DESCRIÇÃO

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

N.º. 98.009

REQUERENTE: CHIRON CORPORATION

EPÍGRAFE: "INSTRUMENTO AUTONOMO PARA ANALISE"

INVENTORES: Rich T. Smethers, norte americano; Lev J. Leytes, apátrida; Brian D. Warner; norte americano; Robert R. Shadel, norte americano; e Michael S. Urdea, norte americano, residentes respectivamente em 360 Boulder Street, Milpitas, California 95035; em 256 Ferne Avenue, Palo Alto, California 94306; em 134 Alhambra Avenue, Martinez, California 94553; em 1616 Church Street, San Francisco, California 94131; e em 100 Bunce Meadow Road, Alamo, California 945, Estados Unidos da América.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

15 de Junho de 1990 , nos Estados Unidos da América, sob o Nº. 07/539.002.

Titular: **CHIRON CORPORATION**

Epígrafe: **"INSTRUMENTO PARA ANALIZAR UMA ESPÉCIE NUMA AMOSTRA LÏQUIDA"**

M E M O R I A D E S C R I T I V A

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um instrumento para analizar uma espécie numa amostra líquida e, em particular, a um instrumento autónomo que liberta reagentes pré-embalados, os quais podem ser adicionados à amostra, numa sequência pré-estabelecida.

Antecedentes da Invenção

Muitas análises de espécies implicam uma sequência de reacções em fases, nas quais uma espécie a ser analizada é feita reagir sequencialmente com dois ou mais reagentes. Tipicamente, este tipo de análise consiste em adicionar um reagente, e esperar, durante um tempo pré-determinado, até que ocorra a reacção de mistura; apenas depois desta reacção se adiciona o reagente seguinte. Nos casos em que a análise implica a ligação da espécie a um suporte sólido, a câmara de reacção, que contém a espécie ligada ao suporte, pode ser lavada entre as fases de

adição de reagentes.

Preferencialmente, as tais análises de adições múltiplas devem ser realizadas num instrumento simples e autónomo, capaz de ser adaptado para o funcionamento automatizado ou semi-automatizado, num ambiente clínico, ou, alternativamente, capaz de ser realizada com segurança numa residência ou consultório médico, pela utilização de processos simplificados de análise.

Existem vários instrumentos autónomos para diagnóstico contendo reagentes múltiplos e pré-embalados. A Patente Norte Americana No. 4.806.316 descreve um instrumento descartável para diagnósticos, no qual uma amostra liquida é distribuida através de câmaras de reacção múltipla, que podem conter reagentes pré-embalados para reacção com a espécie a ser analizada. O dispositivo pode ser adaptado para análises de reacção sequencial, pela transferência de cada amostra, sucessivamente através de duas ou mais câmaras, contendo as diversas câmaras os reagentes pré-embalados desejados.

A Patente Norte Americana No. 4.519.981 descreve um dispositivo rotativo para diagnóstico, dotado de uma série de câmaras dispostas lado a lado e sobrepondo-se radialmente, podendo cada uma delas conter um reagente pré-embalado. As células estão interligadas, a fim de permitir a passagem de uma amostra de fluido, através de cada câmara, até à câmara seguinte, devido ao movimento centrífugo em direcções opostas e alternadas. Isto é, a amostra de fluido é passada de uma primeira câmara para uma segunda câmara, localizada ao seu lado, pela rotação do instrumento numa direcção e, após um período pré-determinado de

reacção, a amostra de fluido é passada da segunda câmara para uma terceira câmara adjacente, por movimento rotativo na direcção oposta.

Outro dispositivo rotativo de multi-reacção é apresentado na Patente Norte Americana No. 4.390.499. O dispositivo tem uma série de compartimentos separados por vedações quebráveis. Durante o funcionamento, forças pneumáticas e centrífugas são usadas para romper as vedações entre os compartimentos, a fim de provocar a mistura sequencial do material reagente com a amostra.

A Patente Norte Americana No. 4.469.793 revela um dispositivo rotativo para diagnóstico, no qual uma amostra de fluido fica depositada numa câmara interna radial e é distribuída em volumes pré-determinados para cada uma de diversas câmaras receptoras externas, sob o efeito de forças centrífugas aplicadas pela rotação do dispositivo numa direcção, a fim de levar a amostra, inicialmente, para câmaras de extravaso e, a seguir, na direcção oposta a fim de levar volumes pré-determinados da amostra para dentro das câmaras externas. Os compartimentos das células podem conter líquidos diferentes para uso em análises simultâneas. Esta Patente também inclui um reactor sólido de partículas esféricas, destinado a recolher, sucessivamente, um volume da espécie que está a ser medida e, a seguir, um volume de um reagente contendo um indicador biológico.

Todos os instrumentos de análise descritos acima utilizam mecanismos de força centrífuga e/ou pressão, relativamente complicados, com a finalidade de libertar reagentes pré-embalados numa amostra, ou para transferir a amostra de uma

câmara de reacção para outra. Por esta razão, os instrumentos cujo fabrico pode ser relativamente dispendioso, podem também ter um funcionamento irregular devido às variações nas forças centripetas ou pneumáticas aplicadas durante o funcionamento, ou devido a variações na força necessária para romper vedações ou fazer circular a amostra entre as câmaras, e/ou devido a perdas variáveis de volume ocorridas quando um liquido é transferido de uma câmara para outra.

Além disso nenhum destes instrumentos pode ser usado ou adaptado para efectuar múltiplas reacções em fase sólida, tais como análises de controlo e amostra, numa câmara de reacção única, seguida da separação dos suportes de fase sólida para controlo individual.

Sumário da Invenção

Num aspecto, esta invenção inclui um instrumento autónomo que detecta uma espécie ligante através da ligação especifica a um suporte sólido. O instrumento tem uma placa de reacção possuindo uma câmara que contém o suporte sólido, uma placa de transferência que contém o primeiro e segundo reagentes contidos no primeiro e segundo reservatórios, que são independentes. A placa de transferência é montada na placa de reacção, de forma a permitir a sua movimentação para uma posição de adição de amostra, na qual uma amostra pode ser adicionada à câmara, uma primeira posição de transferência de reagente na qual o primeiro reservatório fica alinhado com a câmara, uma posição de lavagem na qual uma solução de lavagem pode ser introduzida na

câmara, e uma segunda posição de transferência de reagente, na qual um segundo reservatório fica alinhado com a câmara. As placas de transferência e de reacção são projectadas de forma a impedir a saída dos reagentes dos seus correspondentes reservatórios, até que o reservatório associado esteja alinhado com a câmara.

Numa das configurações preferidas, o reagente apresenta-se sob a forma de uma solução líquida, e o reservatório que contém a solução possui um canal escavado na placa, sendo o canal vedado na sua abertura localizada na placa de transferência. De preferência, o canal e a vedação são formados por uma manga elastomérica mantida num canal dentro da placa de transferência, e os planos confrontantes das placas de transferência e reacção são espaçados, adjacentes à região da manga, de maneira a formar uma vedação capilar a fim de impedir que o material existente no líquido vaze do reservatório por capilaridade. Também na configuração preferida, a placa de transferência tem uma abertura chanfrada que liga um reservatório, na placa de transferência, com a câmara na placa de reacção.

Noutra configuração geral, pelo menos um dos reagentes inclui uma forma particulada do reagente, e o reagente particulado é levado, do respectivo reservatório para a câmara, por gravidade, quando o reservatório do reagente é alinhado com a câmara de reacção.

A câmara de reacção, na placa de reacção, pode ser formada por um canal alongado que contém um suporte de análise em fase sólida. Nesta configuração, a placa de transferência pode

ter câmaras que são alinháveis com áreas espaçadas no canal, quando a placa de transferência é movida para a posição de lavagem, formando uma passagem fechada para a transferência de solução através do canal.

Num método, o instrumento é usado para detectar um ácido nucleico com uma sequência-alvo conhecida. Aqui, o suporte em fase sólida não reacção é revestido por fragmentos de ácido nucleico imobilizados, e o instrumento contém reservatórios de reagentes para a adição sequencial, ao canal de reacção, de (1) uma sonda para hibridizar, quer com a sequência-alvo, quer com os fragmentos imobilizados, e (2) uma molécula-repórter para ligar, directa ou indirectamente, com a referida sonda.

Num outro método, o instrumento é usado numa análise imunológica para detecção de um ligante, para ligar imunoespecificamente ao suporte sólido. Aqui, o dispositivo é dotado de reservatórios de reagentes para adição sequencial ao canal de reacção de (1) um reagente anti-ligante capaz de ligar imunoespecificamente com o ligante, quando tal ligante está unido ao suporte, e (2) um reagente capaz de reagir com o reagente anti-ligante, a fim de produzir um sinal detectável no suporte sólido.

Num outro aspecto, a invenção inclui um instrumento para a detecção de uma espécie ligante através da união detectável, ligante-especifica, no suporte sólido. O instrumento consiste num dispositivo autónomo do tipo descrito acima, e num dispositivo para fixar a placa de reacção, e girar a placa de transferência referida, até às suas diferentes posições.

Numa outra configuração, o conjunto é capaz de girar

como um todo, a câmara de reacção contém um canal que se estende radialmente, a superfície, no suporte sólido, inclui, pelo menos, duas partículas de fase sólida transportadas no canal, para movimento no seu interior, indo das posições internas para as posições externas radiais, e a placa de transferência contém uma ranhura de recepção, na qual as partículas podem ser recebidas quando as partículas no canal são submetidas a uma força centrífuga, e o canal fica alinhado com a tal ranhura. A placa de reacção é dotada de câmaras para recepção de partículas, nas quais podem depositar-se, na ranhura, as partículas, quando a placa de reagente, contendo partículas depositadas, é girada em relação à placa de reacção.

Numa configuração do instrumento, destinada a aquecer os conteúdos líquidos da câmara, o conjunto inclui também uma estrutura para vedar a câmara quando o tal aquecedor é posto a funcionar. O conjunto inclui uma placa de cobertura fixa à referida placa de reacção, e a estrutura de vedação inclui (a) uma bucha de vedação, transportada na placa de transferência referida, para flutuação na direcção normal do plano da placa, e (b) meios, na referida placa de cobertura, para desviar a tal bucha contra a tal câmara, quando a placa de transferência é movimentada para a posição de aquecimento.

Numa outra configuração do instrumento, o suporte sólido é feito por uma partícula esférica na câmara, e o instrumento é dotado de meios de detecção para um detector, que inclui um detector de luz, e um tubo que se projecta do detector de luz, e que é posicionável, a fim de abranger uma parte da superfície esférica da partícula esférica.

Estes e outros objectivos e caracteristicas da invenção tornar-se-ão claros pela seguinte descrição detalhada da invenção, juntamente com os desenhos anexos.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 é uma perspectiva em corte, ampliada, dos componentes de um instrumento de análise, construido de acordo com a presente invenção;

A Figura 2 é uma perspectiva em corte, ampliada, e parcialmente esquemática, de um instrumento de análise, construido de acordo com a invenção;

A Figura 3 é uma perspectiva plana de uma placa de cobertura no conjunto da Figura 2;

A Figura 4 é uma perspectiva plana de uma placa de transferência, no conjunto da Figura 2;

A Figura 5 é uma perspectiva plana de uma placa de reacção no conjunto da Figura 2;

As Figuras 6A e 6B são cortes seccionais fragmentários, tirados a partir de posições relativas das placas, no conjunto da Figura 2, nas quais um reservatório de reagente na placa de transferência está isolado de um canal de reacção na placa de reacção (6A), e o reservatório está numa posição de transferência em relação ao canal (6B);

As Figuras 7A e 7B são cortes seccionais ampliados e fragmentários das regiões dos reservatórios vistos ao longo das linhas A-A, na Figura 6-A, e ao longo da linha B-B na Figura 6B, respectivamente;

A Figura 8 é um corte seccional ampliado e fragmentário da câmara vedada do conjunto, durante um estágio de aquecimento, no funcionamento do conjunto;

As Figuras 9A e 9B são cortes seccionais semelhantes a 6A e 6B, respectivamente, mas ilustrando uma configuração de um conjunto no qual o reagente no reservatório se apresenta sob a forma de uma particula seca;

A Figura 10 é um corte seccional ampliado e seccionado do conjunto, mostrando o conjunto numa posição para irrigação da câmara;

A Figura 11 é um corte seccional ampliado de uma região da câmara, mostrando a estrutura do detector para detecção de um sinal óptico proveniente duma particula esférica na câmara;

As Figuras 12-A-12C ilustram os fases de transferência de particulas em fase sólida, do canal de reacção na placa de reacção para uma ranhura formada na placa de transferência (12A, 12B), e desta ranhura para câmaras independentes na placa de reacção (12C);

A Figura 13 é um diagrama de fluxo dos fases realizados pelo conjunto na execução de uma reacção da espécie a ser analisada; e

As Figuras 14A-14D são ilustrações esquemáticas das reacções sequenciais de ligação de ácido nucleico no DNA submetido a análise, que pode ser realizada de maneira automatizada, pelo instrumento desta invenção.

