



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0910898-0 B1**



**(22) Data do Depósito: 03/04/2009**

**(45) Data de Concessão: 14/09/2021**

**(54) Título:** DISPOSITIVO ELETROCINÉTICO DE CORRENTE ALTERNADA PARA ISOLAR ANALITOS EM NANO ESCALA A PARTIR DE AMOSTRAS DE ALTA CONDUTIVIDADE EM UMA REGIÃO DE ALTO CAMPO DIELETRORFÓRÉTICO (DEP), MÉTODO PARA SEPARAR ANALITOS EM NANO ESCALA A PARTIR DE GRANDES ENTIDADES EM UMA AMOSTRA DE ALTA CONDUTÂNCIA E SISTEMA PARA SEPARAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO

**(51) Int.Cl.:** G01N 27/403; G01N 27/404; G01N 33/49.

**(30) Prioridade Unionista:** 03/04/2008 US 61/042,228.

**(73) Titular(es):** THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA.

**(72) Inventor(es):** MICHAEL HELLER; BENJAMIN SULLIVAN; RAJARAM KRISHNAN; DENNIS CARSON; SADIK ESENER.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2009039565 de 03/04/2009

**(87) Publicação PCT:** WO 2009/146143 de 03/12/2009

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 04/10/2010

**(57) Resumo:** SISTEMA MULTIDIMENSIONAL EX-VIVO PARA A SEPARAÇÃO E O ISOLAMENTO DE CÉLULAS, VESÍCULAS, NANOPARTÍCULAS E BIOMARCADORES. A presente invenção refere-se a dispositivos e técnicas que envolvem uma combinação de forças multidimensionais eletrocínéticas, dieletroréficas, eletroforéticas e fluidas e efeitos para separação de células, nanovesículas, nanoparticulados e biomarcadores (DNA, RNA, anticorpos, proteínas) em amostras biológicas de potência de alta condutância (iônica) e tampões. Em modalidades reveladas, uma combinação de forças dieletroréficas (DEP) contínuas e/ou pulsadas, forças eletroforéticas de corrente contínua de campo contínuo e/ou pulsado, de microeletroforese e fluidas controladas são utilizadas com séries de eletrodos. Em particular, o uso de dispositivos dieletroréficos divididos em câmaras e de alguns dispositivos de séries de eletrodos relativamente maiores adequadamente escalados que combina fluido, forças eletroforéticas e dieletroréficas possibilita que tanto volumes maiores quanto/ ou clinicamente relevantes de Sangue, soro, plasma ou outras amostras sejam analisados mais diretamente, rapidamente e eficientemente. A invenção possibilita a criação de dispositivos e sistemas de diagnóstico de amostra para resposta "ilimitados". Os dispositivos e técnicas descritos também podem realizar a automontagem assistida de moléculas, polímeros, nanocomponentes e entidades mesoescala em estruturas tridimensionais de ordem superior.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"DISPOSITIVO ELETROCINÉTICO DE CORRENTE ALTERNADA  
PARA ISOLAR ANALITOS EM NANO ESCALA A PARTIR DE  
AMOSTRAS DE ALTA CONDUTIVIDADE EM UMA REGIÃO DE  
ALTO CAMPO DIELETROFORÉTICO (DEP), MÉTODO PARA  
SEPARAR ANALITOS EM NANO ESCALA A PARTIR DE GRANDES  
ENTIDADES EM UMA AMOSTRA DE ALTA CONDUTÂNCIA E  
SISTEMA PARA SEPARAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO".**

REFERÊNCIAS CRUZADAS A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório de Patente dos Estados Unidos Nº 61/042.228 arquivado em 3 de abril de 2008 intitulado "*Ex-Vivo Multi-Dimensional System for the Separation and Isolation of Cells, Vesicles, Nanoparticles and Biomarkers*", cuja descoberta é incorporada aqui, a este pedido de patente, por meio de referência em sua totalidade.

DECLARAÇÃO REFERENTE A DIREITOS A INVENÇÕES FEITAS SOBRE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO PATROCINADOS PELO GOVERNO FEDERAL

[0002] Este trabalho foi patrocinado pela NIH Grant/Contract CA119335. O Governo dos Estados Unidos da América pode ter alguns direitos nesta invenção.

ANTECEDENTES

[0003] Em pesquisa biomolecular e diagnóstico clínico é tanto importante quanto um desafio separar e identificar células raras, bactérias, vírus, e biomarcadores (por exemplo, DNA, RNA, anticorpos, outras proteínas, etc.) em amostras de fluidos complexos como sangue, plasma, soro, saliva, e urina. Adicionalmente, o advento de bio-nanotecnologia levou a numerosas abordagens de liberação de fármacos que envolvem encapsulação de fármacos e agentes de estudo por imagens dentro de nanovesículas e nanopartículas. As

abordagens significam que agora também será importante identificar e separar nanovesículas e nanopartículas residuais que permanecem na corrente sanguínea. Uma variedade de técnicas e mecanismos físicos, eletrônicos, e biológicos pode ser usada para preparação e isolamento de amostras de células, nanovesículas, e biomoléculas específicas de amostras complexas como sangue. Estas técnicas e mecanismos incluem centrifugação, filtração por gel, ligação por afinidade, eletroforese CC, e várias combinações incorporadas em laboratório em um chip ( "lab-on-a-chip"), dispositivos microfluídicos, e sistemas amostra para resposta ("sample to answer").

[0004] Muitas destas técnicas convencionais (ou combinações) são processos que relativamente consomem tempo que não são sem problemas e limitações. Em particular, o isolamento de células raras (células cancerosas, células fetais, e células-tronco), baixos números de bactérias e vírus ou números muito baixos de anticorpos específicos, proteínas, enzimas, DNA, e moléculas de RNA, ainda permanece difícil. No caso de diagnóstico clínico, a detecção de células raras e de biomarcadores também pode ser limitada pelo tamanho da amostra; isto é, somente uma quantidade relativamente pequena de sangue pode ser colhida de pacientes muito doentes, os idosos e crianças. Deste modo, processos de preparação de amostras que são ineficientes ou requerem alta diluição da amostra original frequentemente falham ou não são confiáveis para isolar células e outros marcadores relacionados com doença em menores faixas de concentração. Isto é um problema em particular para detecção precoce de câncer, doença residual, células fetais/DNA/RNA no sangue materno, bactérias e vírus no sangue (infecção séptica), e a detecção de baixos números de patógenos (por exemplo, bactérias, vírus, etc.) e agentes de bioterrorismo em grandes volumes de ar, água, ou em produtos alimentícios.

[0005] Técnicas eletrocinéticas de corrente alternada que envolvem o uso de campos CA para manipular células e nanopartículas oferecem alguns mecanismos particularmente atraentes para a separação de células [vide as Referências 2-5], biomarcadores (DNA [Ref. 5-8], proteínas [Ref. 9], etc.), e por fim nanovesículas de liberação de fármacos [Ref. 10]. Estas técnicas podem ser decompostas em três fenômenos distintos: (1) eletro-osmose CA, a qual é fluxo de fluido superficial devido à carga superficial sobre um eletrodo; (2) fluxo eletrotérmico, o qual é fluxo de massa em solução devido a gradientes térmicos produzidos pelos campos elétricos; e (3) dieletroforese (DEP)<sup>1</sup> a qual é um movimento induzido de partículas produzido pelas diferenças dielétricas entre as partículas e o meio em um campo elétrico CA [Ref. 10]. Infelizmente, a maior parte das formas convencionais de DEP e efeitos eletrocinéticos relacionados têm problemas que limitam a utilidade destas tecnologias para preparação de amostras clinicamente relevantes e diagnóstico.

[0006] Em primeiro lugar, separações DEP eficientes em termos de velocidade e controle de seletividade geralmente têm de ser realizadas em condutância relativamente baixa da ordem de  $<10 - 100$  mS/m [Ref. 11]. Adicionalmente, a capacidade para isolar as entidades / analisados desejados tais como nanopartículas ou biomarcadores de DNA nas regiões de campo elevado positivo ou DEP (geralmente em torno ou sobre os eletrodos) se torna mais difícil à medida que a força iônica da solução aumenta e a condutância se torna maior do que 10 mS/m. Deste modo, amostras biológicas tais como sangue ou plasma que têm forças iônicas na faixa de 100 a 200 mM (condutância  $\sim 500-1000$  mS/m) devem ser significativamente diluídas e/ou processadas antes de poderem ser realizadas separações DEP [Ref. 13, 14]. Isto somente frequentemente limita a utilidade de DEP para diagnóstico clínico envolvendo a detecção de células raras ou baixos números de

biomarcadores. Em casos onde uma amostra (um ml de sangue) deve ser diluída 100 a 1000 vezes, agora significa que um volume de amostra muito grande deve ser processado, o qual pode desperdiçar tempo proibitivamente. Se as células são primeiro concentradas por mecanismos físicos tais como centrifugação ou filtração e em seguida são diluídos em tampões de baixa condutância, estes processos não somente desperdiçam tempo, mas também são caros e causam considerável perturbação da amostra. No caso onde DEP pode ser usado para separações de células-tronco, diluição em baixa força iônica, tampões do tipo menos fisiológico podem resultar em perturbação de células-tronco sensíveis e podem afetar sua diferenciação posterior. O isolamento de biomarcadores de proteína, DNA e RNA do sangue é também importante para diagnóstico clínico futuro, em particular para monitorar quimioterapia do câncer [Ref. 15], doença residual [Ref. 16], e detecção precoce de câncer [Ref. 17].

[0007] Apesar de DEP ter sido usado para o isolamento de DNA e proteínas, existem problemas e limitação em usar DEP para realizar a detecção de DNA no sangue. O primeiro problema novamente é a necessidade de diluir e/ou processar a amostra de sangue antes da análise DEP. No caso de biomarcadores de DNA e RNA circulantes livres de células clinicamente relevantes no sangue, é importante descobrir e medir a quantidade de DNA/RNA, seu tamanho e composição de bases (mutações e polimorfismos) [Ref. 17-19]. O processamento de amostras que envolve ou requer procedimentos de centrifugação, filtração, e lavagem pode causar a liberação de moléculas de DNA por células normais que são danificadas ou lisadas no processo, bem como cisalhar o DNA clinicamente relevante em fragmentos menores. A liberação de fragmentos de DNA estranhos e dano do processamento de DNA clinicamente relevante comprometem muito e limita o valor diagnóstico de usar os procedimentos referidos.

O processamento de amostras referido é também altamente ineficiente, e até 60% do DNA e mais de 90% do RNA no sangue pode ser perdido durante o procedimento [17].

[0008] Uma segunda área de problema é que a maioria dos dispositivos de separação DEP que têm sido usados para separações de DNA, proteína, e nanopartícula usam ou microeletrodos de ouro polinomial criados com uma separação muito pequena (6  $\mu\text{m}$  ou menos) entre os mesmos para servir como armadilhas de partículas; ou usam arranjos de microeletrodos de ouro acastelados com separação de 6 a 8 micra ou menos entre os mesmos [Ref. 18-19]. Estes dispositivos de arranjo de microeletrodos de ouro são geralmente fabricados expelindo ouro sobre um material de substrato de vidro. Há também uma série de abordagens de DEP envolvendo o uso de nanoeletrodos [20]. O problema com estas abordagens são que os arranjos têm intrinsecamente baixa produtividade, uma vez que o espaço real para capturar DNA ou outras biomoléculas é relativamente pequeno e o efeito de campo elétrico é significativamente reduzido quando a distância do nanoeletrodo aumenta (por exemplo,  $>10\text{ nm}$ ). Se este tipo de dispositivo for escalado para preparação de amostra (por exemplo, para processar 1 a 10 ml de sangue), a área de amostra real que pode ser interrogada pelo campo DEP limitado próximo aos eletrodos significa que a maior parte do DNA será perdida, ou seria necessário um tempo de processamento de amostra extremamente longo. Se o dispositivo for designado para restringir o fluxo de líquido de modo a passar dentro de dezenas de nanômetros dos nanoeletrodos, então o tempo de processamento é novamente extremamente longo ou seria requerido um dispositivo massivamente grande (dimensão x-y). Existe uma variedade de outros problemas inclusive correntes parasitas fluídicas descontroladas devido a outros efeitos eletrocínéticos e forças osmóticas. Em outras aplicações de

DEP, arranjos que utilizam microeletrodos de platina circulares (de 50  $\mu\text{m}$  a 80  $\mu\text{m}$  de diâmetro) com cerca de 200  $\mu\text{m}$  de espaçamento e revestidos com um hidrogel poroso também têm sido usados para realizar a separação DEP de bactérias do sangue, e para a separação de células cancerosas [Ref. 13, 14]. Novamente, para estas separações de DEP, a amostra de sangue foi centrifugada e uma pequena fração das células foram ressuspensas em um tampão de força iônica baixa [Ref. 13, 14, 24-26].

[0009] Um terceiro problema geral para técnicas electrocinéticas de CA é frequentemente que as proporções resultantes de sensibilidade versus especificidade não são suficientemente elevadas para realizar separações importantes ou clinicamente relevantes. Para separações celulares usando dielectroforese (DEP), é difícil realizar separações de células raras eficientes com proporções de um em um milhão. Como muitos diagnósticos de doenças precoces requerem detecção de biomarcador de baixo nível ou de células raras, é importante ser capaz de melhorar as proporções de sensibilidade versus especificidade tanto quanto possível. Em geral, a maioria dos dispositivos DEP não é escalada adequadamente para lidar com a realidade clínica de isolamento e detecção de biomarcador de baixo nível ou de células raras, onde uma amostra relativamente grande de a partir de 1 a 10 ml de sangue pode ser necessária por simples razões estatísticas. Quando dispositivos DEP são designados para amostras grandes, eles são geralmente ineficientes e não têm capacidade de operar em condições de alta condutância, e, portanto, requerem diluição de amostras adicional.

[00010] Um quarto problema para técnicas electrocinéticas de CA é realizar processos de separação eficientes (baixa perda) e altamente seletivos em amostras biológicas complexas (por exemplo, sangue, plasma, soro, etc.) para analisados e biomarcadores os quais incluem;

células raras, bactérias, vírus, DNA, RNA e proteínas onde todas as entidades podem ter 2 a 3 ordens de diferença de magnitude na faixa de tamanho, e ainda é necessário atingir uma separação eficiente entre entidades que são mais similares em tamanho e composição. Um exemplo importante é a separação de nanoparticulados de DNA (20 a 50 kb), DNA de alto peso molecular (5 a 20 kb), DNA de peso molecular intermediário (1 a 5 kb), e DNA de menor peso molecular DNA (0,1 a 1 kb).

[00011] O problema final e mais sério para dispositivos e técnicas electrocinéticas de CA (DEP) é a introdução de eletroquímica que se torna mais pronunciada em soluções de maior condutância ( $>100$  mS/m), em menores frequências CA ( $< 20$  kHz) e em maiores voltagens ( $>20$  volts pt-pt). Conforme será mostrado na seção de Descrição Detalhada deste documento, a eletroquímica referida pode causar uma série de efeitos adversos inclusive borbulhamento, aquecimento, turbulência fluídica, degradação de eletrodos, e destruição de analisados lábeis. Estes efeitos adversos limitam muito a performance geral do dispositivo DEP, evitam que ocorra a acumulação, o isolamento, e a detecção de entidades específicas (células, nanopartículas, DNA e proteínas) nas regiões de campo elevado de DEP, e interferem com o isolamento de células e analisados nas regiões de campo baixo DEP.

[00012] Outros tipos de CA dispositivos electrocinéticos têm sido usados para separar células e nanopartículas, mas não se comprovaram viáveis em soluções de alta condutância. Um dos argumentos mais convincentes para a não-viabilidade de dispositivos de CA electrocinéticos e de DEP é o fato de que diferentemente de eletroforese CC, a qual tem uso disseminado em pesquisa biológica e em diagnóstico clínico, DEP não tem sido usada para quaisquer aplicações práticas. Seria desejável realizar dielectroforese com

características de de alta performance que possibilitam separações em amostras biológicas de alta condutância e tampões.

## SUMÁRIO

[00013] Modalidades da presente invenção se referem a nova preparação de amostras, sistemas de ponto de atenção ("point-of-care") e amostra para resposta, dispositivos, métodos, e técnicas que envolvem combinações únicas de eletrocinética CA multidimensional e dieletroforética (DEP), eletroforética CC, microeletroforese em dispositivo ligado ("*on-device*") e técnicas fluídicas para separar e identificar células raras, bactérias, vírus, nanovesículas e nanopartículas de liberação de fármacos, organelas celulares e estruturas (núcleos, mitocôndrias, vacúolos, cloroplastos, cilomicra, etc.), biomarcadores de DNA/RNA circulantes livres de células e outros nanoparticulados celulares relacionados com doença (por exemplo, componentes celulares parcialmente degradadas os quais são liberados no sangue, linfa ou órgãos por células cancerosas, doentes ou danificadas), anticorpos, complexos de anticorpos, proteínas, enzimas, e fármacos e terapêuticos diretamente no sangue ou outras amostras biológicas ou tampões. Nas modalidades reveladas, uma combinação de forças eletrocinéticas / dieletroforéticas (DEP) contínuas e/ou pulsadas, forças eletrocinéticas CC de campo contínuas e/ou pulsadas, separação de tamanho por microeletroforese em dispositivo, e fluxo de fluido controlado (bombeado externamente e/ou de acionamento eletrocinético CA/CC) são utilizadas através de novos dispositivos divididos em câmaras e outros dispositivos que incorporam arranjos de eletrodos robustos (de tamanho micro e/ou macro) com estruturas porosas revestidas as quais são usadas para realizar preparação de amostras complexas, separações de biomoléculas, e análises diagnósticas.

[00014] Este relatório revela pela primeira vez novos dispositivos e

sistemas DEP eletrocínéticos nos quais os eletrodos são colocados dentro de câmaras isoladas e regiões de DEP positivas e regiões de DEP negativas são criados dentro de uma câmara interna por passagem do campo CA DEP através de estruturas de orifícios ou poros. Várias geometrias podem ser usadas para formar as regiões DEP positivas desejadas (campo elevado) e regiões DEP negativas (campo baixo) para realizar separações de células, nanopartículas, e biomarcadores. As estruturas de orifícios ou poros referidas podem conter (ou ser preenchidas com) material poroso (hidrogéis) ou podem ser cobertas com estruturas do tipo de membranas porosas. Segregando os eletrodos dentro de câmaras isoladas, os dispositivos DEP de estrutura de poros / orifícios referidos basicamente eliminam quaisquer efeitos eletroquímicos, aquecimento, ou movimento fluídico caótico de ocorrer dentro da câmara de separação interna durante o processo de DEP (vide a figura 1 e a figura 2).

[00015] O relatório também revela o uso de disposições de arranjos seccionadas escaladas (dimensional x-y) de eletrodos robustos e dispostos estrategicamente (dimensional x-y-z) de eletrodos auxiliares que combinam forças DEP, eletroforéticas, e fluídicas de modo que volumes clinicamente relevantes de sangue, soro, plasma, ou outras amostras podem ser mais diretamente analisados sob condições de maior força iônica / condutância. Este relatório revela o revestimento de estruturas de eletrodos robustas (por exemplo, platina, paládio, ouro, etc.) com uma ou mais camadas porosas de materiais (hidrogéis porosos naturais ou sintéticos, membranas, materiais de nanoporos controlados, e materiais de camada dielétrica fina) para reduzir os efeitos de quaisquer reações eletroquímicas (eletrólise), aquecimento, e movimento de fluidos caótico que ocorrem sobre ou próximo aos eletrodos, e ainda permitir que seja realizada a separação efetiva de células, bactérias, vírus, nanopartículas, DNA, e outras biomoléculas

(figuras 3 a 8). Além de usar pontos de cruzamento de frequência CA para obter separações de maior resolução, microeletroforese de CC em dispositivo ligado ("*on-device*") (em arranjo ("*on-array*") também pode ser usada para as separações secundárias. Por exemplo, a separação de nanoparticulados de DNA (20 a 50 kb), DNA de alto peso molecular (5 a 20 kb), DNA de peso molecular intermediário (1 a 5 kb), e fragmentos de DNA de menor peso molecular (0,1 a 1 kb) (figuras 9 a 12). O fato de que o dispositivo pode ser subseccionado significa que podem ser realizadas separações concorrentes de diferentes células sanguíneas, bactérias e vírus, e DNA simultaneamente sobre um dispositivo semelhante (figuras 13 a 16).

[00016] Modalidades da presente invenção também se referem ao uso de controle de temperatura para proporcionar separações de células mais seletivas e eficientes (por exemplo, de células de câncer e de células-tronco). Modalidades da invenção, portanto, se referem em um aspecto à preparação de amostra *ex-vivo*, sistemas de diagnóstico ilimitada de resposta para amostra, laboratório em um chip e de ponto de atenção (POC) que podem ser usados para monitorar e/ou analisar sangue para células cancerosas, bactérias, vírus, nanovesículas (liberação de fármacos), nanopartículas, nanoparticulados de DNA de alto peso molecular, organelas celulares, proteínas, anticorpos e complexos de anticorpos, e uma variedade de outros biomarcadores clinicamente relevantes de doença e estado metabólico. Os sistemas e dispositivos *ex-vivo* referidos podem monitorar ou triar o sangue por campos elétricos CC, separando, isolando, concentrando altamente, e detectando analisados e entidades clinicamente relevantes. Sistemas podem ser usados para coletar seletivamente as entidades referidas para análise mais complexa inclusive, mas não limitada a imunquímica; hibridização de sonda de DNA/RNA; reação de cadeia polimerase (PCR), amplificação

de círculo de laminação (RCA), amplificação de deslocamento de filamento (SDA) e outras técnicas para genotipagem, análise de sequência, expressão genética todas dentro da mesma câmara de amostras (resposta para amostra ilimitada), ou através de dispositivos analíticos associados e/ou sistemas de compilação. Um novo dispositivo construído de acordo com a invenção pode ser um sistema de ponto de atenção (POC) de resposta para amostra ilimitada que permite que seja realizado rápido diagnóstico molecular sobre uma amostra de sangue não diluído. Outro novo dispositivo de acordo com a invenção pode ser um sistema de monitoramento de quimioterapia de câncer ex-vivo que possibilitaria que sangue fosse desviado do paciente, analisado rapidamente (medir os níveis de DNA biomarcador, de fármaco ou de nanovesícula de liberação de fármaco e isolar células cancerosas), e então retornado para o paciente (através de circuito fechado) com mínima diluição ou perturbação física/ química para a amostra. Os sistemas ex-vivo referidos também podem ser usados para monitorar outros terapêuticos, doenças, e disposições do paciente, particularmente em situações de tratamento crítico.

[00017] Os sistemas, dispositivos, métodos, e técnicas revelados incorporando a invenção possibilitam que a separação de células, nanopartículas, e entidades biomarcadoras seja agora realizada sob condições de força iônica de maior condutância ( $>100$  mS/m), em menores frequências CC (DEP) ( $< 20$  kHz), e em maiores forças de campo ( $> 20$  voltagens pico a pico) do que as usadas para a maioria das separações DEP prévias. Mais especificamente, separações DEP podem ser realizadas não somente sob condições de maior força iônica, mas também diretamente em amostras biológicas complexas inclusive sangue, plasma, soro, e tampões não diluídos onde agora analisados em nanoescala (500 nm a 5 nm) e entidades podem ser isolados nas regiões de campo elevado DEP, ao passo que as

entidades maiores (células, partículas micra, etc.) podem ser isoladas nas regiões de baixo campo DEP entre os eletrodos.

[00018] Os novos dispositivos melhoram os efeitos eletroquímicos, de aquecimento, e fluídicos caóticos que ocorrem com o uso de arranjos de eletrodos DEP acastelados, os quais são atualmente um método preferencial para separar nanopartículas e biomoléculas. Em outro aspecto, dispositivos e processos podem usar disposições de múltiplos eletrodos robustos mais macroscopicamente escalados em arranjos seccionados, os quais não somente possibilitam que maiores volumes de amostras sejam mais rapidamente e eficientemente interrogados, mas essencialmente permitem que um número muito pequeno de números muito grandes de células de câncer, bactérias, vírus, nanopartículas, e nanoparticulados e concentrações muito baixas de DNA, biomarcadores de RNA, e complexos de anticorpos seja isolado de amostras complexas contendo números muito grandes de células normais, isto é, sangue. Essencialmente, o uso de um sistema macroscópico "adequadamente escalado" de eletrodos modifica os processos de descobrir uma célula específica (ou outra entidade) em um milhão, para descobrir uma célula específica em um milhar, isto é, a amostra é espalhada sobre muitos subgrupos de eletrodos, criando um mecanismo de classificação hierárquica paralelo. Este processo de separação pode ser aplicado para tratar sangue, e removerá DNA de tamanho menor, RNA, e DNA de maior peso molecular de proteínas bem como células. Em consequência do tamanho dos eletrodos (10 a 100 micra de diâmetro, com separação de 20 a 100 micra) e capacidade para usar amostras menos diluídas, o processo de separação pode agora ser completado em uma maneira rápida e de alta produtividade sobre dispositivos de arranjo escalados, os quais têm 2 a 100 seções de arranjo, cada uma das seções pode conter de 100 a 1000 eletrodos individuais. O dispositivo também

incorporaria eletrodos auxiliares estrategicamente colocados nas dimensões x-y-z.

