



(11) Número de Publicação: **PT 1383603 E**

(51) Classificação Internacional:

B01L 3/00 (2006.01) **G01N 30/92** (2006.01)

G01N 30/38 (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2002.04.11	(73) Titular(es): VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL PLEINLAAN 2 B-1050 BRUSSELS BE
(30) Prioridade(s): 2001.04.26 EP 0187009	
(43) Data de publicação do pedido: 2004.01.28	(72) Inventor(es): GINO BARON GERT DESMET BE BE
(45) Data e BPI da concessão: 2006.08.25 001/2007	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PROCESSO PARA A ACELERAÇÃO E INTESIFICAÇÃO DA LIGAÇÃO RECEPTOR-ALVO E DISPOSITIVO PARA ESTE FIM**

(57) Resumo:

Resumo

"Processo para a aceleração e intensificação da ligação receptor- alvo e dispositivo para este fim"

A presente invenção diz respeito a um dispositivo para a realização simultânea de uma multiplicidade de reacções de ligação sobre um substrato com uma primeira superfície, a dita superfície compreendendo locais discretos e isolados de uma tal reacção de ligação, a dita reacção de ligação é gerada por contacto entre o substrato e uma amostra fluida compreendendo uma ou mais moléculas alvo capazes de se ligarem pelo menos com uma molécula receptora pelo menos parcialmente ancorada à dita primeira superfície do substrato, e compreendendo ainda meios de aumentar o fluxo do fluido por difusão da amostra sobre o substrato, em que os ditos meios de aumentar o fluxo de difusão do fluido compreende a geração de campos de forças de tensão, em que os ditos meios compreendem uma segunda superfície posicionada de uma maneira interactiva no fluxo no dito canal de fluxo. A dita segunda superfície é capaz de ser movida de um modo substancialmente paralelo sobre a primeira superfície.

A invenção diz ainda respeito a um processo para ligar uma ou várias moléculas alvo compreendidas numa amostra fluida a pelo menos uma molécula receptora, pelo menos parcialmente ancorada a uma primeira superfície num canal de fluxo, em que as ditas moléculas alvo são transportadas paralelamente à dita superfície por meios que geram campos de força de tensão, em que os meios que geram forças de tensão compreendem uma segunda superfície

que é movida de um modo substancialmente paralelo ao longo ou sobre a dita primeira superfície.

Descrição

"Processo para a aceleração e intensificação da ligação receptor- alvo e dispositivo para este fim"

Campo da Invenção

A presente invenção diz respeito a um novo método de operação para sistemas de análises biológicas e químicas baseado em acontecimentos de ligação receptor- alvo.

Antecedentes da Invenção

Com o aumento da procura de informação genómica e proteómica da indústria farmacêutica, agrobiotecnológica e do sector médico (vidé diagnósticos clínicos) a última década presenciou um tremendo interesse no desenvolvimento do rastreio miniaturizado ou sistemas de ensaios de ligação. Esta tendência na direcção de sistemas de análise miniaturizados e em chip foi iniciada pela introdução de técnicas poderosas de micro maquinaria desenvolvidas originalmente para a indústria da microelectrónica no campo da química analítica e bioanalítica. As vantagens mais importantes da miniaturização são: a cinética melhorada da transferência de massa originada pela redução das distâncias de transferência de massa, a possibilidade de efectuar análises múltiplas em paralelo sobre uma pequena superfície, e a redução do consumo de amostra e reagente. Como resultado, são obtidos débitos mais elevados (e assim mais informação por unidade de tempo) e melhor economia global do processo.

Actualmente, dois formatos principais para sistemas de análises bioquímicos miniaturizados estão a ser

adoptados. Num formato geralmente designado por sistemas de micro matrizes e sendo o passo de evolução lógica dos sistemas de placas de microtitulação de 96 poços utilizados em tantos ensaios bioquímicos e procedimentos de rastreio, os reagentes ou amostras desconhecidas são postos em contacto com um grande conjunto de reagentes ou moléculas receptoras diferentes, mas conhecidos imobilizados à superfície de uma placa de suporte fixa e disposta em redes de (tipicamente) pontos circulares. No segundo formato referido geralmente como microfluídico o fluido é bombeado através de uma multiplicidade de microcanais gravados com água forte para efectuar separações, operações de mistura e para fornecer amostras em locais pré-definidos, todos sobre a mesma superfície minúscula de um chip microelectrónico de tamanho convencional.

Tradicionalmente, os ensaios em micro matriz de rastreio de ADN ou de proteínas são efectuados por aplicação de uma gota de uma amostra entre dois pratos paralelos, um que transporta uma micro matriz de alta densidade da chamada sonda ou pontos das moléculas receptoras, enquanto que a outra placa serve simplesmente para selar o sistema e evitar a evaporação do líquido da amostra. Em tais sistemas, o transporte das moléculas da amostra na direcção dos pontos receptores ocorre frequentemente de um modo passivo, i.e. o transporte ainda tem que ocorrer, através de difusão molecular pura (vidé via difusiva 3 na Figura 1). Como resultado, os rastreios por micro matriz são relativamente lentos e realizam-se geralmente de um dia para o outro.

Foram propostas duas revelações recentes para aliviar o problema da difusão em micro matriz. Na patente de invenção US 6,017,696 o transporte na direcção y (i.e. perpendicular à superfície que transporta os pontos da

sonda como indicado no presente documento pelas setas 4 na Figura 2) é aumentado aplicando um campo eléctrico perpendicular à superfície que transporta os pontos da sonda (Patente de invenção US 6,017,696). Numa outra estratégia, é utilizada uma membrana nanoporosa, através da qual é direccionado um fluxo de filtração (i.e. também na direcção y como indicado pelas setas 4 na Fig. 2) (patente de invenção US 5,843,767). Uma limitação de ambos os conceitos é que o transporte é apenas acelerado na direcção y. Isto implica que durante o processo de hibridização, a sonda imobilizada, ou as moléculas receptoras presentes num dado ponto são apenas postas em contacto com as moléculas alvo presentes no volume do fluido situado directamente por cima de um dado ponto. Muito frequentemente o número de moléculas que emparelham volume limitado não é suficiente para gerar um sinal mensurável. Em ambos os métodos mencionados acima, um fornecimento adicional de moléculas que se podem emparelhar provenientes do volume de fluido que cobrem os pontos vizinhos ainda tem de ocorrer através do processo de difusão (lento) (seguindo a via difusiva 3 indicada na presente Figura 2). Uma outra desvantagem do método na patente de invenção US 6,017,696 é que o campo eléctrico pode induzir ligações indesejáveis não específicas, de modo que um teste adicional de severidade tem de ser adicionado. Além disso, a utilização de um campo eléctrico para acelerar a transferência de massa radial não é aplicável para moléculas alvo possuindo uma carga total nula. Uma outra desvantagem é que tem de se lidar com um número de problemas específicos, tais como a formação de bolhas de gás nos eléctrodos. Para o método do filtro nanoporoso da patente de invenção US 5,843,787 pode ser encontrada uma desvantagem adicional pelo facto da geração do fluxo através dos nanoporos necessitar da

aplicação de uma pressão em excesso suficientemente grande próxima de um lado da membrana. Isto acarreta inevitavelmente problemas de estanqueidade. Além disso, uma vez que o fluxo através dos poros é proporcional à pressão em excesso aplicada, o fluxo que se consegue através do dispositivo possui um limite superior nítido (vidé lei de Poiseuille).

Para além de se encontrar uma resposta à pergunta de quantas moléculas alvo que emparelham se encontram presentes numa dada amostra, outras aplicações, por exemplo no rastreio de fármacos também necessitam de informação sobre a velocidade do processo de ligação (por exemplo para investigar os fenómenos de ligação competitivos). Actualmente o sistema mais frequentemente utilizado para a medição da cinética de ligação receptor-alvo o chamado dispositivo BIAcore (comercializado por Biacore AB, Upsalla, Suécia), em que amostras são feitas fluir através de um ponto de moléculas receptoras conhecidas e em que a quantidade ligada é constantemente monitorizada através de uma técnica de detecção de superfície, tal como ressonância de superfície de plasmão.

O sistema Biacore sofre com uma desvantagem importante. Uma vez que a força motora do sistema é a pressão, são necessárias cuvetes de fluxo relativamente grandes. Consequentemente, o tempo de difusão necessário para atingir as moléculas de receptor é parte do tempo de ligação medido. Assim, as medidas cinéticas obtidas, não dizem respeito exclusivamente, ao processo de ligação intrínseco, mas encontram-se enviesados pelo processo lento de difusão. Este problema é de facto comum a todos os sistemas de medição de cinética de ligação conhecidos no estado da técnica. Para obter medidas mais exactas do próprio processo de ligação intrínseco, seria assim

benéfico possuir um método que é capaz de acelerar substancialmente o passo de transporte difusional. Adicionalmente seria preferível possuir um método de aceleração que não se baseia na aplicação de um campo eléctrico, porque isso iria certamente influenciar o próprio processo de ligação.

A geração de fluxos que passam por pontos de moléculas receptoras imobilizadas dispostos sobre uma superfície de canais de micro fluidos é por exemplo conhecida no estado da técnica do fabrico de biosensores miniaturizados. Como é pelos peritos da técnica dos micro fluidos, movimentos de fluidos em sistemas de canais de micro fluidos não são em geral criados, através de uma bomba de pressão, mas através de um campo de força eléctrica. Isto é devido às grandes resistências ao fluxo e às correspondentes grandes perdas de pressão encontradas nos sistemas de microcanais, cuja força motora é a pressão (vidé equação de Poiseuille). Fluxos, cuja força motriz é eléctrica (também designados como fluxos electroosmóticos, EOF) não sofrem com o problema de perda de pressão e estão por isso muito melhor adaptados a aplicações de micro fluidos. Contudo, o problema de fluxos, cuja força motora é eléctrica é que são inevitavelmente acompanhados por efeitos electromigratórios (tanto na direcção axial como na direcção radial). Nalgumas aplicações tais como electroforese capilar, isto é um efeito altamente desejável, mas para o transporte de um grupo de diferentes amostras de moléculas, a uma velocidade pré-definida estes efeitos electromigratórios podem conduzir a uma dispersão axial indesejável, ou podem conduzir a uma adsorção à parede indesejável, ou repulsão pela parede dependendo da carga das moléculas da amostra (no EOF as cargas transportam sempre uma carga total). Outra desvantagem de fluxos,

cuja força motora é eléctrica, é que uma vez que a sua geração se baseia na formação de uma dupla camada ao longo das paredes do canal, a velocidade do fluxo é facilmente perturbada (e sofre assim de uma baixa reprodutibilidade) por adsorção de moléculas de amostras às paredes dos canais. Este problema é especialmente grave no caso de moléculas grandes e carregadas, tais como proteínas. Porém uma outra desvantagem é quando os capilares ou os canais se tornam demasiado estreitos as duplas camadas das paredes dos canais opostos começam a sobrepor-se, de modo que os efeitos de atracção radial eléctrica e de repulsão tornam-se dominantes em relação ao movimento axial desejado. Isto evita a utilização de canais finos sub-micron. Finalmente os fluxos, cuja força motora é eléctrica estão também sujeitos a um limite de velocidade superior (de modo análogo aos fluxos cuja força motora é a pressão). Uma vez que o fluido é directamente proporcional à queda de tensão eléctrica aplicada, e existe um limite superior nítido (cerca de 30 kV) para esta queda de tensão, por razões de segurança e para evitar um aquecimento excessivo devido ao efeito de Joule e formação de bolhas é obvia a existência de um limite de velocidade superior.

Na WO 99/61896 é revelado um dispositivo em que a ligação de biomoléculas é aumentada criando finas camadas de fluido forçando bolhas de ar através de uma cuvette de detecção de fluxo. O efeito desvantajoso, i.e., a criação de uma camada fina de fluido com tempos de difusão ultracurtos destas bolhas de ar é contudo apenas temporário. Além disso, a cuvette completa necessita de ser cheia com amostra, de tal modo que o dispositivo ainda necessite de volumes de amostras que são pelo menos da mesma ordem de grandeza do volume do tamanho da bolha. Quando as bolhas passam através da cuvette, a maior

fracção da amostra vai correr à frente da bolha e vai assim ser puxada para fora da cuvete sem ter atingido as moléculas receptoras ligadas à parede.

É objectivo da presente invenção disponibilizar dispositivos e métodos melhorados de que resultam tempos de rastreio, ou de ensaio mais curtos, limites de detecção de rastreio melhorados e medidas cinéticas de ligação mais exactas e equilíbrios. Em particular, o dito dispositivo e método da presente invenção, quase que elimina completamente o passo difusional determinante da velocidade.

Na presente invenção são revelados um dispositivo e um processo em que o dispositivo completo se encontra miniaturizado e em que uma camada fina de fluido é continuamente mantida, conservando o fluido entre duas superfícies sólidas substancialmente paralelas. Movendo uma das duas superfícies para gerar um fluxo de tensão contínuo, asseguramos que cada molécula da amostra passe as moléculas de receptor, a uma distância que é suficientemente pequena para escapar à difusão molecular pura durante o tempo de residência.

Sumário

É objectivo da presente invenção fornecer um novo modo de operação de aplicação geral para os sistemas de micro matriz e biosensores actualmente utilizados para, mas não limitados à detecção e quantificação de moléculas biológicas tais como ácidos nucleicos e proteínas (incluindo hormonas, receptores de hormonas, anticorpos, antígenos, proteínas estruturais, enzimas, etc...), o rastreio do efeito terapêutico de moléculas, ensaios de reacções enzimáticas, a purificação de quantidades de produção de biomoléculas e moléculas terapêuticas valiosas, e a medição da afinidade da ligação ligando/

receptor e cinética ultrapassando as desvantagens acima e fornecendo velocidades de análise superiores e limites de detecção e permitindo medidas mais exactas da cinética de ligação.

A presente invenção pode ser explicada através de um cálculo teórico (apresentado em detalhe na secção da descrição) que mostra que vez de se contactar um ponto de molécula receptora directamente com uma camada de fluido da amostra de, digamos 100 micron de espessura, é mais vantajoso fazer contactar o ponto com uma camada de fluido fina digamos de 0,1 micro de espessura e de repor continuamente a camada 1000 vezes, desde que a velocidade de reposição possa ser suficientemente grande. Como se baseiam na acção de arrastamento de uma superfície móvel, induzindo uma velocidade do fluido igual a metade da velocidade da superfície em movimento, independentemente da espessura do canal ou comprimento do canal, fluxos provocados por forças de tensão são o único tipo de fluxo capaz de produzir velocidades de fluido suficientemente grandes, através dos canais finos sub-micron.

A presente invenção diz respeito a um dispositivo e a um método de acordo com as reivindicações 1 e 18.

Outras concretizações mais preferidas são descritas abaixo detalhadamente e nas reivindicações dependentes.

No contexto da presente invenção "uma primeira superfície" designa em geral uma superfície, ou um substrato munido com uma ou várias moléculas receptoras iguais ou diferentes. Estas moléculas receptoras encontram-se geralmente parcialmente ancoradas à dita superfície. No contexto da presente invenção uma "segunda superfície" designa uma superfície que é fornecida de uma maneira móvel no canal de fluxo. O movimento da dita segunda superfície vai fornecer um campo de força de

tensão que actua sobre a amostra fluida, se estiver presente no canal de fluxo.

Em várias concretizações, a primeira e a segunda superfície delimitam o canal de fluxo. Tal como nestas concretizações a primeira e a segunda superfície podem ser movidas independentemente uma da outra. Consequentemente, o canal de fluxo de acordo com estas concretizações é caracterizado por não ser hermeticamente selado ao longo da sua superfície de cobertura, mas consistir simplesmente em duas superfícies independentes.

As moléculas alvo encontram-se geralmente presentes numa amostra fluida forçada sobre estas moléculas receptoras de modo a aumentar a eficácia da ligação.

O método e dispositivos de acordo com a presente invenção podem contar com a combinação de três características específicas dos fluxos originados por tensões nos microcanais. A primeira característica é que a espessura do canal pode ser seleccionada de modo a que seja apenas um número mínimo de vezes maior (preferencialmente 1,5 a 5 vezes maior) do que as dimensões das moléculas a serem analisadas. Deste modo, as moléculas alvo podem ser transportadas por convecção dentro de alguns diâmetros moleculares de moléculas receptoras com as quais se emparelham imobilizadas sobre uma superfície sólida, eliminando assim, quase completamente o tempo necessário para difusão. A segunda característica é que a velocidade de fluxo pode ser suficientemente grande para transportar volumes de amostras da ordem de 10 a 200 μl , através dos canais da micro matriz com um volume da ordem de apenas 0,1 μl , enquanto que em combinação com a primeira característica, ganha-se ainda em tempo de rastreio em relação às micro matrizes de rastreio de ADN e de proteínas convencionais baseadas na difusão, em que o volume completo de 10 a 200

µl é feito contactar directamente com a matriz completa. A terceira característica é que devido ao facto do grau de dispersão axial em canais com uma espessura sub-micron ser extremamente pequena, êmbolos curtos de amostra (i.e., com um comprimento da ordem de 10 a 500 µm) podem ser injectados a uma frequência elevada e podem subsequentemente ser transportados, através de um canal de microfluído, sem qualquer mistura substancial entre os êmbolos sucessivos de amostra. A terceira característica permite, em combinação com a primeira característica, uma verdadeira análise de rastreio de alto débito de por exemplo, potenciais moléculas terapêuticas. O pequeno grau de dispersão axial também implica que pequenas quantidades de amostra possam ser analisadas e recuperadas com uma diluição mínima. Esta é uma característica altamente desejada em aplicações bioanalíticas e de purificação. Tal como no fluxo provocado por tensões a velocidade do fluído é independente da velocidade do fluído da natureza (carga, tamanho, etc....) de substâncias fluidas a serem transportadas, é ainda uma outra vantagem do método de acordo com a presente invenção que moléculas de natureza diferente possam ser transportadas num único êmbolo, i.e. à mesma velocidade. Isto é essencialmente vantajoso para investigar acontecimentos de ligação ou reacção envolvendo um cofactor, ou para efectuar ensaios de ligação competitiva. Uma vantagem adicional em relação a fluxos, cuja força motriz é eléctrica, em que o perfil de velocidade é uniforme é de que a velocidade de fluxos por tensão varia linearmente com a espessura do canal e é quase zero na superfície estacionária em que a ligação tem que ocorrer. A ligação pode assim ocorrer com uma influência mínima da força de tensão aplicada. Num sistema, cuja força motriz é eléctrica, o campo eléctrico

é igualmente forte em todo o lado, de modo que possui uma maior possibilidade de perturbar o processo de ligação.