Descrição Detalhada da Invenção

A. Instrumento de Análise

A Figura 1 mostra, em perspectiva ampliada, um instrumento de análise 20, construído de acordo com a presente invenção. O instrumento possui um conjunto 22, incluído também na invenção, e que será descrito pormenorizadamente mais adiante, em referência nas Figuras 2-12. Resumidamente, o conjunto é formado de placas de reacção e cobertura 24, 26, respectivamente, que são unidas nas suas extremidades externas, e uma placa intermediária de transferência 28 que pode ser girada em relação às duas placas exteriores em redor de um eixo central 30. Para isso a placa de transferência possui um eixo 32 dotado de uma abertura alongada 34 (Figura 2) que é engrenável para efectuar a rotação da placa de transferência, estando as placas de reacção e de cobertura suportadas numa posição fixa.

Um dispositivo de controlo 36, existente no conjunto, possui uma base 38 que define uma base anular 40 na qual o conjunto é suportado durante a operação de análise. A base tem cinco pinos, tais como os pinos 42, dispostos assimetricamente ao redor da base, conforme ilustrado. Estes pinos encaixam nos orifícios correspondentes na parte inferior do conjunto, descrito abaixo, a fim de imobilizar as placas de cobertura e de reacção contra a rotação da base.

A base é sustentada e fixa a um motor que está assinalado por um eixo motor 44, na Figura; o motor propriamente dito fica contido numa carcaça 45. Um suporte de três braços 46, que fica fixo à extremidade do eixo motor tem um prolongamento 48

destinado a engrenar com a abertura no eixo do conjunto, estando a superfície de reacção do conjunto assente sobre os braços do suporte, conforme se pode verificar na Figura. Portanto, quando o conjunto é recebido e imobilizado na base 40, sendo o prolongamento 48 recebido na abertura 34 no eixo, a placa intermediária de transferência, no conjunto, pode ser girada para posições pré-escolhidas, em relação às placas de cobertura e de reacção, pelo eixo motor.

O motor no instrumento de controlo pode ser mudado, de uma posição de transferência mais baixa, na qual o conjunto fica imobilizado na base 40, como acaba de ser descrito, para uma posição elevada, de livre rotação na qual o conjunto é desengrenado da base e pode girar livremente no eixo motor 44. Devido ao coeficiente relativamente alto de movimento interno (placa de transferência), o conjunto pode ser girado como um todo pelo eixo motor, de forma que o conjunto e o motor, numa posição de livre rotação, podem funcionar como uma centrifugadora a fim de forçar o material radialmente para fora do conjunto, para fins que serão adiante descritos. O conjunto também pode ser agitado, para mistura de componentes de reacção, através da oscilação do conjunto no motor, numa posição de livre rotação.

Uma unidade de lavagem 50, no conjunto, destina-se a fazer circular uma ou várias soluções de lavagem, através do conjunto, conforme será abaixo descrito em relação à Figura 8. Em resumo, quando o conjunto é colocado em condições de lavagem, as aberturas 52a, 52b, existentes na placa de cobertura do conjunto, formam as extremidades de uma passagem fechada que inclui uma parte da região de reacção no conjunto. A unidade 50,

que é montada sobre a base, conforme indicado, tem um braço posicionável verticalmente, 54, que sustenta um par de tubos, 56a, 56b, para inserção nas aberturas 52a, e 52b, respectivamente, quando o braço é movido para uma posição mais baixa de lavagem. Numa operação de lavagem, a solução de lavagem é libertada através do tubo 56a, sob pressão, e é removida através do tubo 56b.

A Figura 1 também mostra uma unidade de aquecimento 62 no conjunto, utilizada para aquecer uma câmara de reacção a temperaturas de reacção seleccionadas. A unidade permanece fixa ao lado inferior da base 38, conforme indicado, para posicionar um elemento aquecedor 64, na unidade, directamente abaixo da região de reacção do conjunto, estando o conjunto assente sobre a base.

Embora não se verifique na Figura 1, o instrumento 36 pode possuir, também, uma unidade de detecção óptica, para detectar espécies no conjunto. Uma unidade preferida será abaixo descrita, em relação à Figura 11.

O instrumento de análise da invenção será mostrado especialmente em relação às Figuras 2-10. A placa de reacção 24 no conjunto (Figura 5) tem um canal ou câmara 66, alongado, e que se estende radialmente, o qual serve como uma câmara de reacção do conjunto, ou seja, a câmara, na qual a espécie a ser analisada e os diversos reagentes, necessários para ligar e detectar a espécie, são colocados em contacto líquido com um suporte em fase sólida contido na câmara. Na configuração mostrada, a câmara é formada numa peça metálica (por exemplo, alumínio) 166 que fica fixada ao lado inferior de uma placa em forma de disco 168. A

peça encontra-se sob uma plataforma 170, definida pela superfície superior da placa 168, acima da peça. Existem aberturas radialmente espaçadas, formadas na plataforma, 172a e 172b, que se encontram adjacentes a regiões de extremidades opostas do canal, e uma abertura central 172c. As aberturas 172a e 172b são alinhadas com as aberturas 52a e 52b, na placa 76, para fins que serão adiante descritos.

Pormenores sob a construção da câmara da placa são verificados na Figura 7B, que representa um corte lateral ampliado da região da câmara na placa de reacção 24, e uma região sobreposta na placa 28. O canal ou câmara, formados na peça, tem uma secção lateral marcadamente em forma de U, que se extende entre extremidades opostas, correspondendo às regiões abaixo das aberturas 172a e 172b, na Figura 5, formando, a região da extremidade radial externa do canal, uma rampa afunilada 70, conforme mostrado na Figura 11. A peça é recebida numa cavidade 174, formada na região mais baixa da placa 168, e fixa à placa por intermédio de flanges, tais como as representadas em 176.

Cada abertura na plataforma 170, tal como a abertura 172a mostrada na Figura 7B, comunica com a câmara, e contém uma curta secção de orifício cilíndrico 178 e uma secção chanfrada 180. Esta construção serve para retirar líquido para dentro, e através da abertura, a partir do reservatório na placa 28, para dentro do canal na placa de transferência, conforme será descrito adiante.

O canal transporta uma ou mais partículas esféricas em fase sólida, tais como as partículas esféricas 68a, 68b, 68c, que formam os suportes em fase sólida, na reacção de análise. Na

configuração descrita adiante na Secção C, sobre a determinação de DNA em fase sólida, as três particulas servem para (1) controlo positivo, (2) controlo negativo, e (3) ligação da espécie a ser analisada. O canal e as particulas estão mostrados, numa perspectiva lateral, nas Figuras 10 e 12A. A invenção prevê também um formato de reacção contendo um único suporte em fase sólida.

A ranhura arqueada, 72, localizada imediatamente adiante da extremidade externa do canal, serve de guia para as particulas, e também para os fins a serem abaixo descritos. Ao lado desta ranhura encontram-se três câmaras 74a, 74b, 74c, nas quais as três particulas podem ser transferidas do canal 66, após a reacção quimica, também como será a seguir descrito. As três câmaras podem conter uma solução de detecção, para detectar a presença de moléculas-repórter ligadas às particulas sólidas.

A placa de reacção é fixa à placa de cobertura por presilhas, tais como rebites 75 (Figura 2), ligando as regiões periféricas anulares das duas placas. As presilhas são recebidas em orifícios, tais como os orifícios 76, formados na placa. Também na placa de reacção existe uma abertura central 82, através da qual o prolongamento 48 é encaixado quando o conjunto está assente sobre o dispositivo de controlo.

A placa de cobertura 26 no conjunto está representada, numa perspectiva plana, na Figura 3. A placa é um disco circular com diâmetro idêntico ao da placa de reacção. Na região periférica anular exterior 83 da placa, existem orifícios, tais como os orifícios 84, para prender as placas superior e de reacção (linha a tracejado 85, na Figura 3, indica a extremidade

exterior da placa de transferência 28, no conjunto). Ainda na placa da cobertura existe (i) uma abertura central 86, através da qual a calota do eixo 32 é recebida, conforme verificado na Figura 2; (ii) várias janelas 88a, 88b, 88c, que são alinhadas com as câmaras 74a, 74b, 74c, respectivamente, na placa de reacção; (iii) as aberturas 52a, 52b, 52c, descritas acima, que se alinham com as aberturas 172a, 172b, 172c, respectivamente, para passagem de solução de lavagem através do canal; e (iv) uma abertura 52c entre as câmaras 52a e 52b, em alinhamento com a câmara 172c.

Em referência às Figuras 2 e 4, a placa de transferência, 28, tem uma placa 190 dotada de uma abertura central 90 na qual o eixo 32 é fixo para rotação com a placa. A placa tem quatro reservatórios de reagentes 92, 94, 96, e 98, que têm a forma de canais cilíndricos que se projectam através da placa. Com especial referência à Figura 7A, o reservatório 92, que é típico, consiste de uma manga 100 que se projecta através da placa 184, extendendo-se para além do plano da placa, tanto na parte superior como na parte inferior da placa. Em todo o conjunto, as mangas que formam os diversos reservatórios, são comprimidas axialmente, formando vedações estanques contra os lados confrontantes da placa de cobertura e da placa de reacção, conforme ilustrado na Figura 7A. De preferência, as mangas são feitas de Teflon ou polietileno. As extremidades vedantes das mangas são também chamadas, aqui, meios para impedir a libertação de reagente líquido de um reservatório, até que o reservatório esteja alinhado com uma das aberturas na placa de transferência que comunica com o canal 66.

O espaçamento entre o elemento da placa que forma a placa 28 e as superfícies confrontantes das placas de cobertura e de reacção no conjunto funcionam de forma a impedir que o líquido contido em cada reservatório seja sugado por capilaridade para dentro do espaço existente entre as duas placas. Isto é, o espaço entre as superfícies confrontantes das placas, tal como o espaço 186, é demasiadamente amplo para produzir fluxo da capilaridade entre as duas superfícies. O espaço na configuração mostrada é obtido pelos comprimentos relativamente maiores das mangas que formam os reservatórios, se comparados com a espessura da placa 184. Alternativamente, a região da placa de transferência, imediatamente adjacente a cada manga, pode ser recuada de forma a formar um espaço bloqueador de capilaridade ao redor de cada manga, como na manga 100.

Conforme indicado, cada um dos reservatórios na placa 28 é alinhável com uma das aberturas 172a-172c, na placa de reacção que comunica com o canal 66, para a passagem de reagentes fluidos para o interior da câmara de reacção, a ser descrita adiante, com referência às Figuras 6A, 6B, e 7B. Em especial, nota-se que alguns dos reservatórios, tais como os reservatórios 94, 96, e 98, ficam espaçados radialmente, impedindo a contaminação cruzada dos reagentes líquidos dos dois reservatórios, à medida que os reservatórios são movimentados em relacção às placas de cobertura e reacção.

Na placa de transferência existem também orifícios, 102a-102c, alinháveis com as aberturas 172a-172c, respectivamente, na placa de reacção, e ao mesmo tempo com as aberturas 52a-52c. Quaisquer um destes conjuntos de aberturas

alinháveis, são daqui em diante chamadas, em geral, de meios para introdução de uma amostra na região de reacção do conjunto.

Entre as outras aberturas existentes na placa de transferência, existem três janelas, 104a, 104b, 104c, que são alinháveis com as janelas 88a, 88b, 88c, respectivamente, quando os dois conjuntos de janelas estão alinhados. Além disso, a placa de transferência tem três conjuntos de aberturas radialmente espaçadas, tais como as aberturas 106a, 106b, que são alinháveis, numa das três diferentes posições da placa, com as aberturas 172a, 172b, respectivamente, na placa de reacção, e ao mesmo tempo, com as câmaras 52a, 52b, na placa de cobertura, para formar uma passagem continua 108 (Figura 8) para a circulação de uma solução de lavagem através da região de reacção.

A placa de reacção também contém diversas buchas de vedação flutuantes, tais como as buchas 192, 194, que são projetadas para vedar as aberturas do canal, na placa de reacção, quando os conteúdos liquidos da placa de reacção são aquecidos. Detalhes do funcionamento das buchas, numa operação de aquecimento, são mostrados na Figura 8. Aqui mostra-se um corte seccional ampliado, tirado através do conjunto na região do canal de reacção, e uma parte do elemento aquecedor 64, usado no aquecimento de conteúdos liquidos no canal. Conforme verificado, o elemento aquecedor estabelece contacto com o lado inferior da peça 166, durante o aquecimento.