[00019] Modalidades descritas aqui, neste pedido de patente, mostram que os dispositivos e sistemas de arranjo revelados podem ser usados para separar nanopartículas e nanoparticulados celulares em faixas de menor frequência (10 a 50 kHz) de entidades de maiores tamanhos (células e partículas de tamanho micra) com base nos efeitos do fator de Clausius Mossotti (junto com outros fenômenos Eletrocinéticos CA) inerentes em cada nanoparticulado menos do que ou igual a cerca de 500 nm de diâmetro. Este relatório também revela que quando efeitos eletrocinéticos de CA são usados em fluxo de fluido de combinação, o processo auxiliará o excesso de formação de calor. Este relatório revela adicionalmente que, quando fluxo de fluido e eletroforese de CC são combinados com efeitos eletrocinéticos de CA, tanto células quanto proteínas podem ser movidas efetivamente a jusante para a seção de arranjo inferior dos dispositivos ilustrados, ao passo que nanoparticulados de DNA altamente negativamente carregados e moléculas de DNA podem ser concentrados a montante na seção de arranjo superior dos dispositivos. Deste modo, as diferentes seções de arranjo dos dispositivos ilustrados podem agora ser usadas para realizar mais um processo de separação seletivo tal como: multiplexação com hemácias, leucócitos, separações de células cancerosas, e remoção de proteína sobre a seção de arranjo inferior; bactérias, vírus, nanopartículas e nanovesículas na seção de arranjo central; e nanoparticulados de DNA e moléculas de DNA sobre a seção de arranjo superior dos dispositivos.

[00020] Finalmente, este relatório também revela dispositivos divididos em câmaras de eletrodos separadas e estruturas de poros / orifícios levando a uma câmara de separação isolada, bem como dispositivos de arranjos eletrodos robustos que são revestidos com

materiais nanoporosos (de um nanômetro a um milímetro de espessura) que podem ser usados para realizar processos de separação de tamanho secundária simultânea ou subsequente. Por exemplo, se a seção de arranjo superior de um dispositivo ilustrado puder ser usada para concentrar uma mistura complexa de componentes de DNA, então uma combinação de efeitos eletrocinéticos de CA e forças eletroforéticas de CC podem ser usadas para obter a separação secundária de nanoparticulados de DNA de DNA de alto peso molecular (5 a 50 kb), DNA de peso molecular intermediário (1 a 5 kb), e DNA de menor peso molecular (0,1 a 1 kb). Além disso, as modalidades ilustradas permitem que seja usada microeletroforese de CC dentro das camadas nanoporosas para realizar a separação de tamanho dos vários fragmentos de DNA.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00021] A figura 1 mostra um novo dispositivo DEP eletrocinético no qual eletrodos foram colocados dentro de câmaras separadas e campos de DEP são criados dentro de uma câmara interna por passagem através de estruturas de poros.

[00022] A figura 2 mostra a geometria de poro / orifício superficial para novo dispositivo DEP eletrocinético mostrado na figura 1.

[00023] A figura 3 mostra uma disposição de eletrodos construída de acordo com a invenção, com um fluxo de fluido exemplar e amostra indicada.

[00024] A figura 4 ilustra a disposição de eletrodos da figura 1 com pulsar de eletrodos de acordo com a invenção.

[00025] A figura 5 mostra a disposição de eletrodos da figura 1 com ativação seletiva de eletrodos para obter melhores resultados de separação.

[00026] A figura 6 mostra esquema mais detalhado de processo de separação de amostras de sangue, antes de serem aplicados DEP CA

pulsada / eletroforese CC / fluxo fluídico controlado combinados.

[00027] A figura 7 mostra amostra de sangue em estágio inicial de DEP CA pulsada / eletroforese CC/ fluxo fluídico controlado combinados.

[00028] A figura mostra amostra de sangue em estágio final de DEP CA pulsada / eletroforese CC / fluxo fluídico controlado combinados.

[00029] A figura 9 mostra a DEP CA pulsada e eletroforese CC combinadas de nanoparticulados de DNA corados com Fluorescente, seleção de DNA de peso molecular muito elevado e DNA de peso molecular intermediário - inferior e separação sobre a seção de arranjo superior.

[00030] A figura 10 mostra a DEP CA pulsada e eletroforese CC de nanoparticulados de DNA corados com fluorescente iniciais combinadas, seleção de DNA de peso molecular muito elevado e DNA de peso molecular intermediário - inferior e separação sobre a seção de arranjo superior.

[00031] A figura 11 mostra a DEP CA pulsada e eletroforese CC de nanoparticulados de DNA corados com fluorescente finais combinadas, seleção de DNA de peso molecular muito elevado e DNA de peso molecular intermediário - inferior e separação sobre seções de arranjo superiores.

[00032] A figura 12 mostra a remoção de nanoparticulados de DNA e DNA de peso molecular muito elevado e separação de tamanho eletroforética CC em arranjo dos fragmentos DNA de peso molecular intermediário e baixo.

[00033] A figura 13 mostra a DEP CA pulsada inicial aplicada a hemácias e leucócitos sobre seção de arranjo inferior do dispositivo.

[00034] A figura 14 mostra a DEP CA pulsada final aplicada a hemácias e leucócitos sobre seção de arranjo inferior do dispositivo.

[00035] A figura 15 mostra a DEP CA pulsada inicial para

separação de bactérias, vírus e nanovesículas sobre a seção de arranjo central do dispositivo.

[00036] A figura 16 mostra a DEP CA pulsada final para separação de bactérias, vírus e nanovesículas sobre a seção de arranjo central do dispositivo.

[00037] As figuras 17A-H mostra separação DEP de nanopartículas de 60 nm e de 200 nm sob condições de condutância intermediária e elevada.

[00038] As figuras 18A-D mostra DEP separação de nanopartículas de 200 nm sob condições de condutância intermediária e elevada.

[00039] As figuras 19A-H mostra imagens de intensidade 3D fluorescentes para a separação DEP de nanopartículas de 60 nm e de 200 nm sob condições de condutância intermediária e elevada.

[00040] As figuras 20A-D mostra imagens reais e imagens de intensidade 3D para a separação DEP de nanopartículas de 60 nm sob condições de alta condutância.

[00041] As figuras 21A-B mostra gráficos do aumento da intensidade de fluorescência das nanopartículas versus condutância crescente para nanopartículas de 60 nm e de 200 nm.

[00042] A figura 22 mostra gráfico dos resultados experimentais versus curvas de crossover DEP teórico para nanopartículas de 60 nm e de 200 nm como função da condutância.

[00043] As figuras 23A-H mostra tanto imagens reais quanto imagens de intensidade 3D para a separação DEP de nanopartículas de 200 nm sobre eletrodos de platina não revestidos e revestidos com hidrogel em condutâncias crescentes (mostra escurecimento dos eletrodos).

As figuras 24A-F mostra imagens de microscopia ótica e de microscopia eletrônica de varredura do dano de eletrodos depois de DEP de alta condutância sem nanopartículas presentes.

[00044] As figuras 25A-H mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura do dano de eletrodos e fusão de nanopartículas de 200 nm depois de DEP de alta condutância.

[00045] As figuras 26A-C mostra imagens fluorescentes e de microscopia eletrônica de varredura de nanopartículas de 60 nm e dano de eletrodos depois de DEP de alta condutância.

[00046] A figura 27 mostra um processo de resposta para amostra ilimitada de DNA de alto peso molecular em sangue compreendendo a etapa 1.

[00047] A figura 28 mostra um processo de resposta para amostra ilimitada de DNA de alto peso molecular em sangue compreendendo a etapa 2.

[00048] A figura 29 mostra um processo de resposta para amostra ilimitada de DNA de alto peso molecular em sangue compreendendo a etapa 3.

[00049] A figura 30 mostra um processo de resposta para amostra ilimitada de DNA de alto peso molecular em sangue compreendendo a etapa 4.

[00050] A figura 31 mostra um processo de resposta para amostra ilimitada de DNA de alto peso molecular em sangue compreendendo a etapa 5.

[00051] A figura 32 mostra um processo de resposta para amostra ilimitada com amostra complexa.

[00052] A figura 33 mostra um processo de resposta para amostra ilimitada de amostra complexa com análises de PCR e de imunoensaio.

[00053] A figura 34 mostra um processo de resposta para amostra ilimitada de amostra complexa com análises de PCR e de imunoensaio e detecção.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA

[00054] Este documento ensina novos sistemas, dispositivos,

métodos, e técnicas de separação de amostras e de resposta para amostra que combinam eletrocinéticas CA multidimensionais, incluindo dieletroforese (DEP), eletroforéticas CC, microeletroforese, e fluídicos em modos únicos que podem ser usados para separar e identificar células, nanovesículas e nanoparticulados, bactérias e/ou vírus, bem como um hospedeiro de outros biomarcadores de doença clinicamente relevantes a partir de volumes relevantes de amostras biológicas e clínicas de alta condutância (força iônica) e tampões incluindo, mas não limitados a sangue, plasma, soro, urina, fluido linfático, saliva, amostras biopsiadas, culturas celulares (células-tronco), culturas bacterianas, e de fermentação. Apesar das modalidades reveladas da invenção possibilitarem que a separação DEP de células, nanopartículas, e outros analisados seja realizada diretamente em amostras não diluídas (sangue, plasma, tampões biológicos), as modalidades não excluem o uso dos dispositivos e métodos revelados para amostras ou tampões parcialmente diluídos, ou para amostras que passaram por outros procedimentos de preparação de amostras.

[00055] O uso de novos dispositivos de multicâmaras e dispositivos de arranjo de eletrodo com eletrodos robustos de diâmetro e distâncias de separação definidas possibilita que DEP viável seja realizado em soluções de alta condutância (força iônica). Estes novos dispositivos DEP são designados em uma maneira tal que borbulhamento, aquecimento, e outros efeitos adversos devido à eletroquímica aumentada que ocorre sob condições de alta condutância não reduzem a eficiência ou previnem a separação, concentração, e detecção de analisados ou entidades específicos de amostras biológicas complexas e tampões de alta força iônica. A realização de separações DEP sob condições de alta condutância tem sido um problema importante e limitação para a maioria dos dispositivos de separação CA eletrocinéticos e dieletroforéticos problemáticos [Ref. 1-

28]. Mesmo quando algum grau de separações DEP de alta condutância puder ser obtido por um curto período de tempo usando dispositivos de microarranjo com revestimento dos eletrodos com hidrogel, os dispositivos referidos não foram viáveis como uma ferramenta de separação de amostras e dispositivo de diagnóstico [Ref. 13, 14, 24-28].

[00056] De modo a melhor demonstrar esta limitação da condutância de DEP, um primeiro exemplo inicial descrito aqui, neste pedido de patente, mostra a separação DEP de nanopartículas em um tampão de baixa condutividade. Este exemplo envolve separar nanopartículas derivadas de DNA de 60 nm de partículas de 10  $\mu\text{m}$  em MilliQ water (5,5  $\mu\text{S/m}$ ). A separação foi realizada a 10 kHz CC a 10 volts pico a pico (*pk-pk*). A figura 17a mostra as condições iniciais sob luz branca antes do campo elétrico CA ser aplicado com uma distribuição aleatória das partículas de 10  $\mu\text{m}$  sobre o arranjo de microeletrodos. As condições iniciais sob detecção de fluorescência vermelha mostram uma névoa fluorescente vermelha através do microarranjo conforme seria esperado a partir das nanopartículas fluorescentes derivadas de DNA de 60 nm (vide a figura 17b). Depois do campo DEP CA ser aplicado por somente 30 segundos, a maioria das partículas de 10  $\mu\text{m}$  se concentraram em disposições muito ordenadas dentro das regiões de baixo campo DEP negativo (vide a figura 17c). Depois de 1 minuto de uma aplicação do campo CA, as nanopartículas derivadas de DNA de 60 nm se concentraram sobre as regiões de campo elevado DEP positivo sobre os microeletrodos (vide figura 17d). A elevada intensidade fluorescente sobre os microeletrodos junto com a redução da intensidade fluorescente nas áreas adjacentes indica que a maioria das nanopartículas se concentra dentro das regiões de campo elevado. O exemplo seguinte mostra a separação DEP de nanopartículas de 200 nm misturadas com

partículas de 10  $\mu\text{m}$  em 0,01x TBE (1,81 mS/m) realizada a 3 kHz CA a 10 volts pico a pico. A perspectiva de luz branca inicial mostra uma distribuição aleatória das partículas de 10  $\mu\text{m}$  antes do campo ser aplicado (figura 17e), e a perspectiva de fluorescência verde mostra ausência de acumulação das nanopartículas de 200 nm nas regiões de campo elevado (figura 17f). Em menos de 10 minutos, as partículas de 10  $\mu\text{m}$  são concentradas dentro das regiões de campo baixo (figura 17g), e as nanopartículas de 200 nm são altamente concentradas dentro das regiões de campo elevado DEP (figura 17h). Estes resultados de DEP de baixa condutividade são consistentes de modo geral com outras separações de nanopartícula DEP de baixa condutividade citadas na literatura, e esperados a partir da teoria DEP clássica [Ref. 11-14].

[00057] A próxima série de exemplos DEP mostra as separações de nanopartículas derivadas de DNA de 60 nm, nanopartículas de 200 nm, e partículas de 10  $\mu\text{m}$  em soluções tampão com condutividades maiores do que 100 mS/m. Para 1x TBE (0,109 S/m), depois do campo CA ser aplicado por 20 minutos, a separação entre nanopartículas de 200 nm e nanopartículas de 10  $\mu\text{m}$  sob condições de luz branca mostrou as partículas de 10  $\mu\text{m}$  concentradas nas regiões de campo inferior (figura 18a). Sob fluorescência verde, as nanopartículas de 200 nm foram concentradas nas regiões de campo elevado DEP positivo por cima dos microeletrodos (figura 18b). Para experimentos DEP realizados em 1x PBS (1,68 S/m), depois de 20 minutos as partículas de 10  $\mu\text{m}$  são concentradas dentro das regiões de campo baixo (figura 18c). A imagem de 20 minutos de fluorescência verde para o experimento de alta condutância de 1x tampão PBS foi tomada depois da remoção de algumas bolhas pequenas e em um ganho aumentado (figura 18d). A imagem mostra que as nanopartículas de 200 nm se concentraram dentro das regiões de

campo elevado DEP positivo de quatro microeletrodos. No entanto, os microeletrodos não mostram escurecimento significativo e dois dos microeletrodos borbulharam. A observação de que as nanopartículas de 200 nm se concentraram predominantemente sobre estes quatro microeletrodos é consistente com o fato de que eles produzem campos ligeiramente superiores.

[00058] Os experimentos de alta condutância em tampão de 1x PBS que foram realizados usando nanopartículas derivadas de DNA de 60 nm também produziram resultados similares, isto é, em que ainda se observou que as nanopartículas de 60 nm concentraram nas regiões de campo elevado DEP positivo sobre três dos microeletrodos. Análise adicional das imagens de fluorescência foi realizada em um modelo matemático usando MATLAB para produzir picos tridimensionais, os quais melhor demonstram a concentração das nanopartículas fluorescentes sobre as regiões de campo elevado. Para os experimentos de 1x TBE com nanopartículas derivadas de DNA de 60 nm, os dados fluorescentes 3D mostraram um aumento significativo dos pontos de tempo de 0 minuto (figura 19a), 2 minutos (figura 19b), 8 minutos (figura 19c), e 16 minutos (figura 19d). De modo similar, os dados fluorescentes 3D para as nanopartículas de 200 nm em 1x PBS também mostram um aumento dos pontos de tempo em 0 minuto (figura 19e), 8 minutos (figura 19f), 16 minutos (figura 19g), e depois de 20 minutos (figura 19h).

[00059] Para as nanopartículas derivadas de DNA de 60 nm em 1x PBS, ainda há concentração conforme é visto na imagem fluorescente (figura 20a). Os dados de imagens fluorescentes 3D também mostram um aumento de fluorescência similar de 0 minuto (figura 20b), a 8 minutos (figura 20c) e a 20 minutos (figura 20d). Devido à inativação de um dos microeletrodos (terceira linha, segunda coluna) mostrada na figura 20a, o padrão de campo elétrico é ligeiramente alterado. Os

dados globais de fluorescência foram compilados usando MATLAB para experimentos em tampões de 1x TBE, 0,1x PBS (0,177 S/m) e 1x PBS nos pontos de tempo de 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, e 20 minutos. Os resultados para as nanopartículas derivadas de DNA de 60 nm são mostrados no gráfico (figura 21a), e os resultados para as nanopartículas de 200 nm são mostrados no gráfico (figura 21 b). Estes exemplos mostram um aumento na concentração das nanopartículas fluorescentes com o tempo. De modo mais importante, estes exemplos também mostram uma redução significativa na concentração global das nanopartículas fluorescentes à medida que a condutividade dos tampões aumenta, isto é, um tempo muito mais longo é necessário para concentrar entidades nas condições de maior condutância.

[00060] A figura 22 agora mostra as curvas teóricas e as faixas para os resultados experimentais para a parte real do fator de Clausius-Mossotti ( $\text{Re}(K(\omega))$ ) versus condutividade para as nanopartículas de 60 nm derivadas de DNA e as nanopartículas de 200 nm. O gráfico indica que os valores  $\text{Re}(K(\omega))$  teóricos devem ser negativos para as condutividades usadas nestes exemplos, e, portanto, as nanopartículas devem ter acumulado nas regiões de campo baixo. Não obstante, os resultados reais mostram que a acumulação de nanopartículas continua na região de campo elevado. Infelizmente, sob estas condições de alta condutância, ocorrem ( $> 100$  mS/M) bolhas, escurecimento dos eletrodos, e falhas de eletrodos, e são requeridos tempos de DEP muito mais longos os quais produzem separações relativamente ineficientes.

[00061] Foi descoberto que estes efeitos adversos relacionados com DEP são devidos ao aumento da atividade eletroquímica que ocorre quando se usa tampões de maior força iônica que continham eletrólitos de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) [Ref. 29-30]. Um melhor

entendimento destes efeitos foi necessário para desenvolver dispositivos DEP mais viáveis e robustos para aplicações de diagnóstico molecular. Exemplos adicionais que demonstram claramente as interações adversas de microeletrodos / nanopartículas / eletrólitos sob condições de alta condutância são agora mostrados nos exemplos descritos aqui, neste pedido de patente. Estes exemplos envolveram realizar a separação e a detecção de nanopartículas de poliestireno de 200 nm fluorescentes verde-amareladas a partir de esferas de 10 micra sob diferentes condições de condutância (força iônica), sobre estruturas de microeletrodos de platina com hidrogéis (figuras 23 A-F), e sem algumas camadas de hidrogel (figuras 23 G-H). Os resultados para todos os tampões (0,01 x TBE, 1x TBE, 1x PBS) mostram a separação e a concentração das nanopartículas de 200 nm fluorescentes verdes dentro das regiões de campo elevado DEP sobre os microeletrodos, e a concentração das esferas de 10 µm dentro das regiões de campo baixo entre os microeletrodos. Novamente, a concentração de nanopartículas de 200 nm parece mais elevada para 0,01 x TBE, e diminui à medida que aumenta a força iônica do tampão para 1x PBS (vide as figuras 23B, 23D, 23F, e 23H). A concentração de nanopartículas ocorre mais no centro dos microeletrodos com hidrogéis, e no perímetro externo para os microeletrodos não revestidos (figuras 23A, 23C, 23E, 23G). Na maior condutância de tampão (1x PBS), tanto os microeletrodos revestidos com hidrogel (figura 23E) quanto os microeletrodos não revestidos apresentam significativo escurecimento dos eletrodos (figura 23G).

[00062] Apesar de não mostrado nestas figuras de desenhos, também foi observado aumento de microborbulhamento em tampão de 1x PBS sobre tanto os microeletrodos revestidos com hidrogel quanto os não revestidos depois de quatro minutos de DEP. Não obstante, o microborbulhamento pareceu mais pronunciado sobre os

microeletrodos não revestidos. Além disso, em um tampão de 1X PBS, ocorre borbulhamento caótico sobre quase todos os eletrodos quando a voltagem CA é aumentada acima de 20 volts pt-pt. Enquanto a concentração de nanopartículas e escurecimento puderam ser observados sobre tanto os microeletrodos de platina revestidos com hidrogel quanto sobre os não revestidos, os microeletrodos não revestidos proporcionaram uma oportunidade de usar microscopia eletrônica de varredura (SEM) para analisar os efeitos eletroquímicos e para verificar a concentração e a adesão de nanopartículas.

[00063] Na série de exemplos seguinte, DEP foi realizada em tampão 1x PBS de alta condutividade sobre microeletrodos não revestidos sem nanopartículas presentes. O arranjo de microeletrodos foi lavado, secado, e em seguida estudado por imagens usando microscopia eletrônica de varredura. A figura 24A primeiro mostra as imagens de microscopia ótica de um microeletrodo controle não ativado, e um microeletrodo ativado (figura 24 B) depois de 10 minutos de DEP a 3000Hz, 10 volts pico a pico. Observa-se claramente significativo escurecimento do microeletrodo ativado. As figuras 24C e 24D agora mostram as imagens de microscopia eletrônica de varredura dos mesmos microeletrodos não ativados e ativados. Observa-se claramente dano e degradação significativos do microeletrodo ativado na imagem de microscopia eletrônica de varredura. As figuras 24E e 24F são imagens de microscopia eletrônica de varredura de maior ampliação dos microeletrodos, e mostram ainda mais claramente a degradação da camada de platina que ocorreu em torno do perímetro do microeletrodo (figura 24F).

[00064] Exemplos de DEP similares foram realizados em tampão de 1x PBS de alta condutância com as nanopartículas de 200 nm presentes. A figura 25A primeiro mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura do microeletrodo controle não ativado depois

de dois minutos de DEP a 3000Hz, 10 volts pico a pico em tampão de 1x PBS de alta condutividade. O microeletrodo controle sem ativação mostra somente umas poucas nanopartículas de 200 nm distribuídas aleatoriamente sobre a estrutura. A figura 25B mostra uma imagem de microscopia eletrônica de varredura de maior ampliação da borda de um microeletrodo controle, onde algumas nanopartículas aparecem capturadas aleatoriamente na área entre a borda do microeletrodo de platina. A figura 25C mostra a imagem de microscopia eletrônica de varredura de um microeletrodo, o qual foi ativado por 2 minutos com nanopartículas de 200 nm presentes. Um grande número de nanopartículas se concentra e adere ao microeletrodo, especialmente nas bordas. A imagem ampliada (figura 25D) mostra muito melhor os aglomerados de nanopartículas concentrados e indica alguma degradação da platina na borda do microeletrodo. As figuras 25E e 25F agora mostram imagens de um microeletrodo ativado depois de 5 minutos de DEP com nanopartículas de 200 nm. Novamente, se observa claramente concentração e aglomeração das nanopartículas de 200 nm, mas a estrutura do microeletrodo de platina agora parece mais severamente danificada e degradada. A figura 25G é uma imagem de microscopia eletrônica de varredura de maior ampliação da borda do microeletrodo da figura 25D, mostrando novamente aglomeração das nanopartículas. Finalmente, a figura 25H é uma imagem de maior ampliação do microeletrodo degradado (visto na figura 25F), mostrando os aglomerados de nanopartículas intercalados com aglomerados fundidos ou derretidos de nanopartículas. Estes aglomerados de nanopartículas fundidos são os resultados da atividade eletroquímica agressiva (calor,  $H^+$  e  $OH^-$ ) nos tempos de ativação DEP mais longos.

[00065] Outra série de exemplos envolve a realização de separação DEP e detecção de nanopartículas fluorescentes vermelhas de 40 nm

a partir de esferas de 10 micra em tampão de 1x PBS de alta condutância sobre estruturas de microeletrodos sem um hidrogel. A figura 26A é uma imagem fluorescente vermelha do microeletrodo antes de ativação DEP mostrando nenhuma concentração das nanopartículas de 40 nm. A figura 26B é a imagem fluorescente vermelha do microeletrodo depois de ativação DEP por 4 minutos a 10.000 Hz, 10 volts pico a pico, a qual agora mostra claramente a concentração de nanopartículas de 40 nm sobre o perímetro dos microeletrodos. A figura 26C é uma imagem de microscopia eletrônica de varredura de alta ampliação mostrando o microeletrodo danificado e aglomeração das nanopartículas de 40 nm.

[00066] Estes exemplos mostram claramente que está ocorrendo atividade eletroquímica aumentada quando DEP é realizado sobre condições de alta condutância ( $> 100\text{mS/m}$ ). Esta eletroquímica muito agressiva causa micro-borbulhamento e escurecimento dos microeletrodos. De modo mais importante, mostra que ocorre significativa degradação de microeletrodos, a qual por fim leva a falência do eletrodo, e mostra que esta destruição dos microeletrodos aumenta à medida que aumenta o tempo de ativação DEP. O fato de que foi observada fusão das nanopartículas de poliestireno sobre as estruturas de microeletrodos degradados sugere que está ocorrendo significativo aquecimento, apesar de DEP ser um processo eletrocínético de corrente alternada. Estes resultados podem ser atribuídos às reações de eletrólise CC as quais produziram  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{OH}^-$ , calor e bolhas. A presença de eletrólitos de sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) no tampão de 1x PBS também pode contribuir para condições corrosivas totais presentes sobre as superfícies dos microeletrodos durante DEP. Além de alta condutância, a maioria das amostras biológicas e clínicas e tampões têm concentrações relativamente elevadas de sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ).

Estes resultados imediatamente tornam claro porque DEP clássico, o qual utiliza eletrodos de ouro expelidos menos robustos pode somente ser realizado em condições de baixa condutância (Ref. 29, 30), isto é, os eletrodos seriam destruídos em segundos.

