contienen microcanales de diámetro homogéneo apilados en su interior (reiv. 1-4). Es también objeto de la invención el uso de dichos capilares (reiv. 5-9).

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga el uso de fibras microestructuradas que comprenden un paquete de canales (de entre 30 a 168 canales) de un diámetro interno de unas 5 micras, para la electroforesis capilar. A la vista de la figura 1, se puede comprobar que la distancia entre los canales es de 5 a 20 micras. El uso de estas fibras mejora la eficiencia en la separación de moléculas. Estas fibras microestructuradas tienen un área de sección transversal equivalentes a los capilares convencionales de electroforesis capilar, y pueden ser utilizadas en electroforesis capilar con sistemas de detección como el LIF. En este documento se divulga la mejor separación que se obtiene de fragmentos de ADN, sondas fluorescentes y péptidos marcados, utilizando las fibras microestructuradas. Además, este tipo de fibras son útiles para el análisis integrado de electroforesis capilar y espectrometría de masas.

Los documentos D02 y D03 divulgan el uso de fibras de cristal fotónico en electroforesis capilar. Estas fibras contienen 54 capilares cada uno con un diámetro interno de 3,7 micras. En el documento D02 se hizo un estudio de separación de una mezcla de fluoresceína (100nM) y rodamina (200nM), mientras que en el documento D03 se separaron fragmentos de ADN. En ambos casos se obtuvo una mejora en la resolución de la separación de hasta un 60% utilizando estas fibras, en comparación con un microchip de vidrio convencional. En los dos estudios el sistema de detección fue un microscopio confocal invertido.

A la vista de los documentos citados, la utilización de capilares microestructurados para electroforesis capilar ya es conocida en el estado de la técnica. Como se puede ver en dichos documentos, ya se conoce que este tipo de capilares mejora considerablemente la resolución de la separación de distintas moléculas. Los capilares pueden ser fabricados según las necesidades de la muestra a analizar, pudiendo estar formados por un número variable de canales internos de un diámetro de pocas micras, manteniendo un área de sección transversal equivalente a los capilares convencionales de electroforesis capilar. De esta forma, pueden ser utilizados en cualquier equipo de electroforesis capilar y acoplarlos con distintos sistemas de detección.

Por lo tanto, las características de las reivindicaciones 1-9 ya son conocidas del documento D01, y derivan directamente y sin ningún equívoco de los documentos D02 y D03. Por lo tanto el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 1-9 no son nuevas ni implican actividad inventiva en el sentido de los art. 6.1 y 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.