A bucha 192, que é tipica, é uma bucha alongada elastomérica, do tipo formado com polietileno ou outro material polimérico comprimivel e de baixa fricção, que é dimensionada para cobrir as aberturas 172a-172c quando a bucha estiver

posicionada na plataforma 170, conforme indicado na Figura 8. A bucha fica numa ranhura 194, que se estende radialmente, existente na placa de transferência, para flutuar numa direcção normal em relação ao plano da placa. A altura da bucha permite que ela se mova facilmente, e sem ser comprimida, entre as placas de cobertura e de reacção, à medida que a placa de transferência é girada relativamente às duas outras placas. Todavia, quando a bucha é movida na direcção de uma posição de vedação acima da câmara de reacção, ela estabelece contacto com uma came 195, que se projecta radialmente, formada no lado inferior da placa de cobertura, imediatamente acima das aberturas 172a-172c. Conforme se vê na Figura 8, o referido contacto actua para desviar, isto é, para comprimir a bucha contra as aberturas da plataforma, vedando desta maneira a câmara de reacção.

A placa de transferência também tem uma ranhura em forma de L, 112, no seu lado inferior, ou seja o lado fronteiro à placa de reacção. A ranhura possui partes que se estendem radialmente e em circunferência, 112a, 112b, que são alinháveis com a região da extremidade externa do canal 66 e da ranhura 72, na placa de reacção, respectivamente. A ranhura é posicionada e dimensionada de maneira a receber as particulas do canal 66 (Figura 12A), conforme será descrito na Secção B.

As placas no conjunto são formadas, de preferência, pela moldagem por injecção de um material plástico adequado. Para formar a placa de transferência, o elemento da placa 184 pode ser moldado por injecção, em redor das quatro mangas que formam os quatro reservatórios na placa de transferência, e o eixo 32, e, subsequentemente, ser equipada com as quatro buchas

de vedação. Para formar a placa de reacção, o elemento da placa 168 pode ser moldado por injecção, em redor da peça 166. Com a placa de transferência colocada entre as placas de cobertura e de reacção, as duas placas exteriores ficam presas juntas, tal como por meio de rebites, cola, ou soldagem a quente. Conforme observado acima, a construção e a fixação das placas são feitas de forma a derivar as placas de cobertura e de reacção firmemente contra lados confrontantes da placa de transferência, a fim de comprimir as vedações elastoméricas do conjunto. O reagente liquido pode ser adicionado aos reservatórios e câmaras ao posicionar-se adequadamente a placa de transferência, após a montagem do conjunto.

Noutra configuração genérica do conjunto, os reservatórios de reagente são projectados para libertar uma particula de um reagente desidratado composta por reagente seco, formulado de preferência sob forma pelotizada. Esta configuração está ilustrada nas Figuras 9A e 9B, que mostram uma parte fragmentária de um instrumento de análise 120, com placa de cobertura 122, placa de transferência 124, e placa de reacção 126. As placas de cobertura e de reacção, no instrumento, são substancialmente idênticas às do conjunto 22. A placa de transferência possui vários reservatórios, tal como o reservatório 128, que comunicam com a placa de reacção, mas não com a placa de cobertura.

Cada reservatório contém particulas de reagentes secos, tal como a particula 130 no reservatório 128, que é mantido no interior do reservatório, para depósito dentro do canal de reacção 132, na placa de reacção quando o reservatório é alinhado

com a placa de reacção, conforme mostra a Figura 8B. A extremidade mais baixa do reservatório pode ser vedada, por exemplo, por mangas vedantes, a fim de impedir a exposição do reagente à humidade, ou a sua contaminação, por outros reagentes.

O reagente particulado pode ser formulado, caso desejado, com vários agentes espessantes solúveis em água, tais como polímeros solúveis em água, de acordo com métodos bem conhecidos. No caso de o conjunto conter uma ou mais partículas em fase sólida, estas podem ser adicionadas ao canal de reacção na placa de reacção, antes que as placas de transferência e de reacção sejam unidas.

Os conjuntos descritos e ilustrados acima são projectados especialmente para uso numa reacção em fase sólida de DNA, submetido a análise, envolvendo (i) pelo menos uma partícula em fase sólida, (ii) quatro líquidos diferentes e/ou reagentes sólidos que são adicionados sequencialmente, (iii) uma fase de aquecimento após cada adição de reagente, e (iv) três fases diferentes de lavagem que se seguem à adição dos segundo, terceiro e quarto reagentes, conforme será descrito abaixo.

A presente invenção prevê também uma variedade de configurações alternativas de conjuntos. Por exemplo, a análise pode implicar a adição sequencial de dois reagentes, exigindo apenas dois reservatórios, ou dois ou mais reagentes podem ser adicionados à região de reacção simultaneamente, numa configuração na qual os reservatórios ficam dispostos ao longo de uma linha radial comum.

Além disso, as partículas em fase sólida na reacção podem ser substituídas por um ou mais suportes em fase sólida,

independentes, existentes na câmara de canal, e/ou as particulas em fase sólida podem ficar no interior de câmaras independentes, na câmara de reacção, aliviando a necessidade de transferência de particulas, após a reacção de análise. Alternativamente, a reacção de análise pode ocorrer em fase liquida, quer numa solução livre ou num filtro absorvente, eliminando-se assim as fases de lavagem. No caso de uma região de reacção de tipo de filtro absorvente, um reagente liquido deve ser levado ao filtro por efeito de sugagem ou por capilaridade, eliminando, assim, a necessidade de ventilação dos reservatórios de liquidos.

Funcionamento do Conjunto

Durante o seu funcionamento o conjunto fica assente sobre o dispositivo de controlo, com os pinos dos tais dispositivos encaixados nos orifícios correspondentes, na placa de reacção do conjunto, e sendo o prolongamento 48 recebido no eixo 32, conforme acima descrito. O eixo 32 fica orientado inicialmente em relação aos pinos, de forma a que a placa de transferência fique numa posição de abrigo, na qual todos os reservatórios e região de vedação ficam vedados.

A seguinte descrição de operação típica será feita em referência à Figura 13, que representa um diagrama do fluxo das fases da reacção de DNA submetido a análise, descrita na Secção C, abaixo. Os fases mostrados em quadros de linha maciça são executados, preferivelmente, de forma automatizada, por meio de uma unidade microprocessadora adequada, não mostrada, no dispositivo de controlo. As fases de amostragem e/ou adição de

solução de lavagem, mostrados nos quadros de linha a tracejado, podem ser efectuados quer manualmente, quer sob o controlo do instrumento.

O dispositivo de controlo é ligado inicialmente a fim de mover a placa de transferência na direcção dos ponteiros do relógio na Figura 2, a fim de alinhar a abertura 102a, na placa de transferência, com a abertura 52a, na placa de cobertura, e a abertura 172 na placa de reacção, e uma amostra liquida é introduzida, através da abertura alinhada, para o interior do canal de reacção. A amostra da espécie a ser analisada pode ser qualquer amostra fluida, tal como sangue, serum ou plasma, em volume adequado, tipicamente entre 10µl-200µl.

A placa de transferência é girada, adicionalmente, na mesma direcção, a fim de alinhar o reservatório 92 com a abertura 172a na placa de reacção, conforme ilustrado nas Figuras 6B e 7B, de forma a transferir o reagente liquido do reservatório, por gravidade, para o canal. A medida que a vedação do reservatório, se sobrepõe, inicialmente, à extremidade da abertura 172a, a vedação liquida no reservatório é rompida, permitindo que o fluido flua imediatamente para fora do reservatório. Conforme acima descrito, a capacidade de vedação capilar da placa de transferência impede que o fluido saia, por capilaridade, do reservatório para a região entre as placas de transferência e de reacção. Em segundo lugar, a abertura chanfrada, 172a, serve para direccionar o fluido do reservatório para a câmara, por meio de uma combinação de efeitos de capilaridade, causada pela maior estreiteza da secção superior da abertura, e fluxo rápido de fluido causado pela secção chanfrada inferior da abertura.

Conforme mencionado acima, numa configuração alternativa desta invenção, o reservatório pode conter um reagente desidratado e particulado que é depositado, por gravidade, para dentro do canal de reacção, conforme indicado na Figura 9B. Para misturar o reagente com uma amostra liquida, a placa de transferência pode ser girada de volta para a posição de vedação do canal, após o que o conjunto é removido da sua posição do dispositivo de controlo, ao se levantar o eixo motor, até uma posição de livre rotação, sendo então o conjunto levemente oscilado como um todo, a partir do motor.

Após a introdução do reagente liquido (ou sólido), na câmara de reacção, a placa de reacção é ligeiramente girada para posicionar a bucha 192 sobre a câmara de reacção. Conforme descrito em relação à Figura 8, a bucha é comprimida, nesta posição, entre as placas de cobertura e de reacção, formando uma vedação estanque em redor da câmara de reacção. O elemento aquecedor do instrumento é activado a seguir, a fim de aquecer a câmara durante o período de reacção. Durante o ciclo de aquecimento, a vedação sobre as aberturas 172a-172c impede que o fluido aquecido durante a mistura de reacção escape da câmara.

Seguidamente, a placa de transferência é girada a fim de transferir os conteúdos do reservatório 94 para o canal, e a mistura de reacção é novamente misturada e feita reagir durante um determinado período de reacção, a uma temperatura pré-determinada. Como se pode verificar em relação à Figura 4, o movimento continuo da placa de transferência, na direcção dos ponteiros do relógio, alinha o primeiro conjunto de câmaras de solução de lavagem, indicadas por 106a, 106b, com as aberturas

52a, 52b, respectivamente, na placa de cobertura, e com as aberturas 172a, e 172b, respectivamente, na placa de reacção. Quando este alinhamento estiver completo, abaixa-se a unidade de lavagem a fim de inserir os tubos de solução de lavagem dentro das câmaras alinhadas, e circula-se a solução de lavagem através do canal de reacção, conforme ilustrado na Figura 10, para remover, a amostra inicial e os primeiros dois reagentes, da câmara de reacção.

As fases acima são repetidos para (i) transferir, misturar e incubar um terceiro reagente com as particulas em fase sólida lavadas na câmara de reacção, (ii) remover o terceiro reagente por lavagem, (iii) transferir, misturar e incubar um quarto reagente com as particulas lavadas, e (iv) remover o quarto reagente por lavagem. Estes fases são mostrados na Figura 13, em que os três diferentes fases de lavagem estão indicados como (1), (2) e (3).

Após o fim da reacção, um sinal-dependente da espécie na superficie da fase sólida, ou seja, as particulas esféricas em fase sólida, pode ser lido estando as particulas esféricas na câmara de reacção. A fim de minimizar o uso de artefactos de leitura óptica das outras particulas esféricas na câmara de reacção, o detector de sinal no instrumento (ou num instrumento independente de leitura óptica) deve, preferivelmente, ter uma construção como a representada para o detector 196, na Figura 11, permitindo uma leitura directa de cada particula esférica. Especialmente, o detector contém um sensor óptico 198, e um tubo refractário 200 dimensionados para abranger uma secção da esfera, conforme indicado, quando o tubo é baixado através de uma

abertura no conjunto (formada pelo alinhamento da abertura nas câmaras de cobertura, transferência e reacção), para o interior da câmara de reacção. Após a leitura de cada partícula esférica, o tubo é içado e, a seguir, introduzido noutra abertura do conjunto, a fim de ler a partícula esférica seguinte.

Alternativamente, as partículas esféricas podem ser distribuídas no interior de câmaras de leitura independentes, de acordo com a operação descrita a seguir, em relação às Figuras 12A-12C. Resumidamente, a placa de transferência é girada até à posição mostrada na Figura 12B, a fim de alinhar a parte radial da ranhura 112, com o canal de reacção. Estando o eixo motor na sua posição de levantado, o conjunto é então girado a uma velocidade suficiente para forçar as partículas no canal de reacção, radialmente para fora e para dentro da ranhura, conforme mostra a Figura 12A. As partículas acabam por ser forçadas para dentro da parte circunferencial da ranhura, conforme mostrado na Figura 12B. As partículas são aprisionadas na fenda 72 (Figura 5), nesta posição, a fim de impedir o seu retorno ao canal de reacção no final da centrifugação.

Para distribuir as partículas para dentro das respectivas câmaras na placa de reacção, o motor é movido até à sua posição mais baixa, o conjunto é re-assente sobre o dispositivo de controlo, e a placa de transferência é girada na direcção dos ponteiros do relógio, ou seja, numa direcção que tende a forçar as partículas na direcção da parte de trás da ranhura (as posições das partículas mostradas na Figura 12B). A medida que a ranhura é movida sobre cada câmara na placa de reacção, a partícula mais avançada na ranhura cai dentro da

câmara, e assim sucessivamente, até se completar a transferência de partículas para dentro das três câmaras.