[00067] Apesar dos microeletrodos de platina revestidos com hidrogel possibilitarem separação de nanopartículas em condições de alta condutância, não obstante eles ainda são inadequados para quaisquer aplicações práticas pelas seguintes razões. Primeiro, pronunciado borbulhamento aleatório e falência de eletrodo tornaria o próprio dispositivo não confiável para qualquer tipo de diagnóstico molecular de resposta para amostra usando sangue. Em experimentos posteriores envolvendo a separação de nanopartículas a partir da camada leucoplaquetária e sangue total, foram observados borbulhamento, escurecimento de eletrodo, e falência de eletrodo. Apesar de nanopartículas poderem ser isoladas dentro das regiões de campo elevado, elas foram difíceis de remover por lavagem fluidica, indicando que aquecimento adverso pode ter fundido as mesmas à superfície do arranjo. Segundo, para separações de amostras biológicas e análises moleculares subsequentes (por exemplo, PCR, imunoensaio, etc.) este aquecimento e eletroquímica agressiva seriam gravemente prejudiciais para as células, DNA, proteínas, e a maioria dos outros analisados. Terceiro, de modo a melhorar a eficiência da separação (aumentar a quantidade total de analisado concentrado), seriam necessários tempos de DEP mais longos, os quais produziriam efeitos ainda mais adversos. Quarto, se maiores voltagens de corrente alternada (por exemplo, 20 volts pt-pt) são usadas para aumentar a velocidade de concentração, isto também causaria ainda mais efeitos de borbulhamento e eletroquímicos. Esta descoberta das razões subjacentes para as limitações dos dispositivos DEP clássicos e de condutância agora proporciona a oportunidade de criar dispositivos de

preparação de amostras DEP mais viáveis e novos sistemas de diagnóstico de resposta para amostra "ilimitada". Estes novos dispositivos DEP possibilitarão que células raras, nanopartículas, e uma variedade importante de biomarcadores de doença sejam diretamente isolados, concentrados, e detectados no sangue, plasma, soro, e na maioria das outras amostras biológicas e tampões.

[00068] Esta descrição a seguir revela uma combinação de forças eletrocinéticas / dieletoforéticas (DEP) contínuas e/ou pulsadas, forças eletroforéticas CA contínuas e/ou pulsadas, separação de tamanho microeletroforético em dispositivo em arranjo, e fluxo de fluido controlado (bombeado externamente e /ou de orientação eletrocinética CA/CC) junto com os novos dispositivos desta invenção que podem ser usados para realizar preparação de amostras complexas, levando a separação e concentração de analisados específicos, e subseqüentes análises de diagnóstico molecular e detecção. Isto pode incluir, mas não está limitado a (1) tanto a separação DEP e detecção de analisados marcados e/ou a detecção subseqüente de analisados não marcados depois de separação DEP, usando imuniquímica e técnicas de ligação de ligante que incluem anticorpos fluorescentes, anticorpos não-fluorescentes, nanopartículas derivadas de anticorpos, microesferas derivadas de anticorpos, superfícies derivadas de anticorpos (sítios específicos sobre o dispositivo DEP), biotina / estreptavidina, e várias lecitinas; (2) o uso pré-DEP ou pós-DEP de corantes de cores gerais e/ou específicas, corantes fluorescentes, nanopartículas fluorescentes, pontos quânticos para detectar células específicas, bactérias, vírus, DNA, RNA, núcleos, membranas, organelas celulares, e nanoparticulados celulares (é importante ter em mente que DEP é intrinsecamente uma técnica "sem etiqueta" e que células, nanopartículas, e outros analisados podem ser identificados por suas frequências no cruzamento; etiquetagem é usada

para aumentar a sensibilidade da detecção, identificar entidades individuais, e realizar análise mais detalhada); e (3) a pós-análise de células, núcleos, DNA, e RNA por hibridização *in situ* de sonda fluorescente (FISH, etc.); e (4) uso de métodos de análise molecular de conhecimento geral para células, núcleos, DNA, e RNA incluindo mas não limitados a PCR, RCA, SDA, e outras técnicas de genotipagem, sequenciamento, e expressão genética - todas as quais podem ser realizadas dentro do mesmo compartimento de câmaras no qual a separação DEP ocorreu.

[00069] Os exemplos acima não excluem a realização de análises subsequentes dentro de outra câmara separado do dispositivo ou movendo os analisados para um ou mais tubos de coleta de amostra para análises de dispositivo desligado (*off-device*), armazenamento, ou arquivamento de amostras. Adicionalmente, outros tipos de técnicas de detecção que podem ser usados para análise incluem, mas não estão limitados a, radioisótopos, métodos colorimétricos, quimiluminescência, eletroquímicos, ou outros métodos para bioabsorção ou nanoabsorção dos analisados, biomoléculas, e células uma vez que eles tenham sido isolados. Os dispositivos e processos descritos aqui, neste pedido de patente, podem ser considerados um sistema de diagnóstico de resposta para amostra verdadeiramente "ilimitada" que pode ser usado diretamente com sangue não diluído ou outras amostras clínicas ou biológicas complexas. O processo de resposta para amostra ilimitada usando os dispositivos DEP exemplares aqui, neste pedido de patente, são descritos abaixo em mais detalhes.

[00070] A figura 27 mostra a primeira etapa em diagnóstico de resposta para amostra ilimitada onde uma amostra de sangue é aplicada diretamente ao dispositivo e DEP é usado para realizar, neste caso, a separação de uma concentração muito baixa de DNA de alto

peso molecular (hmw) e/ou RNA da amostra de sangue total não diluída. No entanto, deve ser observado que quase qualquer analisado, incluindo, mas não limitados a células raras, nanopartículas, nanoparticulados celulares, anticorpos, imunocomplexos, proteínas, e RNA pode ser separado, concentrado, e detectado; e amostras podem incluir, mas não estão limitadas a plasma, soro, urina, e saliva.

[00071] A figura 28 mostra a segunda etapa em um processo de diagnóstico de resposta para amostra onde o campo DEP é agora aplicado à frequência CA apropriada e voltagem que faz com que as células sanguíneas (hemácias e leucócitos) movam para regiões de campo baixo negativo (DEP), e o DNA hmw (RNA) consente dentro das regiões de campo elevado positivo (DEP) (no desenho, estruturas de domo representam as áreas de alta potência de campo DEP).

[00072] A figura 29 mostra a terceira etapa, quando uma simples lavagem fluídica é usada para remover as células sanguíneas do dispositivo de arranjo DEP, ao passo que hmw-DNA (RNA) permanece altamente concentrado nas regiões de campo elevado DEP. Também está dentro do âmbito desta descoberta o uso de um fluxo fluídico contínuo, pulsado, ou intermitente através do dispositivo DEP de modo a processar um maior volume de amostras, e como um mecanismo para reduzir aquecimento, o qual é mais pronunciado em soluções de maior condutância, em menores frequências de corrente alternada (< 20 kHz), e em altas voltagens (>20 volts pt-pt).

[00073] A figura 30 mostra a etapa seguinte no processo, a qual envolve a etiquetagem *in situ* do DNA (RNA) por adição de um corante fluorescente específico para DNA (RNA) (por exemplo, CyberGreen, OliGreen, brometo de etídio, TOTO, YOYO, laranja de acridina, etc.). Neste processo, uma solução do corante fluorescente apropriado é jateada através do dispositivo DEP para tingir o DNA ou RNA. O DNA/RNA pode ser mantido no local mantendo o campo DEP

enquanto o tingimento está em progresso. O DNA/RNA corado com fluorescente pode ser agora detectado e quantificado usando um sistema de detecção epifluorescente (figura 31). Sistemas e dispositivos de detecção fluorescente são de conhecimento geral na técnica de biologia molecular e de diagnóstico clínico para análise de dispositivos de microarranjo, e estão disponíveis comercialmente uma variedade de sistemas.

[00074] Também está dentro do âmbito desta descoberta: (1) o uso de outros métodos e técnicas de detecção por análise molecular incluindo, mas não limitados a PCR, PCR em tempo real com sinais moleculares, RCA, e SDA; (2) a hibridização do DNA/RNA da amostra durante o processo de separação DEP para capturar sondas (DNA, RNA, pNA, etc.) imobilizadas para sítios específicos sobre o dispositivo DEP para análise / detecção subsequentes usando sondas repórteres fluorescentes; (3) a liberação do DNA/RNA dos sítios de concentração DEP, a amplificação deste usando PCR, RT-PCR, RCA, ou SDA, a desnaturação e em seguida o uso de eletroforese CC sítio-seletiva para rehibridizar os amplicons para capturar sondas imobilizadas sobre o dispositivo DEP para análise / detecção subsequentes usando sondas repórteres fluorescentes; (4) o uso de hibridização *in situ* fluorescente com sondas de DNA/RNA/pNA sequência específicas; (5) a liberação do DNA/RNA e o transporte deste quer por DEP ou eletroforicamente (campos CC) para outra localização específica sobre o dispositivo; e (6) a liberação do DNA/RNA e a movimentação deste (por fluxo fluido) para outra câmara do dispositivo ou para um tubo de coleta de amostra para posterior análise ou armazenamento.

[00075] A figura 32 mostra como o dispositivo de resposta para amostra pode ser usado para realizar separação DEP mais múltipla de células raras, bactérias, vírus, nanoparticulados celulares, ou CNPs

(membrana celular, núcleos, DNA de alto peso molecular, RNA de alto peso molecular, vacúolos, retículo endoplasmático, mitocôndrias, etc.), proteínas, complexos de anticorpos, e outros biomarcadores do sangue total. A figura 33 mostra os métodos de análise molecular que podem ser agora usados para identificar os analisados específicos que tinham concentrados sobre o dispositivo; estes métodos incluem, mas não estão limitados a procedimentos de tintura fluorescente, imunoenensaio fluorescente, FISH, e PCR, RCA, e SDA. Finalmente, a figura 34 mostra a detecção final de células, bactérias, vírus, CNPs, e complexos de anticorpos usando técnicas fluorescentes de conhecimento geral e outras técnicas de detecção.

[00076] Esta descoberta descreve adicionalmente métodos únicos que podem ser usados para reforçar a capacidade analítica e de diagnóstico dos dispositivos e sistemas de resposta para amostra descritos aqui, neste pedido de patente. No caso de isolamento e detecção de DNA e RNA, apesar de DEP poder ser usado para isolar e concentrar de modo eficiente DNA / RNA de alto peso molecular, DNA e RNA de peso molecular inferior (< 10 kb) são mais difíceis de isolar por DEP. Neste caso, estão disponíveis anticorpos específicos contra ds- DNA de filamento duplo e anticorpos específicos contra ss-DNA de filamento único que podem ser usados para etiquetar o DNA e RNA de peso molecular inferior, criando nanoestruturas maiores (> 5nm). Estes complexos maiores de DNA-anticorpos podem ser isolados e concentrados de modo mais eficiente por DEP.

[00077] Adicionalmente, uma variedade de novos testes de anticorpos pode ser possibilitada usando os dispositivos descritos aqui, neste pedido de patente. Mais especificamente, a capacidade de DEP para separar anticorpos únicos de grandes complexos de anticorpos significa que podem ser desenvolvidos numerosos testes de anticorpos únicos e duplos nos quais a formação do maior complexo

antígeno-anticorpo pode ser separada da amostra clínica por DEP. Nestes casos, anticorpos fluorescentes e/ou anticorpos secundários podem ser acrescentados diretamente à amostra, DEP é aplicado, e somente os complexos antígeno-anticorpo marcados com fluorescente seriam concentrados dentro das regiões de campo elevado DEP para subsequente detecção. Os referidos arranjos de anticorpos à base de DEP podem ser usados para antígenos de molécula pequena incluindo, mas não limitados a fármacos, hormônios, metabólitos, e peptídeos; bem como para antígenos maiores incluindo mas não limitados a proteínas, enzimas, e outros anticorpos. Também está dentro do âmbito desta descrição permitir muitos outros testes de DEP similares que se baseiam na formação de complexos maiores, incluindo, mas não limitados a detecção de bactérias, vírus, bacteriófago, nanopartículas, CNP's usando ligante seletivo ligando com anticorpos, biotina / estreptavidina, lecitinas, proteínas, enzimas, peptídeos, dendrímeros, apatâmeros, pontos quânticos, nanopartículas fluorescentes, nanotubos de carbono, e outras nanoentidades designadas para fins de marcação e detecção seletivas. Finalmente, além de anexar ou imobilizar sondas de captura de DNA/RNA/pNA sobre o dispositivo DEP, uma variedade de outras entidades de ligação também podem ser anexadas ao dispositivo DEP, incluindo mas não limitados a anticorpos, biotina / estreptavidina, lecitinas, proteínas, enzimas, peptídeos, dendrímeros, e apatâmeros. Os ligantes imobilizados referidos proporcionarão ligação seletiva de analisados ao dispositivo DEP depois campo DEP ter sido desligado.

[00078] Deve ser observado que os novos dispositivos DEP descritos aqui, neste pedido de patente, agora possibilitam todos estes métodos pelo fato de que estes novos dispositivos DEF3 eliminam ou reduzem grandemente os efeitos adversos de borbulhamento, aquecimento, e eletroquímicos que danificariam ou destruiriam de

modo diverso a maioria das biomoléculas (por exemplo, DNA, RNA, anticorpos, proteínas, etc.) que são usadas para imobilização, bem como os analisados e biomarcadores sendo isolados e concentrados sobre sítios de campos elevados DEP específicos sobre o dispositivo para detecção e análises.

[00079] Este primeiro relatório revela em mais detalhes novos dispositivos e sistemas DEP eletrocinético nos quais os eletrodos são colocados dentro de câmaras separadas e regiões DEP positivas e regiões DEP negativas são criados dentro de uma câmara de amostras internas por passagem do campo DEP CA através de estruturas de poros ou orifícios. Várias geometrias podem ser usadas para formar as regiões DEP positivas desejadas (campo elevado) e regiões DEP negativas (baixo campo) para realizar separações de células, nanopartículas e biomarcadores com a câmara de amostras. As estruturas de poros ou orifícios referidas podem ser preenchidas com um material poroso (hidrogéis de agarose ou poliacrilamida) ou ser cobertas com estruturas do tipo de membranas porosas (papel, celulose, náilon, etc.). As estruturas revestindo membranas porosas podem ter espessuras de um micrão a um milímetro, porém mais preferencialmente de 10 micra a 100 micra; e tamanhos de poros que variam de um nanômetro a 100 micra, porém mais preferencialmente de 10 nanômetros a um micrão. Por segregação dos eletrodos dentro de câmaras separadas, estes dispositivos DEP únicos basicamente eliminam quaisquer efeitos eletroquímicos, aquecimento ou movimento fluídico caótico de influenciar as separações de analisados que estão ocorrendo dentro da câmara de amostras internas durante o processo DEP. Estes dispositivos de câmaras podem ser operados em voltagens CA muito elevadas (> 100 volts pt-pt), e além de DEP também podem ser usados para realizar transporte eletroforético CC e eletroforese na câmara de amostra. Em geral estes dispositivos e

sistemas podem ser operados na faixa de frequência CA de a partir de 1000 Hz a 100 mHz, em voltagens as quais podem variar de 1 volt a 2000 volts pt-pt; e CC voltagens de 1 volt a 1000 volts, em taxas de fluxo de a partir de 10 microlitros por minuto até 10 mililitro por minuto e em faixas de temperatura de 1 °C a 100 °C . Os dispositivos de câmaras são mostrados na figura 1 e na figura 2. Os dispositivos referidos podem ser criados com uma variedade de estruturas de poros e/ou orifícios (nanoescala, microescala e ainda macroescala) e podem conter membranas, géis ou materiais de filtragem os quais podem controlar, confinar ou evitar que células, nanopartículas ou outras entidades difundam ou sejam transportadas para dentro das câmaras internas. No entanto, os campos elétricos CC/CA, moléculas de soluto, tampão e outras moléculas pequenas podem passar através das câmaras.

[00080] As figuras 1 e 2 representam uma versão mais básica dos dispositivos de câmaras que podem ser construídos de acordo com a invenção. Uma variedade de configurações é prevista para os dispositivos de acordo com a invenção. Os dispositivos referidos incluem, mas não estão limitados a, dispositivos de câmaras e eletrodo multiplexado, dispositivos que permitem que sejam criados padrões de campos elétricos reconfiguráveis, dispositivos que combinam processos eletroforéticos CA e fluídicos; dispositivos de preparação de amostras, dispositivos de preparação e diagnóstico de amostras que incluem detecção e análise subsequentes, dispositivos de laboratório em chip de ponto de atenção e outros sistemas de diagnóstico clínico ou versões. A figura 1 é um diagrama esquemático de um dispositivo de processamento de amostras construído de acordo com os ensinamentos aqui, neste pedido de patente, e mostra que o dispositivo 100 inclui uma pluralidade de eletrodos 102 e câmaras contendo eletrodos 104 dentro de um estojo 106. Um controlador 108

do dispositivo controla de modo independente os eletrodos 102, conforme descrito adicionalmente aqui, neste pedido de patente.

[00081] A figura 2 mostra uma vista superior de um dos dispositivos 100 o qual é ilustrado com seis câmaras de eletrodos 104, cada uma das quais tem no mínimo um eletrodo de platina robusto. A figura 2 mostra o dispositivo configurado com uma câmara de separação central principal 110, a qual tem uma disposição de dezoito estruturas de poros / orifícios 112 de tamanho variável que são preenchidos com um hidrogel (a câmara interna também deve ter uma membrana porosa cobrindo os poros ou orifícios). As estruturas de poros / orifícios são arranjadas em três grupos de seis estruturas de poros / orifícios. Apesar da parte superior da câmara de separação 110 não ter separações físicas, a menor porção é dividida em nove compartimentos separados (indicados pela linha tracejada clara). Cada um destes compartimentos está em contato fluídico com uma câmara de eletrodos, mas não uns com os outros. Quando um campo DEP CC é aplicado aos eletrodos, o campo passa através dos poros 112, criando regiões de campo elevado DEP positivo na parte superior das estruturas de poros e regiões de campo baixo DEP negativo entre as estruturas de poros. Amostras podem ser acrescentadas e removidas do dispositivo através da entrada 220 e da saída 222. O dispositivo pode ter entradas 224 e saídas 226 adicional. O dispositivo mostrado nas figuras 1 e 2 representa somente uma forma de um dispositivo de câmaras DEP de alta condutância; deve ser entendido que pode ser criado um grande número de diferentes tipos de dispositivos com grandes números de poros / orifícios e diferentes geometrias.

[00082] Outra modalidade de dispositivo envolve usar arranjos de eletrodos com eletrodos robustos de diâmetros e distâncias de separação definidos que possibilitarão menos efeitos eletroquímicos e aquecimento, o qual é um problema nos dispositivos de separação

eletrocinética e dieletroforética atuais. A adequada construção e revestimento de eletrodos robusto (por exemplo, platina, paládio e ouro) podem reduzir efeitos adversos de produtos eletroquímicos no processo de separação, e permitir que sejam aplicadas voltagens muito maiores, as quais podem melhorar muito os tempos de separação. Além disso, os dispositivos habituais são relativamente de baixa produtividade e estas modalidades descritas aqui, neste pedido de patente, superaram este problema proporcionando um sistema que usa arranjos de seções paralelas multiplexadas e que possibilita que o dispositivo seja usado como uma grande zona de separação e em seguida transferido para zonas de separações controladas separadamente, resultando em aumento da sensibilidade e seletividade do sistema global. Um terceiro problema visto em outros sistemas convencionais é a incapacidade de separar componentes das amostras que são relativamente similares em tamanho e composição. Este problema é superado de acordo com a descrição aqui, neste pedido de patente, proporcionando um dispositivo que pode realizar processos de separação secundários, a microeletroforese referida, diretamente sobre o próprio dispositivo de arranjo DEP.

[00083] Forças dieletroforéticas negativas (DEP) são relativamente mais fracas do que forças DEP positivas; portanto entidades que experimentam DEP negativa podem ser movidas por fluxo de fluido, ao passo que entidades que experimentam DEP positiva permanecerão no local. Nas modalidades presentemente descritas, usando tanto fluido quanto forças eletroforéticas CC em direções opostas, fragmentos de DNA e nanoparticulados de DNA altamente carregados podem ser separados de células e proteínas em sangue e outras amostras. Deste modo, usando múltiplas frequências CA, eletroforese CC pulsada, e microeletroforese, uma separação de tamanho mais

completa de nanoparticulados de DNA e fragmentos de DNA pode ser realizada.

[00084] Usos comerciais de semelhantes novos sistemas e dispositivos que agora permitem que DEP seja realizado sob condições de alta condutância (sangue, plasma, soro, etc.) provavelmente incluirão numerosas aplicações de pesquisa e de diagnóstico clínico, tais como diagnóstico de ponto de atenção, monitoração de terapêuticos e fármacos, monitoração de suprimento de água e ambiental, e detecção de agentes de bioterrorismo. Numerosos analisados e entidades tais como células raras (células cancerosas, células fetais, células-tronco hematopoiéticas), bactérias, vírus, DNA/RNA, e nanoparticulados de DNA biomarcadores, nanovesículas de liberação de fármacos, bem como proteínas normais ou aberrantes, podem ser detectados usando um sistema semelhante.

[00085] Um sistema experimental de separação eletroforética CA DEP e CC (uma versão de topo de bancada de laboratório descrita adicionalmente na Seção Experimental abaixo) foi construído e foram conduzidos experimentos para refinar os novos dispositivos de protótipos. Os resultados obtidos nestes dispositivos (os quais são descritos acima) levam à importante descoberta quanto a porque DEP clássico tem sido limitado a soluções de baixa condutância.

[00086] Agora novos dispositivos que usam arranjos de eletrodos planares, paralelos, e robustos de platina com eletrodos de a grosso modo cerca de 1 a 1000 micra de diâmetro com 10 a 5000 micra de distância de separação e revestidos com um hidrogel de 5 a 100 micra de espessura (agarose, poliacrilamida) ou uma ou mais camadas de membrana porosa), possibilitam menos problemas de aquecimento e eletroquímicos, uma vez que as linhas de campo elétrico não são tão altamente concentradas como são em outros sistemas DEP convencionais clássicos, e de modo mais importante a região de

acumulação de campo elevado DEP está na verdade agora a alguma distância da superfície real dos eletrodos. Uma diferença significativa de designs de eletrodos prévios é não usando eletrodos de platina ou ouro expelidos, os quais são facilmente degradados e destruídos por eletroquímica, particularmente em maiores forças de campo e alta condutância da solução. Os eletrodos para os novos dispositivos serão construídos a partir de materiais de platina ou ouro sólidos, incluindo fios ou hastes. Uma segunda diferença é que a eficiência da separação para isolar uma única entidade em um milhão de entidades relativamente similares (células, nanopartículas, biomarcadores) pode ser aprimorada modificando o problema de uma grande separação para o de muitas separações separadas as quais são muito mais controláveis. Os dispositivos descritos aqui, neste pedido de patente, realizam isto usando arranjos seccionados multiplexados e um processo de classificação paralelo controlado. Isto é realizado usando subgrupos de arranjos controlados individualmente de 10 a 100 ou mais eletrodos em um dispositivo de arranjo grande que permite que uma amostra biológica complexa (sangue) seja distribuída através do dispositivo de arranjo, separando os componentes em seções de separação menores (áreas) para separação e isolamento posteriores dos analisados ou entidades desejados. Decompor o problema de separação de amostras complexas em partes menores encerra a maior promessa para resolver o problema de sensibilidade versus especificidade, isto é, o processo possibilita tanto rápida quanto maior produtividade total de amostras, bem como tempos de interrogação (separação) relativamente mais longos para isolar e identificar células únicas ou outras entidades na amostra. Finalmente, o último problema pode ser superado criando um dispositivo de classificação hierárquica multidimensional. Esta solução se baseia no fato de que DEP negativo é uma força mais fraca do que DEP positivo e células ou outras

entidades experimentando DEP negativo podem ser movidas por fluxo de fluido controlado, ao passo que os analisados ou entidades experimentando DEP positivo ficarão concentrados nas áreas de campo elevado DEP. Através do uso de fluxo de fluido controlado e eletroforese CC pulsada em direções opostas, DNA/RNA e nanoparticulados carregados podem ser separados de células e proteínas em uma amostra biológica complexa (isto é em adição à capacidade intrínseca de DEP para separar células e DNA).

[00087] A combinação de fluxo de fluido controlado e eletroforese CC pulsada com usando múltiplas frequências CA, isto é, baixa frequência para capturar os CNPs e nanoparticulados de DNA/RNA de alto peso molecular sobre o subgrupo de arranjo de eletrodos iniciais, e maiores frequências CA sobre outros subgrupos de arranjos de eletrodos para capturar partículas de células progressivamente maiores (bactérias e vírus) pode ser obtida uma separação completa da maioria das células e entidades por tamanho. Caso desejado os eletrodos podem ser transferidos para diferentes frequências para que ocorra separação mais fina localmente ao passo que globalmente a separação de tamanho global é mantida.

[00088] Descreveu-se um sistema de separação envolvendo um dispositivo com estruturas de arranjos de eletrodos de platina planares e robustas, e eletrodos auxiliares, dentro dos quais uma amostra biológica complexa (sangue, plasma, soro) é aplicada diretamente, de tal modo que sinais CA controlados de um ou mais geradores de função produzem forças dieletoforéticas, e um suprimento de energia CC controlado produz forças eletroforéticas. A entrada e saídas do dispositivo também permitem a passagem controlada de fluidos (água, tampões, etc.) através do sistema em uma taxa de fluxo controlada. O sistema também inclui um microscópio ótico / epifluorescente e câmera digital para monitorar, detectar, quantificar, e registrar os

processos de separação que estão ocorrendo sobre o dispositivo (visual e fluorescente). O dispositivo é essencialmente um sistema de classificação hierárquica paralelo de multiplexagem que é possibilitado controlando efeitos eletrocinéticos, forças dieletroréticas, forças eletroforéticas, microeletroforese, e fluxo de fluido. Deve ser observado que os novos processos de resposta para amostra múltiplos referidos são tornados possíveis pelo fato de que os novos dispositivos DEP eliminam ou reduzem muito os efeitos adversos de borbulhamento, aquecimento, e eletroquímicos experimentados pelos dispositivos convencionais.