Para a ligação selectiva de moléculas lineares longas (ácidos nucleicos, proteínas desnaturadas) é ainda uma outra vantagem do método de acordo com a presente invenção que o campo de velocidade linear de fluxos provocados por forças de tensão induza uma pré-orientação vantajosa de moléculas. Devido às grandes forças de tensão as moléculas lineares serão estendidas ao longo da direcção do campo de fluxo, e estarão assim menos enroladas. Deste modo, pode ser obtido um contacto melhorado alvo- receptor.

É ainda uma outra vantagem do método de acordo com a presente invenção que a velocidade do fluido possa ser utilizada como um parâmetro de controlo de severidade adicional. Moléculas não emparelhadas e assim mais fracamente ligadas vão-se desligar numa maior extensão do que as moléculas perfeitamente emparelhadas sob a influência de um campo de forças de tensão forte.

É ainda uma outra vantagem do método de acordo com a presente invenção que é muito simples mudar de um modo em fluxo contínuo para um modo de transporte que consiste numa série contínua de sequências de fluxo- paragem. Esta possibilidade é altamente vantajosa em casos em que um fluxo convectivo forte perturba os acontecimentos de ligação: durante os períodos de paragem (curtos) o processo de ligação pode ser efectuado de forma não perturbada por quaisquer efeitos convectivos, enquanto que os períodos de fluxo são utilizados para gerar uma renovação rápida da camada de fluido que cobre um dado ponto de molécula do receptor.

Breve Descrição das Figuras

Figura 1. Representação esquemática do transporte difusivo em dispositivos de rastreio de ADN e de proteínas convencionais baseado na difusão.

Figura 2. Representação esquemática de soluções do estado da técnica para a aceleração do transporte radial, envolvendo membranas de fluxo porosas, ou hibridização electronicamente assistida.

Figura 3. Representação esquemática da organização do fluxo nos dispositivos de rastreio de ADN e de proteína movidos por tensão de acordo com a presente invenção.

Figura 4. Representação esquemática de canais básicos de transporte de fluido utilizados no método de rastreio alvo- receptor revelado presentemente: vista longitudinal (a), vista da secção recta (b) e vista de topo (c).

Figura 5. Volume do fluido no topo do ponto da sonda num sistema convencional movido por difusão (a) e num sistema movido por tensão de acordo com a presente invenção (b).

Figura 6. Representação esquemática de uma correia móvel (a) e dispositivos de disco rotativo de acordo com a presente invenção: vista lateral (b) e vista do topo (c).

Figura 7. Vista de topo do dispositivo de disco rotativo apresentando uma das numerosas possibilidades do método de acordo com a presente invenção para utilizar uma única superfície móvel para gerar um fluxo que passa numa multitude de superfícies de moléculas receptoras.

Figura 8. Vista de topo (a) e vista longitudinal (b) do sistema de superfície móvel que transporta uma rede de protuberâncias micro maquinadas para disponibilizar sustentação adicional do movimento do fluido e/ ou para induzir uma mistura suplementar.

Figura 9. Exemplos de matrizes de protuberâncias micro maquinadas que permitem a geração de diversões intermitentes da difracção do fluxo para promover a mistura na direcção Z.

Figura 10. Vista lateral da posição e design conceptual para o dispositivo do reservatório da amostra integrado na superfície da matriz de rastreio.

Figura 11. Vista de topo do método de rastreio movido por tensão em que o transporte convectivo é apenas numa direcção (a). Vista de topo da segunda passagem da amostra, após se ter rodado a superfície da rede de pontos de 90° (b).

Figura 12. Visão de topo de um método de rastreio movido por tensão em que um transporte convectivo é estabelecido em duas direcções mutuamente perpendiculares.

Figura 13. Visão de topo de um método de rastreio em que um transporte convectivo tanto translaccional e rotacional são estabelecidos.

Figura 14. Representação esquemática de dispositivos duplos rotativos de acordo com a presente invenção: visão de topo superfície do receptor (a), e vista lateral do aparelho montado com um espaçamento de disco variável, e mostrando o fluxo periférico para o exterior do fluido da amostra (b).

Figura 15. Representação esquemática de dispositivos de rotação dupla com um espaçamento de disco variável, e com uma superfície receptora possuindo poros ou orifícios micro maquinados que permitem o fluxo para o exterior do fluido da amostra.

Figura 16. Visão esquemática de um método para a injeção de êmbolos de amostra distintamente delimitados nos dispositivos de acordo com a presente invenção.

Figura 17. Visão esquemática de um transporte de alto débito de êmbolos de diferentes amostras.

Figura 18. Visão esquemática de diferentes sequências envolvidas num método para a medida da cinética da ligação alvo- receptor de acordo com a presente invenção compreendendo transporte movido por tensão de moléculas

de amostra em relação a uma secção de ligação contendo moléculas de receptores selectivos (a) e fazendo contactar as ditas moléculas de amostra com as ditas moléculas receptoras selectivas durante um determinado período de tempo t_{cont} (b), e transportando para fora as moléculas não ligadas (c).

Figura 19. Visão longitudinal de uma concretização de acordo com a presente invenção, em que as moléculas receptoras se encontram imobilizadas numa porção com sulcos da superfície estacionária.

Descrição Detalhada da Invenção

Em particular, o dispositivo da presente invenção permite melhorar o desempenho dos diagnósticos analíticos e sistemas de rastreio baseados na ligação específica entre ligandos ou moléculas alvo numa amostra com moléculas receptoras complementares ancoradas numa superfície sólida. É utilizado também para a detecção, quantificação e análise funcional de analitos biológicos e químicos, incluindo, mas não estando limitado a ácidos nucleicos, proteínas, anticorpos, antigénios, hormonas, receptores de hormonas, enzimas e moléculas pequenas de bibliotecas de química combinatória. O dispositivo da invenção pode também ser explorado para investigar a velocidade de reacção e a formação de produtos de conversões enzimáticas de substrato.

No que diz respeito às Figuras apresentadas no presente documento, deveria ser salientado que apesar da forma de algumas das moléculas representadas possa sugerir que o dispositivo representado e método da invenção como a seguir abaixo descrito diz apenas respeito especificamente a ácidos nucleicos ou anticorpos, todos os métodos e dispositivos de acordo com

a presente invenção dizem respeito a um grupo completo de analitos químicos e biológicos mencionados acima.

Em vez de apresentarem uma natureza molecular, os meios receptores podem também ser uma superfície com sulcos micro maquinada possuindo um tamanho específico e/ou forma permitindo reter selectivamente pequenos cristais, células completas ou nano dispositivos.

A figura 1 apresenta a organização do transporte de fluido em dispositivos de rastreio de ADN e de proteínas convencionais baseados na difusão. Nestes dispositivos moléculas desconhecidas alvo 1a, 1b, 1c, etc... de diferente composição têm que se difundir tanto na direcção y e x (i.e. eles têm que seguir um caminho difusivo tortuoso 3), antes de se poderem ligar a um dos pontos de moléculas receptoras de emparelhamento 2a, 2b, 2c, etc...imobilizadas na superfície 10. A Fig. 2 apresenta uma organização de transporte de fluido nos dispositivos de rastreio de ADN de acordo com o estado da técnica por exemplo na patente US 5843767 e patente US 6103479. Nestes dispositivos, o transporte é apenas acelerado na direcção radial 4. Durante o transporte radial rápido, o transporte na direcção transversal 4, i.e. de local para local, tem ainda de ocorrer através da difusão molecular lenta a seguir à via difusiva 3. Uma vez que o tempo para o transporte radial é várias ordens de grandeza mais pequeno do que o tempo necessário para o transporte transversal de local para local, este último não pode ocorrer numa extensão significativa e os limites de detecção permanecem baixos.

De acordo com uma concretização da presente invenção, o dispositivo desta invenção, como descrito acima é caracterizado por os meios que geram o campo de forças de tensão compreenderem uma segunda superfície sendo preferencialmente maior do que a dita primeira

superfície e capaz de se mover mecanicamente de um modo substancialmente paralelo, ao longo da dita primeira superfície.

Na presente invenção, o conceito de fluxos provocados por tensão é utilizado para acelerar processos de ligação alvo- receptor explorando o facto de num fluxo provocado por uma tensão a espessura do canal poder ser reduzida substancialmente sem ter de se sacrificar a velocidade do fluido que pode ser conseguida. Como é explicado de maneira quantitativa mais abaixo, a combinação de ambos os factos dá origem ao factor chave na possibilidade de acelerar ensaios de rastreio de acordo com a presente invenção.

A fig. 3 apresenta uma concretização preferida da organização do fluido de transporte nos dispositivos de rastreio de ADN e proteínas de acordo com a presente invenção. O transporte na direcção radial, é aqui acelerado diminuindo a espessura da camada de fluido, de modo a que na direcção transversal (i.e. na direcção X), é organizado um transporte convectivo e deste modo o transporte de ponto para ponto é rápido. Num dispositivo de acordo com a presente invenção, a amostra contendo o alvo desconhecido, moléculas 1a, 1b, 1c, etc... é transportado numa camada muito fina (com espessura d) através de uma rede de pontos de moléculas de sondas de emparelhamento 2a, 2b, 2c, etc... immobilizadas numa primeira superfície 10, utilizando um campo de forças de tensão. Este campo de forças de tensão de acordo com esta concretização é originado pelo movimento de uma segunda superfície 20, movimentada por qualquer sistema de motor adequado 40, e induzindo um fluxo com um perfil substancialmente linear 511. A segunda superfície 20 constitui conjuntamente com a primeira superfície 10 nesta concretização os limites de um canal de fluxo.

Forças motoras de tensão são conhecidas como uma força de transporte em técnicas de separação, tais como cromatografia. Na WO 98/55858 por exemplo em nome da presente requerente foi revelado um número de possíveis desenhos de canais que permitem o estabelecimento de um transporte contínuo da fase móvel movido por tensões a partir de um reservatório de entrada para um reservatório de saída para uma aplicação no campo da cromatografia líquida. É revelado como um fluxo gerado por tensão pode ser estabelecido para dentro, através e para fora de um canal micro fluido que consiste em duas partes de paredes diferentes, sendo uma parte substancialmente maior do que a outra parte sendo movida de um modo substancialmente paralelo, através da parte mais curta.

Na figura 4 um canal básico de fluxo de fluido é apresentado em três perspectivas em que uma camada fina da amostra 100 é transportada ao longo da superfície 10 de um chip de uma micro matriz na direcção 99 por um efeito da força de tensão originado a partir da parte móvel da parede 20.

Ainda de acordo com outra concretização da invenção, o dispositivo da invenção é também caracterizado pelo facto da primeira superfície compreender sulcos na superfície micro maquinadas e/ ou microestruturadas que possuem preferencialmente aproximadamente a mesma profundidade que a altura das moléculas receptoras imobilizadas sobre elas. Isto protege as moléculas receptoras do campo de tensão elevado em caso de aplicações com velocidade de fluido elevada.

Uma vez que são utilizados canais que são apenas um número mínimo de vezes (preferencialmente entre 1,5 e 5 vezes) maiores do que as moléculas alvo a serem analisadas o tempo necessário para a difusão é diminuído substancialmente e quase completamente eliminado. Deste

modo, o transporte radial é acelerado, enquanto que o transporte na direcção lateral (i. e de ponto para ponto) ocorre por convecção rápida, com velocidades de fluxo independentes da espessura do canal. Deste modo, a desvantagem do volume pequeno do canal, que conduziria normalmente a maus limites de detecção, pode ser facilmente ultrapassada devido à renovação contínua, rápida da camada de fluido dentro do canal de rastreio.

Nos dispositivos de acordo com a presente invenção, o espaço do canal formado pela segunda superfície móvel e pela primeira superfície estacionária possui preferencialmente uma secção recta rectangular plana, i.e. os canais possuem uma espessura entre 10 nanometro e 10 micrómetro e mais preferencialmente entre 50 e 1000 nanómetros, enquanto que a sua largura seria muito mais larga preferencialmente entre 100 microns e 10 cm (vidé Fig. 4b, não está à escala). O comprimento dos canais deverá ser preferencialmente entre 1 milímetro e 10 cm.

Num sistema de canal como o representado na Figura 4, o fluxo (na direcção 99) da amostra de líquido 100 é gerado pelo efeito de arrastamento ou da força de tensão originado pela superfície móvel 20. Na presente invenção, aproveita-se a vantagem do facto da velocidade do fluido num fluxo gerado por tensão como pode ser deduzido a partir do perfil de fluxo linear 5 na figura 3, ser sempre igual a uma metade da velocidade da parte móvel, independentemente do comprimento do canal, da espessura do canal, ou da natureza do fluido. Assumindo por exemplo uma velocidade da parede móvel de 10 cm/s isto implica que uma camada fina da amostra 100 (por exemplo 50 nm de espessura) pode ser transportado, através de uma superfície do chip de micro matriz 10 de por exemplo de 5 cm de comprimento a uma velocidade de por exemplo 5 cm/s. Num canal movido por pressão com uma secção recta

rectangular plana iria requerer uma pressão impraticavelmente grande de 60000 bar. No dispositivo de acordo com a presente invenção a vantagem mencionada acima de fluxos movidos por tensão é explorada para transportar convectivamente substâncias moleculares fluidas ao longos de alguns diâmetros moleculares de uma molécula receptora complementar (potencialmente) de composição conhecida e imobilizada sobre uma superfície sólida (vidé figura 3).

Tendo como referência as figuras 3 e 5 o raciocínio abaixo permite quantificar o ganho do método de rastreo movido pela tensão de acordo com a presente invenção para o caso de uma aplicação de rastreo do ADN. O raciocínio inicia-se verificando que os valores de difusão do ADN típicos (Chan et al., 1995) variam entre $D_{dif}=9.10^{-11}$ m²/s para 30-bp ssADN, até $D_{dif}=5.10^{-12}$ m²/s para 1000-bp ssADN. Considerando o design típico de um chip de ADN (vidé uma representação 1-dimensional dada na Figura 1) como sendo uma rede de pontos circulares com um diâmetro típico de 200 µm e com uma distância entre pontos de 30 a 50 µm, e considerando o tempo τ necessário para percorrer uma determinada distância/ pode ser estimado a partir da equação de difusão de Einstein:

$$\tau=\zeta/(2.D_{dif}), \quad (1)$$

pode-se verificar facilmente que leva cerca de 1 h para uma cadeia de ADN com um $D_{dif}=1.10^{-11}$ m²/s a viajar de um ponto para outro ponto e que leva cerca de 2.10^8 segundos (200 milhões de segundos) a percorrer o comprimento completo de 7,5 cm de uma micro matriz de ADN (possuindo as mesmas dimensões que uma lâmina de microscópico convencional). O cálculo básico mostra que num chip típico de ADN um ponto "vê" apenas o fluido na sua

vizinhança imediata. Calculando o raio a partir do qual um determinado ponto é capaz de recolher material numa experiência de um dia para o outro de 15 h resolvendo a equação (1) para τ e fazendo $\tau=15$ h, é encontrada uma distância de amostragem da ordem de $\tau=1$ mm. Isto implica que um dado ponto "vê" apenas a amostra localizada a 1 mm à sua esquerda e 1 mm à sua direita. Isto também explica, porque é que um dado ponto "vê" apenas a amostra localizada a 1 mm à sua esquerda e 1 mm à sua direita. Isto explica, porque é que para se conseguir um determinado limite de detecção têm que ser utilizadas camadas de fluido relativamente espessas da ordem dos 20 a 100 micron em micro matrizes de ADN (da ordem de 100 μ m, Duggan, D. J., et al., 1999. *Nature Genetics Supplement* 21, 10-14).

Num método baseado na tensão de acordo com a presente invenção (Fig. 3), em que a amostra é espalhada numa camada de fluido ultra-fina de por exemplo 100 nm de espessura (ou de qualquer outra espessura adequada, dependendo das dimensões das cadeias de ADN), a eq. 1 prevê um aumento de 1 milhão de vezes na velocidade de difusão radial (i.e. na direcção Y, ver Figs. 1 e 3). Este ganho é extremamente grande, mas deverá ter-se em linha de conta que uma camada de 100 nm de espessura também contém menos 1000 vezes de material alvo de ADN. Isto implica que para obter quantidades de detecção comparáveis a camada tem de ser renovada continuamente. É aqui que uma das características únicas do conceito de fluxo gerado pela tensão i.e. a possibilidade de gerar grandes velocidades de fluido, mesmo em canais sub-micron torna-se especialmente útil. Como o método de acordo com a presente invenção permite estabelecer velocidades de fluidos da ordem das dezenas de centímetros por segundo, e mesmo para além disso, o tempo necessário para o

transporte através de por exemplo um chip de ADN de 7,5 cm de comprimento (que é da ordem de 100 milhões de segundos para um sistema movido puramente por difusão) pode facilmente ser reduzido a alguns segundos ou dezenas de segundos (dependendo do tempo de residência da mancha necessário para as moléculas se difundirem em direcção das moléculas receptoras e para completar a reacção de ligação).