A quantidade de espécie a ser analizada, associada a cada partícula em fase sólida, pode ser determinada através de diversos meios conhecidos. Tipicamente, a espécie a ser analizada, que é ligada especificamente à partícula, une-se ela mesma a uma sonda indentificadora (molécula-repórter) que contém uma substância fluorescente, ou partes enzimáticas de moléculas-repórter que podem ser detectadas e/ou quantificadas através de procedimentos padrão de foto-detecção ou espectrofotometria. Conforme acima indicado, as câmaras podem conter uma solução de detecção que é reactiva com as partes de moléculas-repórter, a fim de produzir o sinal de detecção desejado.

Uma vantagem do mecanismo de transferência de partículas desta invenção é a de que várias partículas em fase sólida podem ser postas a reagir sob condições idênticas numa única câmara, e serem isoladas a seguir, para detecção. A separação das partículas para detecção permite uma detecção exacta por actividade quimiluminescente, fluorescente ou enzimática que não é possível quando as partículas se encontram próximas e/ou na mesma câmara de reacção. Todavia, será forçoso reconhecer que a presente invenção também apresenta vantagens na realização de uma reacção em fase sólida que utiliza uma ou mais partículas esféricas, e outras superfícies de suporte sólido na câmara de reacção, e na leitura das superfícies sólidas na câmara, conforme descrito em relação à Figura 11.

A secção C abaixo descreve uma forma típica de análise para detecção do DNA submetido a análise, por meio do método de

reacção em fase sólida. O método ilustra as diversas vantagens do instrumento, incluindo (i) a capacidade de realizar análises complexas, de reagentes múltiplos, num conjunto simples e autónomo, (ii) adição de reagente por gravidade, (iii) a capacidade de alternar fases de reacção com ciclos de lavagem, e (iv) a capacidade de realizar múltiplas reacções em fase sólida numa única câmara, e separar, a seguir, os suportes em fase sólida para detecção da espécie. Embora a reacção de DNA submetido a análise seja ilustrativa de um tipo de análise que pode ser realizada com o instrumento desta invenção, compreende-se que a invenção pode ser facilmente adaptada para uma grande diversidade de procedimentos de análise, nas quais deve haver adição de reagentes sólidos ou liquidos à região de reacção, preferivelmente em sequência, para detecção ou quantificação de uma espécie numa zona de reacção.

Em especial, a invenção também prevê a detecção de uma espécie ligante na qual a superfície do suporte sólido, na câmara de reacção, contém moléculas que se ligam especificamente com o ligante, ou que se podem ligar especificamente com o ligante através de uma molécula intermediária bivalente, introduzida por meio de um dos reagentes. Num formato preferencial, o ligante é um antigene, e a molécula ligadora do ligante, levada pelo suporte sólido, é um anticorpo especifico. Após a adição de uma amostra, contendo o ligante, ao suporte sólido, e após uma fase de lavagem para remover material de amostra não-ligado, adiciona-se um primeiro reagente-repórter à câmara. Este reagente contém uma molécula identificadora, capaz de se ligar, especificamente, ao ligante, com tal ligação com o suporte sólido. Após um

segundo estágio de lavagem para remover material não-ligado, um segundo reagente, contendo um substrato para detecção do identificador ligado, é adicionado à câmara de reacção. De preferência, tal identificador é uma enzima, tal como a fosfatase ou a peroxidase alcalina, e o segundo reagente contém substrato capaz de reagir com a enzima identificadora, para produzir uma reacção colorida detectável na câmara de reacção.

Tanto no formato de sonda para DNA, como no formato de ligante, que acaba de ser descrito, os reagentes múltiplos existentes no conjunto, para produzir uma ligação especifica com o suporte sólido e um sinal detectável da espécie ligada, são chamados, daqui para a frente, colectivamente, reagentes de reacção, necessários para ligar a espécie a ser analizada ao suporte sólido, de forma detectável.

Será evidente que o instrumento desta invenção pode ser manualmente operado, especialmente se tiver uma forma simplificada na qual os reagentes são adicionados a uma câmara de reacção líquida, para a produção de um sinal dependente, numa fase líquida. Neste caso, o operador pode manipular o instrumento, utilizando as posições de transferência de reagente e realizar qualquer mistura necessária por meio de oscilação manual.

C. Reacção de DNA em Fase Sólida

As Figuras 14A-14D ilustram, esquematicamente, a sequência de fases de reacção numa análise de DNA em fase sólida, realizada utilizando-se o instrumento desta invenção.

Considerando-se inicialmente as particulas e reagentes em fase sólida que estão incluidos no conjunto, as três particulas em fase sólida servem de controlos positivo e negativo (particulas a e b), e para a análise especifica da espécie (particula c). A particula de controlo negativo não é revestida, e as particulas de controlo positivo e de espécie são revestidas com fragmentos de DNA de cadeia simples, que são complementares a sondas de captura de controlo positivo e analitico-especifica, respectivamente. A natureza destas sondas está descrita mais abaixo. As particulas de controlo positivo e de espécie são preparadas pela derivatização de particulas esféricas de polimero ou vidro, com os fragmentos de DNA seleccionados, de acordo com métodos padronizados de acoplamento. A particula em fase sólida da espécie a ser analizada está indicada com o número 130 das Figuras 14A-14D, e os fragmentos de DNA que revestem esta particula, que são complementares das sondas de espécie, estão indicadas pelas linhas tracejadas, tais como 132.

Um primeiro reagente liquido, contido no reservatório 92 do instrumento, inclui um agente desnaturador, tal como NaOH, sondas de controlo positivo e especificas, um DNA de controlo positivo, e sondas amplificadoras de controlo positivo e especificas. O DNA de controlo positivo é um fragmento de DNA de cadeia dupla que tem uma série de regiões de sequência conhecida que são exclusivas daquele fragmento, isto é, que não se apresentam no DNA da espécie. As sondas amplificadoras incluem várias sondas que têm uma primeira região que é complementar a uma ou várias sequências diferentes, no DNA de controlo positivo e no ácido nucleico da espécie, e uma segunda região comum que é

complementar da sequência do DNA ramificado contido no terceiro reagente. Na sonda amplificadora ilustrada em 134, na Figura 14A, a primeira região que é complementar à sequência num ácido nucleico da espécie, está indicada por um padrão de onda 136, e uma segunda região comum, indicada pela linha em espiral 138, que é complementar da sequência do DNA de um DNA ramificado.

As sondas de captura de controlo positivo incluem uma série de sondas que têm uma primeira sequência comum, a qual é complementar à sequência no fragmento de DNA existente na partícula de controlo positivo, e diferentes segundas sequências que são complementares às diferentes regiões de sequência conhecida no DNA de controlo positivo. De uma forma análoga, as sondas de captura da espécie incluem uma série de sondas que têm uma primeira sequência comum que é complementar à sequência no fragmento de DNA existente na partícula da espécie, e diferentes segundas sequências que são comuns às diferentes regiões de sequências conhecidas no ácido nucleico da espécie. Uma destas sondas de captura de espécie está ilustrada, 140, na Figura 14A, que mostra uma primeira região, indicada pela linha serrada 142, que é complementar a uma sequência no ácido nucleico da espécie, e uma segunda região comum, indicada pela linha tracejada, 144, que é complementar da sequência do DNA existente na partícula da espécie.

Um segundo reagente líquido, contido no reservatório 94, inclui um agente ou tampão de aglutinação, que permite a aglutinação do DNA, tal como através da neutralização de um reagente desnaturante de base.

Um terceiro reagente líquido, existente no reservatório

96, inclui a molécula ramificada de DNA mencionada acima, a qual está indicada como 146, nas Figuras 14B-14D. A molécula inclui uma sequência indicada pela região em espiral 148, que é complementar com a região 138 das sondas de ligação, e um grupo de sequências de cadeia ramificada, tais como as indicadas pela linha tracejada 150, que são complementares a uma sequência de sonda identificadora. Nesta configuração, o DNA ramificado é adaptado para ligação indirecta com a espécie e o ácido nucleico de controlo positivo, isto é, através de sondas amplificadoras. Alternativamente, o DNA ramificado pode ser usado para hibridização directa, em sequências, na espécie e no ácido nucleico de controlo positivo.

Um quarto reagente liquido, contido no reservatório 98, inclui uma sonda identificadora, indicada com o número 152 nas Figuras 14C-14D, uma parte da qual inclui um fragmento de DNA 154, com uma sequência de nucleótido complementar à sequência 150, na molécula de DNA ramificada, e uma metade repórter 154 que é usada para a detecção de sinal. A metade repórter, no presente instrumento de análise, é preferivelmente uma enzima, tal como a fosfatase alcalina, capaz de gerar um sinal quimiluminescente numa solução de detecção adequada.

Para completar a descrição dos componentes químicos do instrumento, as câmaras do instrumento ficam parcialmente cheias com uma solução de detecção que são reactivas com a molécula repórter, a fim de gerar um sinal detectável. Por exemplo, uma solução contendo doxetano é reactiva com uma molécula identificadora de fosfatase alcalina, para gerar um sinal quimiluminescente que pode ser detectado e quantificado

convencionalmente com o uso de um fotomultiplicador.

Inicialmente, o conjunto é posicionado para adição da amostra, e uma amostra contendo o DNA a ser analizado 160 é adicionada na câmara de reacção do conjunto. Conforme indicado acima, a espécie tem sequências múltiplas, como a sequência 162, que são complementares às regiões das sondas de captura da espécie na análise, e uma ou mais sequências, tais como a sequência 164, que são complementares às sondas de ligação, na reacção.

Após a adição da amostra, o conjunto é manipulado a fim de se adicionar e misturar o primeiro reagente, e, a seguir, incubado por 10 minutos a 65°C para desnaturar a espécie. Com a adição do tampão de hibridação, mistura, e incubação adicional por 10 minutos, ocorrem as seguintes reacções de ligação com mediação de sonda: (1) sondas de captura de controlo positivo hibridizam com a particula de controlo positivo e com o DNA de controlo positivo para ligar este DNA com a particula de controlo positivo; (2) sondas amplificadoras hibridizam com o DNA de controlo positivo; (3) sondas de captura de espécie hibridizam com a particula de espécie e com a espécie para ligar o DNA analizado com a particula; e (4) sondas amplificadoras hibridizam com o DNA analizado. Os fases (3) e (4) estão ilustrados na Figura 14B.

Depois da reacção de aglutinação, a câmara de reacção do conjunto passa por um ou mais fases de lavagem, nos quais uma solução de lavagem é feita circular através do canal de reacção, a fim de remover reagentes não ligados. A seguir, o terceiro reagente é adicionado, misturado, e deixado aquecer a 55°C, a fim

de hibridizar o DNA ramificado com as sondas amplificadoras de ligação de particulas, conforme ilustrado na Figura 14C. Depois do aquecimento, o DNA ramificado não-ligado é removido por meio de segundo estágio de lavagem.

A última sonda identificadora é adicionada às particulas, misturada, e deixada aquecer com o DNA ramificado, não-ligado, a fim de ligar moléculas repórter com as particulas de controlo positivo e da espécie. A ligação das moléculas da sonda identificadora com a particula da espécie, está ilustrada na Figura 14D. A seguir, a sonda identificadora não-ligada é removida por um terceiro estágio de lavagem, conforme indicado.

A seguir, o conjunto é manipulado de acordo com os fases mostrados à direita da Figura 10, e acima descritos, a fim de transferir as três particulas para o interior das respectivas câmaras para a detecção do sinal. A reacção do repórter, ligado com o fluido de detecção nas câmaras, produz um sinal quimiluminescente detectável que é medido e convertido para o valor quantitativo de análise. Na análise de três particulas, o valor de controlo positivo, é usado para calcular uma curva padrão de concentração de espécie como uma função da concentração, com subtracção de background (controlo negativo). A concentração da espécie é calculada a partir da curva padrão, após subtracção de background.

O instrumento fornece diversas vantagens numa análise de DNA em fase sólida, conforme pode ser verificado. A análise pode ser realizada de forma substancialmente automatizada e sem a adição de reagentes a partir de fontes externas. Por isso, a necessidade de treino em laboratório e manipulação pelo

necessidade de treino em laboratório e manipulação pelo utilizador, é mínima.

A capacidade de efectuar múltiplas reacções em fase sólida, numa única câmara, minimiza as variações nas medições quantitativas da espécie a ser analizada, devido a variações nas condições de reacção, possibilitando cálculos de espécie auto-corrigidos, baseados numa curva padrão, com subtracção de background.