[00089] A figura 3 mostra somente uma versão de um dispositivo de arranjo de eletrodos de platina planar 300 compreendendo um estojo 302 através do qual um fluido da amostra pode escoar. O padrão do fluxo de fluido através do dispositivo é indicado pelas setas largas, representando fluxo de uma amostra idealizada, a partir de uma extremidade da entrada 304 na parte superior do desenho até uma extremidade da saída 306 no fundo, e uma saída de analisado lateral 308. O dispositivo inclui múltiplos eletrodos CA 310. Somente uns poucos dos eletrodos 310 são identificados na figura 3, para simplicidade de ilustração, mas deve ser entendido que todos os pequenos círculos abertos na figura do desenho representam eletrodos de construção similar. Um arranjo 312 ampliado 3x3 dos eletrodos é ilustrado sobre o lado direito da figura do desenho para mostrar um fluido da amostra no dispositivo 300. A amostra consiste de uma combinação de entidades ou células de tamanho micrométrico 314 (os maiores círculos preenchidos mostrados na vista ampliada), maiores nanoparticulados 316 (os círculos preenchidos de tamanho intermediário) e menores nanoparticulados ou biomoléculas 318 (os círculos de menor tamanho). Os maiores nanoparticulados 316 podem representar DNA de alto peso molecular, nucleossomas, ou CNPs ou

fragmentos celulares dispersados na amostra. Os menores nanoparticulados 318 podem representar proteínas, fragmentos menores de DNA, RNA e celulares. O dispositivo de arranjo de eletrodos planar 300 na figura é um arranjo de eletrodos de 60x20 que pode ser seccionado em três arranjos de 20x20 que podem ser controlados separadamente, mas operados simultaneamente. Os eletrodos CA auxiliares 320 no topo da figura podem ser ligados para carga positiva, ao passo que os eletrodos CA 322 no fundo da figura são ligados para carga negativa para fins eletroforéticos. Cada um dos sistemas CC e CA controlados pode ser usado em tanto uma maneira contínua e/ou pulsada (por exemplo, cada um pode ser emitido em forma de pulsos e ter a emissão interrompida em intervalos de tempo relativamente curtos). Os arranjos de eletrodos planares 324 ao longo dos lados do fluxo da amostra, quando revestidos com materiais nanoporosos, podem ser usados para gerar forças eletroforéticas CC bem como DEP CA. Adicionalmente, processos de separação microeletroforéticos podem ser realizados dentro das camadas de nanoporos usando eletrodos planares no arranjo e/ou nos eletrodos auxiliares nas dimensões x-y-z. Em geral estes dispositivos e sistemas podem ser operados na faixa de frequência CA de a partir de 1000 Hz a 100 mHz, em voltagens as quais podem variar de cerca de 1 volt a 2000 volts pico a pico; em voltagens CC de 1 volt a 1000 volts, em taxas de fluxo de a partir de 10 microlitros por minuto até 10 mililitro por minuto, e em faixas de temperatura de 1 °C a 100 °C. O controlador 108 (figura 1) controla de modo independente cada um dos eletrodos 310, 320, 322, 324. O controlador pode ser conectado externamente ao dispositivo 100 tal como por uma conexão de bocal e tomada (não ilustrada), ou pode ser integrado com o estojo do dispositivo. Linhas de chumbo elétricas para os eletrodos não são mostradas nos desenhos, por simplicidade de ilustração.

[00090] Pode ser presumido que as células e partículas e outras entidades na amostra são distribuídas uniformemente por todo o arranjo de eletrodos, embora somente a seção de eletrodos 312 de 3x3 ampliada seja mostrada na figura do desenho. A taxa de fluxo de fluido é tal que exerce uma força mais forte do que a DEP negativa que as partículas maiores experimentam, porém mais fraca do que a DEP positiva que as partículas maiores experimentam.

[00091] A figura 4 mostra os eletrodos CC do topo 320 e do fundo 322 sendo pulsados ligados e desligados (um segundo ligados seguido por um segundo desligados), deste modo proporcionando um breve pulso eletroforético empurrando o DNA, RNA, e pequenos nanoparticulados em direção ao eletrodo CC positivo 320, o qual está localizado no topo da figura do desenho. O arranjo de eletrodos de 60x20 é visualizado como quebrado em três seções distintas ou subarranjos que são controladas de modo independente. As vinte linhas de arranjo de eletrodos CA superiores 402 são ajustadas para um campo de menor frequência CA para assegurar que as menores entidades, as quais geralmente se movem em direção aos eletrodos, devido aos fenômenos eletrocinéticos positivos DEP e CA em menores frequências, serão capturadas nestes eletrodos enquanto as maiores células e entidades experimentam DEP negativo nestas frequências, e, portanto, são movidas para a seção inferior do dispositivo pelo fluxo de fluido constante. As vinte linhas do meio 404 de eletrodos CA reterão as grandes partículas submícron (por exemplo, vírus) ao passo que as partículas e células de tamanho micron fluirão através. Finalmente, as últimas vinte linhas 406 de eletrodos CA podem ser ajustadas, caso desejado, para uma frequência CA elevada, a qual pode ser então usada para capturar células e partículas de tamanho desejadas.

[00092] A figura 5 mostra o mecanismo de separação para isolar

"uma célula em um milhão", isto é, detecção de células raras. Usando o arranjo de eletrodos completo, é possível multiplexar e paralelizar o problema de separação para tornar este mais simples. Isto pode ser realizado meramente ativando tanto do arranjo de eletrodos quanto necessário para obter melhor separação. Dividindo de modo eficaz o arranjo em áreas de separação específicas que podem ser analisadas por detecção ótica (isto é, epifluorescência), deve ser possível separar uma célula específica experimentando DEP positivo de todas as células em torno desta, uma vez que todas as células são distribuídas uniformemente. Na figura 5, os círculos preenchidos de tamanho intermediário 502 representam células de 10  $\mu\text{m}$  de um tipo específico, tal como linfócitos, hemácias, e semelhantes, e o único círculo preenchido 504 mostrado sobre o eletrodo CA 506 da terceira seção 406 de eletrodos CA representa a "uma células em um milhão" isolada de um tipo diferente das outras 502 na amostra, a qual também é a única célula que experimenta eletroforese positiva e portanto é facilmente distinguível das outras células. Usando somente dielectroforese, deve ser possível separar células do tipo "uma células em um milhão" isolada 504 dos tipos celulares indiferenciados 502. Isto é mais facilmente realizado se houver um número suficiente de eletrodos CA para dividir o problema de separação em pedaços menores, mais facilmente separáveis e analisáveis. Uma vez que o problema de separação de tipos celulares for dividido em uma maneira semelhante, se somente algumas seções do arranjo de eletrodos são analisadas de uma vez, tais como o arranjo de 3x3 mostrado na figura 5, deve ser possível descobrir a partícula 504 isolada de interesse. Adicionalmente, controle de temperatura pode ser eficaz em possibilitar separação mais seletiva e eficiente de células (por exemplo, separação de células cancerosas e células-tronco).

[00093] A figura 6 mostra um esquema mais detalhado de um

processo de separação de amostra de sangue, antes da aplicação de DEP CA pulsada / eletroforese CC / fluxo fluídico controlado combinados. O diagrama da figura 6 mostra algumas de uma ampla variedade de potenciais entidades de diagnóstico e biomarcadoras que seriam encontradas em uma amostra complexa tal como sangue, cujas entidades podem incluir: eritrócidos e hemácias, bactérias, vírus, nanovesículas, DNA/RNA nanoparticulados, um sortimento de fragmentos de DNA e RNA, e proteínas. O diagrama da figura 6 também mostra os eletrodos de arranjo de platina planares 310 cobertos com uma camada de nanoporos de densidade intermediária 604, uma camada de nanoporos de baixa densidade 606, e uma camada de nanoporos de alta densidade 608 diretamente sobre os eletrodos CA 310.

[00094] A figura 7 mostra a amostra de sangue nos estágios iniciais de DEP CA pulsada / eletroforese CC / fluxo fluídico controlado combinados. Na figura 7, o dispositivo de arranjo inteiro 300 é utilizado para realizar um processo de separação global que começa a concentrar diferentes classes de entidades dentro de cada uma das seções de subarranjos de eletrodos 402, 404, 406 (superior, intermediária, inferior, respectivamente).

[00095] A figura 8 mostra a amostra de sangue agora em estágios finais de DEP CA pulsada, eletroforese CC, e fluxo fluídico controlado combinados. Na figura 8, as diferentes entidades foram concentradas em suas seções de arranjo de eletrodos apropriadas 402, 404, 406. Neste exemplo, nanoparticulados de DNA e fragmentos de DNA menores são mostrados na seção de arranjo superior 402; bactérias, vírus, e nanovesículas são mostrados na seção de arranjo central 404; e células e proteínas são mostrados na seção de arranjo inferior 408.

[00096] A figura 9 mostra uma vista ampliada do arranjo de eletrodos CA na qual a combinação de DEP CA pulsada e eletroforese

CC de nanoparticulados de DNA corados com fluorescente, seleção de DNA de peso molecular muito elevado e DNA de peso molecular intermediário e inferior e separação sobre a seção de arranjo superior 402. Como estas entidades foram agora concentradas e isoladas na seção de arranjo superior elas também podem ser coradas seletivamente com reagentes de corante fluorescente de DNA apropriados, e o processo de separação secundário pode ser agora realizado.

[00097] A figura 10 mostra a vista ampliada do arranjo de eletrodos CA com combinação inicial de DEP CA pulsada e eletroforese CC de nanoparticulados de DNA corados com fluorescente, seleção de DNA de peso molecular muito elevado e DNA de peso molecular intermediário e inferior e separação sobre a seção de arranjo superior 402. Este processo inicial fará com que os nanoparticulados de DNA comecem a concentrar sobre o topo da camada de nanoporos intermediária a qual tem um tamanho de poro que exclui estas entidades de DNA muito grandes; ao passo que os fragmentos de DNA de peso molecular mais intermediário e inferior são transportados para dentro da camada de nanoporos de menor densidade.

[00098] A figura 11 mostra a vista ampliada do arranjo de eletrodos CA com combinação final de DEP CC pulsada e eletroforese CC de nanoparticulados de DNA corados com fluorescente, seleção de DNA de peso molecular muito elevado e DNA de peso molecular intermediário e inferior, e separação por microeletroforese sobre a seção de arranjo superior 402. Neste ponto na operação do dispositivo 300, os nanoparticulados de DNA e DNA de peso molecular muito elevado são totalmente concentrados e isolados sobre o topo da camada de nanoporos de densidade intermediária 604 e os fragmentos de DNA de peso molecular mais intermediário e inferior são concentrados dentro da camada de nanoporos de menor

densidade interna 606.

[00099] A figura 12 mostra a vista ampliada do arranjo de eletrodos CA 402 depois da remoção de nanoparticulados de DNA e DNA de peso molecular muito elevado e separação de tamanho eletroforética CC em arranjo dos fragmentos DNA de peso molecular intermediário e baixo. Os nanoparticulados de DNA e DNA de peso molecular muito elevado podem ser adicionalmente analisados sobre outra parte do dispositivo 300, ao passo que os fragmentos de DNA de peso molecular mais intermediário e inferior podem ser separados por tamanho por microeletroforese dentro das camadas de nanoporos 604, 606, 608. A figura 12 mostra que alguns dos eletrodos CA 310a são carregados positivamente e outros eletrodos CA 310b são carregados negativamente.

[000100] A figura 13 mostra uma vista ampliada do arranjo de eletrodos CC com a DEP CA pulsada inicial aplicada a hemácias e leucócitos sobre a seção de arranjo inferior 406 do dispositivo 300. Neste processo, as proteínas na amostra podem ser removidas e/ou analisadas sobre outro componente do dispositivo, ao passo que as células e outras entidades de tamanho micron podem ser adicionalmente separadas e diferenciadas por DEP CA sobre a seção de arranjo inferior 406.

[000101] A figura 14 mostra a vista ampliada do arranjo de eletrodos com a DEP CA pulsada final aplicada a hemácias e leucócitos sobre a seção de arranjo inferior 406 do dispositivo 300. Neste ponto da operação do dispositivo, as hemácias e os leucócitos foram separados nas regiões de campo elevado e baixo DEP, subsequentemente os eritrócidos podem ser removidos e os leucócitos adicionalmente diferenciados; isto é, começar o processo de isolamento de células cancerosas.

[000102] A figura 15 mostra uma vista ampliada do arranjo de

eletrodos CA com a DEP CA pulsada inicial para separação de bactérias, vírus e nanovesículas sobre a seção de arranjo central 404 do dispositivo 300. O desenho da figura 15 é um exemplo de como subseções do dispositivo de arranjo 300 que podem ser controladas de modo independente podem ser usadas para realizar processos de separação importantes adicionais.

[000103] A figura 16 mostra a vista ampliada do arranjo de eletrodos com a DEP CA pulsada final para separação de bactérias, vírus e nanovesículas sobre a seção de arranjo central 404 do dispositivo 300. Novamente, deve ser mantido em mente que este processo de separação sobre a seção de arranjo central pode ser operado concorrentemente com, e de modo independente de, outros processos de separação que estão ocorrendo sobre as outras subseções de arranjo; por exemplo, separações de fragmentos de DNA podem ocorrer sobre a seção de arranjo superior e separações celulares podem ocorrer simultaneamente sobre as outras seções de arranjos (inferiores).

[000104] Por último, o arranjo de eletrodos multiplexados paralelos pode ser usado em conjunto com classificação celular hierárquica para criar áreas definidas dentro das fileiras de eletrodos onde partículas específicas que são de tamanho similar, mas têm diferentes propriedades dielétricas podem ser capturadas. Uma variedade de aplicações de diagnóstico e terapêuticas as quais podem utilizar forças e efeitos eletrocinéticos, dielectroforéticos, eletroforéticos e fluídicos todos em combinação uns com os outros para aumentar a sensibilidade e a eficiência de separação em um dispositivo. De modo mais importante, estes processos de separação de alta performance e clinicamente úteis são atingidos somente quando as forças e efeitos eletrocinéticos, eletroforéticos e fluídicos são unicamente combinados sobre um dispositivo de arranjo de eletrodos adequadamente

escalados e controlado. Além deste tipo de separação, dielectroforese, o qual é um método de separação paralela sem perdas, potencialmente sem etiquetas, pode ser usado em conjunto com métodos de separação mais tradicionais os quais têm muito mais preparação de amostras envolvida bem como maior perda da amostra, tais como fracionamento de fluxo de campo, classificação celular assistida por fluorescência (FCCS) ou classificação celular assistida por magnética, para obter níveis ainda maiores de separação celular e de nanopartículas para uso nas aplicações.

[000105] Com respeito a outros aspectos nas modalidades ilustradas, deve ser salientado que, quando marcação (fluorescente ótica, luminescente, eletroquímica, magnética, etc.) é acrescentada às células, nanopartículas, e biomarcadores a serem separadas, a multiplexagem descrita aqui, neste pedido de patente, provavelmente seria ainda mais eficaz devido às etiquetas ajudando a afetar o tamanho, a condutividade e a detectabilidade das entidades.

[000106] Atualmente, os mecanismos de separação DEP descritos acima são em um estágio de dados experimentais precoce. Um sistema de protótipo foi construído, utilizando uma estrutura de arranjo de eletrodos conforme descrito acima que recebe materiais biológicos para separação, que incluem células, nanopartículas e DNA de alto peso molecular. A energização seletiva de subgrupos de eletrodos na estrutura de arranjo foi agora atingida com um gerador de função operando sob controle de programação de software adequada, a qual pode ser executada em computadores convencionais tais como computadores de estações de trabalho ou de desktop. Eletrodos individuais podem ser controlados usando este equipamento. O sistema de protótipo tem um microscópio epifluorescente associado para monitorar e registrar os experimentos de separação (vide a Seção Experimental abaixo para descrição adicional).

[000107] Uma variedade de aplicações de separação e isolamento as quais incluem detecção de células raras para isolamento de células-tronco de adulto do sangue, outros fluidos corporais ou quaisquer tampões, por exemplo, progenitores hematopoiéticos; separação bruta entre células, proteínas e fragmentos de DNA/RNA no sangue, outros fluidos corporais ou outros tampões para os fins de detecção de câncer e outro diagnóstico; o isolamento de células cancerosas do sangue, de outros fluidos corporais ou outros tampões para fins de pesquisa, diagnóstico bem como terapêuticos. Também são previstos os usos para monitoramento ambiental e para a rápida detecção de patógenos e agentes de bioterrorismo. Finalmente, também são previstos sistemas, dispositivos e técnicas descritos nesta invenção podem ser usados para separar, isolar e purificar uma variedade de entidades não-biológicas que incluem em adição a nanopartículas e nanovesículas de fármacos; pontos quânticos, nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono (CNTs), nanofios, e ainda dispositivos e componentes de CMOS micrométrico e submicrométrico; basicamente qualquer macromolécula ou nanocomponente que pode ser suspenso ou solubilizado em um sistema solvente aquoso ou misto pode ser processado nas modalidades ilustradas e usando as técnicas descritas aqui, neste pedido de patente. Nós também previmos que estes novos dispositivos possibilitarão agora que seja realizada auto-montagem de DNA dirigida e outras nanopartículas bioderivadas, nanocomponentes, e objetos em mesoescala. Isto pode levar a novas tecnologias de genotipagem e de sequenciamento de DNA (\$1000 genoma) e aplicações de nano/micro bio/quimiossensor, incluindo dispositivos de tamanho de célula altamente integrados "Fantastic Voyage" (inspirados pelo filme do mesmo nome) que podem ser colocados na corrente sanguínea para realizar diagnóstico, liberação terapêutica in vitro microcirurgia, isto é, remover coágulos e

placas, reparar artérias ateroscleróticas, etc.; bem como nanoeletrônicos, nanofotônicos, fotovoltaicos, célula de combustível, baterias, nanomateriais, e numerosas outras aplicações de integração heterogênea.

[000108] Usando os dispositivos e técnicas descritos aqui, neste pedido de patente, pode ser proporcionado um resultado "de resposta para amostra ", em que a operação de separação resulta em manter no mínimo um tipo de material biológico em uma das subseções de eletrodos, enquanto o restante do fluido da amostra é lavado do dispositivo, de modo que um reagente dentro do dispositivo de processamento da amostra, seguido por reação do reagente introduzido com o tipo de material biológico mantido no dispositivo de processamento da amostra. Conforme observado acima, o reagente pode compreender um corante fluorescente, anticorpos, ou semelhantes. O processo de resposta para amostra pode ser usado para realizar uma variedade de tarefas conforme descritos acima, incluindo operações de PCR e semelhantes.

[000109] A invenção foi descrita acima em termos de modalidades presentemente preferenciais de modo que pode ser transferido um entendimento da presente invenção. No entanto, há muitas configurações e trocas dos dispositivos, sistema e mecanismos de separação não descritos especificamente aqui, neste pedido de patente, mas aos quais a presente invenção é aplicável. Portanto a presente invenção não deve ser vista como limitada às modalidades particulares descritas aqui, neste pedido de patente, mas ao invés, deve ser entendido que a presente invenção tem ampla aplicabilidade com respeito a sistemas de separação biológica de modo geral. Todas as modificações, variações, ou disposições e implementações equivalentes que estão dentro do âmbito das reivindicações anexadas devem ser, portanto, consideradas dentro do âmbito da invenção.

## Seção Experimental

### Tampões e Medições da Condutividade

[000110] Solução concentrada de tampão 5x Tris Borato EDTA (TBE) foi obtida da USB Corporation (USB, Cleveland, Ohio, EUA), e foi diluída usando água deionizada Milli-Q Ultrapure (55 nS/cm) até as seguintes concentrações: 0,01 x TBE, 0,1x TBE e 1x TBE. Solução Salina de Tampão de Fosfato de Dulbecco (1x PBS) foi obtida da Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e foi diluída usando água Milli-Q para 0,1x PBS. Foram feitas medições da condutividade com um medidor de condutividade Accumet Research AR-50 Conductivity meter (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, EUA) usando um eletrodo de 2 células (alcance: 10 a 2000  $\mu$ S) e um de 4 células (alcance: 1 a 200 mS) e foi ajustado com padrões de condutividade apropriados. Foram medidas as seguintes condutividades de tampão: 0,01 x TBE – 18,1  $\mu$ S/cm; 0,1x TBE - 125  $\mu$ S/cm; 1x TBE – 1,09 mS/cm; 0,1x PBS – 1,77 mS/cm; e 1x PBS – 16,8 mS/cm.

### Partículas, Nanopartículas e Derivação de DNA

[000111] Nanopartículas de poliestireno fluorescentes (FluoSpheres) com superfícies revestidas com NeutrAvidin foram adquiridas da Invitrogen (Invitrogen, San Diego, CA, EUA). Os diâmetros das nanopartículas foram de 0,04  $\mu$ m (40 nm) e 0,2  $\mu$ m (200 nm). As nanopartículas de poliestireno de 40 nm foram fluorescentes vermelhas (ex: 585/em: 605) e as nanopartículas de poliestireno de 200 nm foram fluorescentes amarelas-esverdeadas (ex: 505/em: 515). Partículas de poliestireno carboxilado maiores de 10,14  $\mu$ m foram obtidas da Bangs Labs (Bangs Labs, Fishers, IN1 EUA). Sequências de oligonucleotídeos de DNA biotinizados foram obtidas da Trilink Bio Technologies (Trilink, San Diego, CA, EUA). O oligonucleotídeo de DNA de 51meros de filamento único usado para derivar as nanopartículas de 40 nm tinha a sequência - [5]'-Biotina- TCA GGG

CCT CCC CCC CTA CTT CAT CCA CGT TCA CTC AGG GCC TCA  
CCA CCT [3]' . Um segundo oligonucleotídeo de DNA de 23meros de  
filamento único usado tinha a sequência - [5]1- Biotina- GTA CGG  
CTG TCA TCA CTT AGA CC [3]1. A derivação das nanopartículas de  
NeutrAvidina de 40 nm com os oligonucleotídeos de DNA biotinizados  
foi realizada primeiro suspendendo as nanopartículas em diferentes  
concentrações de tampões de Tris Borato EDTA (0,01x, 0,1 x, 1x TBE)  
ou Salina Tamponada com Fosfato (0,1x, 1x PBS). O oligonucleotídeo  
ss-DNA foi acrescentado às misturas na proporção de quantidades de  
400:1 (DNA: nanopartículas de 40 nm) para a sequência de ss-DNA de  
51 meros, e proporção de 6500:1 (DNA: nanopartícula de 40 nm) para  
a sequência de ss-DNA de 23 meros. Uma vez que o DNA foi  
adicionado, a solução foi turbilhada em alta velocidade por 20  
segundos e em seguida deixada para reagir por cerca de 20 minutos.  
Para os experimentos de nanopartículas derivadas de DNA de 40 nm,  
a mistura de nanopartículas de DNA foi preparada adicionando 0,5 µL  
da solução de matéria-prima em 299 µL do tampão apropriado. Para  
os experimentos de nanopartículas de 200 nm, 0,5 µL da solução de  
matéria-prima foi adicionado a 299 µL do tampão apropriado.  
Finalmente, 1 µL da solução de matéria-prima de partículas de  
poliestireno de 10,14 µm foi adicionada às amostras, as amostras  
foram em seguida misturadas lentamente por cerca de 10 segundos.  
As amostras estavam agora prontas para serem aplicadas ao  
dispositivo de cartucho de microarranjo.

#### Dispositivo de Arranjo de Microeletrodos DEP

[000112] Os dispositivos de arranjo de microeletrodos usados para  
estes estudos foram obtidos da Nanogen (San Diego, CA1 USA,  
NanoChip® 100 Cartridges). Os microeletrodos circulares sobre o  
arranjo têm 80 µm de diâmetro e são feitos de platina. O microarranjo  
é revestido com camada de hidrogel de poliacrilamida poroso de 10

µm de espessura. Os microarranjos são encerrados em um cartucho microfluídico o qual forma uma câmara de amostra de 20 µL sobre o arranjo que é coberto com uma janela de vidro. Conexões elétricas para cada microeletrodo individual são pregadas ao fundo do cartucho. Somente um subgrupo de 3x3 de nove microeletrodos foi usado para realizar DEP. Campos elétricos de corrente alternada (CA) foram aplicados a nove microeletrodos em um padrão em tabuleiro de xadrez de endereçamento. Neste padrão em tabuleiro de xadrez de endereçamento, cada microeletrodo tem a tendência oposta a seu vizinho mais próximo. O modelo computacional correspondente para a distribuição de campo elétrico assimétrico por este padrão foi discutido previamente [27]. Este modelo indicava que as máximas de campo positivo (regiões de campo elevado) existem em (sobre) os microeletrodos e as mínimas de campo DEP negativo (regiões de campo baixo) existem nas áreas entre os eletrodos. Em geral, para DEP em soluções de baixa condutância espera-se que nanopartículas de 60 nm de DNA e de 200 nm de concentrem nas regiões positivas ou de campo alto sobre os microeletrodos [28] e o concentrado de partículas de 10 micra nas regiões negativas ou DEP de campo baixo [29] entre os microeletrodos. As computações do modelo prévio foram realizadas por uma série de 5x5 microeletrodos [27]. Antes de cada experimento, o cartucho de microarranjo é jateado 10 vezes com 200 µl do tampão apropriado, durante um espaço de tempo de 5 minutos. O cartucho é deixado para descansar por 5 minutos, e em seguida é lavado mais duas vezes com 200 µl de tampão. Um total de 150 µl da solução de amostra contendo a mistura de nanopartículas é em seguida lentamente injetado dentro do cartucho, um volume de amostra final de cerca de 20 µL permanece no cartucho.