No que diz respeito à figura 5 e assumindo um ensaio baseado na difusão com um ponto de molécula receptora rectangular 2 (dimensões= $a \times b$), e considerando apenas a difusão radial (direcção y), o ponto "vê" um volume total de líquido 5 de $V_a = a \cdot b \cdot h$. De acordo com a eq. (1), o tempo necessário para a difusão através da altura h é:

$$\tau_{as} = h^2 / (2 \cdot D_{dif}). \quad (2)$$

Considerando agora a estratégia movida por tensão em que o volume do fluido 5 em contacto com a dita molécula receptora ponto 2 apenas possui a altura d , e onde uma acção convectiva na direcção 99 é utilizada para transportar o mesmo volume V_a através do ponto, uma decisão tem de ser tomada em relação à velocidade do fluxo aplicável. Este valor pode ser calculado a partir do facto de que o tempo $t_{residência}$, durante o qual um dado volume de fluido corre ao longo do ponto deverá ser tomado de modo a que dentro deste tempo de residência, $t_{residência}$ as moléculas tiveram tempo para se difundirem através da espessura da camada d e tiveram tempo de hibridizar. Expressando o tempo necessário para a hibridação como sendo uma dada fracção ou múltiplo do tempo de difusão obtém-se novamente de acordo com a eq. (1):

$$t_{\text{residência}} = (1 + \alpha) \cdot d^2 / (2 \cdot D_{\text{dif}}), \quad (3)$$

com este tempo de residência necessário a máxima velocidade permitida v pode ser calculada como:

$$V = a / t_{\text{res}} \quad (4)$$

e com esta velocidade, a velocidade volumétrica de fluxo F no sistema movido por tensão pode ser calculado como sendo:

$$F = v \cdot b \cdot d = ab \cdot d / t_{\text{res}} \quad (5)$$

Tomando os valores típicos para $d = 0,1 \mu\text{m}$ e $D_{\text{dif}} = 1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ e um $a = 200 \mu\text{m}$ (tamanho típico dos pontos em micro matrizes) e assumindo que $\alpha = 1$, a velocidade necessária de acordo com a eq. (4) é $0,2 \text{ m/s}$. Considerando uma espessura de 100 nm e por exemplo um canal de 5 cm de comprimento, deveria ser óbvio que considerando as limitações de fluxos movidos por pressão e movidos electricamente, tal velocidade pode apenas ser conseguida num modo de fluxo movido por tensão.

Com o tempo de residência necessário $t_{\text{residência}}$ dado pela eq. (3), pode ser facilmente verificado que o tempo total τ_{DP} necessário para hibridizar o volume total do líquido V_a é dado por:

$$\tau_{\text{DP}} = V_a / F = (1 + \alpha) \cdot h \cdot d / (2 \cdot D_{\text{dif}}) \quad (6)$$

tomando agora a razão entre τ_{as} e τ_{DP} :

$$\tau_{as}/\tau_{DP}=h/d.(1+\alpha), \quad (7)$$

e assumindo que $t_{hibr}=t_{dif}$ (i.e., $\alpha=1$), eq. (7) mostra que o ganho que pode ser obtido mudando de uma micro matriz baseada na difusão com altura $h=10\text{ }\mu\text{m}$ para uma micro matriz com altura $d=0,1\text{ }\mu\text{m}$ é de um factor da ordem de 500.

O ganho é mesmo mais elevado, quando durante um determinado rastreio, um ponto de uma determinada molécula receptora necessita de "ver" uma quantidade de líquido inicialmente espalhada por N pontos. Com N suficientemente grande (digamos $N\geq 5$), a distância característica de difusão na matriz baseada na difusão já não corresponde à altura radial ($l=h$), mas tem que ser tomada agora como a coordenada lateral, i.e. na direcção X , de tal modo que $l=N.a$. Em que agora $V_a=N.a.b.h$, e $\tau_{as}=(N.a)^2/(2.D_{dif})$, e seguindo o mesmo raciocínio mencionado acima a razão entre τ_{as} e τ_{DP} fica:

$$\tau_{as}/\tau_{DP}=N.a^2/h.d.(1+\alpha), \quad (8)$$

Com $N=8$ (vidé os cálculos acima em relação à distância de amostragem de $2./=2\text{mm}$), e com $a=200\text{ }\mu\text{m}$, $h=100\text{ }\mu\text{m}$ e $d=0,1\text{ }\mu\text{m}$ o ganho no tempo de rastreio é da ordem de 16000 (ainda tomando $\alpha=1$). Como o cálculo apresentado assume um modelo 1-D foi desprezado que os pontos são apenas tratadas linha a linha, enquanto que num sistema baseado na difusão as linhas e colunas são tratadas simultaneamente. Contudo, rodando a placa do ensaio de 90° após se ter completado uma determinada corrida e depois repetindo o ensaio (vidé Fig. 11) apenas se reduz o débito de um factor de 2, deixando ainda

suficiente espaço para melhoria em relação a sistemas de rastreio movidos por difusão.

No raciocínio acima também se tornou óbvio que no método movido por tensão de acordo com a presente invenção, apenas a matriz tem de ser contactada com um volume correspondendo ao que cobre aproximadamente 8 a 10 linhas de pontos, em que numa matriz baseada na difusão é aplicado um volume de matriz correspondente a 100 a 300 linhas de pontos (das quais cada ponto vê apenas cerca de 5 a 10%). Este facto implica que no método de acordo com a presente invenção, uma redução de um décimo ou de vinte vezes da quantidade de amostra é prevista em relação às quantidades actualmente necessárias para um ensaio de hibridização clássico. Tratando o problema de outra forma, e considerando o envio de 10 a 200 μ l de volume da amostra volume utilizado tipicamente em micro matrizes convencionais movidas por difusão, num modo movido por tensão através de um canal de 100 nm de espessura cada ponto vai "ver" grosseiramente 10 a 20 vezes mais amostra. É assim óbvio que neste modo de operação, os limites de detecção dos sistemas movidos por difusão utilizados actualmente podem ser fortemente ultrapassados.

Considerando o cálculo acima da velocidade do fluido requerida deveria ser óbvio que no método de acordo com a presente invenção, a camada de fluido deverá ser preferencialmente transportada a uma velocidade na gama entre 1 mm/s (para difusão lenta, cadeias de ADN longas) a cerca de 40 cm/s (para uma difusão mais rápida, cadeias curtas de ADN). Deverá ser salientado que o método acima descrito de acordo com a presente invenção pode também ser aplicado para acelerar o rastreio de outras moléculas, tais como proteínas ou potenciais fármacos.

De acordo com uma concretização preferida da presente invenção, o espaço entre a primeira e a segunda superfície no dispositivo da presente invenção é controlado por uma matriz de espaçadores micro maquinados que saem para fora de pelo menos uma das superfícies e sendo preferencialmente revestidos com uma camada de material isento de desgaste e de baixa fricção.

Uma matriz de espaçadores micro maquinados 50 é disposta sobre a segunda superfície móvel e/ ou primeira superfície estacionária e permite manter a distância entre a placa móvel e estacionária tão constante como possível. Estes espaçadores podem possuir a forma desejada, incluindo mas não limitada a cilindros, cones truncados, semi-esferas, cubos e blocos rectangulares. Numa concretização, os espaçadores dos canais micro maquinados prolongam-se substancialmente ao longo do comprimento completo da primeira superfície estacionária, com a sua dimensão mais longa orientada ao longo da direcção x. Nesta concretização preferida, os espaçadores dos canais deverão possuir preferencialmente uma forma substancialmente linear quando a parede móvel (segunda superfície) é translaccionada numa direcção substancialmente linear, quando deveriam ter preferencialmente uma forma circularmente curva, quando a parede móvel é sujeita a um movimento de rotação. Os espaçadores dos canais podem ser feitos, ou revestidos com qualquer material resistente ao desgaste conhecido dos peritos da técnica da tribologia. Os espaçadores dos canais podem ser fabricados de acordo com qualquer método de deposição adequado (por ex. CVD) e técnicas de gravura com água forte (por ex. "etching" de "lift off") conhecidas dos peritos na arte de micro maquinação. Exemplos de processos para a maquinação de estruturas de espaçadores possuindo tolerâncias para a altura pequenas

da ordem de nanómetros, conjuntamente com processos para a adição de uma camada de revestimento isenta de desgaste sobre estas estruturas, podem por exemplo ser encontrados em Tanaka, H., et al., 1993, J. Tribol. 115, 573-576; Li, Y. e Menon, A K., 1995, J. Tribol. 117, 279-284. Para manter as duas superfícies em contacto íntimo pode ser aplicada uma carga 501.

Numa concretização de base da presente invenção, como é indicado na Fig. 4c, a superfície móvel pode ser movida de um modo linear, de uma passagem, através da primeira superfície estacionária. Contudo, de modo a ser possível transportar uma quantidade suficiente de amostra é preferível possuir um sistema móvel de superfície que fornece um caminho de fluxo infinito (i.e. de recirculação contínua). A Figura 6 apresenta desenhos de concepção de uma correia móvel (fechada, ou não) e dispositivos do tipo de disco rotativo que fornecem um tal caminho de fluxo infinito.

De acordo com uma outra concretização, a dita segunda superfície do dispositivo da presente invenção é uma placa plana que se move linearmente, uma correia flexível linearmente móvel, um dispositivo rotativo ou um cilindro rotativo.

Como explicado anteriormente, a dita segunda superfície móvel é utilizada para gerar um fluxo através de mais do que uma moléculas alvo ancorada sobre a superfície do substrato.

De acordo com uma concretização preferida a dita segunda superfície num dispositivo da invenção é uma superfície plana que se move linearmente, uma correia linearmente móvel flexível, um disco rotativo, ou um cilindro rotativo.

O movimento da segunda superfície móvel pode preferencialmente ser efectuado utilizando qualquer

dispositivo de deslocamento motorizado adequado (não representado na figura), incluindo, mas não limitado a uma mesa de disco rotativo ou um sistema de translação linear automático.)

A Figura 7 apresenta uma das muitas plantas possíveis de conceber do dispositivo da presente invenção, no qual uma única superfície móvel 20 pode ser utilizada para organizar o transporte da amostra através de várias placas matriciais 10. Na figura os espaçadores dos canais 50 utilizados para manter uma distância substancialmente constante entre as superfícies móveis e estacionárias são representados como sendo parcialmente visíveis através das placas matriciais estacionárias 10. Um sistema de matrizes múltiplas pode ser configurado para o caso de um dispositivo de correia móvel, por ex. colocando diferentes placas matriciais atrás umas das outras.

Ainda de acordo com outra concretização a segunda superfície móvel do dispositivo da presente invenção transporta uma matriz de protuberâncias micro maquinadas que se prolongam a partir da dita segunda superfície. As ditas protuberâncias micro maquinadas fornecem sustentação adicional para o movimento do fluido, e/ ou pode ser utilizado para induzir mistura adicional na direcção radial e lateral, e para limitar a mistura na direcção axial.

De acordo com outra concretização, a primeira superfície compreende uma matriz de orifícios porosos.

Numa variante possível (Figura 8), as ditas protuberâncias possuem a forma de varões rectangulares; com a sua dimensão mais longa 151 orientada ao longo da direcção z e por isso seleccionada de tal modo que se ajusta entre os espaçadores de canal. Para além de fornecer uma sustentação adicional do movimento do fluido

(i.e., a velocidade média do fluido será maior do que na ausência das protuberâncias), as ditas protuberâncias podem também induzir uma mistura radial adicional ao longo da direcção 152. Para criar um padrão óptimo de mistura a distância do intervalo entre as diferentes protuberâncias na direcção x deverá ser preferencialmente igual a entre 1 e 10 vezes a altura do canal. É ainda uma outra vantagem da concretização representada na Figura 8 que a dispersão difusional na direcção axial é reduzida. Outros elementos salientes preferidos para serem dispostos na superfície móvel são representados na Figura 9. Nestas concretizações a forma e posição das protuberâncias 150 é seleccionada de tal modo que geram diversões intermitentes 153 da direcção do fluxo. Tais diversões da direcção do fluxo são grandemente preferidas, porque induzem um fluxo adicional na direcção z, em que o transporte tem de normalmente ocorrer através da difusão molecular lenta. Numa estratégia alternativa e sem perder o seu efeito, as protuberâncias representadas na figura 9 podem ser também dispostas na primeira superfície estacionária.

A Figura 10 apresenta outra concretização preferida de acordo com a presente invenção em que o chamado dispositivo portador da amostra 60 é ligado a ou integrado dentro da estrutura da placa 20 que suporta a rede de pontos da molécula receptora 2. O dispositivo portador da amostra pode por exemplo servir como um meio para evitar a evaporação de parte da amostra 100 à espera de ser transportada através do canal de rastreio formado pelas superfícies 10 e 20. Quando posicionado no terminal do canal, o dispositivo portador da amostra pode também servir como meio para recolher a mostra para posterior análise após ter feito uma passagem, através do canal de rastreio. Preferencialmente, o dispositivo portador da

amostra deverá ter um ligação que se pode fechar 611 com a atmosfera circundante ou com uma câmara pressurizada ou de vácuo (não apresentada na figura). Os dispositivos portadores da amostra necessários na presente invenção podem ser fabricados através de qualquer técnica padrão de micro maquinação, tal como "etching" iónico reactivo, LIGA e etching a húmido e numa concretização preferida os portadores de amostra são maquinados directamente no substrato que suporta os pontos de moléculas receptoras. Numa outra variante preferida, os portadores de amostra encontram-se integrados num mandril de vácuo, ou em qualquer outro dispositivo de fixação adequado, utilizado para ligar a superfície estacionária a uma estrutura de suporte fixa (não representada em qualquer dos desenhos do presente documento).

De acordo com uma outra concretização, a dita segunda e/ ou primeira superfície do dispositivo da presente invenção são suficientemente finas e flexíveis para se ajustarem de maneira óptima à superfície oposta.

Em princípio a superfície 20 da parede móvel pode ser feita de qualquer substrato suficientemente plano e suavemente polido feito de qualquer material adequado, tal como vidro, silício, polímeros,...; e preferencialmente entre 50 e 1000 μm de espessura. Para melhorar o funcionamento dos dispositivos de acordo com a presente invenção, a superfície, ou partes da superfície, da segunda superfície móvel e/ ou da primeira superfície estacionária pode ser revestida com uma camada repelente, tal como por exemplo um revestimento hidrofóbico (para evitar que as moléculas da amostra se peguem ou se liguem à superfície em posições indesejáveis não específicas). Tal revestimento pode ser por exemplo uma monocamada hidrofóbica de 3-[(Heptafluoroisopropóxi) propil] triclorosilano. Num outro aspecto é também preferido

fornecer um revestimento de baixa fricção, baixo desgaste, tal como por exemplo uma camada de teflon (para melhorar o comportamento tribológico dos dispositivos) nas partes da segunda superfície móvel e/ ou da primeira superfície estacionária escorregando uma sobre a outra. As partes onde tal revestimento é necessário são a superfície do topo dos espaçadores micro maquinados 50, e as partes da superfície oposta que entram em contacto com os ditos espaçadores.

De acordo ainda com uma outra concretização, a dita primeira superfície do dispositivo da presente invenção encontra-se coberta com uma matriz 1-D ou 2-D de moléculas receptoras.

A primeira superfície pode estar coberta com uma matriz 2-D de moléculas receptoras substancialmente circulares ou quadradas, ou uma matriz 1-D de pontos de moléculas receptoras possuindo uma dimensão muito mais longa do que a outra , e prolongando-se substancialmente ao longo da largura completa ou comprimento da primeira superfície.

De acordo ainda com outra concretização o dispositivo da presente invenção compreende meios para o controlo da temperatura e/ ou meios de detecção, e/ ou meios para o deslocamento automatizado da segunda superfície. A temperatura nos dispositivos de acordo com o presente método pode por exemplo ser controlado utilizando um circuito micromaquinado resistivo integrado na parte de trás do substrato que suporta a superfície estacionária, ou por simplesmente fazer contactar o dito substrato com um bloco de aquecimento. O facto que devido à espessura submicron do canal torna a transferência de calor nos canais extremamente rápida é uma outra vantagem da presente invenção.

Em todas as concretizações reveladas do processo de acordo com a presente invenção, a detecção da quantidade de ligandos ligados, ou de analitos alvo pode ocorrer, através de qualquer dos métodos de detecção conhecidos pelos peritos no estado da técnica da detecção por micro matrizes e biosensores, incluindo métodos de detecção ópticos, eléctricos, acústicos ou baseados na radioactividade. Num método preferido, a detecção ocorre fora do chip, após lavagem e secagem adequada, utilizando matrizes de varrimento, tal como por exemplo os sistemas confocais laser de varrimento ou os sistemas de detecção CCD que se encontram correntemente disponíveis comercialmente. Numa outra concretização preferida, de uso especial para a medição da cinética de ligação a detecção ocorre sobre o chip.

Num outro aspecto, a presente invenção diz também respeito a um método de ligação de uma ou várias moléculas alvo compreendidas dentro de uma amostra de fluido a pelo menos uma molécula receptora pelo menos parcialmente ancorada a uma primeira superfície de um substrato, em que as ditas moléculas alvo são transportadas paralelamente à dita primeira superfície através de um campo de tensões.

As vantagens do dito campo de força de tensão foram discutidas acima detalhadamente em relação ao aparelho desta invenção.

De acordo com uma concretização, o campo de tensões no processo da invenção é originado a partir de uma segunda superfície que é mais larga do que a primeira superfície e que se move mecanicamente de um modo substancialmente paralelo em relação através da dita primeira superfície.