Embora a invenção tenha sido descrita em relação a determinadas configurações, montagens e aplicações, será evidente para os peritos no ramo que é possível fazer várias alterações e modificações sem que nos afastemos do espírito da invenção.

R E I V I N D I C A Ç O E S

1- Um instrumento para analizar uma espécie numa amostra líquida, autónomo, para detecção de uma espécie ligante, através de uma ligação detectável, específica, a um suporte sólido, caracterizado pelo facto de ser constituído por:

- uma placa de reacção contendo o referido suporte sólido e definindo uma câmara para armazenamento de reagentes líquidos em contacto com a base,

- uma placa de transferência contendo um primeiro e segundo reservatórios de reagentes,

- contidos nos primeiro e segundo reservatórios referidos, os primeiro e segundo reagentes de reacção necessários para unir o ligante, de forma detectável, ao suporte sólido,

- meios de fixação da placa de transferência à placa de

reacção, para movimentar para uma posição de adição de amostra, na qual a amostra pode ser adicionada à tal câmara, uma primeira posição de transferência de reagente na qual o primeiro reservatório fica alinhado com a câmara referida, uma posição de lavagem na qual a solução para lavagem pode ser introduzida na câmara, uma segunda posição de transferência de reagente na qual o segundo reservatório fica alinhado com a tal câmara, e

- meios para impedir a libertação dos primeiro e segundo reagentes dos seus reservatórios, até que o respectivo reservatório esteja alinhado com a câmara referida.

2- Um instrumento, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto de, pelo menos, um de tais reagentes se apresentar sob a forma de uma solução líquida, sendo o reservatório, que contém a solução, dotado de um canal na placa, e incluindo o referido meio de prevenção uma vedação elastomérica entre a extremidade do reservatório e a superfície frontal da placa de reacção.

3- Um instrumento, conforme reivindicado na reivindicação 2, caracterizado pelo facto de o reservatório e da vedação referidos serem formados por uma manga elastomérica que se encontra num canal existente dentro da placa de transferência, e sendo os planos confrontantes das placas de transferência e de reacção espaçados na região da manga, de maneira a formar uma vedação capilar, de forma a impedir que o material do líquido saia do reservatório, por capilaridade.

4- Um instrumento, conforme reivindicado na reivindicação 3, caracterizado pelo facto de incluir, além disso, uma placa de cobertura montada na placa de reacção referida, e possuindo

câmaras que estão alinháveis com tais reservatórios, nas posições de transferência referidas, e formando a tal manga uma vedação entre a placa transferência, e a placa de reacção e a placa de cobertura.

5- Um instrumento, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a placa de transferência ser dotada de uma abertura chanfrada que liga o reservatório, na placa de transferência, à câmara, na placa de reacção.

6- Um instrumento, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a tal câmara se situar num canal que se estende radialmente, possuindo a referida placa de transferência várias aberturas chanfradas, espaçadas ao longo do canal, numa direcção radial, e sendo os referidos reservatórios posicionados radialmente, a fim de comunicar com as várias aberturas chanfradas referidas.

7- Um instrumento, conforme reivindicado na reivindicação 1, para uso com um aquecedor, a fim de aquecer os conteúdos líquidos da câmara, caracterizado pelo facto de incluir também meios para vedar a referida câmara, quando se aplica calor.

8- Um instrumento, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto de incluir também uma placa de cobertura fixa à tal placa de reacção, e consistindo o referido meio de vedação em (a) uma bucha de vedação na placa de transferência referida, para flutuação, numa direcção normal, para o plano da placa, e (b) meios, na placa de cobertura referida, para desviar a bucha contra a tal câmara, quando a placa de transferência é movimentada para a posição de aquecimento.

9- Um instrumento, conforme reivindicado na reivindicação 1,

caracterizado pelo facto de, pelo menos um de tais reagentes ser uma forma particulada do reagente, e sendo o reagente particulado libertado a partir do respectivo reservatório até à câmara referida, por gravidade, quando o reservatório do reagente fica alinhado com a câmara de reacção.

10- Um instrumento, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a tal câmara de reacção, na placa de reacção, ser formada por um canal alongado contendo uma base de análise de fase sólida, e tendo, a tal placa de transferência, câmaras que são alinháveis com áreas espaçadas no canal, quando a placa de transferência é movida para uma posição de lavagem, formando uma passagem fechada para a transferência de uma solução através do canal.

11- Um instrumento, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto de as placas de reacção e de transferência serem montadas para rotação em relação uma à outra.

12- Um instrumento, conforme reivindicado na reivindicação 1, para uso numa análise de DNA, para detecção de um ácido nucleico com uma sequência-alvo conhecida, caracterizado pelo facto de o suporte, em fase sólida, na reacção, ser revestido com fragmentos de ácido nucleico imobilizados, e contendo o referido instrumento reservatórios de reagentes para adição sequencial ao canal de reacção, de (1) uma sonda para hibridizar quer com a sequência-alvo, quer com os fragmentos imobilizados, e (2) uma molécula-repórter, para ligar, directa ou indirectamente, a tal sonda.

13- Um instrumento, conforme reivindicado na reivindicação 14, caracterizado pelo facto de os reservatórios de reagentes,

para adição da sonda, possuirem um reservatório contendo a sonda, num agente desnaturante, e um segundo reservatório contendo um tampão de aquecimento, para adição ao reservatório de reacção, após a adição do tampão desnaturante.

14- Um instrumento, conforme reivindicado na reivindicação 13, caracterizado pelo facto de os reservatórios de reagentes, para adição da molécula-repórter, consistirem num reservatório contendo um fragmento ramificado de ácido nucleico para se ligar, directa ou indirectamente, com a referida espécie a ser analisada, molécula, e um segundo reservatório contendo uma molécula identificadora para se ligar ao fragmento ramificado.

15- Um instrumento, conforme reivindicado na reivindicação 1, para uso numa análise imunológica, para detecção de um ligante, para ligar imunoespecificamente ao suporte sólido, caracterizado pelo facto de possuir reservatórios de reagentes para adição sequencial, ao canal de reacção, de (1) um reagente anti-ligante capaz de se ligar imunoespecificamente com o ligante referido, quando o ligante fôr ligado ao suporte, e (2) um reagente capaz de reagir com o reagente anti-ligante, a fim de produzir um sinal detectável no suporte sólido.

16- Um instrumento autónomo para análise, numa amostra líquida, de uma espécie a ser analisada, de ácido nucleico, tendo uma sequência-alvo conhecida, caracterizado pelo facto de ser constituído por:

- uma placa de reacção contendo uma câmara de reacção formada por um canal alongado que se estende radialmente, e uma superfície de fase sólida, contida na câmara, e revestida com fragmentos de ácido nucleico imobilizados,

- uma placa de cobertura fixada à placa de reacção, e dotada de câmaras que são alinháveis com áreas espaçadas da ranhura referida.

- uma placa de transferência, intermediária, que inclui quatro reservatórios de reagentes contendo (1) um agente desnaturante e uma sonda para se ligar com o DNA, sujeito a análise e a tais fragmentos imobilizados, (2) um tampão aglutinador, (3) fragmentos ramificados de ácido nucleico, para se ligarem, directa ou indirectamente, à tal espécie a ser analisada, e (4) fragmentos identificadores, para ligar aos fragmentos ramificados, sendo os quatro reservatórios de reagentes projectados para adição sequencial ao tal reservatório de reacção, tendo ainda, a placa de transferência referida, câmaras que são alinháveis com as câmaras na placa de cobertura, quando a placa de transferência é movimentada para uma posição de lavagem, formando uma passagem fechada para a circulação de uma solução através da ranhura de reacção,

- meios de fixação da placa de transferência, entre as placas de reacção e de cobertura, para rotação relativa em relação às mesmas, a partir de uma posição de "casa", na qual os quatro reservatórios ficam isolados da tal câmara, para posições de transferência primeiro-quarto, nas quais os primeiro-quarto reservatórios ficam alinhados com a câmara referida, permitindo a transferência sequencial dos primeiro-quarto reagentes, respectivamente, à câmara, e

- meios para impedir a libertação do primeiro e segundo reagentes, dos seus reservatórios, até que o respectivo reservatório esteja alinhado com a câmara referida.

17- Um instrumento para detecção de uma espécie ligante, por meio de uma ligação detectável e específica a um suporte sólido, caracterizado pelo facto de ser constituído por

- um conjunto autónomo composto por (a) uma placa de reacção contendo o tal suporte sólido e formando uma câmara contendo reagentes líquidos em contacto com o suporte, (b) uma placa de transferência contendo o primeiro e segundo reservatórios de reagentes, (c) nos primeiro e segundo reservatórios referidos, o primeiro e segundo reagentes de reacção, necessários para ligar o ligante, de forma detectável, ao suporte sólido, (d) meios de montagem da placa de transferência, na placa de reacção, para o seu movimento até uma posição de adição de amostra, na qual a amostra pode ser adicionada à câmara referida, uma primeira posição de transferência de reagente, na qual o primeiro reservatório fica alinhado com a tal câmara, uma posição de lavagem na qual a solução de lavagem pode ser introduzida na câmara, e uma segunda posição de transferência de reagente na qual o segundo reservatório fica alinhado com a câmara referida, e (e) meios para impedir a libertação dos primeiro e segundo reagentes, dos seus reservatórios, até que o respectivo reservatório esteja alinhado com a câmara referida, e

- um instrumento para conter a referida placa de reacção, e para girar a placa de transferência referida para as suas variadas posições.

18- Um instrumento, conforme reivindicado na reivindicação 17, caracterizado pelo facto de o instrumento girar como um todo, e contendo a câmara de reacção referida um canal que se estende

radialmente, possuindo a referida superfície de suporte sólido, pelo menos, duas partículas de fase sólida transportadas no canal, para movimento no interior, indo da posição radial interna em direcção à posição radial externa, tendo a referida placa de transferência uma ranhura de colecta na qual as tais partículas podem ser recebidas quando as partículas, no canal, forem submetidas a uma força centrífuga, e ficando a referida ranhura alinhada com a tal ranhura, e possuindo a referida placa de reacção câmaras para receber partículas, nas quais as partículas na tal ranhura se podem depositar quando a placa de reacção, contendo partículas depositadas, é girada em relação à placa de reacção.

19- Um instrumento, conforme reivindicado na reivindicação 18, caracterizado pelo facto de possuir um aquecedor para aquecer os conteúdos líquidos da referida célula, incluindo ainda o tal conjunto meios para vedar a tal câmara quando o referido aquecedor é accionado, incluindo os referidos meios de vedação uma placa de cobertura fixada à referida placa de reacção, e incluindo os tais meios de vedação (a) uma bucha de vedação transportada na tal placa de transferência para flutuação numa direcção normal para o plano da placa, e (b) meios, na tal placa de cobertura, para desviar a bucha contra a tal câmara, quando a placa de transferência é movida até uma posição de aquecimento.

20- Um instrumento, conforme reivindicado na reivindicação 19, caracterizado pelo facto de o referido suporte sólido conter uma partícula esférica na referida câmara, e incluindo, o referido instrumento, meios de detecção para detectar espécies ligadas à partícula esférica, consistindo, os referidos meios de

detecção, num detector de luz e um tubo que se estende do detector de luz, e sendo posicionável de forma a abarcar uma parte esférica da superfície da partícula.