Estrutura Experimental, Medições, Fluorescência e Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

[000113] Os dispositivos de microarranjo foram controlados usando um sistema de comutação personalizado (projetado e construído no laboratório) que possibilita o controle individual em relação à voltagem sendo aplicada a cada um dos 100 microeletrodos. Os microeletrodos foram ajustados para frequência CA apropriada e voltagens usando um gerador de função arbitrária Agilent 33120A Arbitrary Function Generator (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). As frequências CA variaram de 1000 Hz a 10.000 Hz, a 10 volts pico a pico (*pk-pk*). A forma da onda usada para todos os experimentos foi sinusoidal. Os experimentos foram visualizados usando uma objetiva de 10x PL Fluotar em um microscópio epifluorescente JenaLumar (Zeiss, Jena, Alemanha) empregando os filtros de excitação e de emissão apropriados (fluorescência verde Ex 505 nm, Em 515 nm; fluorescência vermelha Ex 585 nm, Em 605 nm). Foram capturadas tanto imagens com iluminação por trás quanto as imagens fluorescentes usando uma câmera RGB CCD de 24 bits Optronics (Optronics, Goleta, CA, EUA). Os dados das imagens foram processados usando um cartão de captura de vídeo Canopus ADVC-55 (Canopus, San Jose, CA, EUA) conectado a um laptop usando ou Adobe Premiere Pro (Adobe Systems Inc, San Jose, CA, EUA) ou Windows Movie Maker. Os dados de fluorescência finais foram analisados introduzindo as estruturas de imagens fluorescentes individuais do vídeo em MATLAB (Mathworks, Natick, MA, EUA) nos pontos de tempo de 0 minuto, 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 4 minutos, 8 minutos, 16 minutos, e 20 minutos. Os gráficos foram criados usando Excel a partir de dados compilados através de análise MATLAB de leituras da intensidade de fluorescência através do microeletrodo. Foi criado usando MATLAB. Os dados que se seguem foram usados para criar o gráfico:  $\sigma_p$  (para 200 nm) = 18 mS,  $\sigma_p$  (para 40 nm + DNA) = 50 mS  $K_s = 0,9$  nS,  $\epsilon_p = 2,55 \epsilon_0$ .  $r = 30$  nm e  $r = 100$

nm.  $f = 3$  kHz. . Depois da conclusão dos experimentos de DEP os microarranjos FCOS tiveram todo o fluido removido de sua superfície e foram visualizados usando um microscópio eletrônico de varredura Phillips XL30 (SEM). A varredura por microscopia eletrônica foi usada para estudar por imagens as camadas de nanopartículas finais sobre a superfície da microarranjo.

[000114] As referências citadas nesta descrição compreendem as seguintes:

1. Tong, Y-K.; Lo, Y. M. D. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clinica Chimica Acta*. 363:187-96; 2006

2. Becker, F.F.; Wang, X-B.; Huang, Y.; Pethig, R.; Vykoukal, Y.; Gascoyne, P.R.C. The removal of human leukemia cells from blood using interdigitated microelectrodes. *J Phys. D: Appl. Phys.* 27:2659-2662; 1994.

3. Becker, F.F.; Wang, X-B.; Huang, Y.; Pethig, R.; Vykoukal, Y.; Gascoyne, P.R.C. Separation of Human Breast Cancer Cells From Blood by Differential Dielectric Affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92:860-864; 1995.

4. Stephens M, Talary MS, Pethig R, Burett AK, Mils KI. The dielectrophoresis enrichment of CD34+ cells from peripheral blood stem cell harvests. *Bone Marrow Transplant*. 18:777-82. 1996

5. Washizu, M.; Kurosawa, O. Electrostatic manipulation of DNA in microfabricated structures. *Industry Applications, IEEE Transactions on*. 26:1165-1172; 1990.

6. Washizu, M.; Kurosawa, O.; Arai, I.; Suzuki, S.; Shimamoto, N Applications of electrostatic stretch-and-positioning of DNA. *Industry Applications, IEEE Transactions on*. 31:447-456; 1995.

7. Asbury, C.L; Van Den Engh, G. Trapping of DNA in Nonuniform Oscillating Electric Fields. *Biophys J*. 74:1024-1030; 1998.

8. Asbury, C.L.; Diercks, A.H.; Van Den Engh, G. Trapping of DNA by dielectrophoresis. *Electrophoresis*. 23:2658 - 2666; 2002.
9. Holzel, R.; Calander, N.; Chiragwandi, Z; Wil ander, M.; Bier, F.F. Trapping Single Molecules by Dielectrophoresis. *Phys. Rev. Left*. 95:128102 (2005)
10. Ramos, A.; Morgan, H.; Green, N. G.; Castellanos, A. Ac electrokinetics: a review of forces in microelectrode structures. *J Phys. D: Appl. Phys.* 31:2338-2353; 1998.
11. Goodard W.A., Brenner, D.W.; Lyshevski, S.B.; lafrate, G.J.; *Handbook of Nanoscience*, 2nd edition, ch 16, p 5-8.
12. HiguGhi Yo, GhrQIDQsomal DNA fragmentation inapoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharacol*. 66:1527-35. 2003.
13. Ziegler A, Zangemeister-Wittke D, Stahel RA. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? *Cancer Treat Rev*. 5:255-71. 2002.
14. Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao KH, Sun CF, Wu JT. Cell-free DNA: measurement in varous carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin ChimActa*. 21:77-87. 2002.
15. Higuchi Y.; Matsukawa S. Appearance of 1-2 Mbp giant DNA fragments as an early common response leading to cell death induced by various substances that cause oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 23:90-99, 1997 23.
16. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, Jerman M, Mar A, Chasse E, Ratschiler D, Weder W, Joerger M, Betticher CA, Stahel RA, Ziegler A. Circulating deoxyrbonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oneol*. 22:4157- 64. 2004.
17. Stroun M, Aner P, Lyautey J, et aL. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J*

Cancer Clin Oncol 23:707-712. 1987.

18. Morgan, H.; Hughes, M.P.; Green, N.G. "Separation of Sub micrometric Bioparticles by Dielectrophoresis" Biophysical Journal.77:516-525. 1999

19. Green, N. G.; Ramos, A.; Morgan, H. Ac electrokinetics: a survey of sub-micrometre particle dynamics. J. Phys. D: Appl. Phys. 33:632-641; 2000.

20. Tuukanen, S.; Toppar, J. J.; Kuzyk, A.; Hirviniemi, L.; Hytonen, V. P.; Ilalainen T.; Torma, P. Carbon nanotubes as electrodes for dielectrophoresis of DNA. Nano Letters. 6:1339-1343; 2006.

21. Ching 1. et al., "Isolation of Cultured Cervical Carcinoma Cells Mixed with Peripheral Blood Cells on a Bioelectronic Chip", Analytical Chemistry, Vol. 70, #11, pp. 2321-2326, 1998.

22. Cheng, J. et al., "Preparation and Hybridization Analysis of DNA/A from E. coli on 15 Microfabricated Bioelectronic Chips", Nature Biotechnology, Vol. 16, pp. 541-546, 1998.

23. Huang Y, Ewalt KL, Tirado M, Haigis R, Forster A, Ackley D, Heller MJ, O'Connell JP, and Krhak M, "Electric Manipulation of Bioparticles and Macromolecules on Microfabricated Electrodes", Analytical Chemistry 2001, (73):1549-59.

24. Huang Y, Joo S, Duhon M, Heller MJ, Wallace B and Xu, "Dielectrophoretic Cell Separation and Gene Expression Profiling on Microelectronic Chip Arrangements", Analytical Chem. 2002, 74, 3362-71.

25. Patente dos Estados Unidos Nº 5.632.957, 27 de maio de 1997, 1997, Heller et al., Molecular Biological System Including Electrodes.

26. Patente dos Estados Unidos Nº 6.289.590 BI, 28 de agosto de 2001, Cheng et al., Channel-Less Separation of 25 Bioparticles on a Bioelectronic Chip by Dielectrophoresis.

27. Patente dos Estados Unidos Nº 6.403.367.367 BI, 11 de junho de 2002, Cheng et al., Integrated Portable Biological System. 24.

## REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivo eletrocinético de corrente alternada para isolar analitos em nano escala a partir de amostras de alta condutividade em uma região de alto campo dieletroforético (DEP), o dispositivo caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um alojamento; e

(b) uma pluralidade de eletrodos de corrente alternada (CA) dentro do alojamento, em que os eletrodos de corrente alternada (CA) dentro do alojamento compreendem estruturas de arranjo de eletrodos planares de platina e eletrodos auxiliares cobertos com uma camada de estrutura porosa, e entradas e saídas para o fluxo de fluido controlado da amostra de alta condutância através do dispositivo, em que os eletrodos são configurados para serem seletivamente energizados para estabelecer alto campo dieletroforético (DEP) positivo e regiões de baixo campo dieletroforético (DEP) negativo, através dos quais efeitos eletrocinéticos proporcionam a separação dos analitos em nano escala a partir de grandes entidades em amostras de alta condutividade em uma região de alto campo dieletroforético (DEP), e

(c) analitos em nano escala isolados dentro da região de alto campo dieletroforético (DEP) do dispositivo,

em que a amostra de alta condutância possui uma condutância maior que 100 mS/m.

2. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra de alta condutividade é uma amostra biológica de alta condutividade.

3. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica de alta condutividade é sangue, urina, saliva, sangue total, plasma ou soro.

4. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que os analitos em nano escala (1) são partículas tendo um tamanho entre 5 nm e 500 nm; (2) compreendem (i) DNA de alto peso molecular, (ii) RNA, (iii) proteínas e/ou (iv) membrana celular; ou (3) ambos os anteriores.

5. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que ainda compreende grandes entidades, em que os analitos em nano escala são isolados no dispositivo a partir das grandes entidades, as grandes entidades estando presentes em uma região de baixo campo dieletroforético (DEP).

6. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os eletrodos são robustos suficientes para reter eficiência por 30 segundos sob eletroquímica aumentada que ocorre em condições de alta condutividade.

7. Dispositivo eletrocínético de corrente alternada para isolar analitos em nano escala a partir do sangue em uma região de alto campo dieletroforético (DEP) do dispositivo, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um alojamento;

(b) uma pluralidade de eletrodos de corrente alternada (CA) dentro do alojamento, em que os eletrodos de corrente alternada (CA) dentro do alojamento compreendem estruturas de arranjo de eletrodos planares de platina e eletrodos auxiliares cobertos com uma camada de estrutura porosa, e entradas e saídas para o fluxo de fluido controlado da amostra de alta condutância através do dispositivo, em que os eletrodos são configurados para serem seletivamente energizados para estabelecer alto campo dieletroforético (DEP) positivo e regiões de baixo campo dieletroforético (DEP) negativo, através dos quais efeitos eletrocínéticos proporcionam a separação dos analitos em nano escala separados a partir de grandes entidades no sangue em uma região de alto campo dieletroforético (DEP) do

dispositivo, e

(c) analitos em nano escala isolados dentro da região de alto campo dieletroforético (DEP) do dispositivo.

8. Método para separar analitos em nano escala a partir de grandes entidades em uma amostra de alta condutância, caracterizado pelo fato de que o processo compreende:

(a) aplicar uma amostra de alta condutividade no dispositivo eletrocinético de corrente alternada (CA) compreendendo uma pluralidade de eletrodos de corrente alternada, em que o dispositivo eletrocinético de corrente alternada (CA) compreende estruturas de arranjo de eletrodos planares de platina e eletrodos auxiliares cobertos com uma camada de estrutura porosa, e entradas e saídas para o fluxo de fluido controlado da amostra de alta condutância através do dispositivo, em que;

(b) com uma corrente alternada, seletivamente energizar os eletrodos em dito arranjo e estabelecer alto campo dieletroforético (DEP) positivo e regiões de baixa força dieletroforética (DEP) negativa, através dos quais efeitos eletrocinéticos de CA proporcionam a separação dos analitos em nano escala a partir de grandes entidades na região de alto campo dieletroforético (DEP), e

(c) opcionalmente energizar seletivamente os eletrodos para estabelecer campos eletroforéticos de corrente contínua (CC), através dos quais efeitos eletrocinéticos de CC proporcionam a separação dos analitos em nano escala usando eletroforese de CC,

em que a amostra de alta condutância possui uma condutância maior que 100 mS/m.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que (1) a corrente alternada possui uma frequência inferior a 20 kHz; ou (2) a corrente alternada possui uma frequência entre 10 e 50 kHz.

10. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a os analitos em nano escala são (1) partículas tendo um tamanho entre 5nm e 500m,; (2) compreendem (i) DNA de alto peso molecular, (ii) RNA, (iii) proteínas e/ou (iv) membrana celular; ou (3) ambos os anteriores.

11. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que as grandes entidades compreendem células ou partículas em micron escala.

12. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a amostra de alta condutividade é sangue total, soro ou plasma.

13. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente seletivamente energizar os eletrodos auxiliares para estabelecer campos eletroforéticos de CC, através dos quais efeitos eletrocinéticos de CC provêm a separação dos analitos em nano escala usando eletroforese de CC.

14. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o fluxo de fluido da amostra biológica de alta condutância é controlado por bombeamento externo e/ou eletrocinéticos de CC/CA.

15. Sistema para separação de material biológico caracterizado pelo fato de que compreende:

duas ou mais estruturas de câmara de eletrodo separado cada uma com um eletrodo, o grupo de estruturas de câmara de eletrodo separadas por uma estrutura de câmara interna com poros que permitem um campo elétrico passar a partir das câmaras de eletrodo externas através da câmara interna, uma abertura na câmara interna que recebe os materiais biológicos, pelo menos uma saída de analito que recebe um componente separado dos matérias biológicos a partir da câmara interna, e outra saída que recebe os componentes

remanescentes dos materiais biológicos;

um controlador configurado para energizar seletivamente os eletrodos e para iniciar a separação do material biológico e sistema de detecção associado para monitorar o método de separação e análise dos componentes biológicos separados.