Ainda de acordo com outra concretização, o tempo de contacto entre o alvo e as moléculas receptoras no

processo da invenção é deixado ser suficientemente longo, preferencialmente entre 0,1 ms e 10 minutos. O dito tempo de contacto pode ser controlado rigorosamente, controlando a velocidade da segunda superfície móvel. Um tempo contacto entre 0,1 ms e 10 minutos deveria permitir que as reacções de ligação a ser investigadas se completem.

É porém ainda outra vantagem das concretizações de acordo com a presente invenção que é muito simples mudar de um modo de fluxo contínuo para um modo de transporte que consiste numa série contínua de sequências de fluxo-paragem. Isto pode ser facilmente conseguido, utilizando um dos sistemas de deslocamento automatizado linear ou rotativo disponível comercialmente, por ex. movido por um motor de andares e oferecendo uma resolução de deslocação na escala micrométrica, como os meios de monitorização para o movimento da parede móvel. É bem conhecido que tais sistemas de deslocamento podem ser facilmente programados para efectuar uma série de sequências alternadas de movimento-paragem, e que o comprimento do deslocamento e a velocidade, assim como a duração das pausas podem ser seleccionadas com um elevado grau de liberdade. A possibilidade de efectuar sequências de fluxo paragem alternadas é grandemente vantajosa em casos em que um fluxo convectivo forte perturba os acontecimentos de ligação: durante os períodos (curtos) de paragem, o processo de ligação pode ocorrer não perturbado através de quaisquer efeitos convectivos, enquanto que os períodos de fluxo são utilizados para gerar uma renovação rápida da camada de fluido que cobre um determinado ponto de molécula receptora.

Preferencialmente, este modo de transporte alternado de fluxo-paragem deveria ser organizado de tal modo que deslocamentos rápidos de fluido (com uma velocidade

preferencialmente entre 1 cm/s e 1 m/s e cobrindo a distância que iguala preferencialmente a distância entre dois centros consecutivos de pontos) são alternadas com períodos de paragem suficientemente longos (por exemplo entre 1 ms e 1s) para permitir que as moléculas alvo que se podem emparelhar hibridizem ou liguem-se com as moléculas receptoras na ausência de qualquer convecção ou efeitos de forças de tensão. Deste modo, um dado volume de líquido da amostra (com uma superfície de base aproximadamente igual à superfície de um determinado ponto, e com uma altura igual à altura do canal) é deslocado de ponto para ponto de uma maneira incremental, viajando assim por uma superfície completa de um chip de ADN num período relativamente curto de tempo e encontrando um número elevado de diferentes tipos de moléculas receptoras. Do ponto de vista dos pontos de moléculas receptoras, a acção de deslocamento é vantajosa, porque a camada fina de difusão (digamos de 100 nm de espessura) sobre o topo dos pontos é renovada continuamente com líquido da amostra fresco. Como este fornecimento convectivo pode ser organizado mais rapidamente em ordens de grandeza do que o transporte difusivo nas camadas de fluido mais espessas (digamos 50 micrómetros de espessura) típicas para a hibridação convencional do ADN, o ganho no tempo de rastreio pode ser facilmente compreendido.

Para efectuar os rastreios de ligação e ensaios de acordo com a presente invenção, pode ser utilizada toda a composição do fluido (concentração do sal, pH,...) variantes de métodos, e todas as variantes de temperatura e campo eléctrico de métodos conhecidos dos peritos no estado da técnica do rastreio em micro matrizes de ADN e proteínas.

De acordo ainda com outra concretização, no método da invenção a dita primeira superfície encontra-se sujeita a um movimento de translacção ou de rotação numa direcção diferente da direcção do movimento da dita segunda superfície.

Com excepção feita para as concretizações da Figura 9, as concretizações apresentadas até agora possuem uma desvantagem comum, em que por exemplo um fluxo de tensão, por exemplo gerado na direcção 70, apenas diz respeito às pontas de moléculas receptoras 2 de uma maneira linha a linha, enquanto que o transporte na direcção perpendicular (direcção 71) tem ainda de ocorrer, através de um processo de difusão molecular lento (Figura 11a). Uma estratégia possível para resolver este problema seria recolher a amostra num dispositivo portador da amostra 61 que se prolonga pelo menos por duas paredes laterais da placa do ensaio 20, rodando a placa do ensaio 20 de 90°, de acordo com a direcção 62, e repetindo o processo de rastreio na direcção 71. Devido ao efeito da força de capilaridade, o líquido recolhido na extremidade 11 da superfície 20 do ponto do receptor vai-se espalhar igualmente sobre ambas as pernas 61a e 61b do dispositivo de suporte da amostra 61.

Numa outra concretização preferida da presente invenção, um transporte convectivo em duas direcções diferentes 70 e 71 é gerado como indicado na Figura 12. Enquanto que o movimento básico na direcção 70 é efectuado através do movimento da superfície 20, a superfície 10 que transporta os pontos da molécula do receptor imobilizadas 2 pode ser sujeita a, preferencialmente a um movimento recíproco na direcção 71. Com este fim, pode ser utilizado um segundo dispositivo motorizado (não apresentado na Figura). Para se ter quantidade suficiente de amostra disponível para

ser transportada ao longo tanto da direcção 70 e 71 um dispositivo 61 que suporta a amostra ao longo de pelo menos três paredes laterais da placa de ensaio 10 deverá ser montada no lugar como indicado na Figura 12.

No entanto, uma outra concretização preferida da presente invenção que permite gerar um transporte convectivo em mais do que uma direcção é representado na Figura 13. Nesta concretização, a superfície 10 que transporta os pontos de molécula receptora 2 é sujeita a um movimento rotatório. Nesta concretização, o dispositivo suporte da amostra 61 deveria prolongar-se preferencialmente ao longo da circunferência completa do ensaio da superfície 20.

Numa outra concretização preferida (ver Figura 14), tanto a superfície estacionária 10 que transporta os pontos de receptor e a superfície móvel 20 possuem uma forma do tipo disco. Nesta concretização preferida, um dispositivo de suporte da amostra já não é necessário, porque todo o espaço entre as duas superfícies do disco é utilizado para suportar a amostra completa. A geração de um movimento rotatório relativo entre os dois discos (na realidade não interessa, qual das duas superfícies é rodada) gera depois um transporte convectivo na direcção tangencial 70. Isto é altamente vantajoso porque o transporte convectivo ao longo da circunferência completa do disco ocorre numa escala de tempo que é ordens de grandeza mais pequena do que o transporte difusivo puro.

Numa outra variante do conceito de disco duplo rotativo o espaço entre os dois discos é diminuído gradualmente durante a operação de ensaio, sujeitando um dos dois discos a um movimento na direcção 72. Preferencialmente uma matriz de espaçadores micro maquinados 50 é utilizada para manter um espaço mínimo no final da operação. Nesta concretização preferida, o

movimento de uma ou das duas superfícies 10 ou 20 na direcção 72 induz um fluxo convectivo na direcção radial 71, com um movimento resultante do fluido para o exterior, através de uma região periférica do disco 73. Esta é uma situação altamente preferida, porque implica o estabelecimento, tanto de um transporte convectivo tanto na direcção tangencial, como na direcção radial. Preferencialmente, tanto o espaçamento inicial entre as duas superfícies do disco deveriam ser entre 5 a 100 μm , em que o espaçamento final deverá ser preferencialmente entre 50 a 1000 nm. Numa versão alternativa do sistema de diminuição do espaço do canal apresentado na Figura 14, o fluxo para o exterior pode também ocorrer, através de uma matriz de poros ou de orifícios micro maquinados 51 gravados com água forte através da superfície receptora (Figura 15). Os orifícios podem estar distribuídos homogeneamente sobre a superfície do receptor, mas também podem estar concentrados numa região específica por ex. próximo do centro do disco. Os sistemas de diminuição do espaço do canal apresentados na Figura 14 e 15 permitem omitir o dispositivo de suporte de amostra nas concretizações apresentadas nas Figuras 10-13: devido à menor difusibilidade molecular, as moléculas receptoras à superfície do receptor "vêm" apenas as moléculas da amostra numa camada de fluido 160 de apenas alguns diâmetros moleculares de espessura imediatamente adjacentes à superfície do receptor. As moléculas alvo presentes nas camadas do fluido 161 mais distantes da superfície do receptor encontram-se simplesmente à espera da sua vez antes de poderem entrar na zona activa 160 (conduzidas pelo movimento do fluido na direcção 72). Assim, a camada 161 actua de facto como um suporte da amostra. Na Figura 15, a fronteira entre as zonas 160 e 161 encontra-se representada pela linha a tracejado 162.

Numa concretização preferida a velocidade de rotação 70 é suficientemente maior do que a velocidade do fluido na direcção 72, de tal modo que as moléculas da amostra presentes na camada 160 tiveram o tempo de serem transportadas pelo menos uma vez à volta da superfície completa estacionária do disco receptor 10 (vidé Figura 14 a) antes de abandonarem o sistema, através dos orifícios 51.

Ainda de acordo com outra concretização, o método da presente invenção pode ser utilizado para a purificação de quantidades de produção de um determinado analito alvo compreendido numa amostra fluida. O dito método é efectuado cobrindo grandes porções da superfície do substrato com as mesmas moléculas receptoras. Após o processo de ligação se encontrar completo, a segunda superfície móvel pode ser utilizada para transportar um determinado volume de amostra fluida em desadsorção, através das ditas moléculas do receptor para desadsorver e recolher os analitos ligados ao alvo.

Considerando a possibilidade de transportar grandes volumes de fluido, o método de acordo com a presente invenção pode ser utilizado para a purificação de quantidades de produção de anticorpos, factores de crescimento, sondas de ADN, etc... Neste caso, porções maiores da superfície do ponto do receptor, preferencialmente na gama de 10 a 100%, deverá ser coberto com o mesmo tipo de molécula de receptor. Após teste subsequente de severidade "a colheita" das moléculas capturadas selectivamente pode então ocorrer fazendo passar soluções líquidas promotoras da desadsorção através do canal, alterando as condições de temperatura, aplicando um campo eléctrico, ou aplicando qualquer outro método de desadsorção ou regeneração conhecidos dos peritos no estado da técnica de rastreio

por micro matrizes ou medições com biosensores. Deverá aqui novamente ser salientado, que considerando o grau que se pode obter na redução da espessura do canal, é uma das vantagens do método de acordo com a presente invenção o facto de que as moléculas desadsorvidas podem ser recolhidas com uma diluição mínima, utilizando simplesmente a parede móvel para transportar um determinado volume de líquido desadsorvente através das moléculas receptoras.

De acordo ainda com outra concretização, no método da presente invenção a quantidade de amostra contactada com as moléculas do receptor variam preferencialmente desde alguns picolitros a algumas centenas de microlitros.

A dita quantidade pode ser controlada exactamente pela distância em que a segunda superfície é transportada e em que durante a injeção, preferencialmente não se encontra presente outro líquido a jusante do ponto de introdução da amostra, e em que a amostra que não entrou é aspirada para fora, tirada, ou retirada por lavagem.

Todas as concretizações até agora apresentadas foram especialmente desenhadas para o tratamento de grandes volumes de amostra (i.e. para o caso em que o volume da amostra é tipicamente igual a ou maior do que o volume do canal). Quando as amostras se encontram suficientemente concentradas como é frequentemente o caso para o rastreio de fármacos de bibliotecas de química combinatória, é desejável ser se capaz de tratar pequenas quantidades de amostra. Neste ponto surge outra vantagem do método de acordo com a presente invenção. A seguir ao procedimento de injeção representado na Figura 16, e com a possibilidade para controlar o deslocamento 90 da parede móvel 20 mesmo com um deslocamento de precisão sub-micrométrico (utilizando por exemplo um sistema de

deslocamento automático linear com um motor por andares) é óbvio que êmbolos de amostras extremamente curtos 100 podem ser injectados de um modo controlável e reproduzível. Na Figura 16, é mostrado como utilizando dois dispositivos de injeção diferentes um cheio com amostra (dispositivo de injeção 80) e outro cheio com uma solução líquida isenta de amostra (dispositivo de injeção 81), a amostra injectada com o dispositivo 80 e que não entrou no canal pode ser diluída utilizando o dispositivo de injeção 81. Quando por exemplo utilizando os bocais de injeção micro maquinados actuado piezo-electricamente conhecidos do perito no estado da técnica, o fornecimento a alta velocidade de quantidades diminutas de amostra é possível e podem ser obtidas frequências de injeção muito elevadas. Com referência à sequência da Figura 16 deverá ser salientado que a amostra deverá ser preferencialmente adicionada após remoção (por ex. por limpeza ou aspiração) de todo o líquido sobre a superfície 21 em frente da entrada do canal. Nesta concretização preferida, não se encontra presente a montante outro líquido desde o ponto de introdução da amostra, e assim a diluição da amostra é evitada (vidé a situação na Figura 10). A injeção da amostra pode também ocorrer através de dispositivos de suporte da amostra miniaturizados, tal como o representado na Figura 10. Outra vantagem da possibilidade de utilizar a movimento da parede do canal para controlar o volume de injeção no método de acordo com a presente invenção é que volumes de injeção muito pequenos (ou picolitros) podem ser manuseados sem provocar, qualquer diluição desnecessária.

De acordo com outra concretização, a segunda superfície no método de acordo com a invenção pode ser utilizada para injectar e transportar volumes bem controlados de misturas de fluidos com características

promotoras de desadsorção. Isto pode ser efectuado por exemplo para o teste de severidade, para a desadsorção e colheita das moléculas ligadas, para a regeneração das moléculas receptoras e para a análise de substituição de ligandos.

De uma forma semelhante à injeção e transporte de líquidos da amostra, as concretizações reveladas nesta invenção podem também ser utilizadas para injectar e transportar êmbolos bem definidos ou volumes de soluções líquidas isentas de amostra que promovem a desadsorção, por exemplo para efectuar testes de severidade de ligação, para a remoção de moléculas ligadas não especificamente, ou para desadsorver os ligandos acoplados às moléculas receptoras.

Um dispositivo de suporte da amostra semelhante ao representado na Figura 10 pode também ser utilizado para suportar um líquido para testar a severidade, ou líquido de lavagem antes ou depois da sua passagem através do canal. Numa concretização preferida, o dispositivo de suporte da amostra é utilizado como uma câmara de mistura prévia em que a composição do líquido dos testes de severidade é continuamente variada, de modo a que um teste do tipo de gradiente de severidade possa ser efectuada.

De acordo com qualquer outra concretização no método da presente invenção um êmbolo de amostra limitado contendo uma ou várias moléculas alvo diferentes é injectado no canal formado pelas duas ditas superfícies, e em que o dito êmbolo de amostra é posteriormente transportado através de pelo menos um dos pontos das moléculas receptoras ancoradas e em que a largura axial do dito êmbolo da amostra encontra-se preferencialmente na gama entre 0,5 e 10 vezes a largura dos ditos pontos e em que o dito êmbolo da amostra é precedido e seguido por

um êmbolo de líquido isento de amostra possuindo uma largura axial que é preferencialmente maior do que 100 μm .

Combinando a possibilidade de injectar êmbolos de amostras distintamente definidos com o facto de que o grau de dispersão axial em canais com uma espessura sub-micron é muito pequeno, é óbvio que num dos métodos preferidos de acordo com a presente invenção, êmbolos muito curtos (i. e. com um comprimento da ordem de 10 a 500 μm) de diferentes amostras 101-106, apenas separadas por êmbolos comparativamente curtos 110 de êmbolo líquido isento de amostra (i.e., de tal modo que os êmbolos da amostra encontram-se separados por êmbolos líquidos isentos de amostra com um comprimento de apenas 50 a 500 μm), podem ser transportados, através do canal da micro matriz formado pelas superfícies 10 e 20 sem qualquer mistura significativa hidrodinâmica ou arrastamento entre os diferentes êmbolos de amostra (Figura 17). A possibilidade de gerar transportes de elevada frequência de êmbolos curtos de amostra pode ser compreendida pelo facto do grau de dispersão axial ou alargamento do pico em canais com uma espessura submicron é extremamente pequena, porque qualquer diferença na velocidade radial é imediatamente anulada pela rápida difusão molecular.

Este é um facto que é conhecido para fluxos gerados por pressão, mas que podem ser facilmente transpostos para fluxos gerados por tensões. Uma expressão para a dispersão axial em fluxo laminar circular gerado por pressão em tubos é dado por Cussler, E. L., 1984, *Difusion: mass transfer in fluid systems*, Cambridge University press, Cambridge USA, pág. 90.

Injectando diferentes pulsos curtos de amostra consecutivamente um depois do outro e transportando-os através de uma matriz de diferentes pontos de moléculas

receptoras, a concretização agora descrita possibilita um rastreio de alto débito de amostras altamente concentradas. Numa variante preferida, um dispositivo de detecção com um formato de uma matriz (tal como Dispositivo de Matriz de Acoplamento de Carga, ou uma matriz de fluorescência induzida por um laser de micro lente do tipo apresentado em Bruno, A E., et al., 1998, Microoptical fluorescence detection for chip based multiplexed analysis systems, em Micro Total Analysis Systems, Eds. Harison, D. J. e van den Berg, A., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pág. 281-285) capaz de monitorizar uma placa matricial completa é utilizada para detectar e monitorizar a ocorrência de acontecimentos de ligação nos pontos da molécula receptora. Na Figura 17, as setas de dois sentidos 200 representam pontos possíveis de detecção para um tal sistema de detecção em matriz.

De acordo ainda com outra concretização preferida, o método da presente invenção pode ser utilizado para determinar a cinética de ligação e a constante de ligação de equilíbrio variando o tempo durante o qual o dito êmbolo de amostra limitado se encontra em contacto com os ditos pontos da molécula receptora e medindo a quantidade de moléculas alvo do fluido ligadas selectivamente com um dispositivo de detecção sobre o ponto durante ou depois da passagem da amostra.