Lisboa, 17 de Junho de 1991

PELO AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

O ADJUNTO

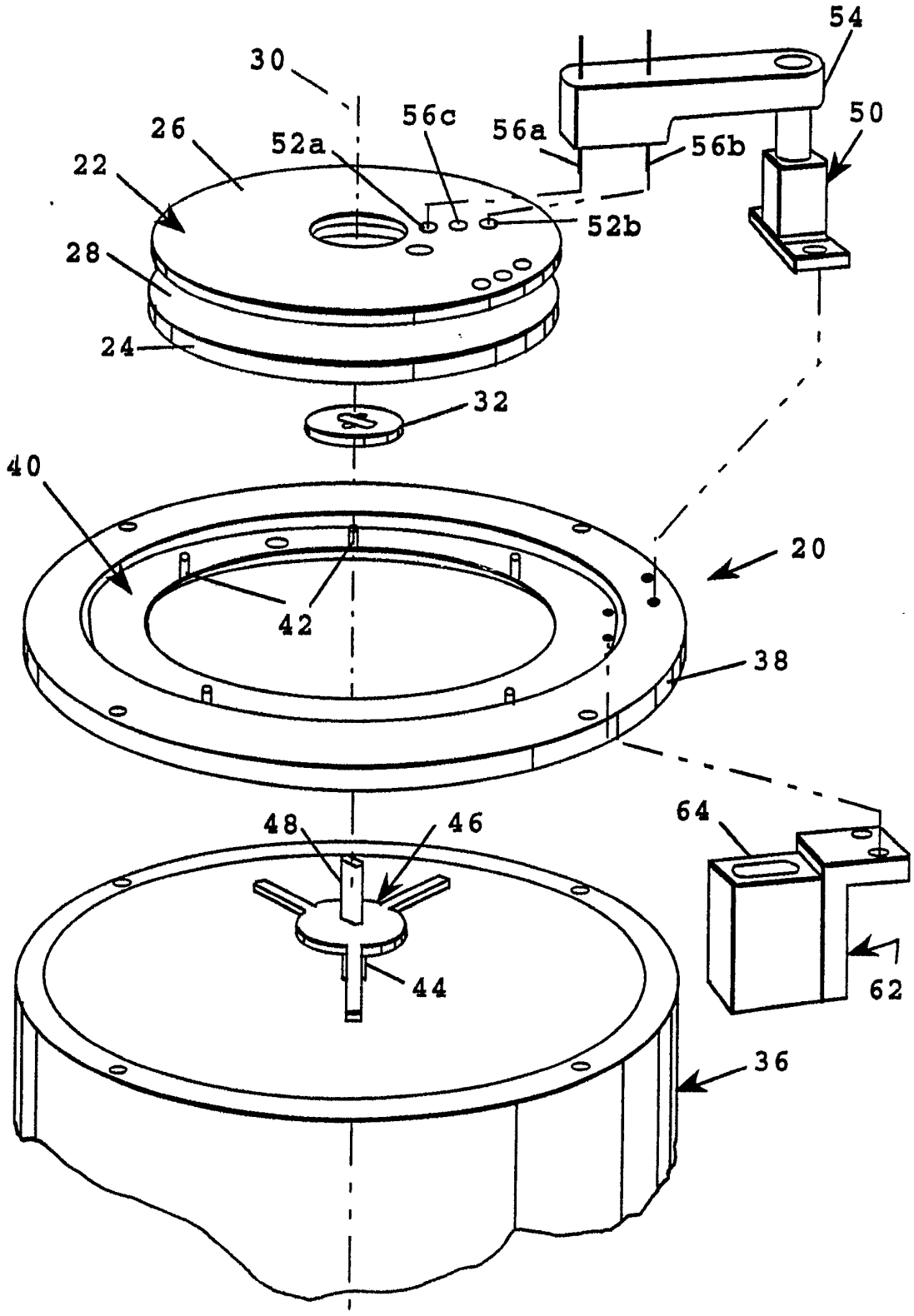

54
30
56c
56a
50
26
52a
56b
22
52b
28
24
32
40
20
42
38
64
48
46
44
62
36

Fig. 1

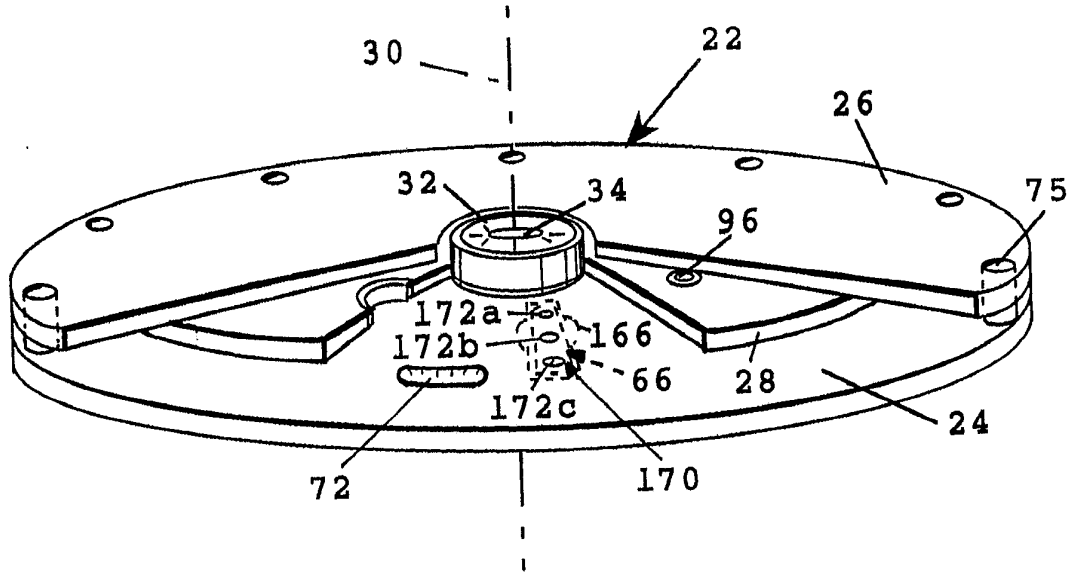


Fig. 2

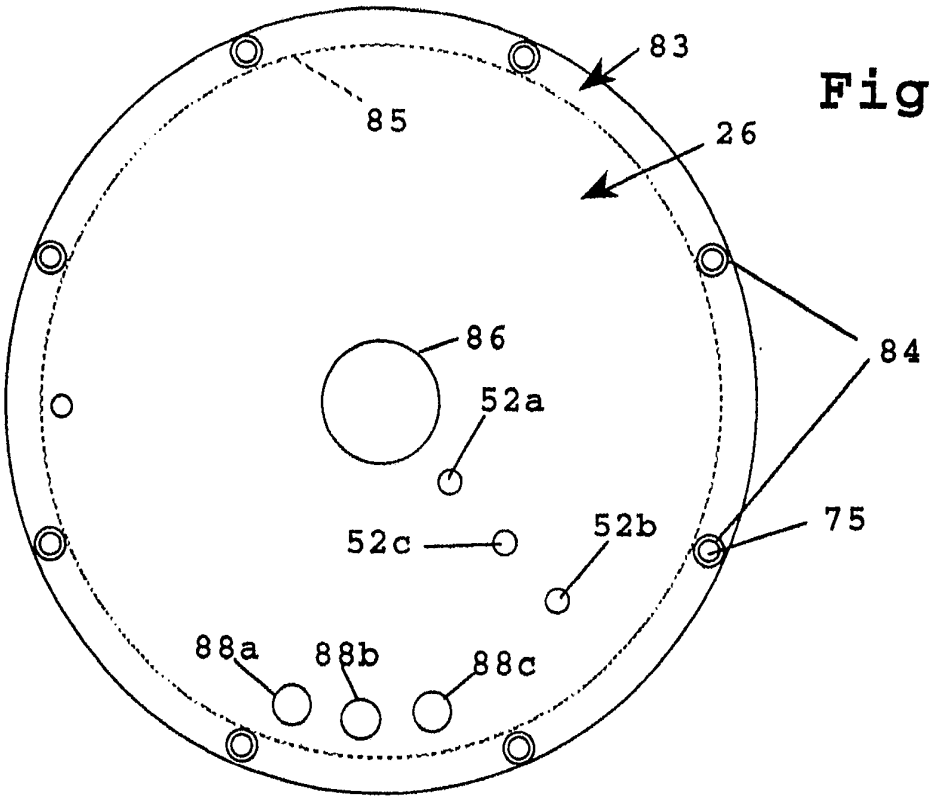

83
85
26
86
84
52a
52c
52b
75
88a
88b
88c

Fig. 3

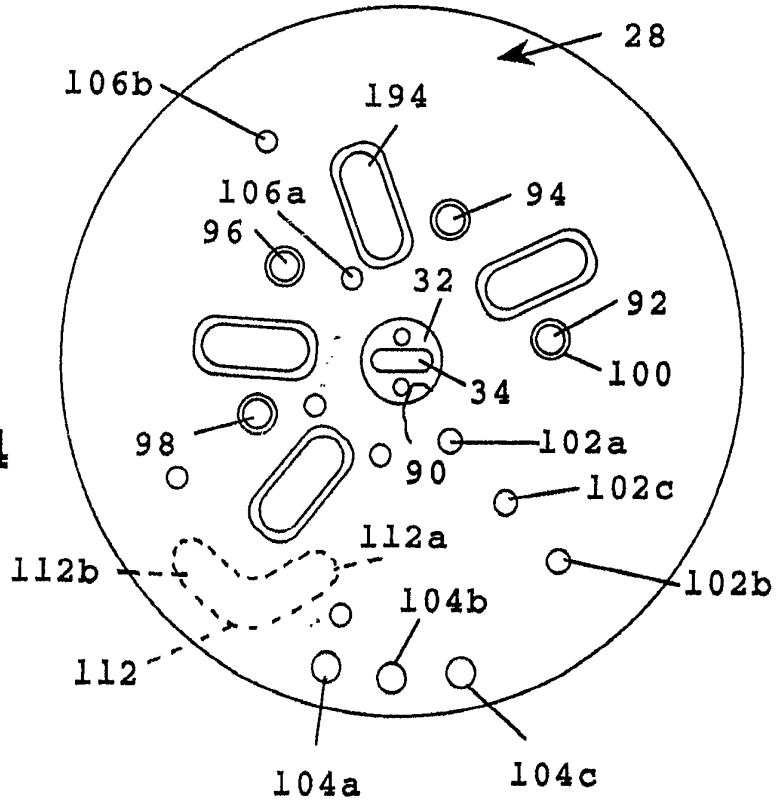

28
106b
194
106a
94
96
32
92
100
34
98
90
102a
102c
112a
112b
102b
104b
112
104a
104c