Dispositivo DEP de Alta Condutância de Múltiplas Câmaras

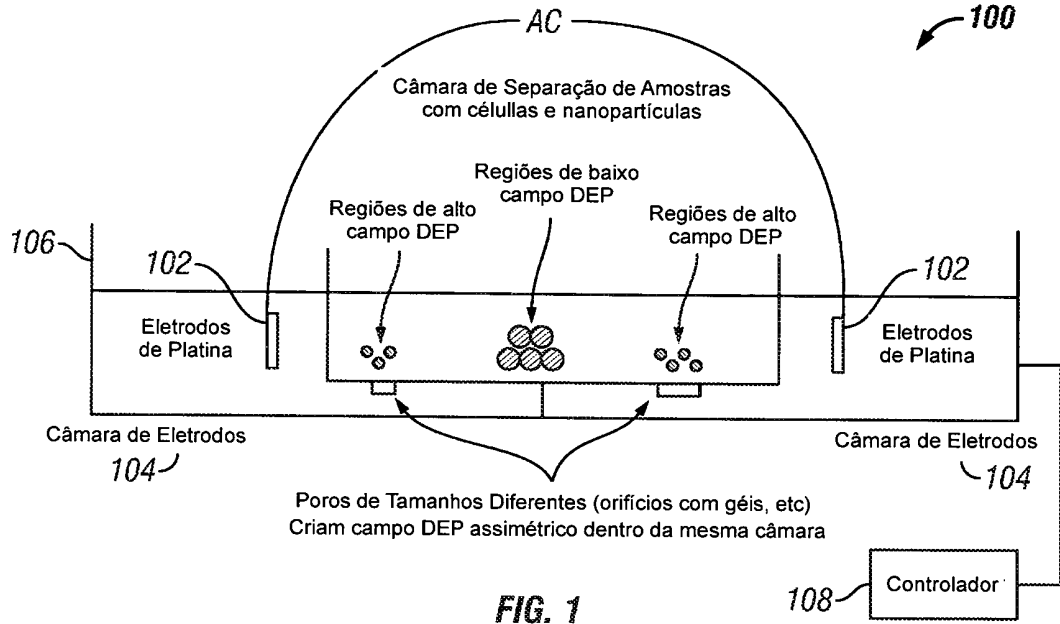


FIG. 1

Vista Superior de Dispositivo DEP de Alta Condutância de Múltiplas Câmaras

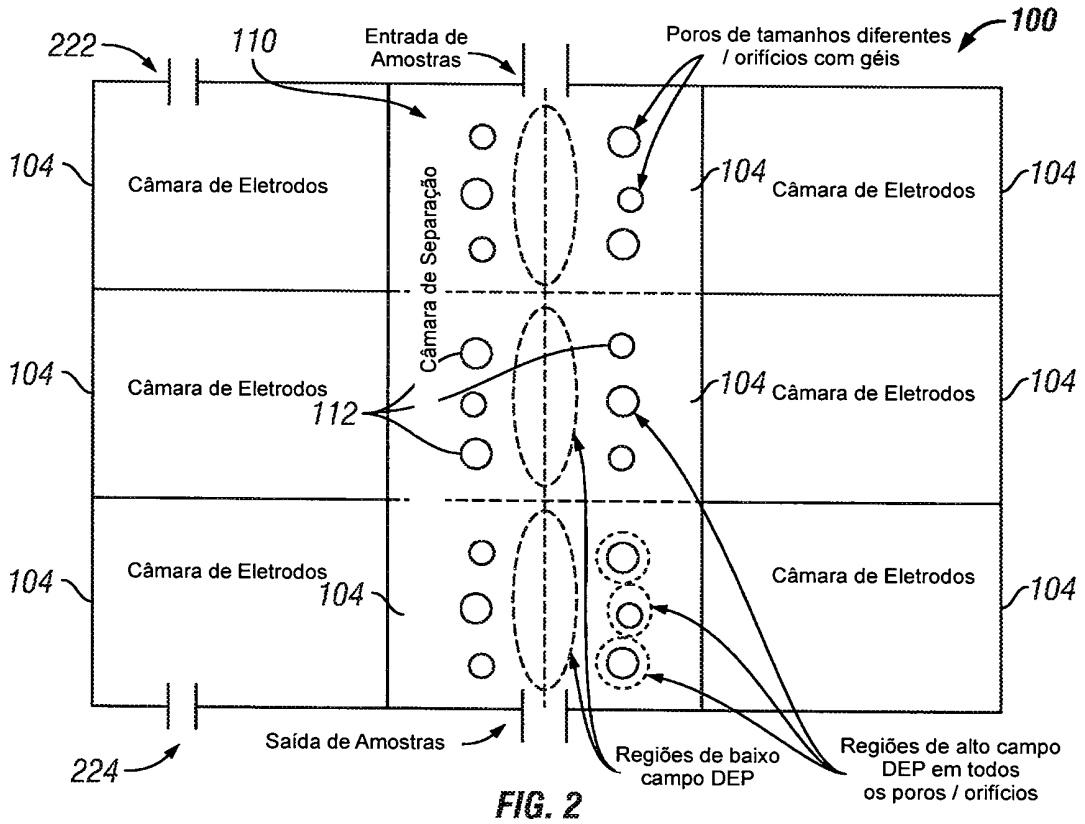


FIG. 2

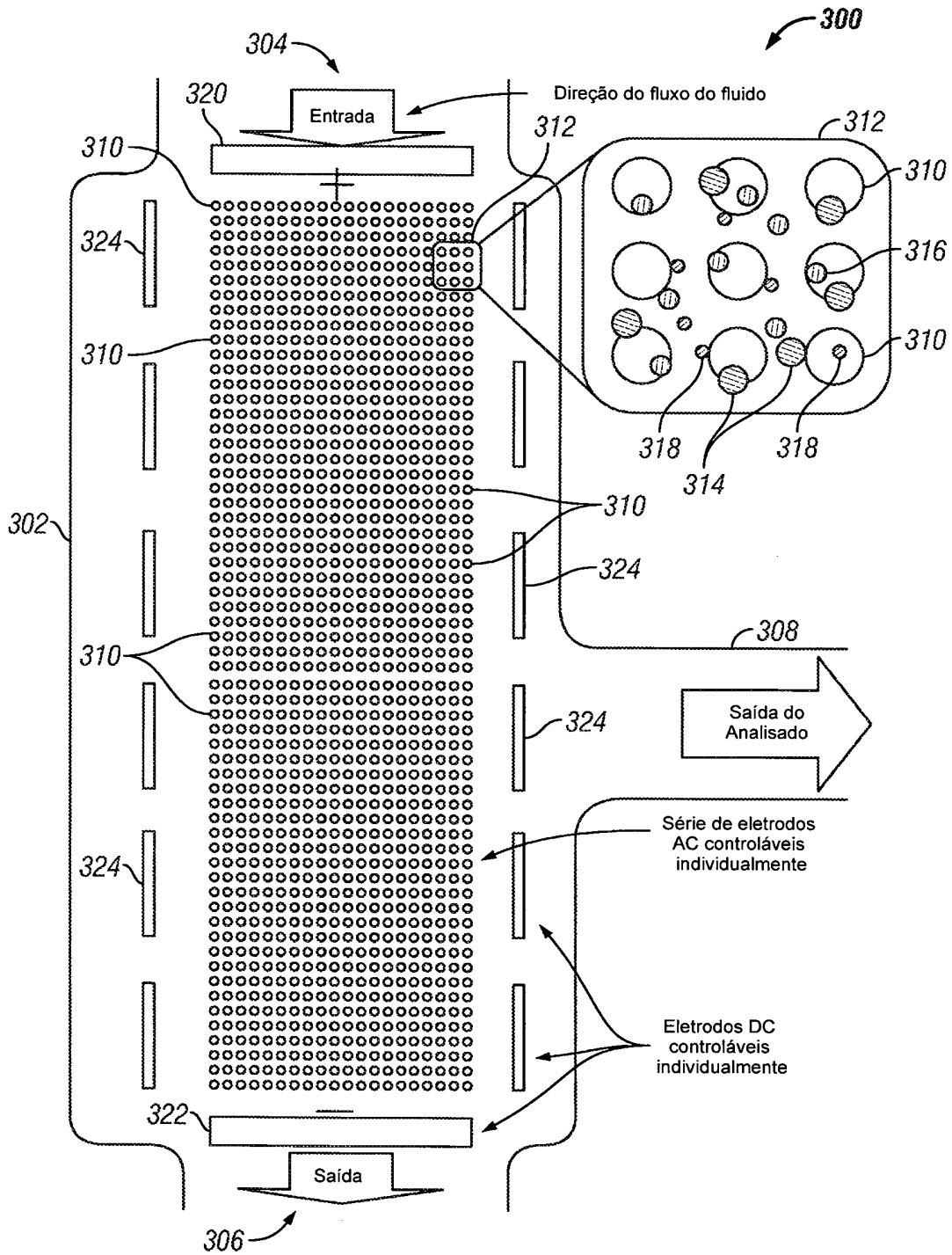


FIG. 3

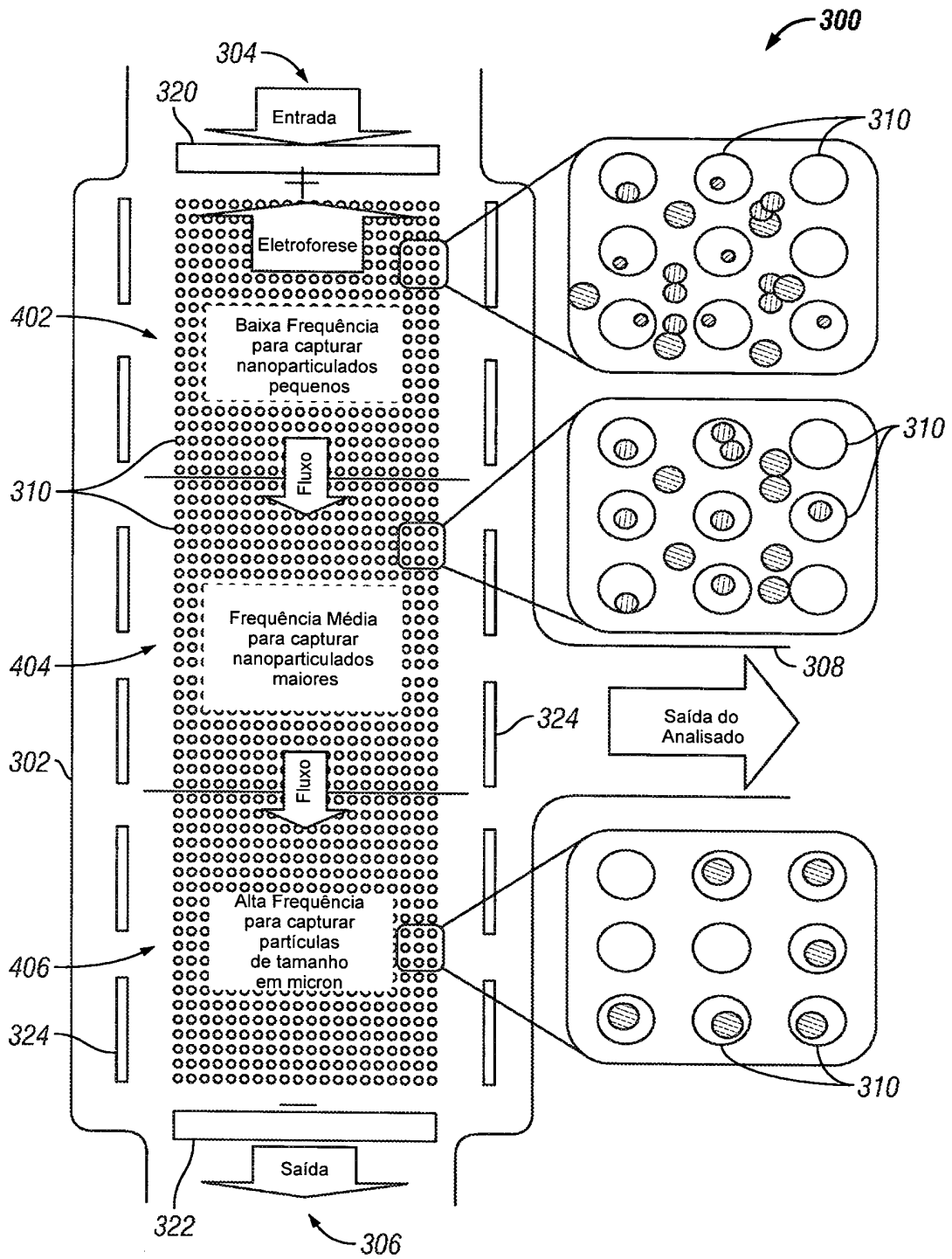


FIG. 4

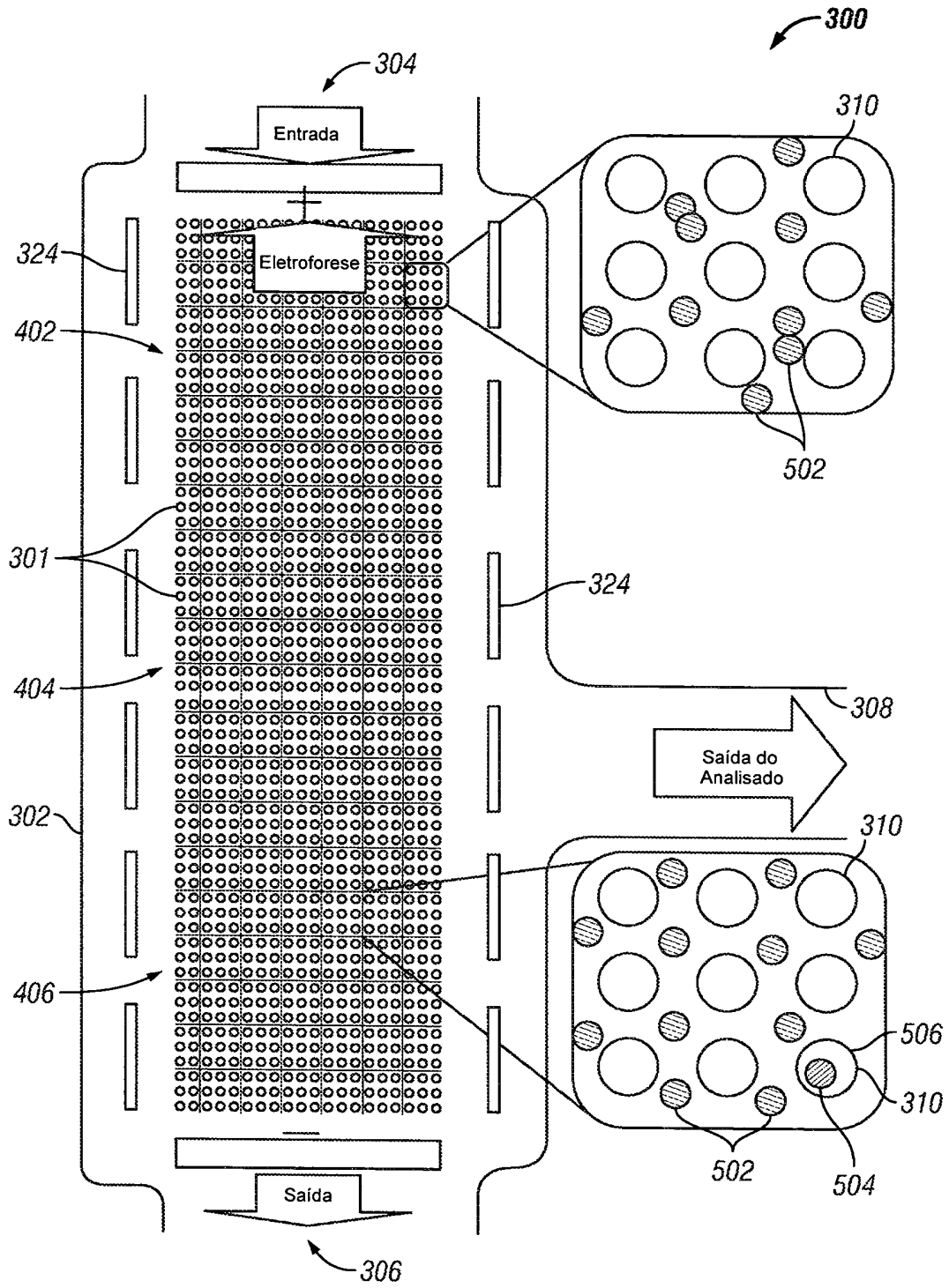


FIG. 5

*Amostra de Sangue Aplicada a DEP AC Pulsada /  
Eletroforese DC / Dispositivo de Fluxo Fluídico Controlado*

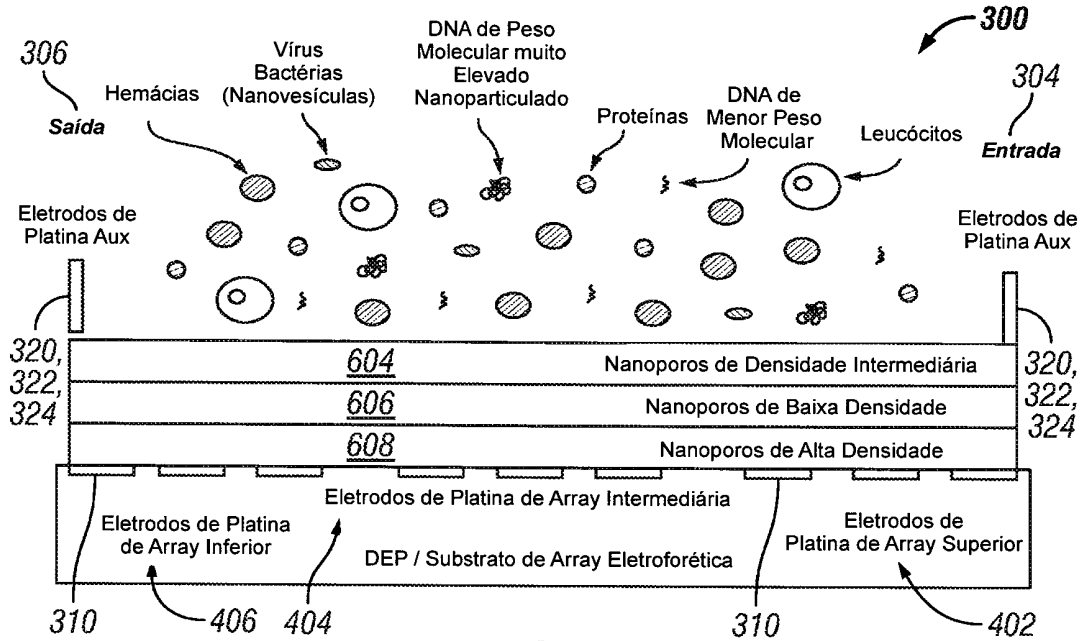


FIG. 6

*Estágio Inicial de Amostra de Sangue DEP AC Pulsada /  
Eletroforese DC / Dispositivo de Fluxo Fluídico Controlado Combinados*

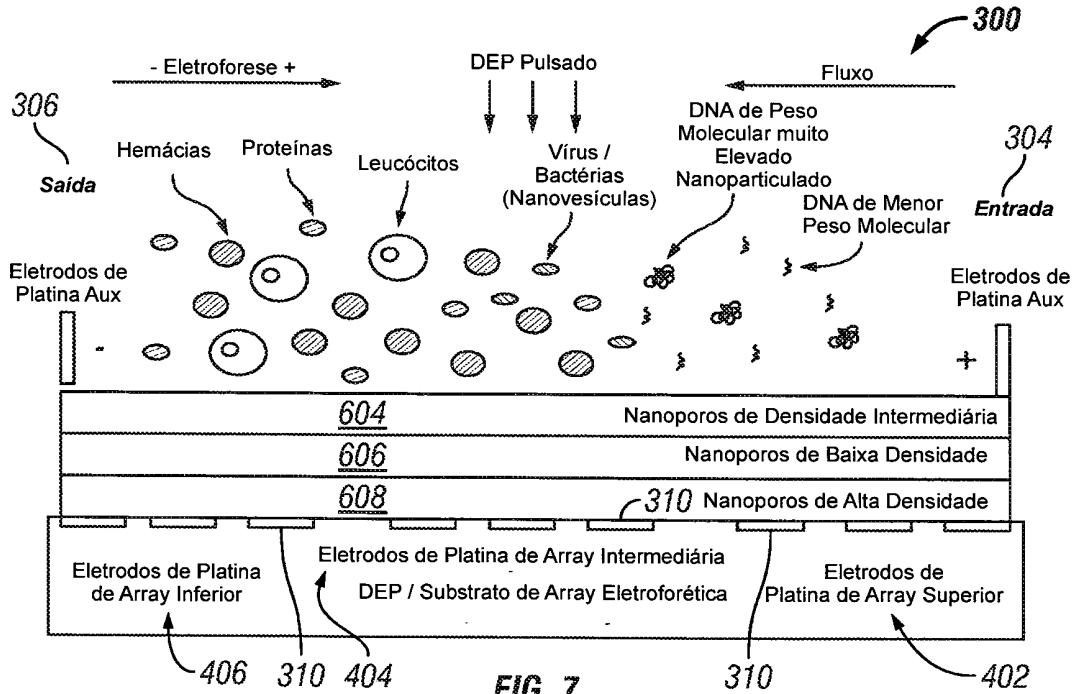
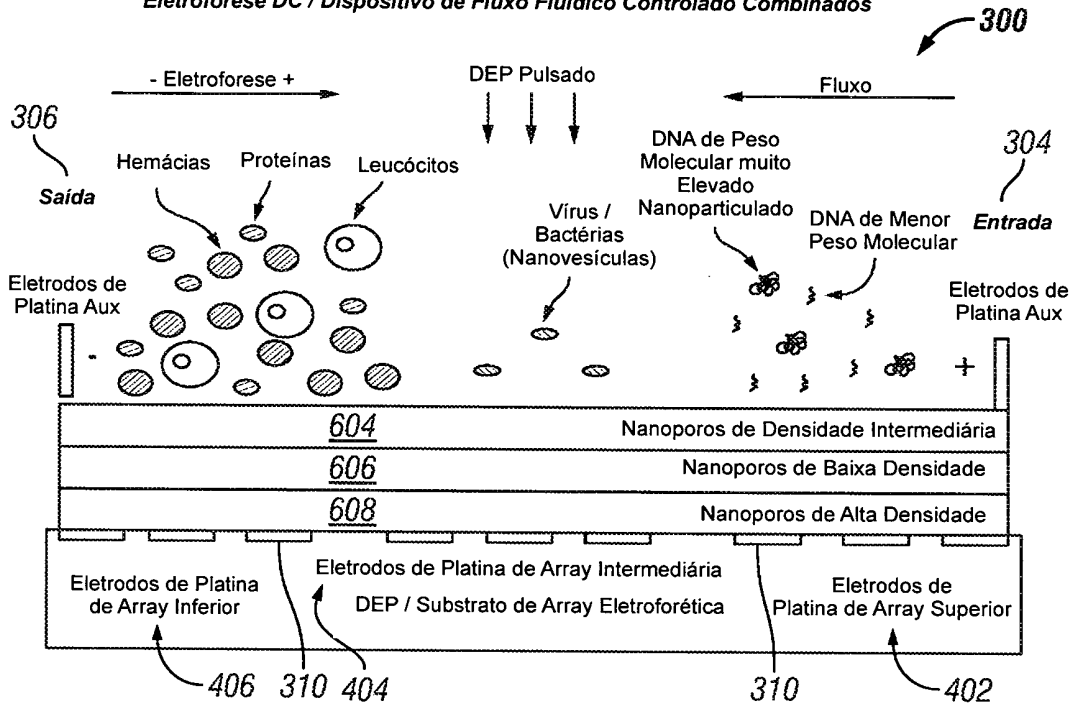


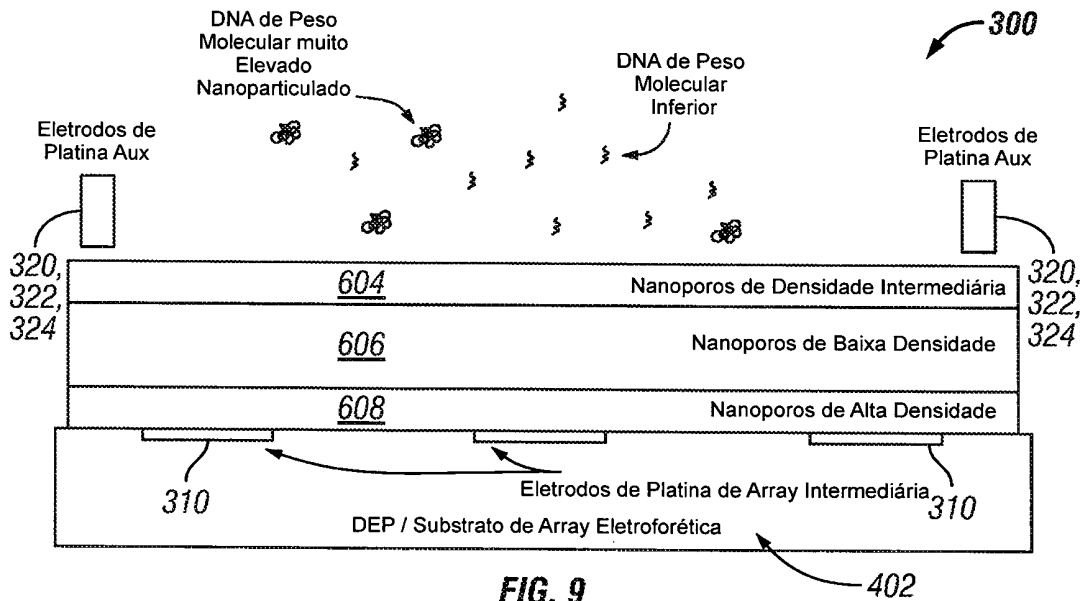
FIG. 7

*Estágio Final de Amostra de Sangue DEP AC Pulsada / Eletroforese DC / Dispositivo de Fluxo Flúídico Controlado Combinados*



**FIG. 8**

*DEP AC Pulsada e Eletroforese DC de Nanoparticulados de DNA, DNA de Peso Molecular muito Elevado e DNA de Peso Molecular Intermediário Inferior Corados com Fluorescente Seleção e Separação Sobre Seção de Array Superior Combinados*



**FIG. 9**

**DEP AC Pulsada e Eletroforese DC Combinados Inicial de Nanoparticulados de DNA, DNA de Peso Molecular muito Elevado e DNA de Peso Molecular Intermediário Inferior Corados com Fluorescente Seleção e Separação Sobre Seção de Array Superior**

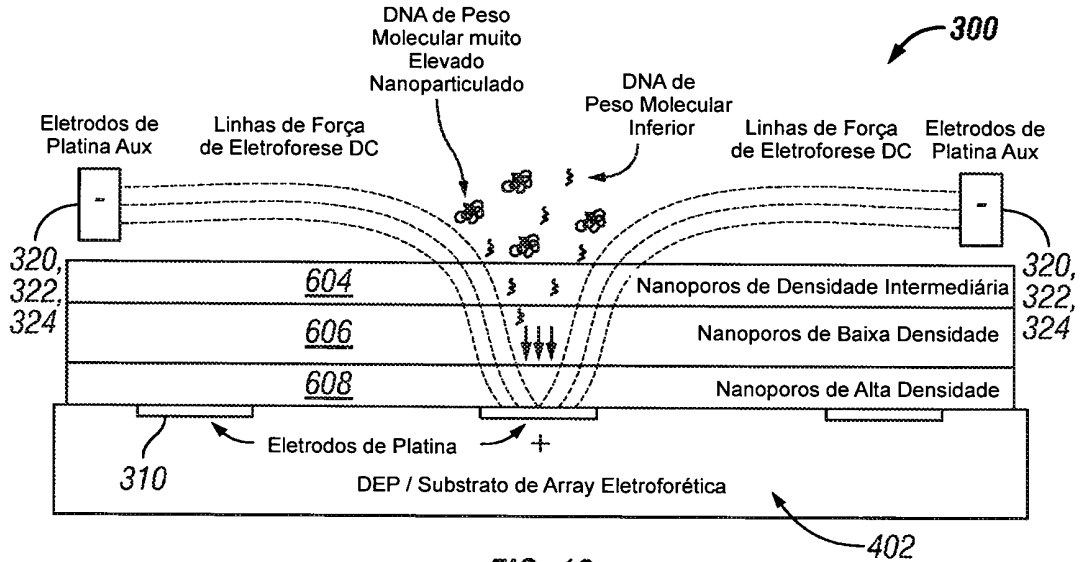


FIG. 10

**DEP AC Pulsada e Eletroforese DC Combinados Final de Nanoparticulados de DNA, DNA de Peso Molecular muito Elevado e DNA de Peso Molecular Intermediário Inferior Corados com Fluorescente Seleção e Separação Sobre Seção de Array Superior**

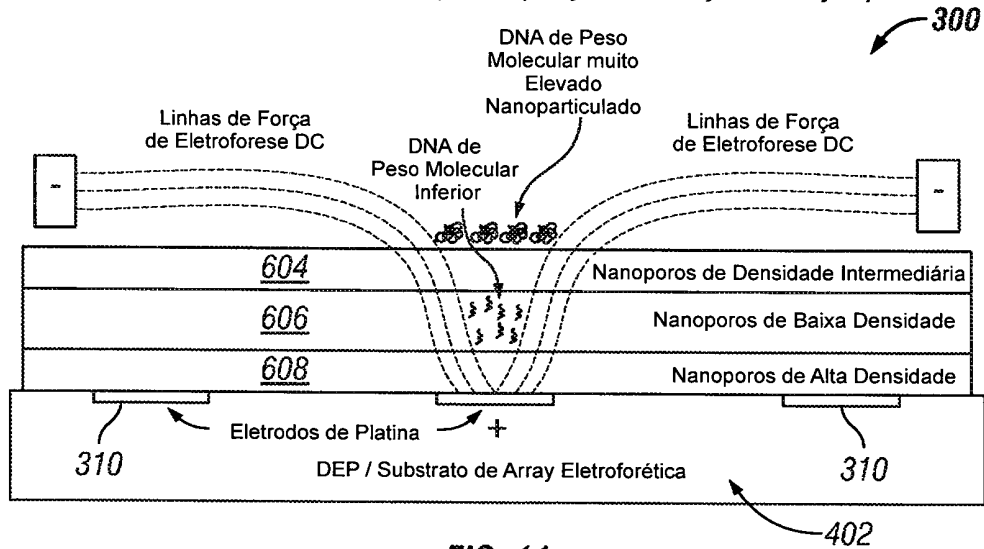
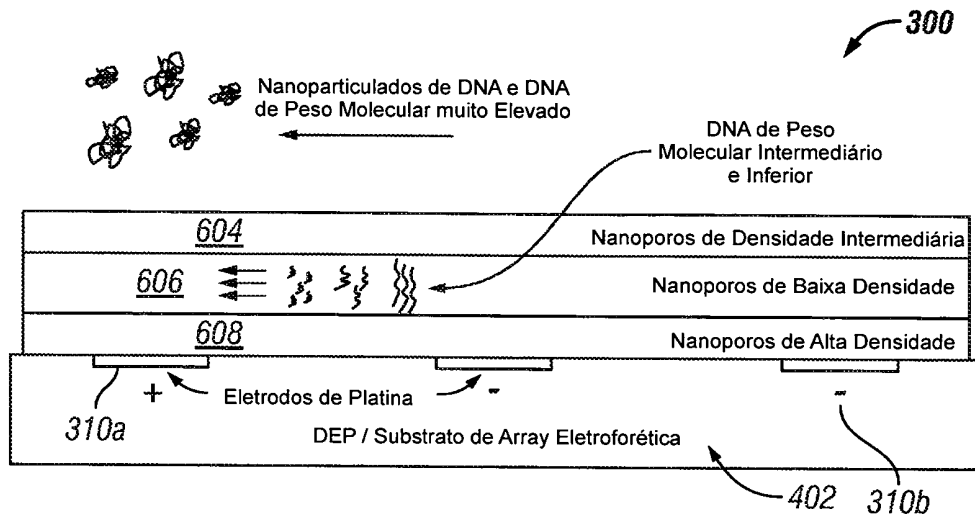


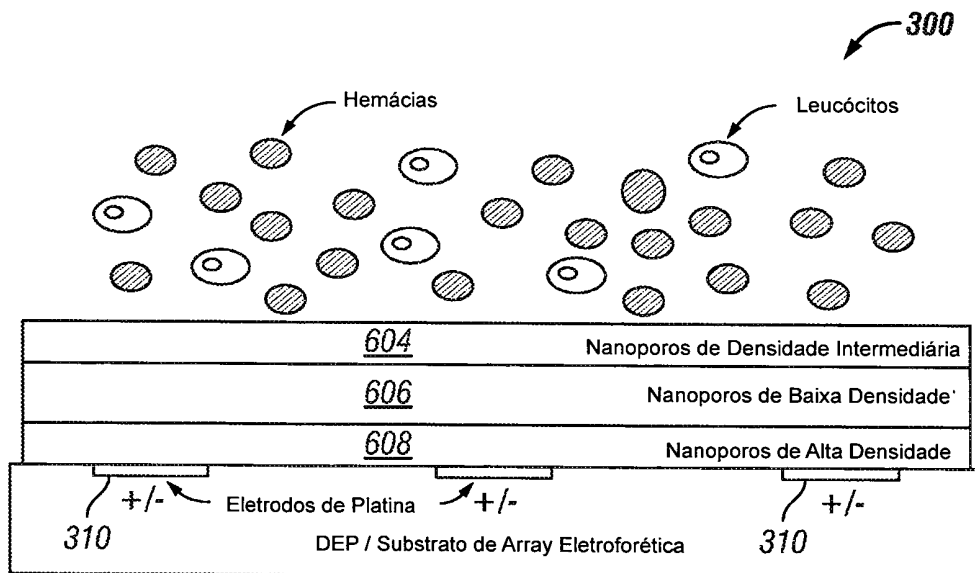
FIG. 11

**Remoção de Nanoparticulados de DNA e DNA de Peso Molecular muito Elevado e Separação de Tamanho Eletroforético On-Array DC de DNA de Peso Molecular Intermediário e Baixo**



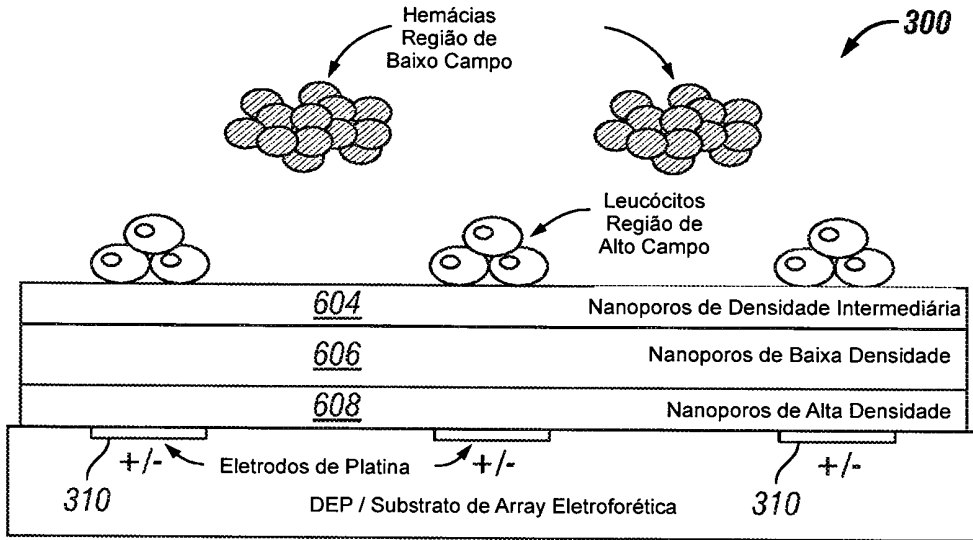
**FIG. 12**

**DEP AC Pulsada Inicial Aplicado a Hemácias e Leucócitos sobre Seção de Array Inferior do Dispositivo**



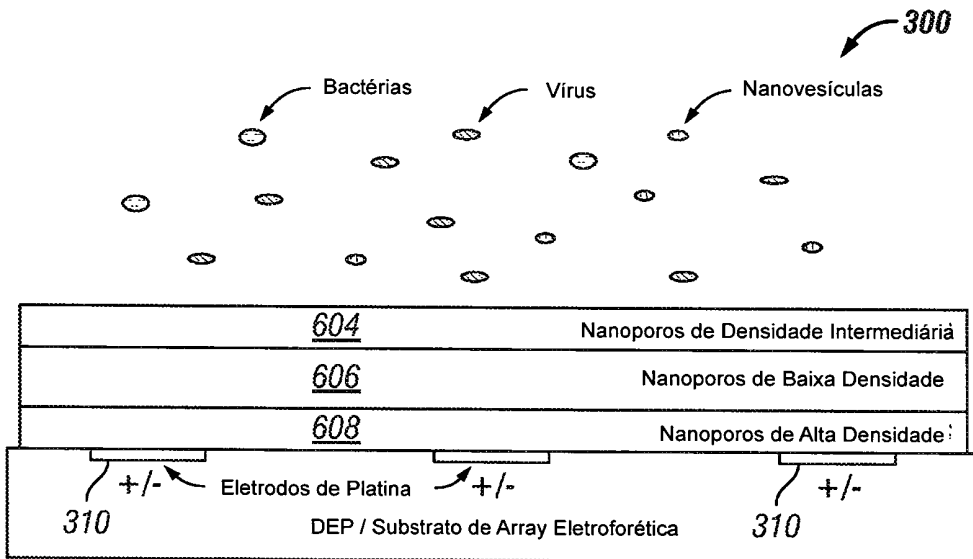
**FIG. 13**

*DEP AC Pulsada Final Aplicado a Hemácias e Leucócitos sobre Seção de Array Inferior do Dispositivo*