De acordo com outra concretização ainda mais preferida, o dito êmbolo de amostra limitado no método da invenção possui uma largura preferencialmente na gama entre 0,5 e 0,8 vezes a largura dos ditos pontos de molécula receptora, e em que o movimento da segunda superfície é parado, quando o dito êmbolo da amostra atingiu a posição de um dado ponto de molécula receptora.

De acordo ainda com uma outra concretização mais preferida, a ligação das ditas moléculas alvo na amostra com as ditas moléculas receptoras sobre a superfície do substrato é seguida por um passo de reacção química, e em que a cinética de reacção é determinada variando o tempo durante o qual o dito êmbolo se encontra em contacto com a dita molécula receptora.

De acordo ainda com uma outra concretização mais preferida, no método da presente invenção pelo menos um dispositivo de detecção encontra-se posicionado a uma determinada distância, preferencialmente entre 100 e 1000 μm a montante, ou a jusante de uma determinada molécula receptora e em que a diferença na concentração do analito alvo entre e depois da passagem do dito êmbolo da amostra na dita molécula receptora é utilizada para determinar a quantidade de analitos alvo ligados.

A representação esquemática dada na Figura 18 mostra como injectando um êmbolo de amostra de moléculas 1 distintamente limitado, o método de acordo com a presente invenção pode também ser utilizado para determinar a cinética intrínseca de acontecimentos de ligação alvo - receptor. Explorando a possibilidade de utilizar canais microfluidicos com uma espessura que é apenas um número limitado de vezes maior do que o diâmetro molecular das moléculas da amostra, as moléculas só têm que se difundir por uma distância negligível, de modo que o tempo de ligação registado encontra-se apenas relacionado com o presente processo de ligação e não se encontra enviesado pelo processo de difusão lento. Um método de medição da cinética de ligação preferido encontra-se baseado na injeção de um êmbolo de amostra que tem preferencialmente aproximadamente a mesma largura que a largura 120 que a mancha 2 da molécula receptora e compreende um primeiro passo em que o dito êmbolo da

amostra 100 é transportado por meio de um fluxo gerado por tensão em direcção ao dito ponto da molécula receptora 2 (Fig. 18a). Quando o êmbolo da amostra atinge o dito ponto (Fig. 18b), o fluxo pode ser parado num determinado tempo de contacto pré-seleccionado t_{cont} ou pode ser continuado a uma velocidade pré-determinada u seleccionada de modo a que o tempo da passagem pelo ponto ou tempo de residência $t_{residência}$, determinado pela razão do comprimento da mancha 120 e velocidade seleccionada u , iguale o tempo de contacto de interesse t_{cont} . Este tempo de contacto varia preferencialmente entre 0,5 milissegundos e várias horas, mas vai ser preferencialmente entre 1 milissegundo e 10 minutos. Os tempos de contacto ultra curtos da ordem de um milissegundo pode ser conseguido por exemplo fazendo passar um fluido com uma velocidade de 0,2 m/s através de uma mancha com uma largura axial de 20 μm . A um nível molecular, os tempos de contacto são mesmo ordens de grandeza mais pequenos. Assim, deverá por isso ser óbvio que o método de acordo com a presente invenção permite realizar tempos de contacto de molécula a molécula ultra-curtos que são da ordem dos tempos de ligação intrínsecos. Esta é uma vantagem muito atractiva do método de acordo com a presente invenção. Utilizando um dos sistemas de deslocamento automatizados de elevada resolução munidos com um motor de andares e disponibilizando mesmo uma exactidão sub-micrométrica e permitindo grandes velocidades de deslocamento da ordem de 10 cm/s ou mais tanto a posição do êmbolo da amostra e a velocidade de deslocamento podem ser controlados com exactidão.

Realizando diferentes experiências a tempos de contacto diferentes, e representando a quantidade ligada N em função do tempo de contacto, ou tempo de residência

$t_{\text{residência}}$, pode ser estabelecida a curva completa da cinética de ligação. Para determinar a velocidade da reacção de desadsorção, um êmbolo de uma solução líquida com características promotoras de desadsorção pode ser injectada e transportada através de uma determinada distância atrás do êmbolo da amostra.

Para aumentar o limite de detecção das medições da ligação cinética de acordo com o processo da presente invenção é também possível injectar volumes maiores de amostra (i.e, com um comprimento maior do êmbolo) e posteriormente transportá-los a uma velocidade pré-definida através do ponto da molécula do receptor. Multiplicando a quantidade total N_{tot} ligada sob estas condições pela razão do tempo de residência ($t_{\text{residência}} = \text{comprimento da mancha} / \text{velocidade do fluido}$) em relação ao tempo de contacto total ($t_{\text{total}} = \text{comprimento de um êmbolo com amostra} / \text{velocidade do fluido}$), a quantidade N é obtida que contém a mesma informação cinética que a quantidade N obtida a partir das experiências com êmbolos curtos citadas anteriormente, mas que possui um menor erro de medida.

De acordo com ainda outra concretização no método da presente invenção a dita segunda superfície móvel é utilizada para transportar um êmbolo de moléculas alvo desadsorvidas ou dos produtos de um ensaio de uma reacção enzimática num único êmbolo em direcção a um dispositivo de detecção. O dito dispositivo da invenção pode ser por exemplo um espectrómetro de massa, capaz de quantificar e identificar moléculas alvo desadsorvidas ou os produtos de reacção enzimática, e localizados a jusantes da molécula receptora.

De acordo ainda com outra concretização no método da presente invenção um teste de severidade é efectuado através da aplicação de uma alteração repentina na

composição do fluido, ou temperatura, ou aplicando um campo eléctrico externo.

De acordo ainda com outra concretização o método da presente invenção pode ser utilizado para medir a quantidade de moléculas alvo ligadas selectivamente a moléculas receptoras ancoradas à superfície do substrato, utilizando meios de detecção. A quantidade de moléculas alvo ligadas selectivamente pode ser medida após lavagem adequada e secagem da dita amostra, utilizando por exemplo um microscópio laser confocal de varrimento, uma matriz CCD, ou um dispositivo de varrimento MALDI/MS.

De acordo com outra concretização, a quantidade de moléculas alvo ligadas selectivamente pode ser medida sobre o chip. Isto pode ser efectuado utilizando por exemplo fluorescência de reflexão total interna, análise por onda acústica de superfície, ressonância de plasmon de superfície, electroquímica, ou análise de impedância eléctrica, condutância, análise amperométrica ou de capacitância para distinguir entre as moléculas ligadas e não ligadas.

Actualmente é conhecido um grande número de métodos que permite a monitorização contínua da quantidade de moléculas ligadas à superfície do ponto sem estarem enviesados pelas moléculas alvo não ligadas presentes na fase fluida que rodeia as moléculas receptoras. Como é conhecido dos peritos da técnica tais métodos incluem, mas não se encontram limitados a ressonância de plasmon de superfície, onda acústica de superfície, fluorescência de reflexão total interna, métodos electroquímicos ou métodos potenciométricos, conductimétricos, amperométricos e de capacitância. Numa outra concretização preferida, a detecção da quantidade de moléculas ligadas é efectuada após um êmbolo com amostra ser transportado para longe do ponto de ligação (vide

Fig. 18c) e foi substituído por uma solução líquida isenta de amostra possuindo a composição salina e de tampão certa para evitar a desadsorção das moléculas alvo ligadas. Deste modo, o método de detecção não deverá estar limitado a técnicas de detecção de superfície, tal como o método citado acima, mas podem ser utilizados métodos de detecção mais universais e baratos, tal como fluorescência induzida por laser (LIF). Tal como representado na figura 18c, este método encontra-se baseado na utilização de um feixe de laser incidente 150 com luz coerente de um dado comprimento de onda para induzir a emissão de um campo magnético fluorescente 160 a um outro comprimento de onda, que pode ser recolhido sob um ângulo diferente. Numa outra concretização preferida a quantidade de moléculas ligadas é detectada utilizando um dispositivo de detecção localizado a uma dada distância (curta) a jusante ou a montante de um dado ponto de molécula receptora. Nesta concretização, a diminuição da concentração de um analito alvo é utilizada como uma medida indirecta da quantidade ligada. Numa concretização preferida, a quantidade de moléculas alvo livres pode ser determinada tanto antes como depois do contacto com o ponto da molécula de receptor utilizando um ponto único de detecção. Posicionando o dispositivo de detecção numa dada posição a jusante do ponto da molécula receptora, o dito dispositivo de detecção pode numa primeira fase de transporte ser utilizado para medir a quantidade total de moléculas alvo não ligadas presentes numa determinada amostra, antes de a amostra estar em contacto com o ponto da molécula receptora. Após o ponto da amostra ter passado pelo detector e ter sido colocada em contacto com o dito ponto da molécula receptora, a superfície móvel pode ser movida na direcção oposta à da primeira fase de transporte, de modo a que o êmbolo passe

pelo mesmo dispositivo de detecção novamente permitindo determinar a redução da concentração da molécula alvo livre.

Nas concretizações em que as moléculas ligadas têm que ser desadsorvidas e posteriormente transportadas num êmbolo com uma diluição mínima em direcção a um dispositivo de detecção ou na direcção do fim do canal (para fins de recolha de fracções) é preferido que as linhas de velocidade do fluxo gerado por tensão corram em paralelo, de modo que ocorra um mínimo de mistura lateral (i.e. na direcção z) entre os diferentes êmbolos de amostra sendo analisados em paralelo.

Numa outra concretização preferida de acordo com a presente invenção particularmente adequada para determinar a estrutura e a composição de ligandos desconhecidos ligados às moléculas de receptor, a possibilidade de transportar êmbolos de líquidos com uma quantidade limitada de dispersão axial pode ser utilizada para transportar um êmbolo de líquido que promove a desadsorção de um dado ponto de moléculas receptoras, em que as moléculas alvo ligadas são desadsorvidas e posteriormente transportadas num único êmbolo concentrado em direcção a um dispositivo de detecção, tal como um espectrómetro de massa, localizado a jusante do ponto da molécula receptora. No caso de ensaios de reacções enzimáticas, o método de acordo com a presente invenção pode também ser utilizado para transportar os produtos de reacção em êmbolos altamente concentrados em direcção a um dispositivo de espectroscopia de massa para análise subsequente do produto de reacção. Ainda numa outra concretização, a caracterização de ligandos desconhecidos ligados pode ocorrer via matriz por desadsorção assistida por laser / espectroscopia de massa ionizante (MALDI/MS),

após lavagem adequada e secagem da mancha da superfície do receptor.

De acordo com outra concretização, no método de acordo com a invenção as medições podem ser efectuadas num formato matricial 1-D ou 2 D e em que é utilizado um detector matricial 1-D ou 2-D e em que todas as linhas de corrente fluem de um modo substancialmente paralelo para evitar mistura entre bandas de fluxo paralelas.

A maior parte dos métodos de detecção em chip citados acima podem também ser aplicados num formato em matriz, em que uma variedade de pontos é monitorizada simultaneamente. Detecção por matriz-LIF utilizando uma matriz 2-D de micro lentes foi por exemplo demonstrada por Bruno et al. (1998). Todos os métodos eléctricos e piezo- eléctricos e acústicos podem utilizando uma larga gama de técnicas de micro maquinação actualmente existentes ser também aplicados num formato em matriz. Mesmo espectrometria de massa multiplex utilizando por ex. um monitor de EM para monitorizar o conteúdo de uma placa de 96 poços foi recentemente demonstrada por (Foret, F. et al., *Microdevices for Electrospray Mass Spectrometry in Micro Total Analysis Systems*, 1998 Eds. Harrison, D. J. e van den Berg, A, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda, pág. 35-38).

De acordo ainda com outra concretização no método da invenção diferentes substâncias fluidas podem ser transportadas num único êmbolo, i.e. à mesma velocidade para investigar acontecimentos de ligação ou reacção envolvendo um cofactor, ou para efectuar ensaios de ligação competitivos.

Numa outra concretização (vidé Figura 19), adequada para aplicações que necessitam de uma grande velocidade do fluido, as moléculas de receptor estão imobilizadas em

sulcos pouco profundos gravados com água forte para as proteger do elevado campo de tensão 5.

Adicionalmente deverá ser notado que em todas as presentes concretizações a superfície que é geralmente suposta gerar o fluxo por tensão pode também transportar elementos receptores selectivos.

Lisboa, 17 de Novembro de 2006

Reivindicações

1. Dispositivo para realização de reacções de ligação alvo- receptor num canal de fluxo munido de moléculas receptoras, caracterizado por a dita reacção de ligação ser gerada por contacto de uma amostra fluida compreendendo uma ou mais moléculas alvo com as ditas moléculas receptoras, o dito dispositivo compreende ainda:

- uma primeira superfície sólida munida com posições discretas e isoladas para uma tal reacção de ligação no dito canal de fluxo,
- uma segunda superfície sólida capaz de ser movida de um modo paralelo, passando ao longo ou sobre a primeira superfície e disposta de um modo interactivo com o fluxo com a dita amostra fluida e dita primeira superfície para formar um canal com uma espessura entre 10 nanómetros e 10 micrómetros,
- em que a dita segunda superfície é configurada para se mover numa série alternada de sequências de movimento-paragem.

2. Dispositivo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a dita sequência de movimento-paragem compreender um deslocamento de fluido cobrindo uma distância igual à distância entre dois locais consecutivos de reacção de ligação.

3. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, ou 2 caracterizado por a dita sequência de movimento-paragem compreender um período de paragem para permitir às moléculas alvo hibridizarem-se, ou ligarem-se às moléculas receptoras na ausência de convecção ou de outros efeitos de força de tensão.

4. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por a segunda superfície ser maior do que a dita primeira superfície.

5. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado por a primeira superfície compreender sulcos na superfície possuindo preferencialmente aproximadamente a mesma profundura que a altura das moléculas receptoras aí imobilizadas.

6. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado por o espaço entre a primeira e a segunda superfície ser controlado por uma matriz de meios separadores que se prolonga a partir de pelo menos uma das superfícies e sendo preferencialmente revestido com uma camada isenta de desgaste e de baixa fricção.

7. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado por a segunda superfície transportar uma rede de protuberâncias que se prolongam a partir da dita superfície.

8. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado por a dita segunda superfície ser escolhida a partir de uma placa plana, que se pode deslocar linearmente, uma correia flexível que se pode deslocar linearmente, um disco rotativo ou um cilindro rotativo.

9. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado por a primeira e segunda superfície serem suficientemente finas e

flexíveis para se ajustarem de forma óptima à superfície oposta.

10. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado por a dita primeira superfície estar coberta homogeneamente com o mesmo tipo de moléculas receptoras, ou estar coberta com uma rede a uma ou a duas dimensões de diferentes pontos de moléculas receptoras.

11. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, compreendendo ainda meios para o controlo da temperatura e/ ou meios de detecção e/ ou meios para o deslocamento automático da dita segunda superfície.

12. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado por a dita primeira superfície transportar pelo menos um recipiente útil para conter grandes quantidades de líquido da amostra, de líquido para teste de severidade, ou líquido de lavagem antes e/ ou após a sua passagem ao longo da superfície receptora.

13. Dispositivo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por o dito recipiente ser uma câmara de mistura prévia adequada para variar a composição do teste de severidade de tal modo que possa ser efectuado um teste de severidade do tipo de gradiente.

14. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado por a dita primeira e a dita segunda superfície possuírem ambas uma forma do tipo disco.

15. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado por a dita primeira superfície compreender uma rede de orifícios porosos.

16. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado por a dita segunda superfície compreender meios receptores selectivos.

17. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado por a dita sequência de movimento- paragem da segunda superfície ser disponibilizada por um sistema de deslocamento programável automático.

18. Processo para a ligação de uma ou várias moléculas alvo compreendidas numa amostra de fluido a pelo menos uma molécula receptora, pelo menos parcialmente ancorada a uma primeira superfície sólida num canal de fluxo, caracterizado por as ditas moléculas alvo serem transportadas paralelamente à dita primeira superfície, por meio de uma segunda superfície, cuja segunda superfície sólida é movida paralelamente ao longo, ou sobre a dita primeira superfície, em que a dita segunda superfície move-se como uma série alternada de sequências de movimento- paragem e a espessura de um canal está entre 10 nanómetros a 10 micrómetros.

19. Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por a sequência movimento- paragem compreender um período de paragem para permitir às moléculas alvo hibridizarem ou ligarem-se às moléculas receptoras na ausência de convecção ou efeitos de tensão.

20. Processo de acordo com as reivindicações 18 ou 19, caracterizado por a segunda dita superfície ser escolhida a partir de uma superfície que se pode mover linearmente, uma correia flexível que se pode mover linearmente, um disco rotativo ou um cilindro rotativo.

21. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 20, caracterizado por a dita primeira superfície ser sujeita a um movimento de translacção ou rotação numa direcção diferente da direcção do movimento da dita segunda superfície.

22. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 21, caracterizado por a dita segunda superfície ser utilizada para transportar um êmbolo de moléculas alvo desadsorvidas ou produtos de um ensaio de reacção enzimática num único êmbolo em relação a um dispositivo de detecção.

23. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 22, caracterizado por um teste de severidade ser efectuado aplicando uma determinada alteração na composição do fluido ou temperatura, ou por aplicação de um campo eléctrico externo.

24. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 23 utilizado para medir a quantidade de moléculas alvo ligadas selectivamente a moléculas receptoras pelo menos parcialmente ancoradas à primeira superfície do dito substrato.

25. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 24, caracterizado por a quantidade de

moléculas alvo selectivamente ligadas ser medida sobre um chip.

26. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 25 utilizado para a purificação de quantidades de produção de um determinado analito alvo compreendido numa amostra fluida.

27. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 26, caracterizado por a quantidade de amostra feita contactar com as moléculas de receptor variar preferencialmente desde alguns poucos picolitros a algumas centenas de microlitros.

28. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 27, caracterizado por uma segunda superfície ser utilizada para injectar e transportar volumes bem controlados de misturas fluidas com características promotoras de desadsorção para o teste de severidade.

29. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 28, caracterizado por a distância entre as ditas superfícies ser diminuída gradualmente durante o decurso da operação do ensaio.

30. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 29, caracterizado por um êmbolo limitado de amostra contendo uma ou várias moléculas alvo diferentes ser injectada num canal formado pelas ditas duas superfícies, caracterizada por o dito êmbolo de amostra ser posteriormente transportado através de uma ou vários pontos de moléculas receptoras, e caracterizado por a largura axial do dito êmbolo da amostra variar

preferencialmente entre 0,5 e 10 vezes a largura dos ditos pontos de moléculas receptoras e em que o dito êmbolo da amostra é precedido e seguido por um êmbolo de líquido isento de amostra.

31. Processo de acordo com a reivindicação 30, que é utilizado para determinar a cinética de ligação e a constante de equilíbrio de ligação fazendo variar o tempo durante o qual o dito êmbolo limitado da amostra está em contacto com o dito ponto da molécula receptora e medindo a quantidade de moléculas alvo do fluido ligadas selectivamente com um dispositivo de detecção sobre o ponto durante ou após a passagem da amostra.

32. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 ou 31, caracterizado por o dito êmbolo de amostra limitado ter uma largura que varia preferencialmente entre 0,5 e 0,8 vezes a largura dos ditos pontos de moléculas receptoras, e em que o movimento da segunda superfície é parado quando o dito êmbolo de amostra atingiu a posição de um determinado ponto de uma molécula receptora.

33. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 32, caracterizado por a ligação das ditas moléculas alvo na amostra com as ditas moléculas receptoras sobre a superfície do substrato ser seguida por um passo de reacção química, e em que a cinética da reacção é determinada variando o tempo durante o qual o dito êmbolo da amostra está em contacto com as ditas moléculas receptoras.

34. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 33, caracterizado por pelo menos um

dispositivo de detecção se encontrar posicionado a uma determinada distância, preferencialmente entre 100 e 1000 μm a jusante ou a montante de uma determinada molécula receptora, e em que a diferença na concentração do analito alvo entre antes e depois da passagem do dito êmbolo da amostra pela dita molécula receptora é utilizada para determinar a quantidade de analitos alvo ligados.

35. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 34, caracterizado por as medidas serem efectuadas numa matriz com um formato 1-D ou 2-D e em que uma matriz de detecção 1-D ou 2-D é utilizada e em que todas as linhas de corrente de fluxo correm de um modo paralelo para evitar a mistura entre vias paralelas de fluxo.

36. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 35, caracterizado por diferentes substâncias fluidas serem transportadas num único êmbolo i.e. à mesma velocidade para investigar acontecimentos de ligação ou reacção envolvendo um cofactor, ou para efectuar ensaios de ligação competitivos.

Lisboa, 17 de Novembro de 2006

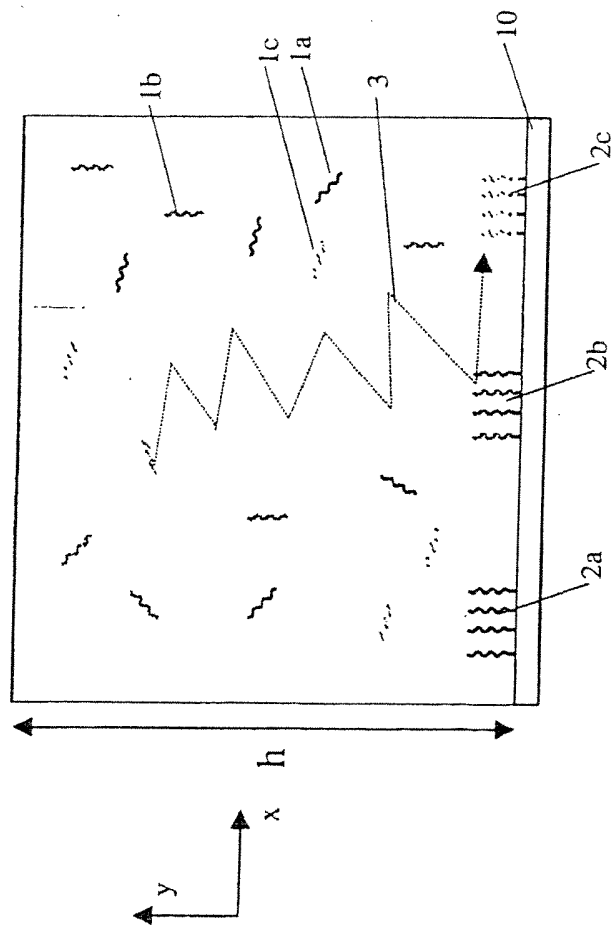
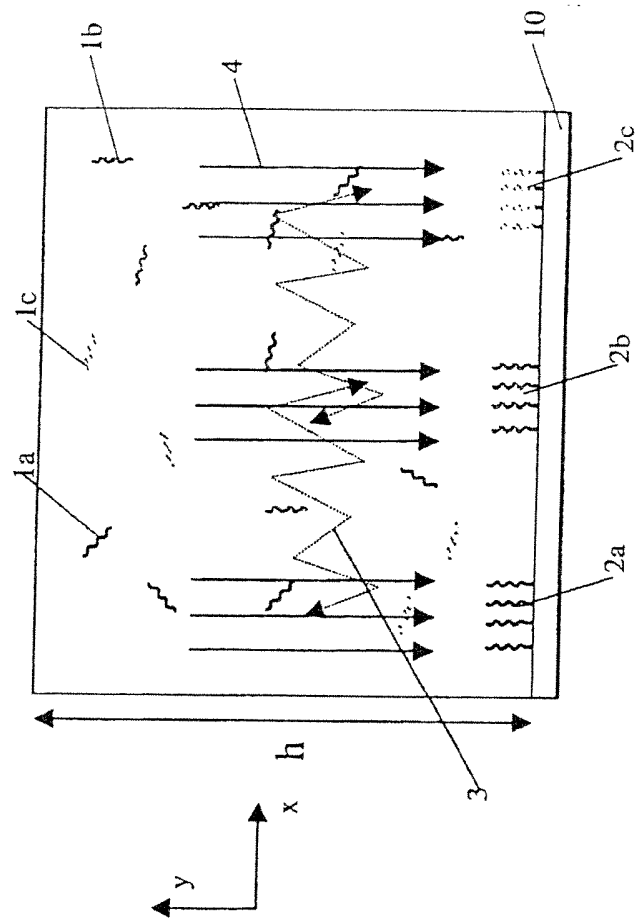


Figura 1.

**Figura 2.**

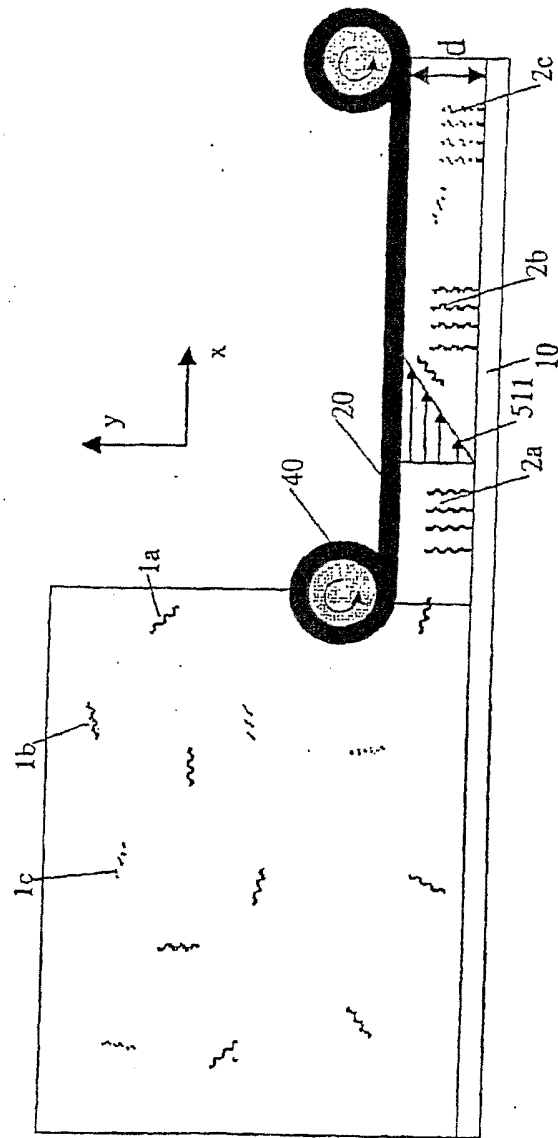
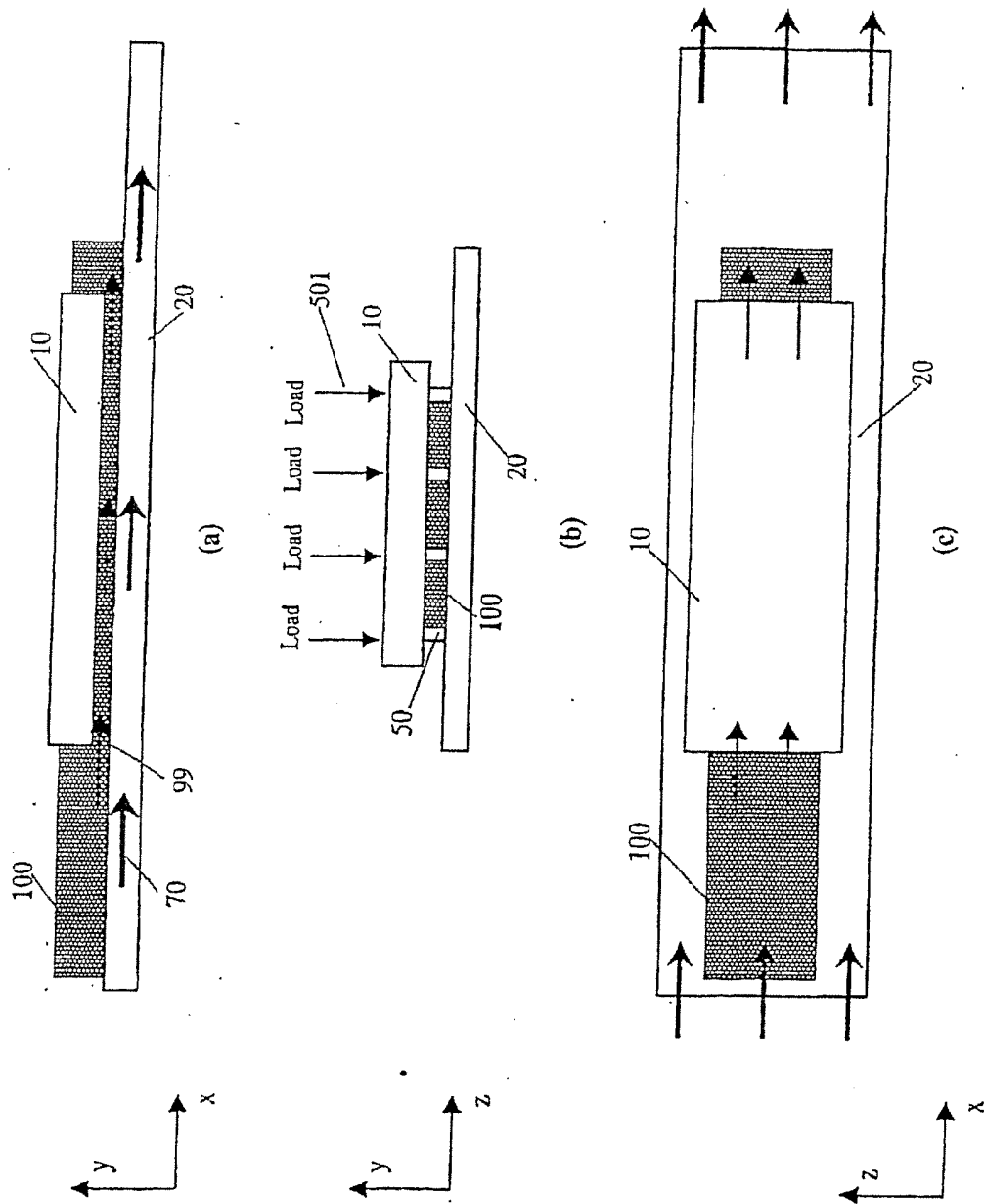
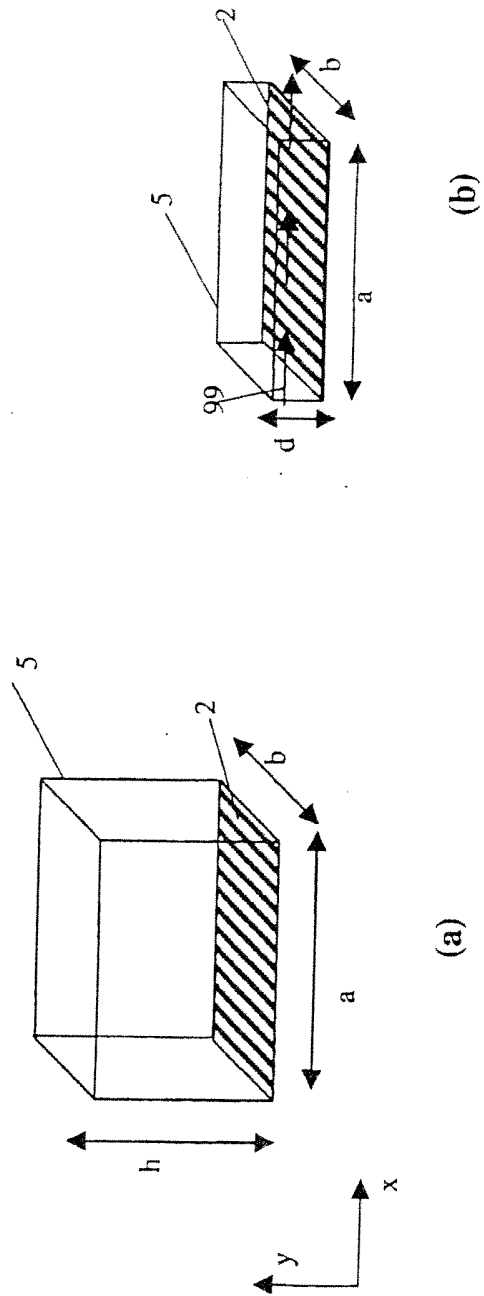


Figura 3.

**Figure 4.**

**Figura 5.**

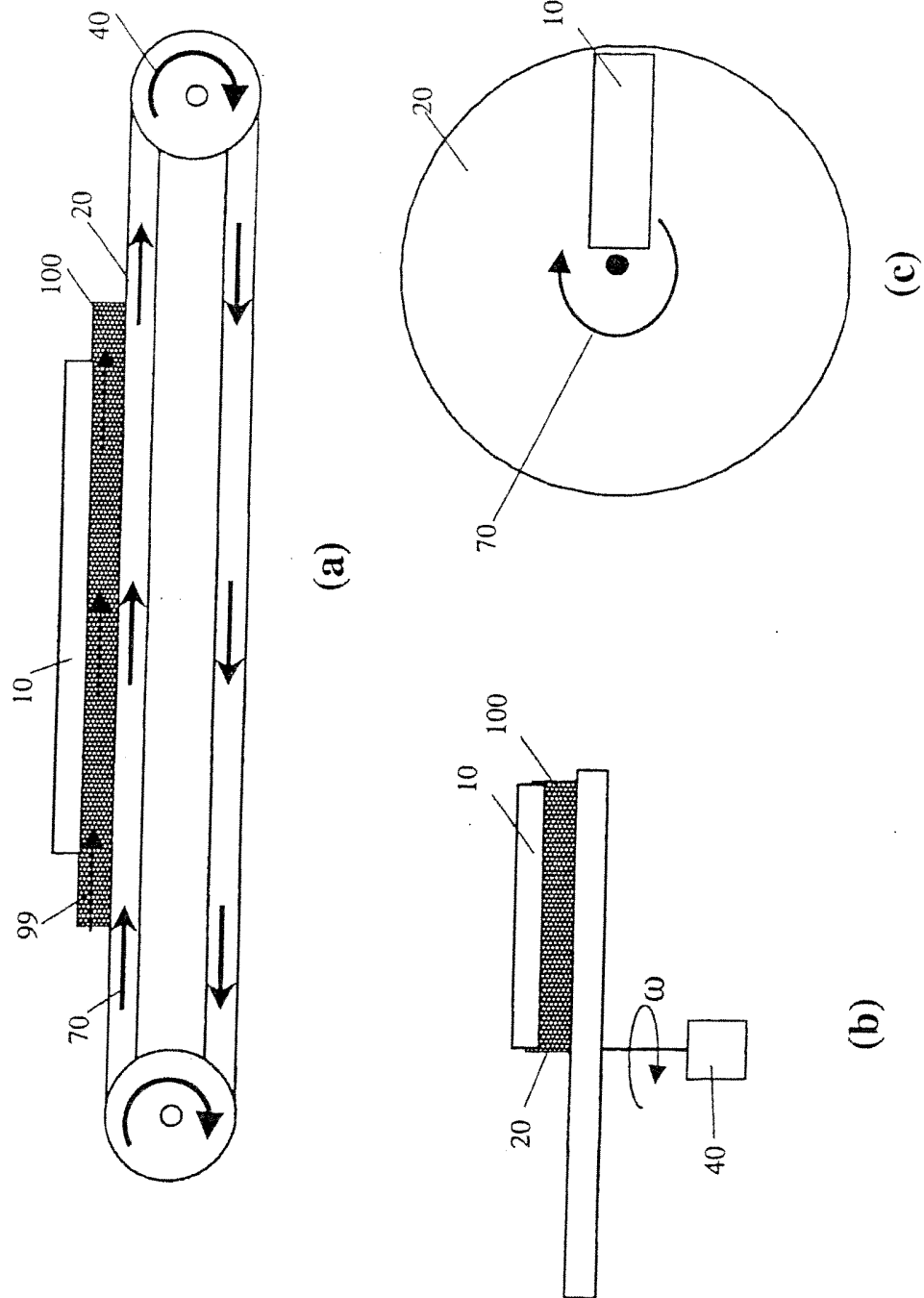


Figure 6.