Fig. 4

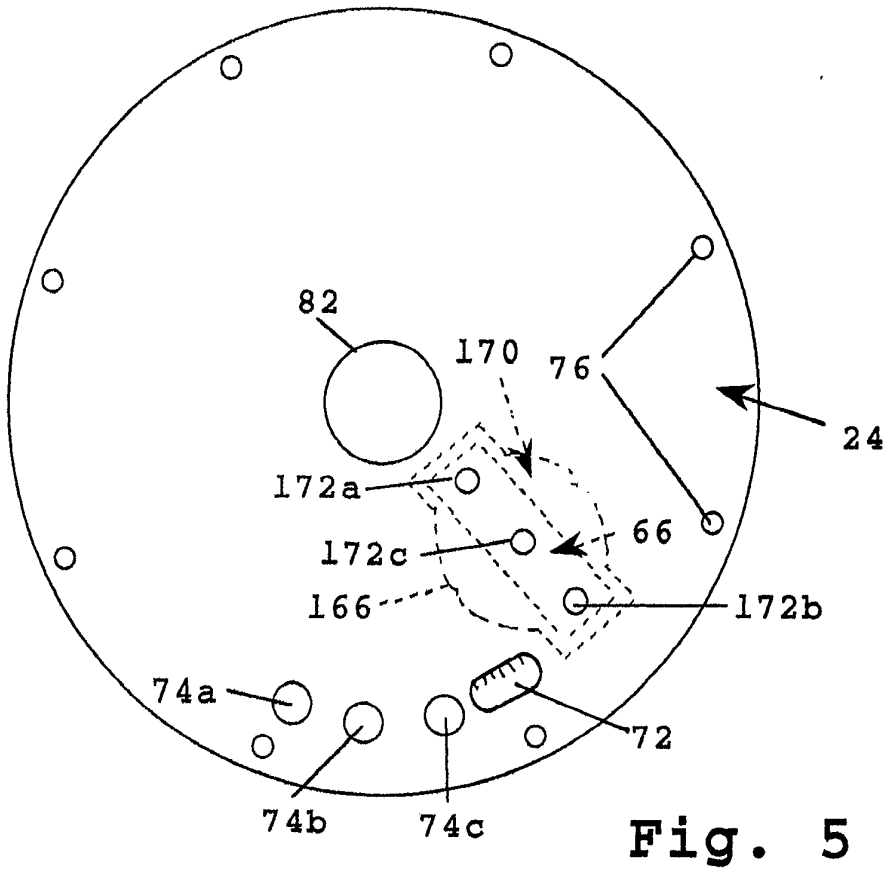


Fig. 5

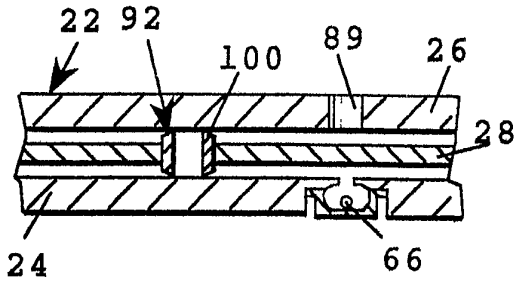


Fig. 6A

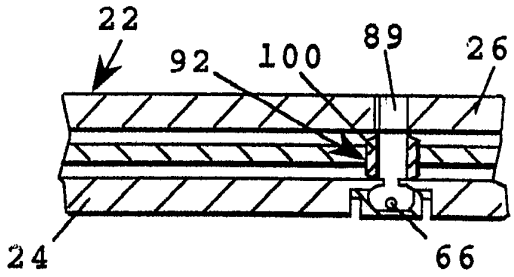


Fig. 6B

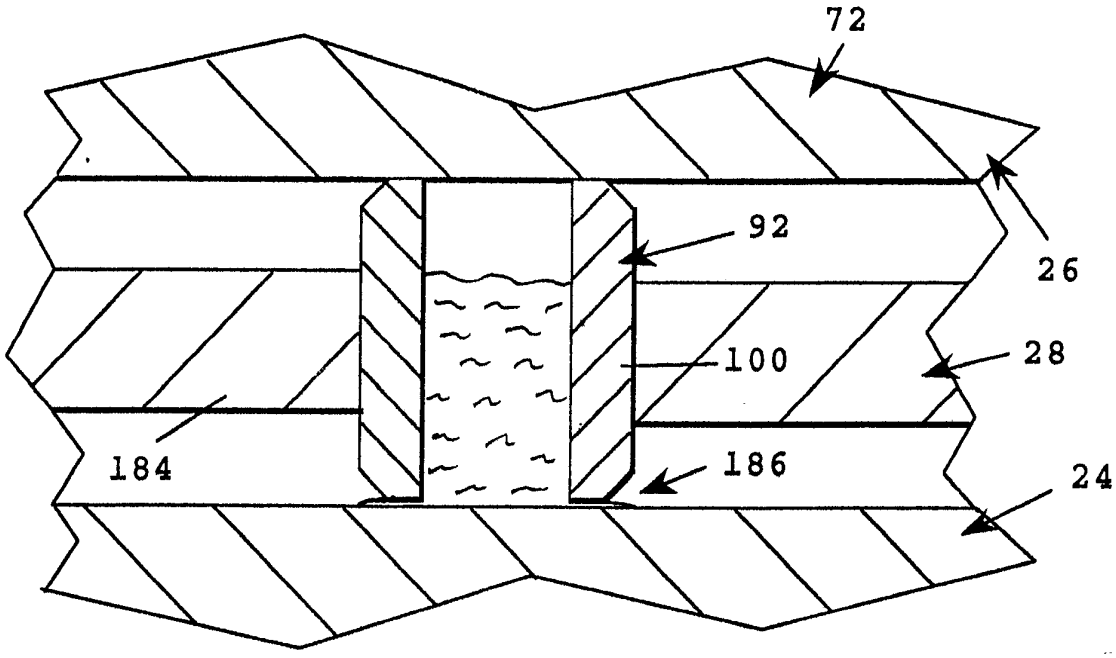


Fig. 7A

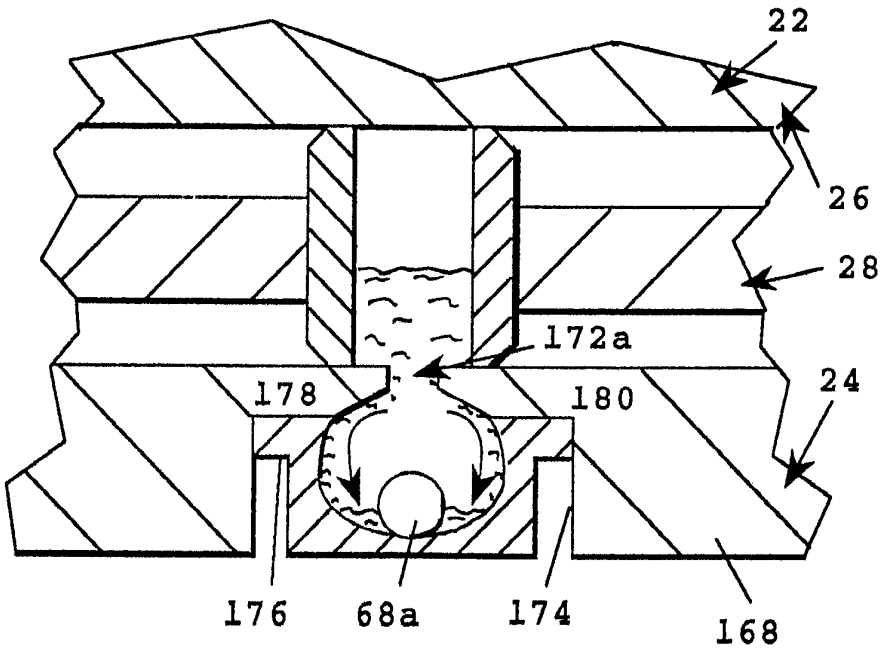


Fig. 7B

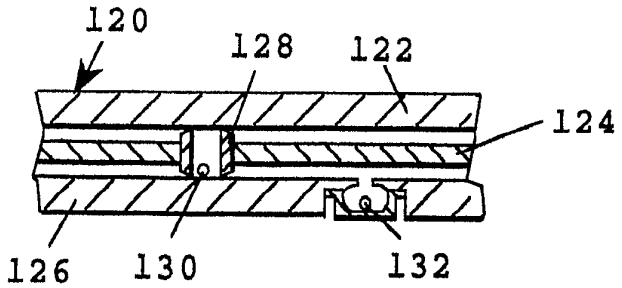


Fig. 9A

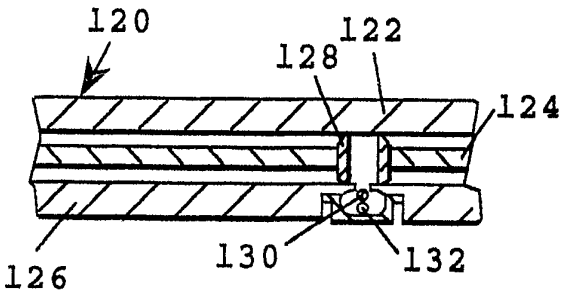


Fig. 9B

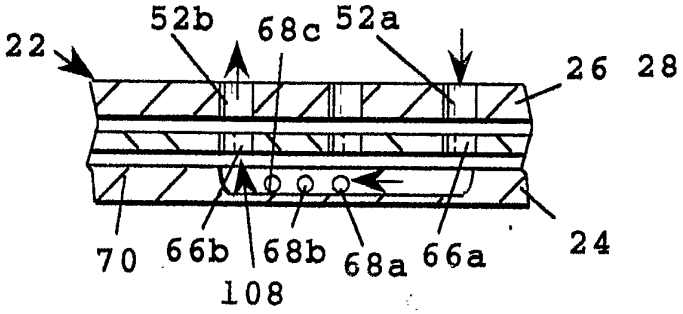


Fig. 10

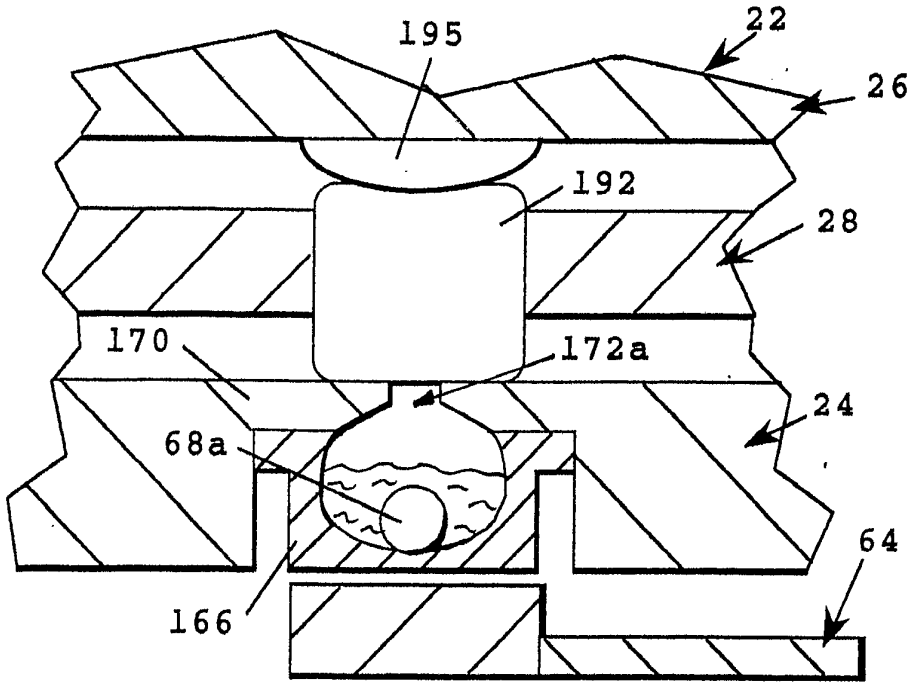

195
22
26
192
28
170
172a
24
68a
64
166

Fig. 8

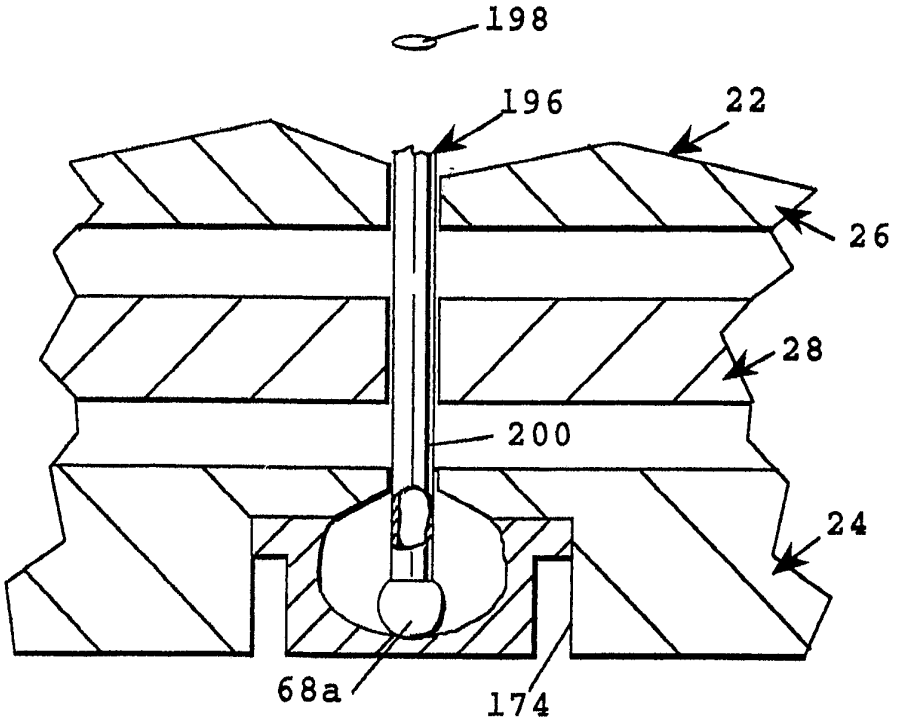

198
196
22
26
28
200
24
68a
174

Fig. 11

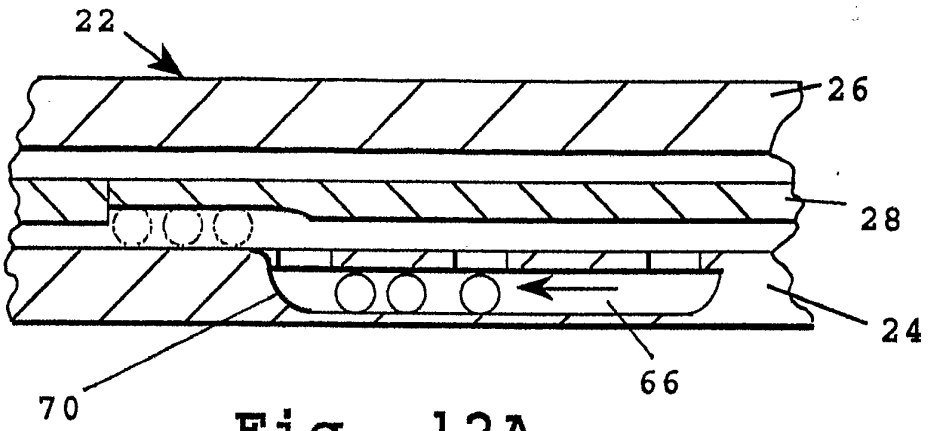
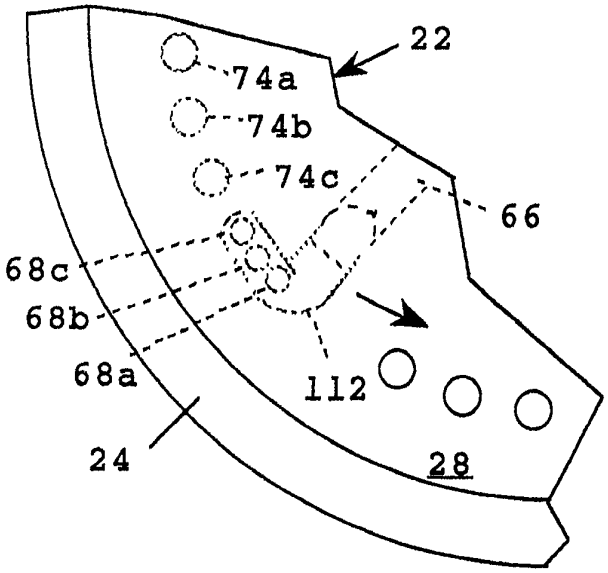