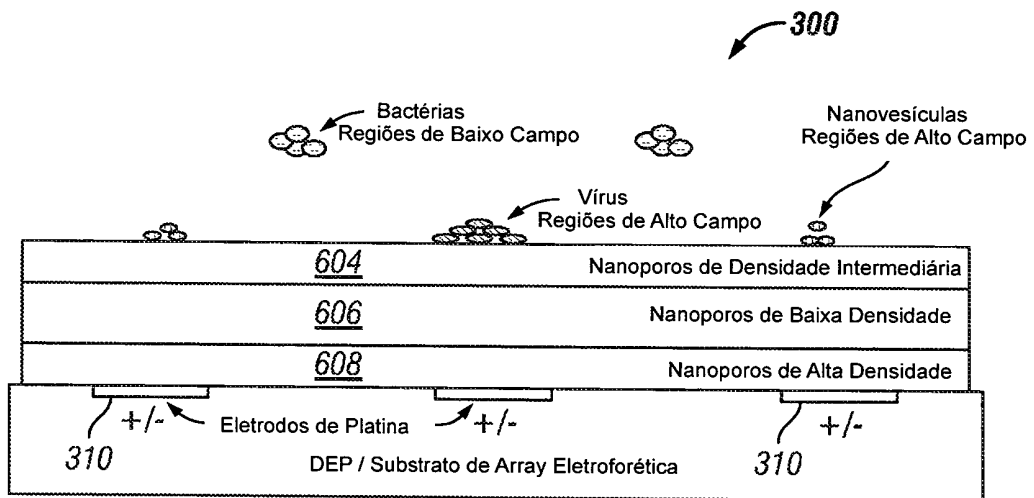
**FIG. 14**

*DEP AC Pulsada Inicial para Separação de Bactérias, Virus e Nanovesículas sobre Seção de Array Central do Dispositivo*

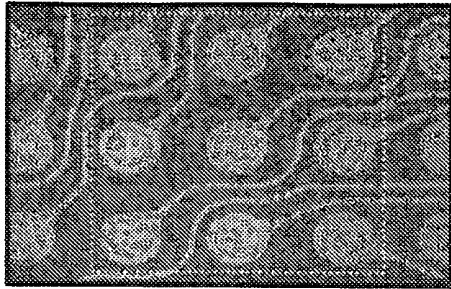


**FIG. 15**

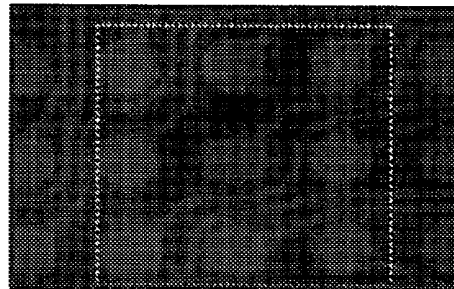
*DEP AC Pulsada Final para Separação de Bactérias, Vírus e Nanovesículas sobre Seção de Array Central do Dispositivo*



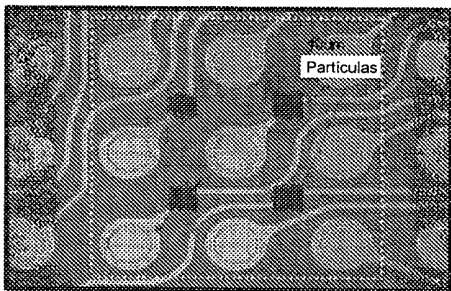
**FIG. 16**



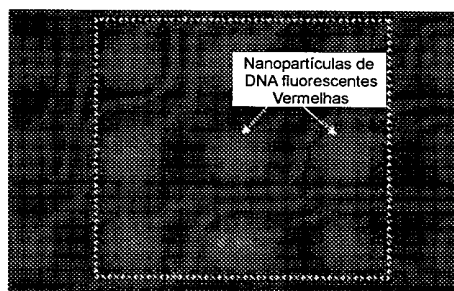
**FIG. 17A**



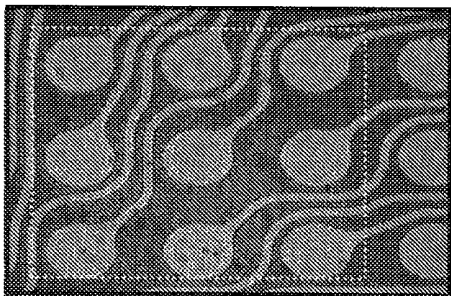
**FIG. 17B**



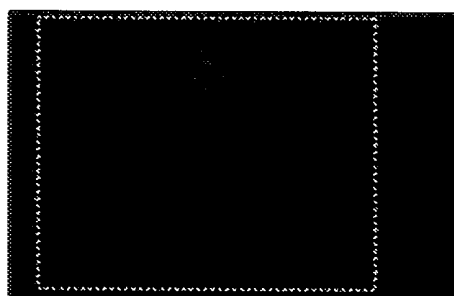
**FIG. 17C**



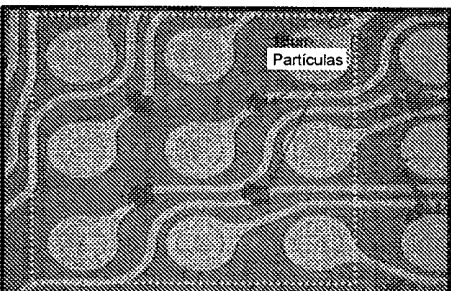
**FIG. 17D**



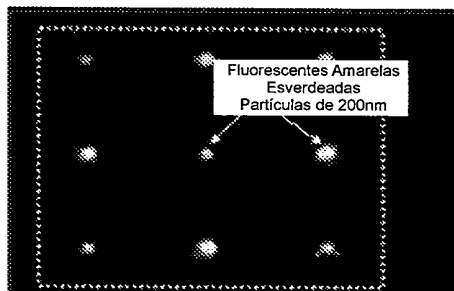
**FIG. 17E**



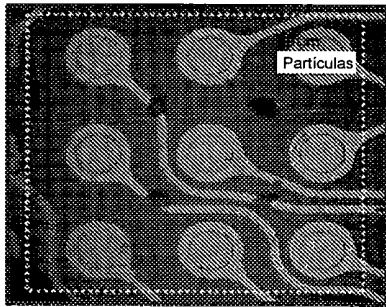
**FIG. 17F**



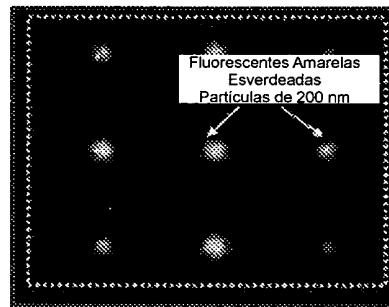
**FIG. 17G**



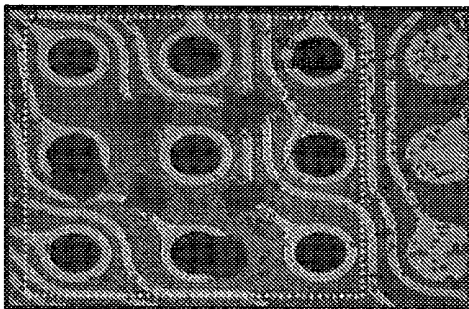
**FIG. 17H**



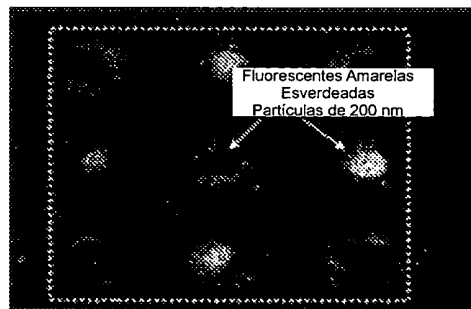
**FIG. 18A**



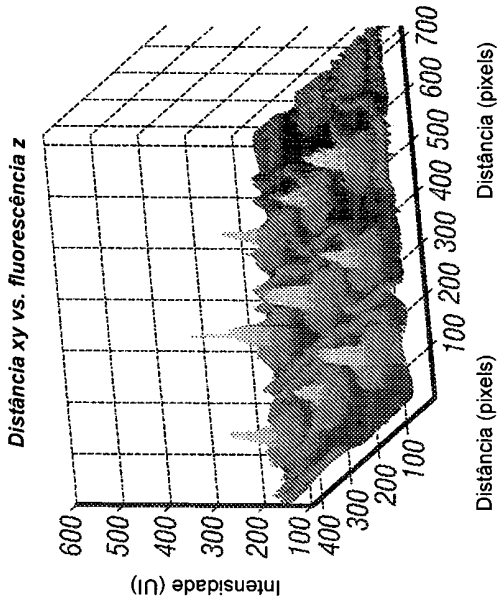
**FIG. 18B**



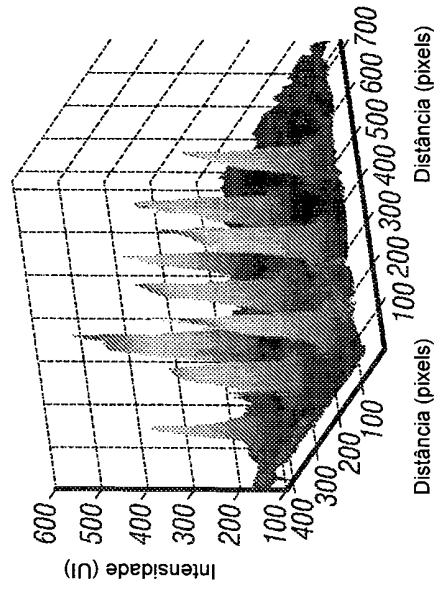
**FIG. 18C**



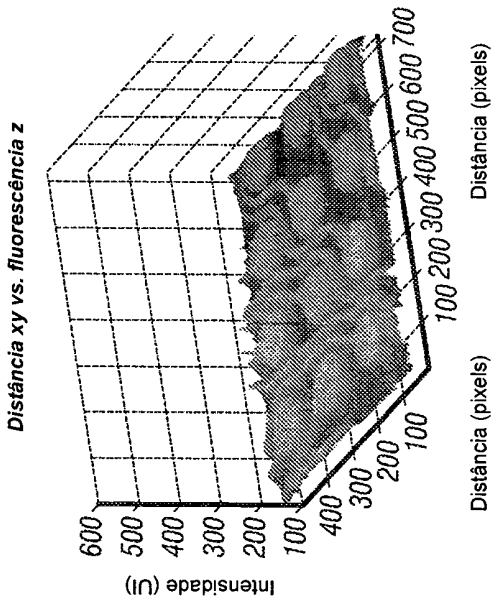
**FIG. 18D**



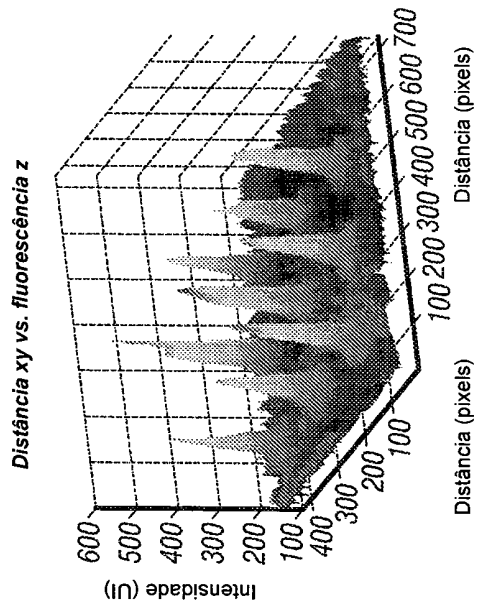
**FIG. 19B**



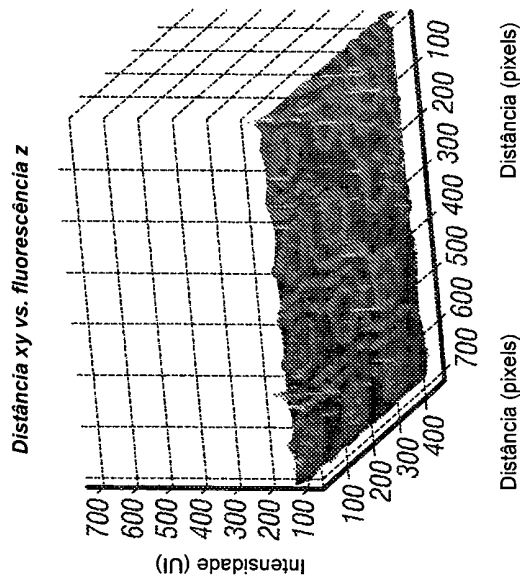
**FIG. 19D**



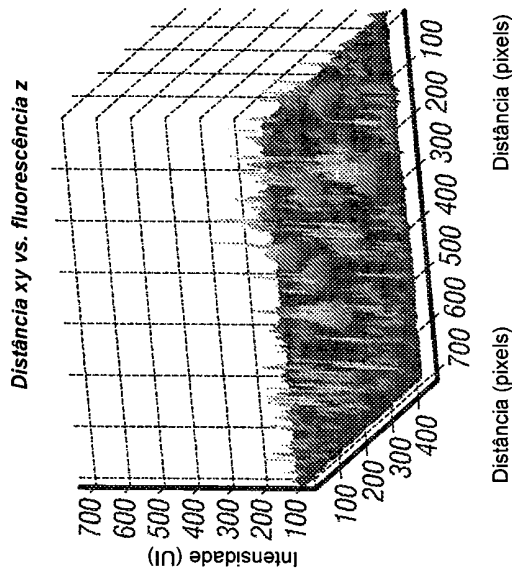
**FIG. 19A**



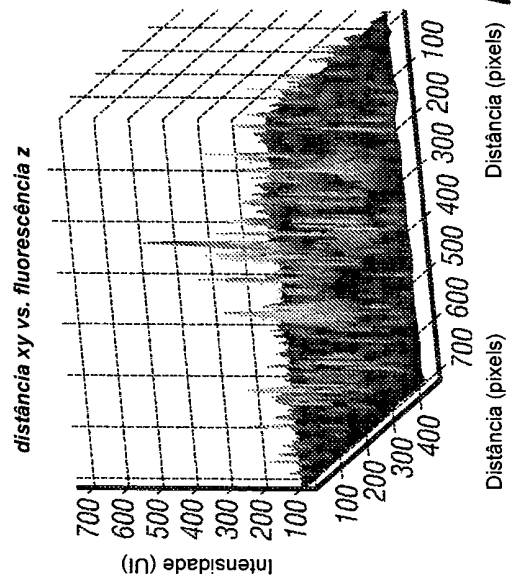
**FIG. 19C**



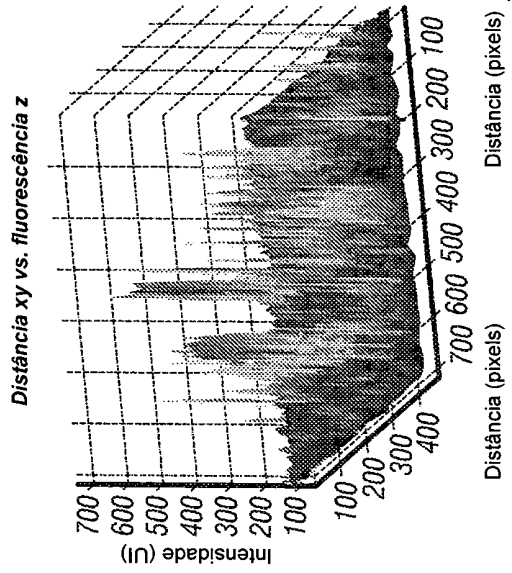
**FIG. 19E**



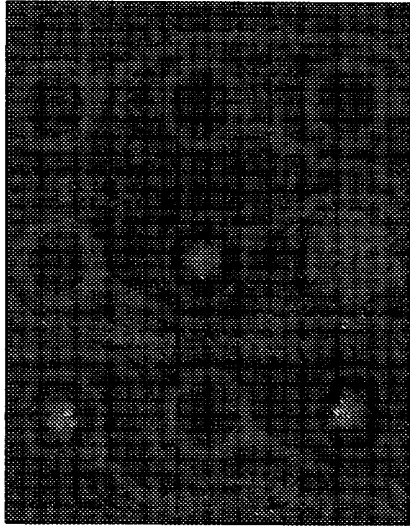
**FIG. 19F**



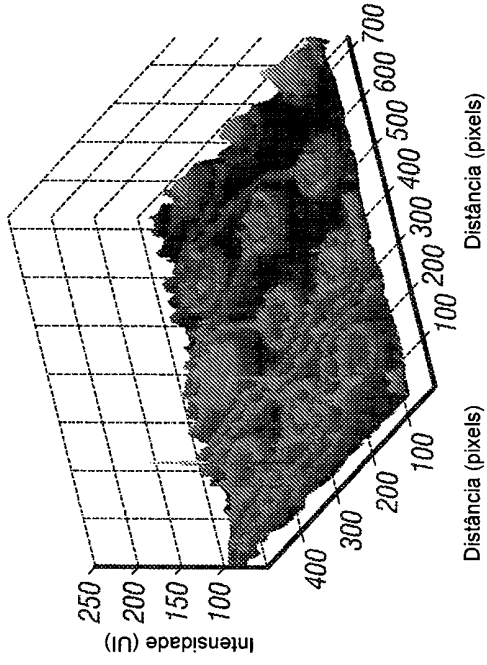
**FIG. 19G**



**FIG. 19H**

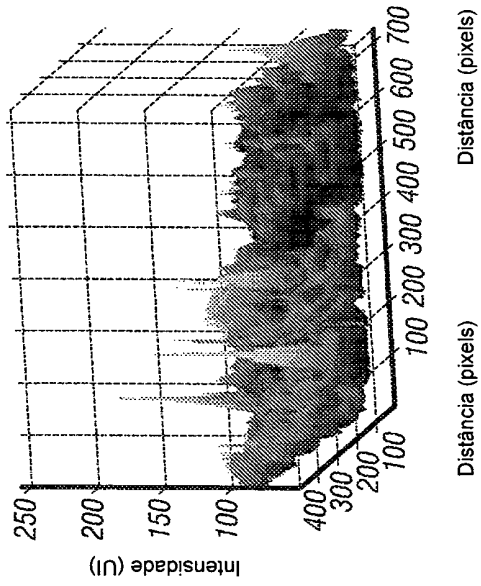


*Distância xy vs. fluorescência z*



**FIG. 20A**

*Distância xy vs. fluorescência z*



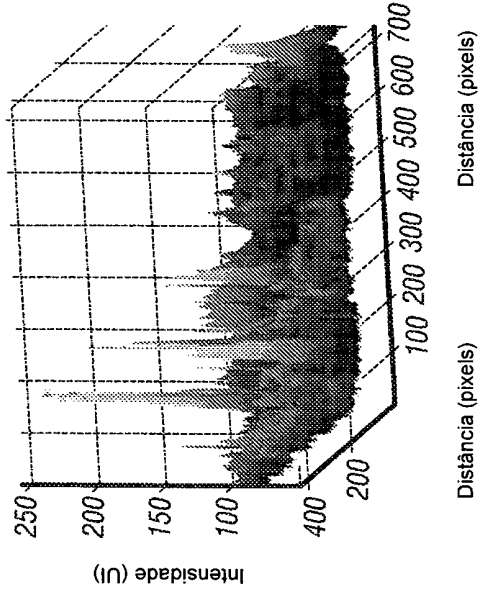
Distância (pixels)

Distância (pixels)

**FIG. 20C**

**FIG. 20B**

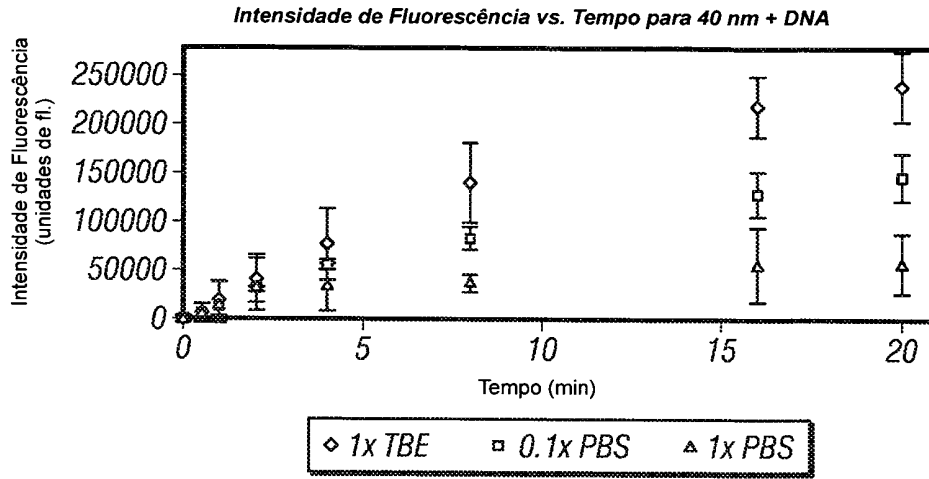
*Distância xy vs. fluorescência z*



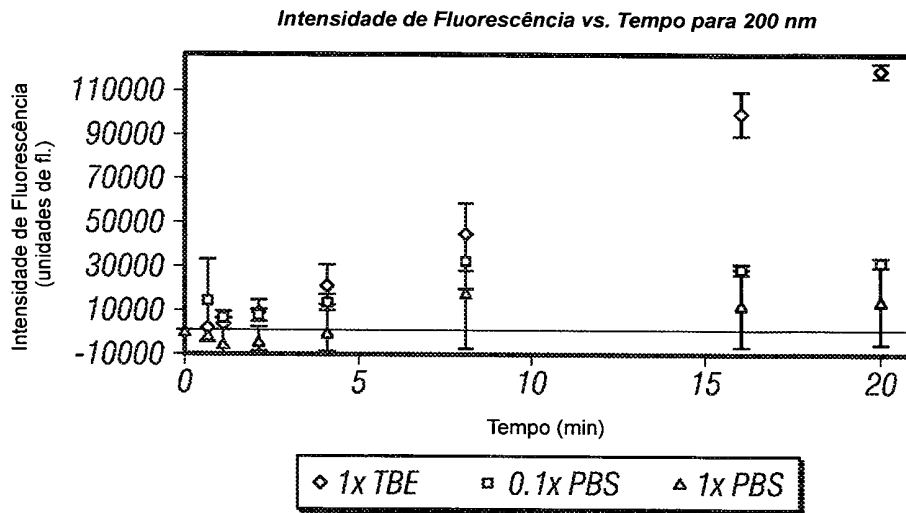
Distância (pixels)

Distância (pixels)