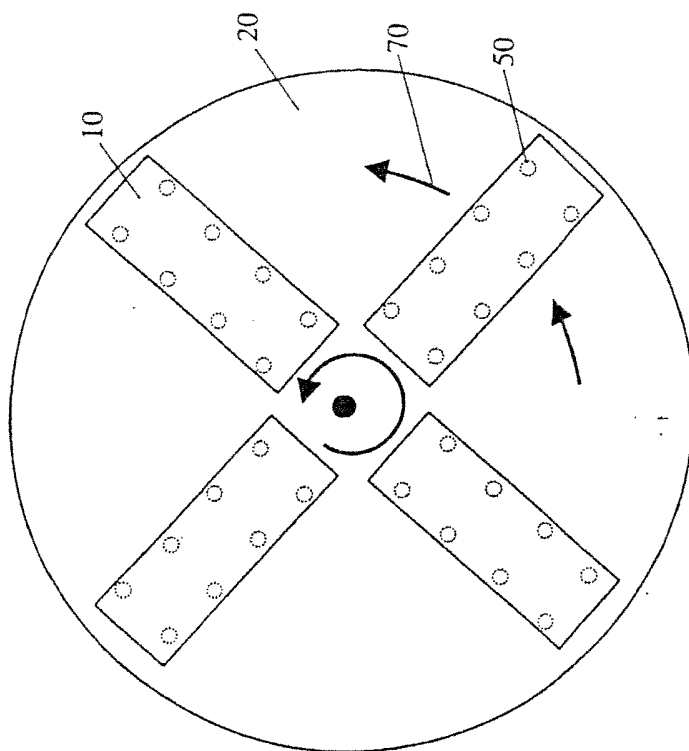


Figure 7.

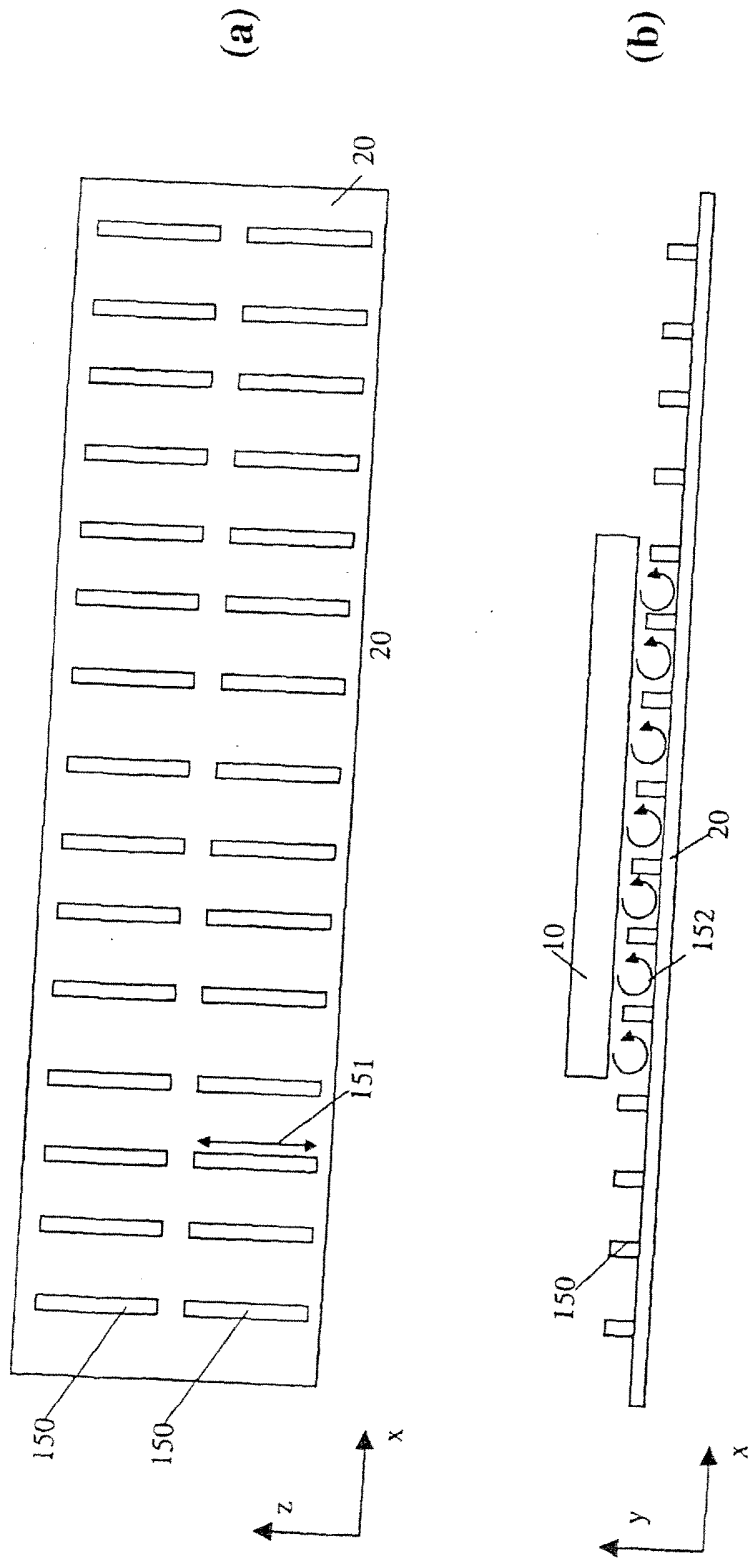


Figure 8.

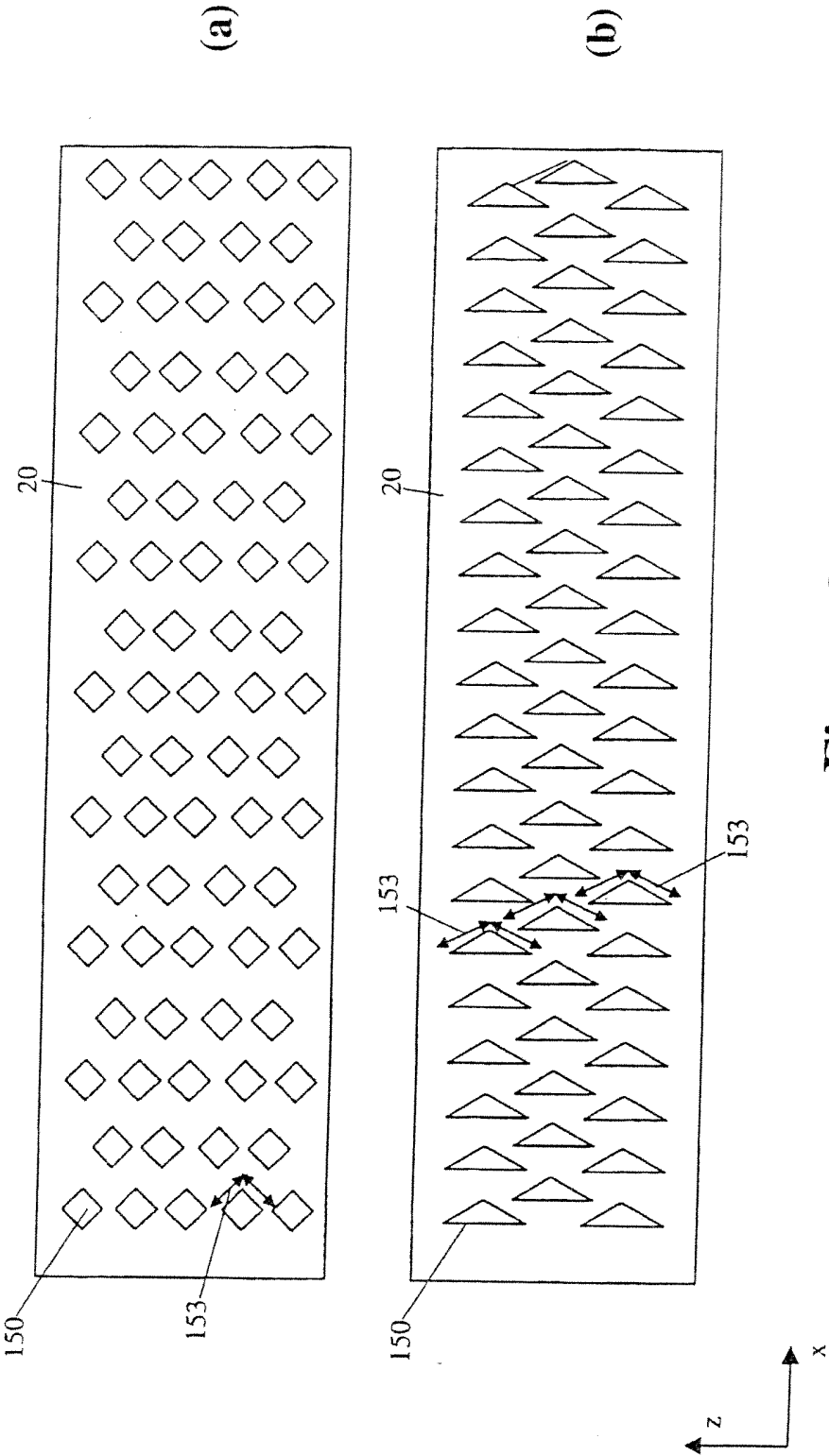


Figure 9.

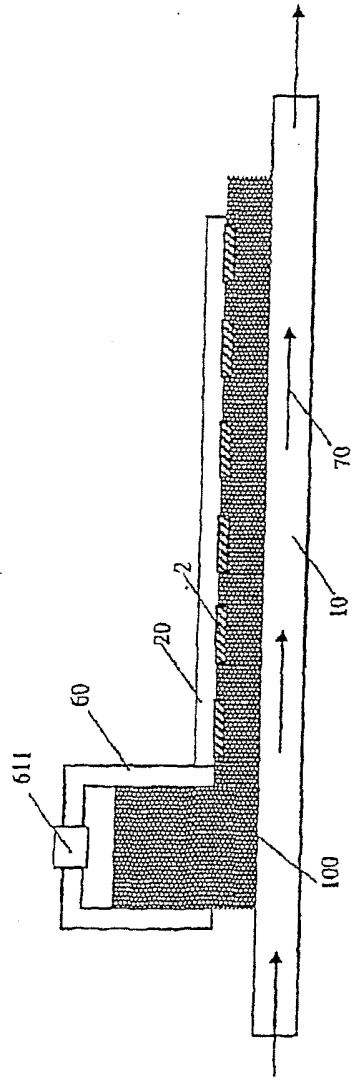


Figure 10.

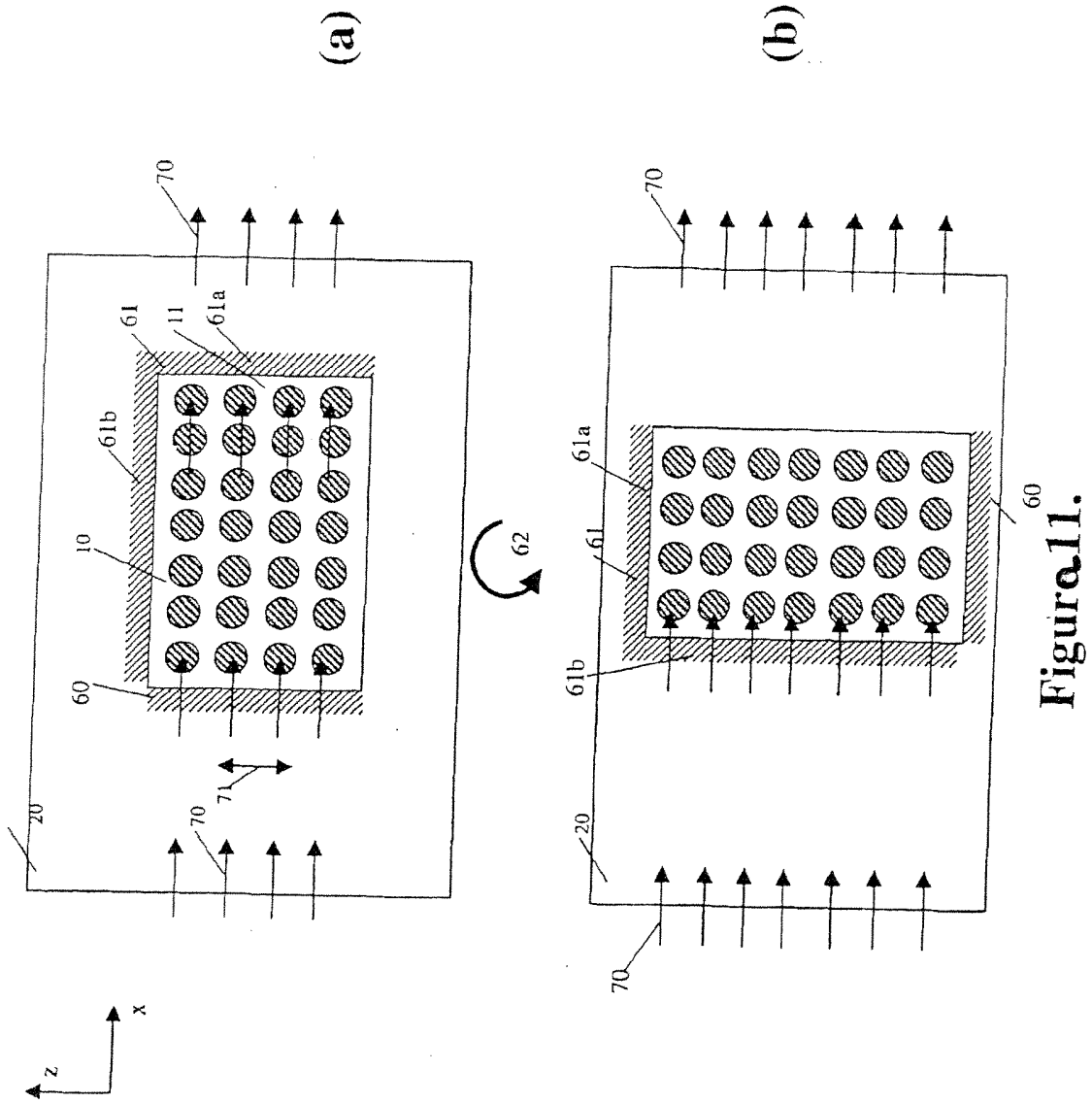


Figure 11.

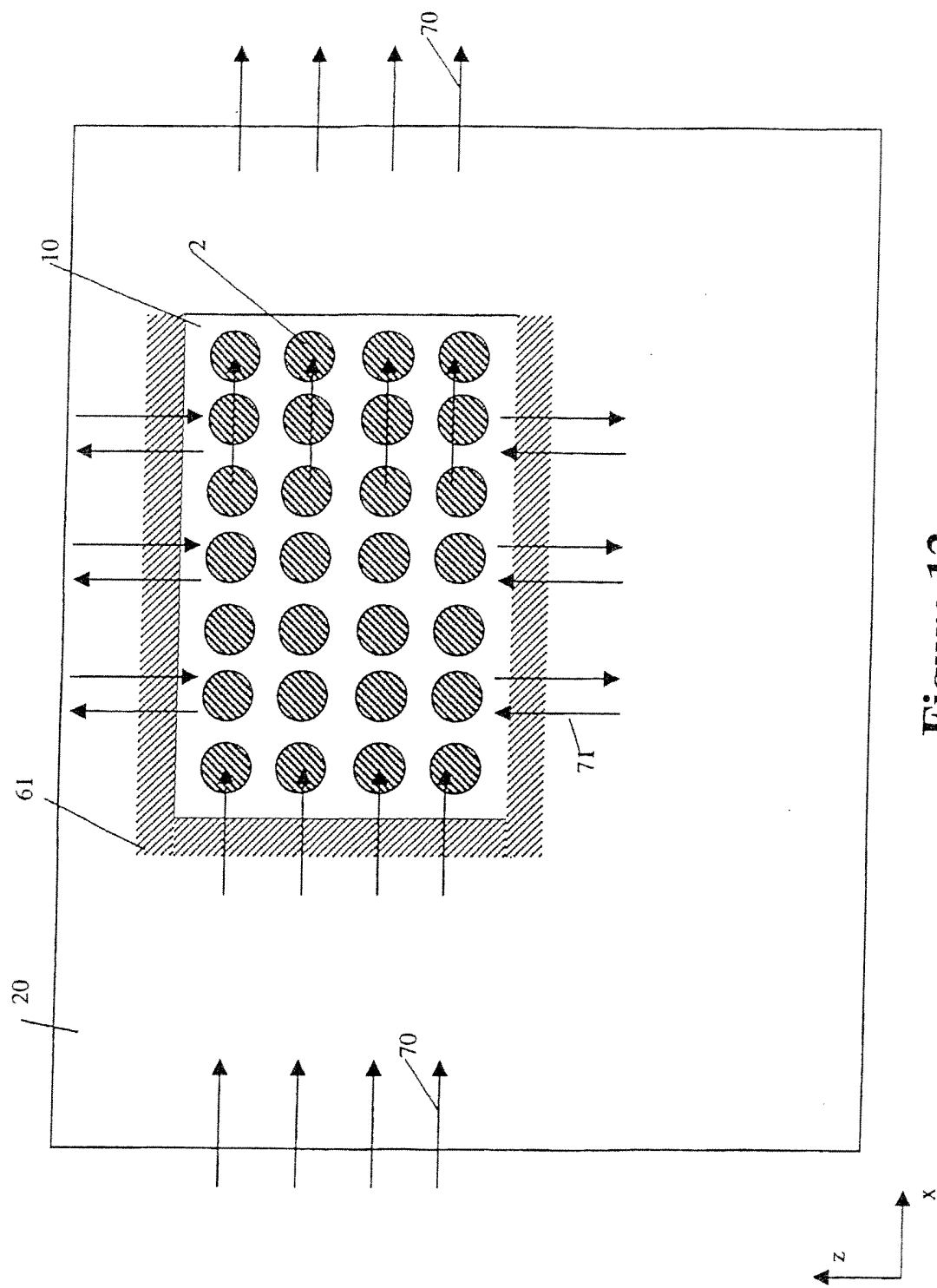


Figure 12.