Fig. 12A

Fig. 12B



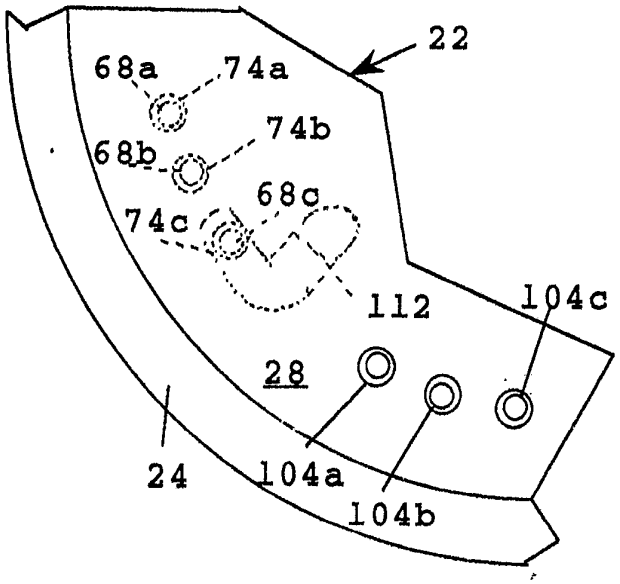
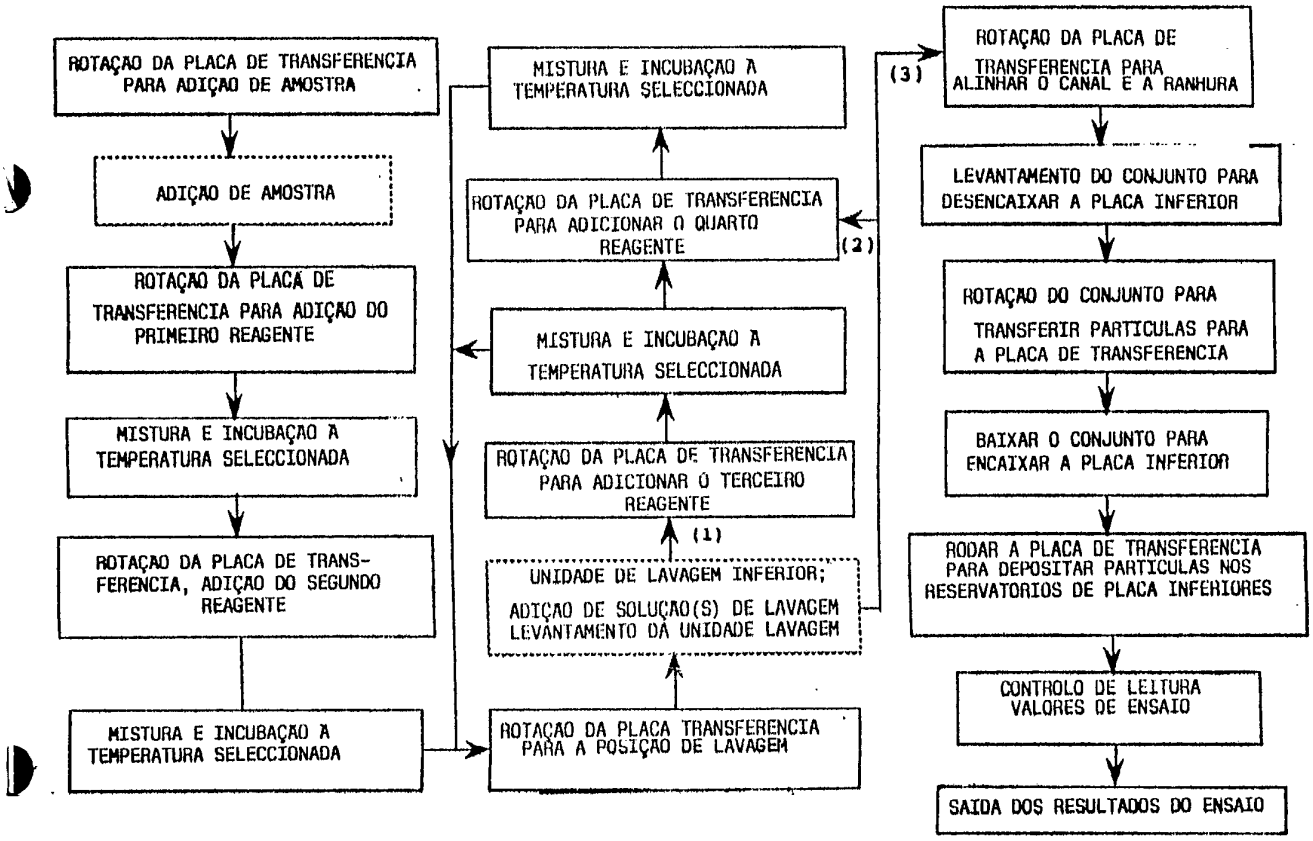


Fig. 12C

Fig. 13


ROTAÇAO DA PLACA DE TRANSFERENCIA PARA ADIÇAO DE AMOSTRA
ADIÇAO DE AMOSTRA
ROTAÇAO DA PLACA DE TRANSFERENCIA PARA ADIÇAO DO PRIMEIRO REAGENTE
MISTURA E INCUBAÇAO A TEMPERATURA SELECCIONADA
ROTAÇAO DA PLACA DE TRANS-FERENCIA, ADIÇAO DO SEGUNDO REAGENTE
MISTURA E INCUBAÇAO A TEMPERATURA SELECCIONADA
ROTAÇAO DA PLACA TRANSFERENCIA PARA A POSIÇAO DE LAVAGEM
UNIDADE DE LAVAGEM INFERIOR; ADIÇAO DE SOLUÇAO(S) DE LAVAGEM LEVANTAMENTO DA UNIDADE LAVAGEM
(1)
ROTAÇAO DA PLACA DE TRANSFERENCIA PARA ADICIONAR O TERCEIRO REAGENTE
MISTURA E INCUBAÇAO A TEMPERATURA SELECCIONADA
ROTAÇAO DA PLACA DE TRANSFERENCIA PARA ADICIONAR O QUARTO REAGENTE
(2)
MISTURA E INCUBAÇAO A TEMPERATURA SELECCIONADA
(3)
ROTAÇAO DA PLACA DE TRANSFERENCIA PARA ALINHAR O CANAL E A RANHURA
LEVANTAMENTO DO CONJUNTO PARA DESENCAIXAR A PLACA INFERIOR
ROTAÇAO DO CONJUNTO PARA TRANSFERIR PARTICULAS PARA A PLACA DE TRANSFERENCIA
BAIXAR O CONJUNTO PARA ENCAIXAR A PLACA INFERIOR
RODAR A PLACA DE TRANSFERENCIA PARA DEPOSITAR PARTICULAS NOS RESERVATORIOS DE PLACA INFERIORES
CONTROLO DE LEITURA VALORES DE ENSAIO
SAIDA DOS RESULTADOS DO ENSAIO

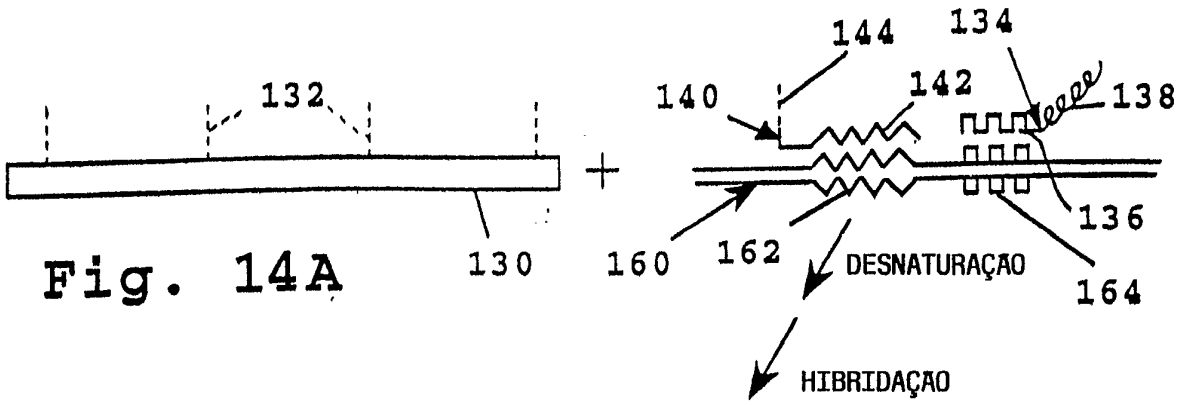


Fig. 14A

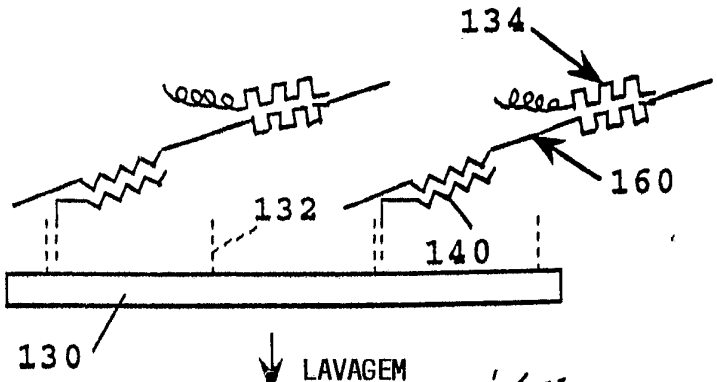


Fig. 14B

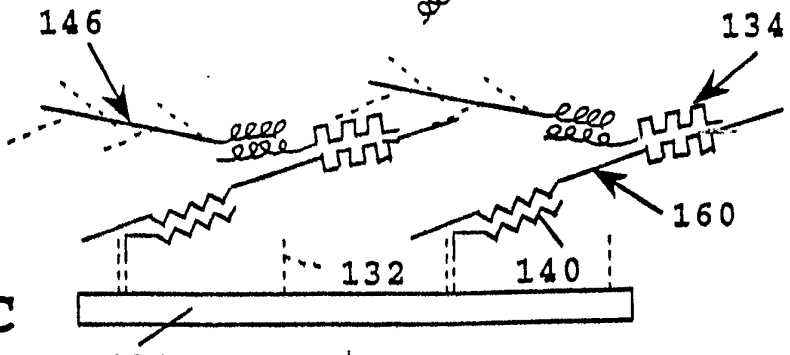


Fig. 14C

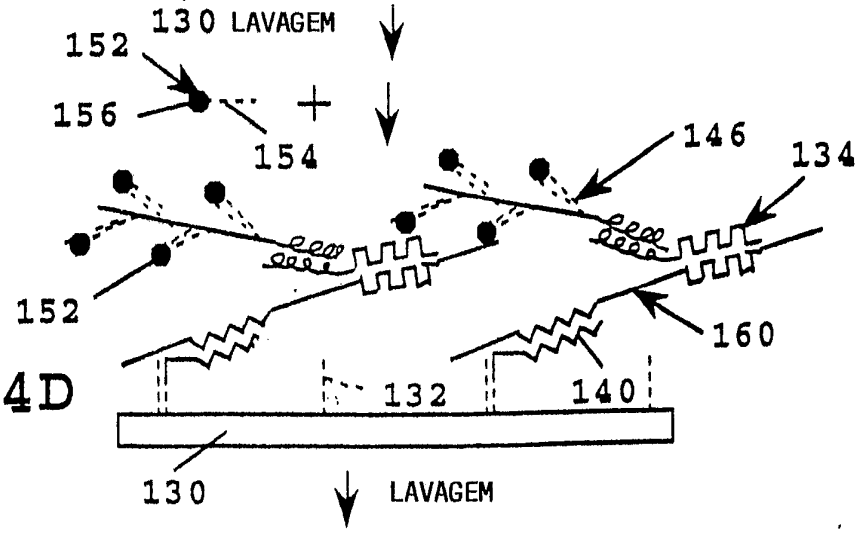


Fig. 14D