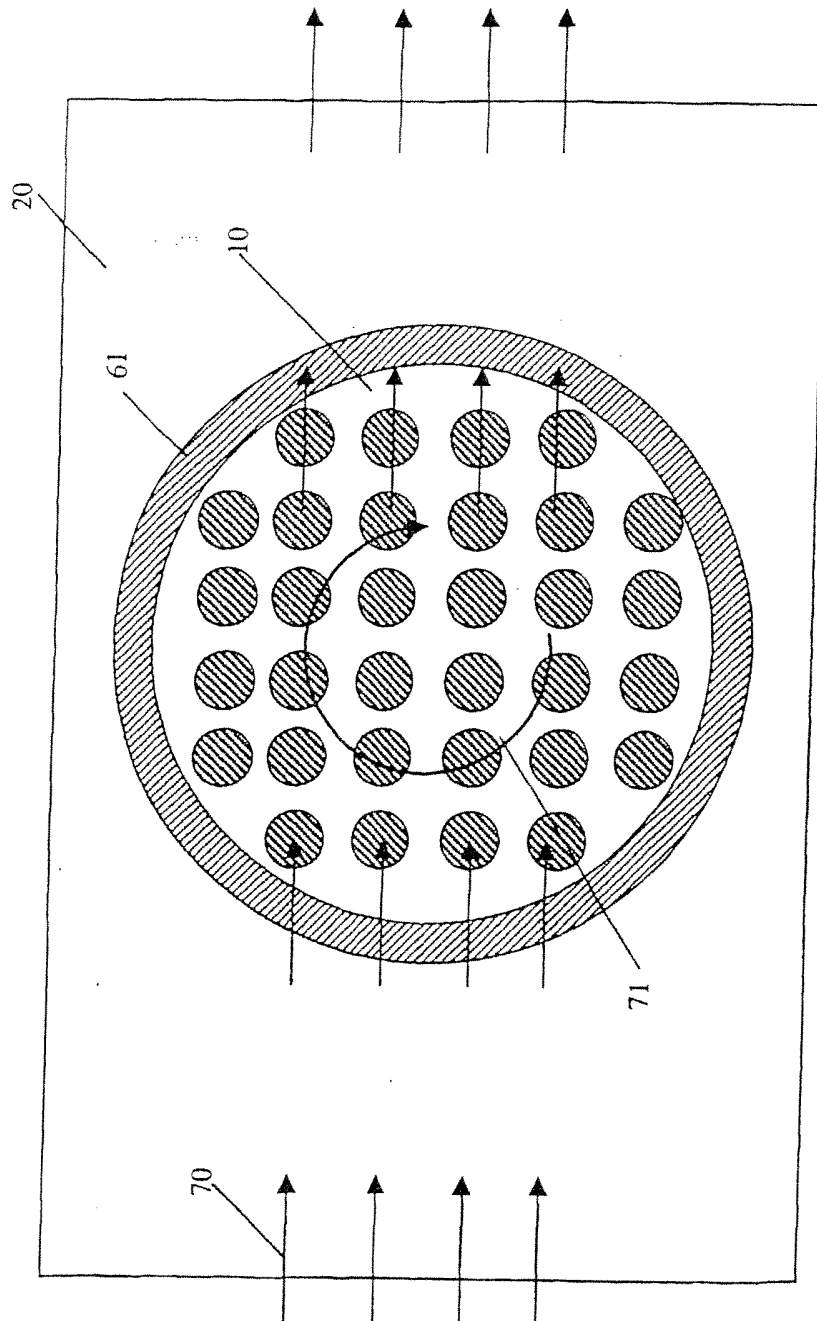


Figure 13.

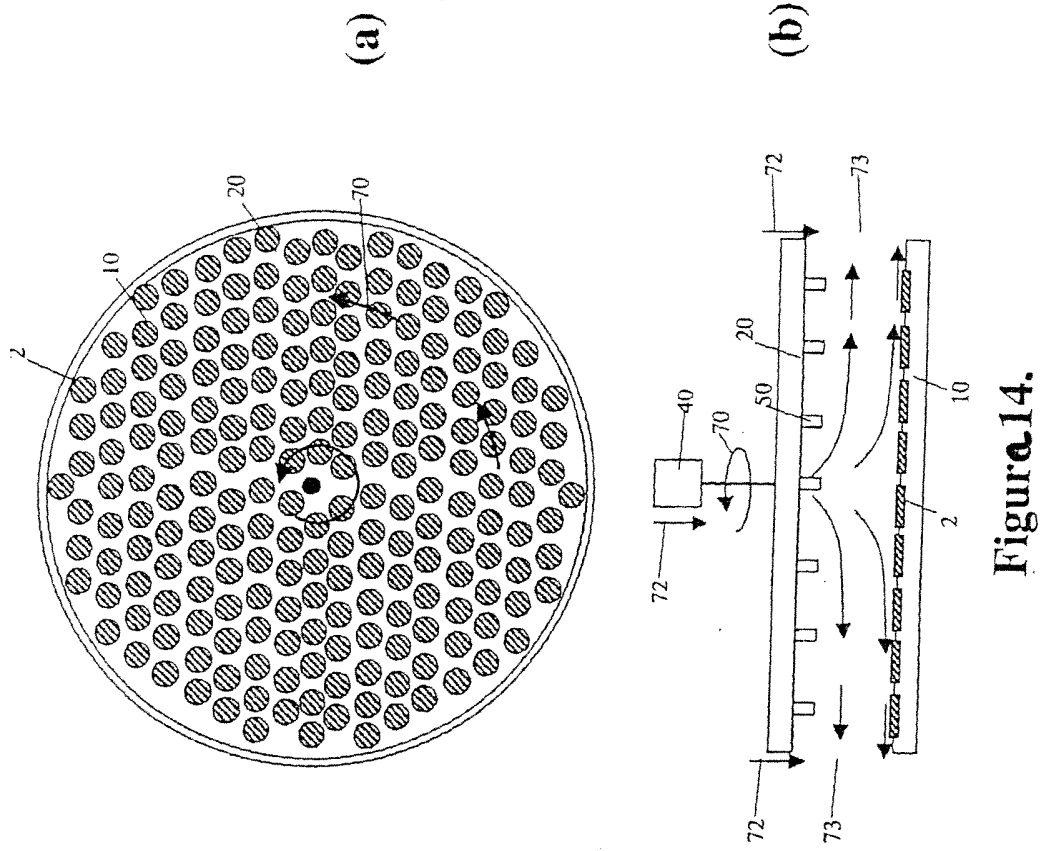


Figure 14.

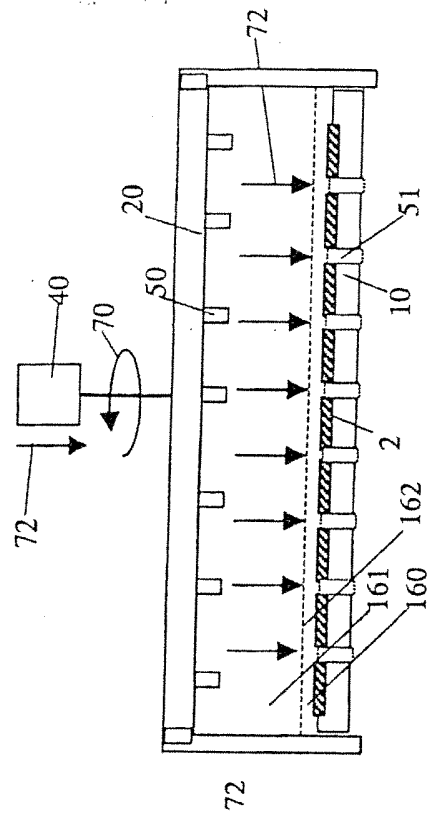
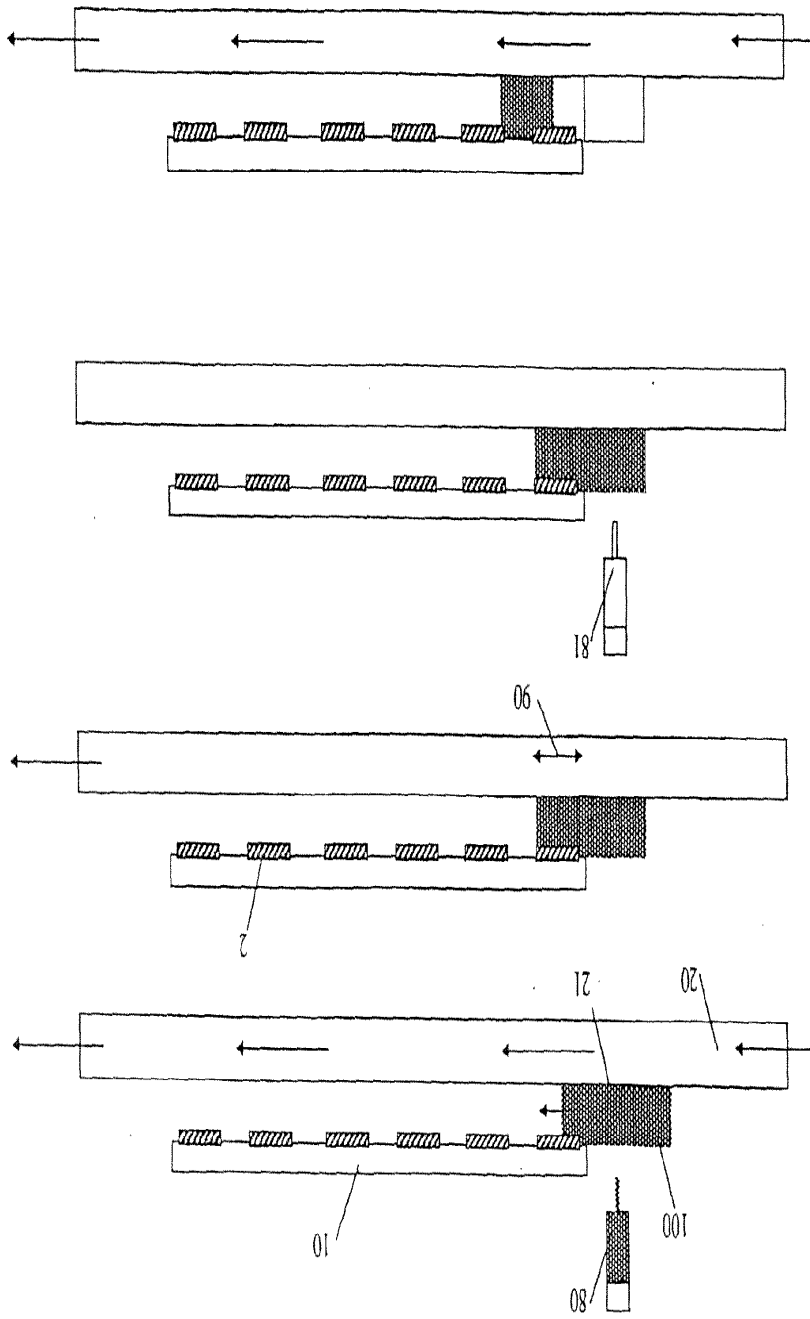


Figure 15.

Figura 16.



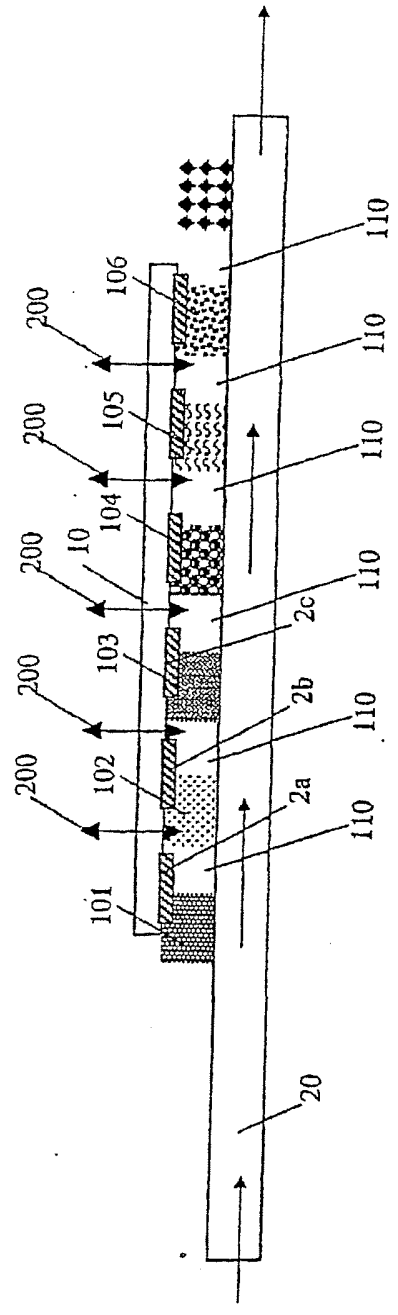


Figure 17.

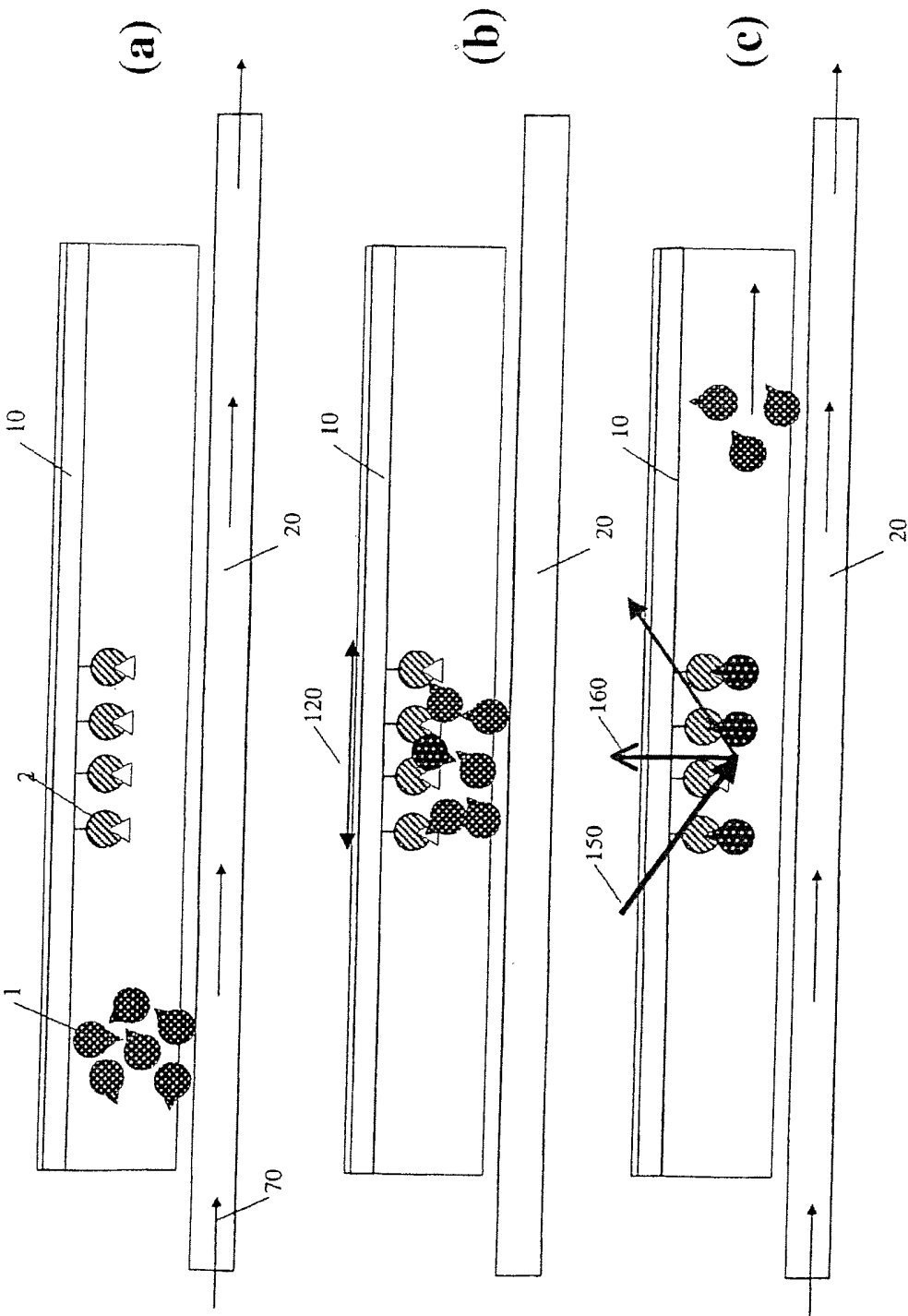


Figure 18.