**FIG. 20D**



**FIG. 21A**



**FIG. 21B**

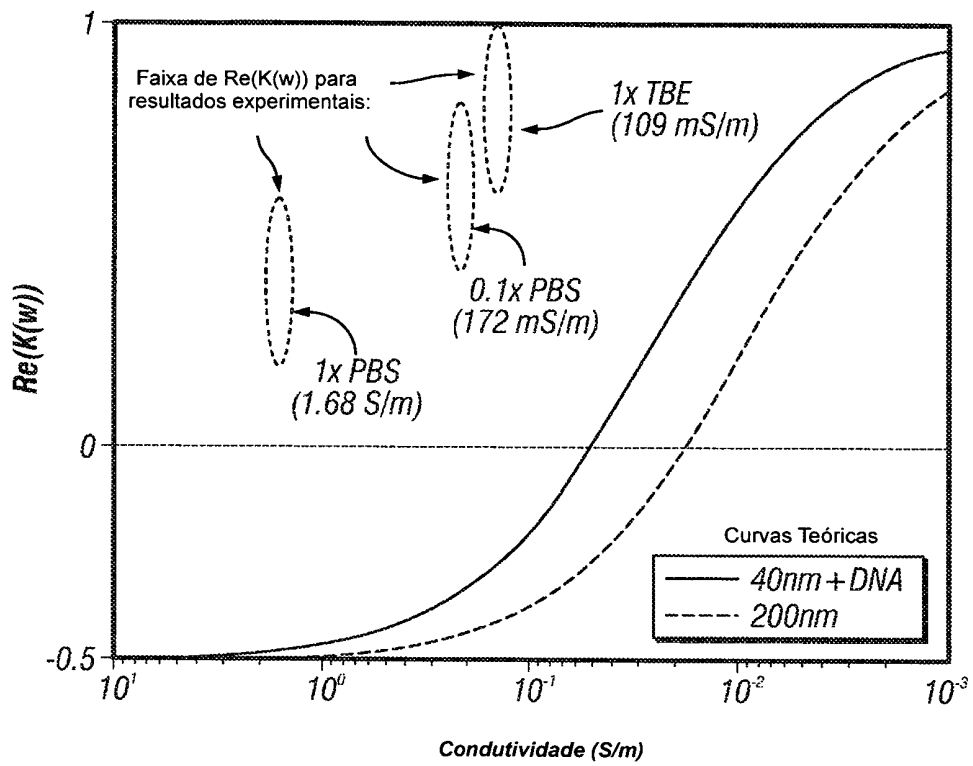


FIG. 22

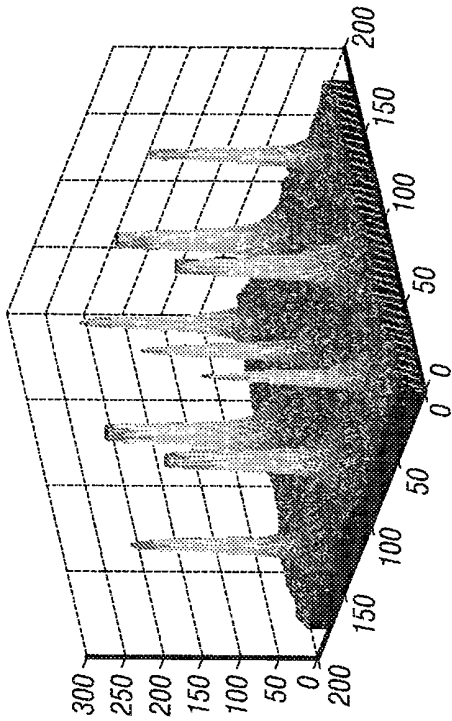


FIG. 23B

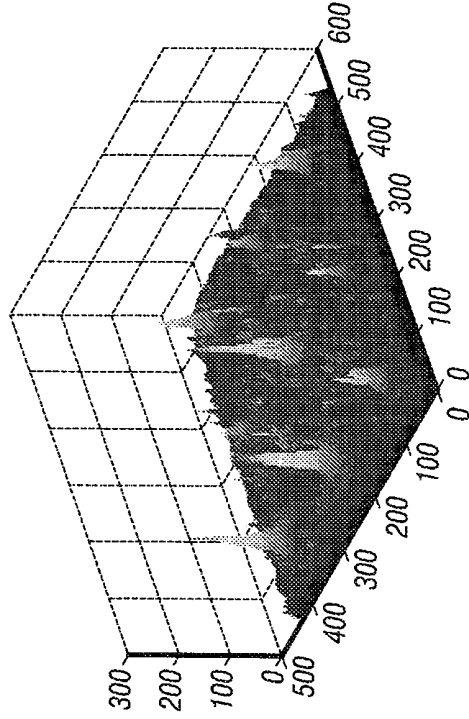


FIG. 23D



FIG. 23A

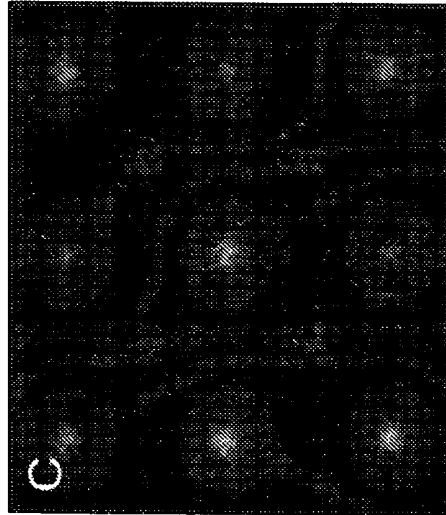


FIG. 23C

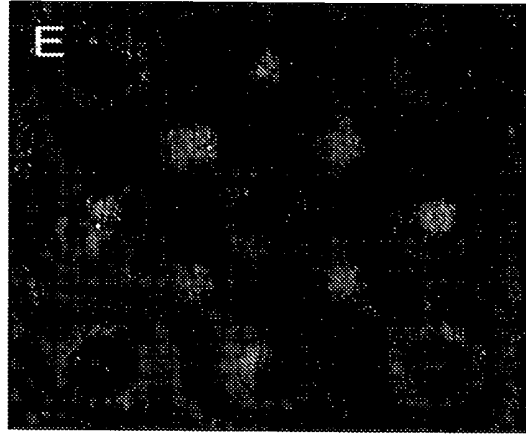


FIG. 23E

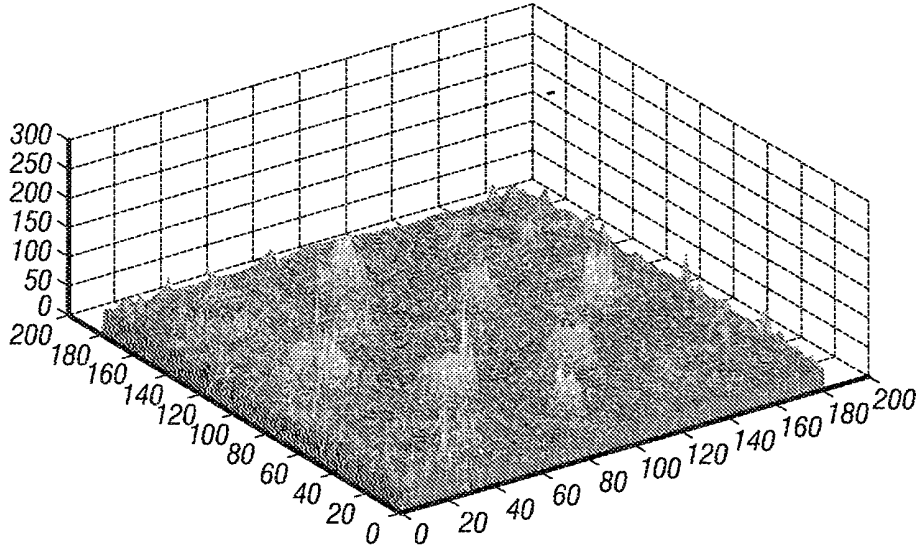


FIG. 23F

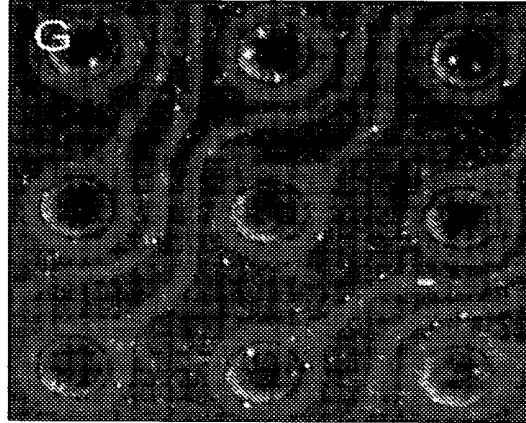


FIG. 23G

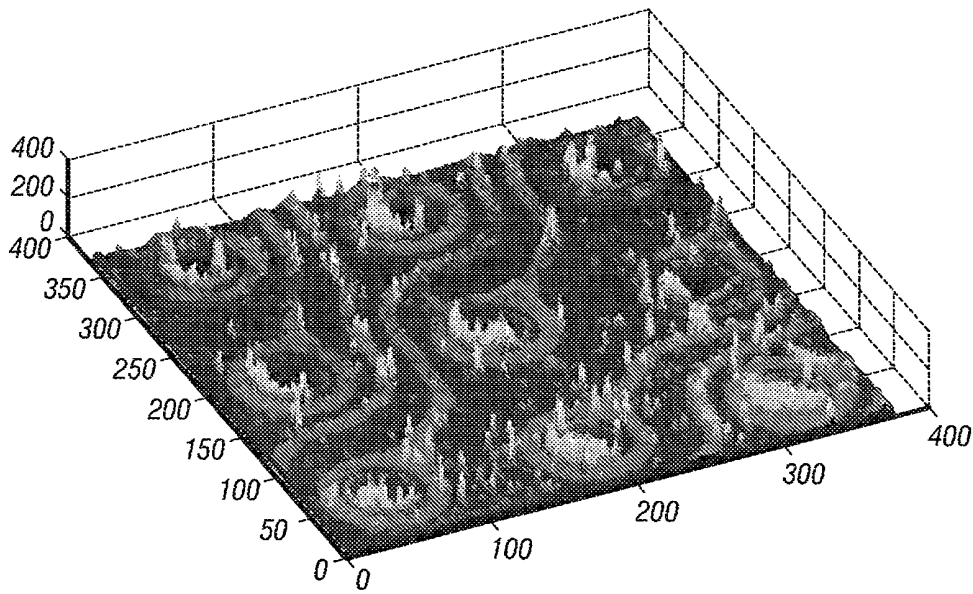
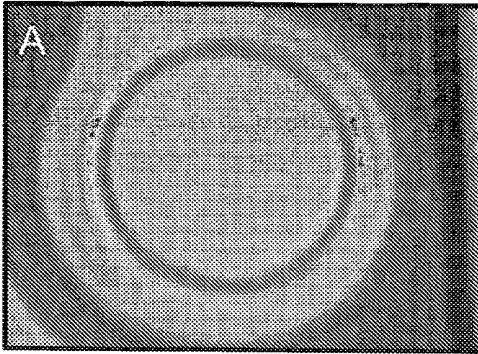
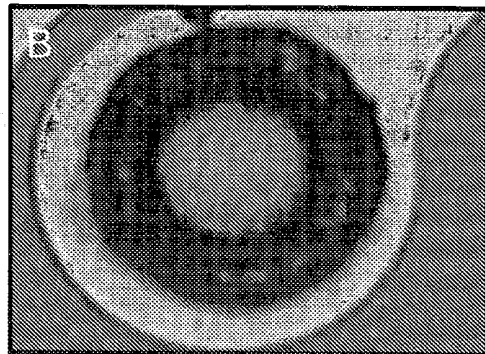


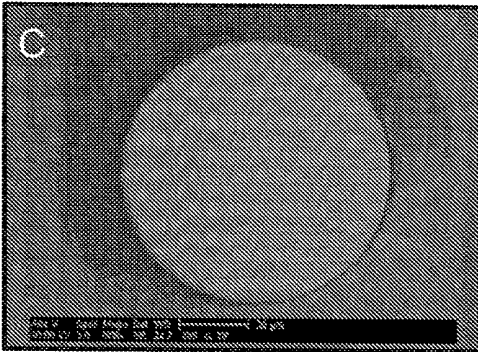
FIG. 23H



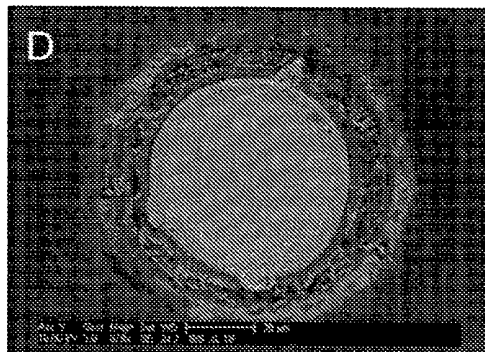
**FIG. 24A**



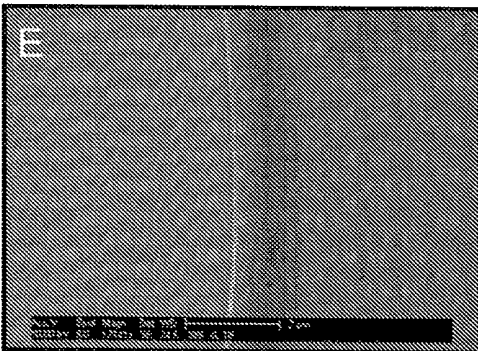
**FIG. 24B**



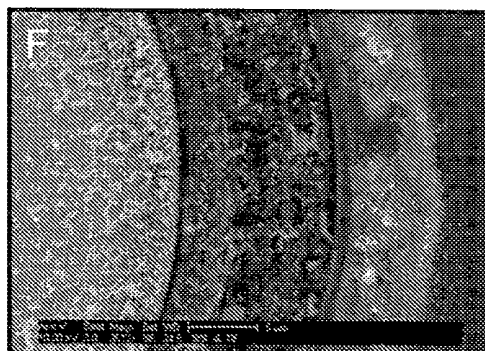
**FIG. 24C**



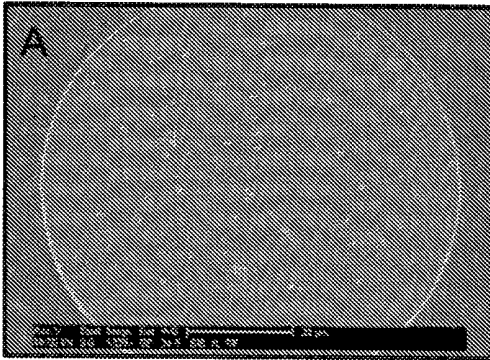
**FIG. 24D**



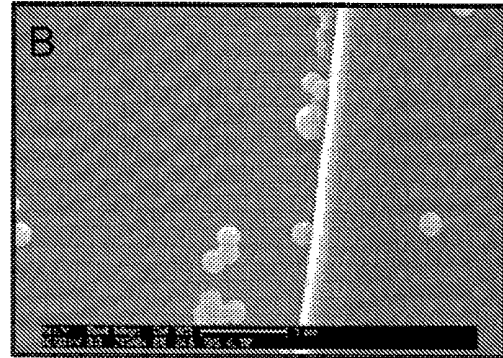
**FIG. 24E**



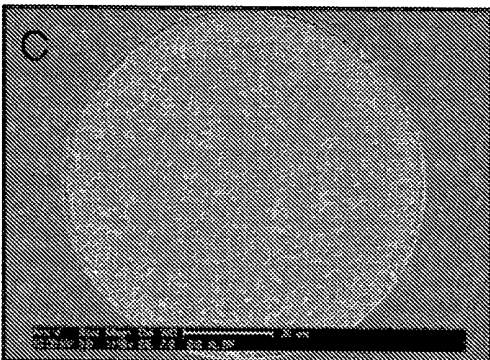
**FIG. 24F**



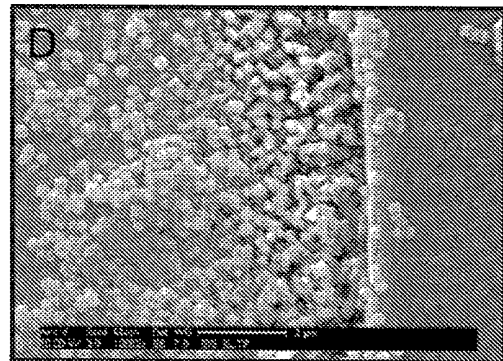
**FIG. 25A**



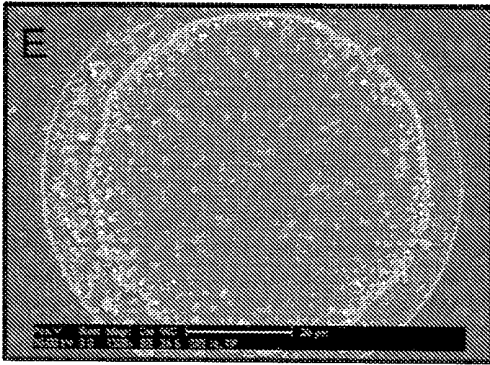
**FIG. 25B**



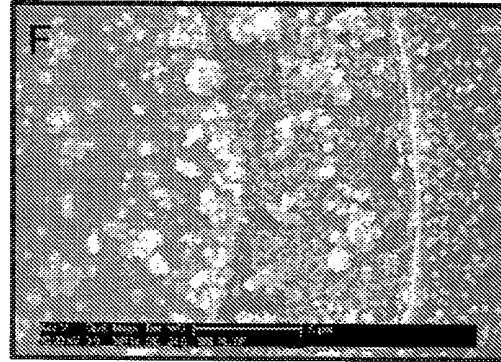
**FIG. 25C**



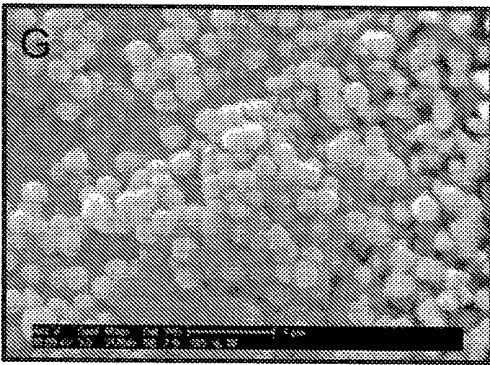
**FIG. 25D**



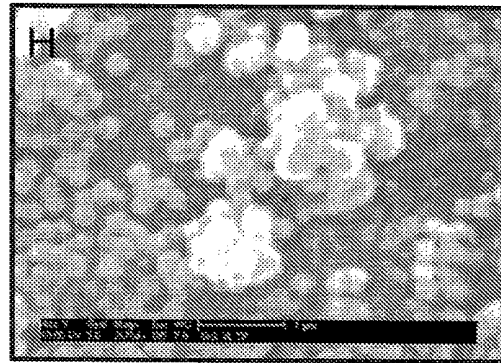
**FIG. 25E**



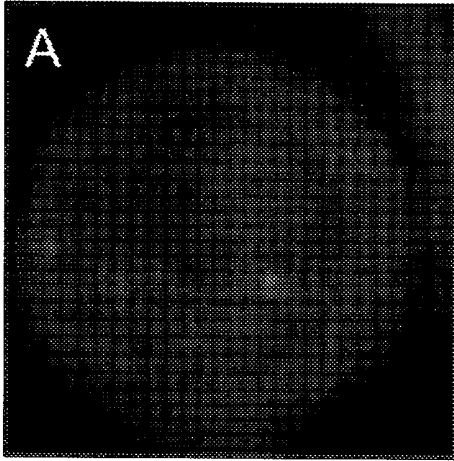
**FIG. 25F**



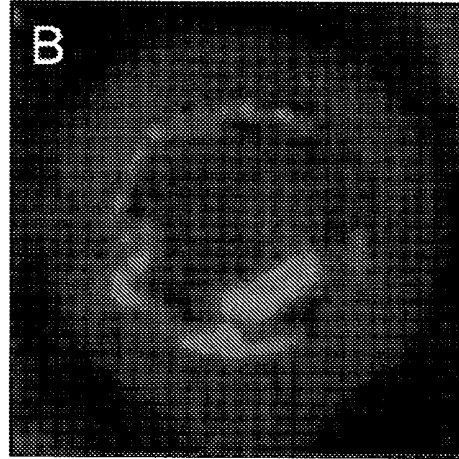
**FIG. 25G**



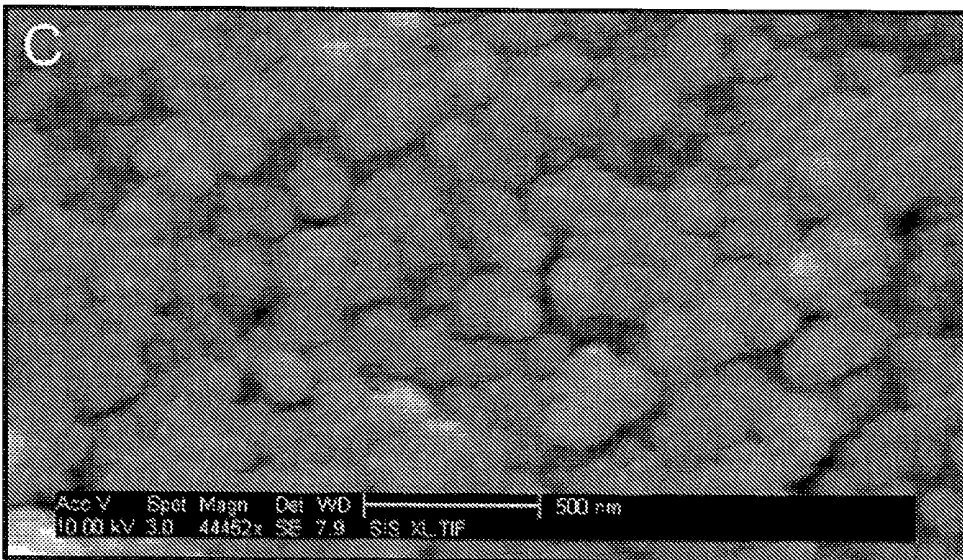
**FIG. 25H**



**FIG. 26A**

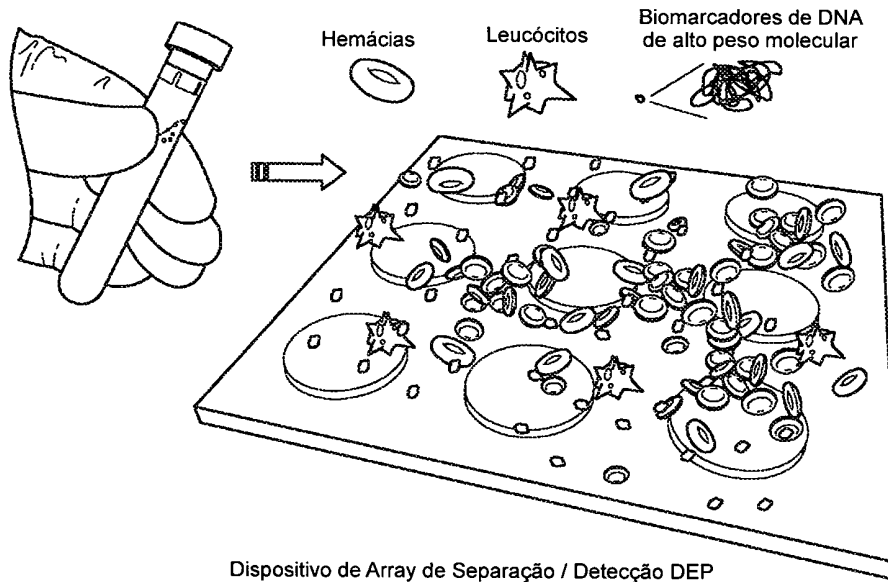


**FIG. 26B**



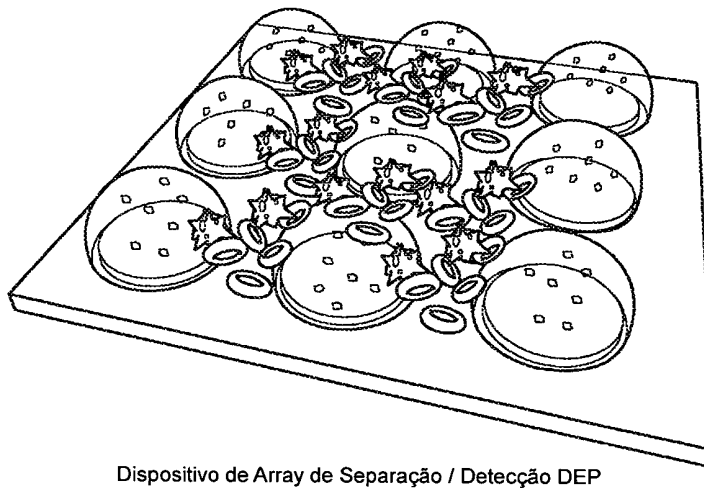
**FIG. 26C**

**Amostra Inconsútil para Resposta para Análise Direta de Sangue, Plasma, Soro e Outras Amostras Biológicas**  
**Etapa 1 – Amostra de sangue aplicada ao dispositivo DEP**



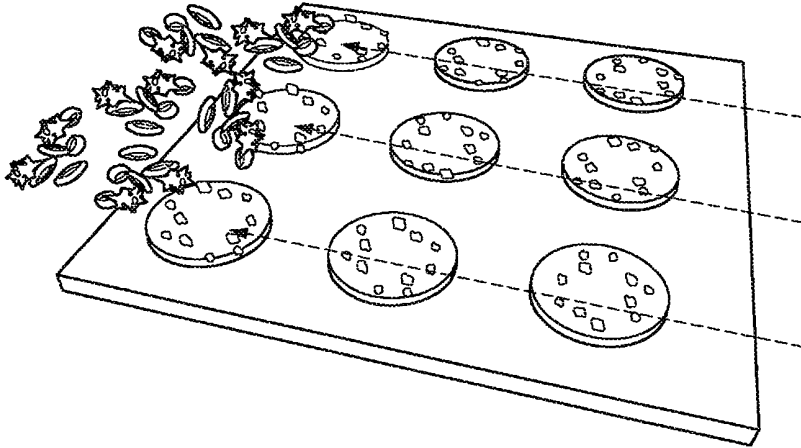
**FIG. 27**

**Etapa 2 – O campo DEP é aplicado (5 minutos)**  
**As células se movem para regiões de campo baixo e os biomarcadores de DNA de alto peso molecular para dentro de regiões de campo elevado**



**FIG. 28**

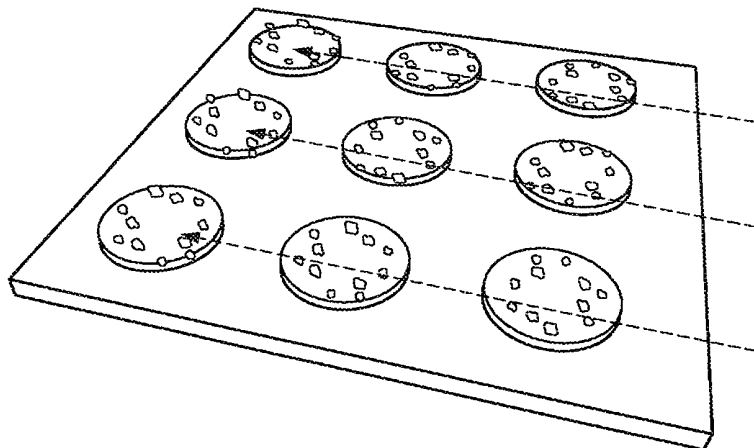
*Etapa 3 – Lavagem fluidica (1 minuto)*  
*As células sanguíneas são removidas enquanto os biomarcadores de DNA de alto peso molecular permanecem concentrados em regiões de campo elevado*



Dispositivo de Array de Separação / Detecção DEP

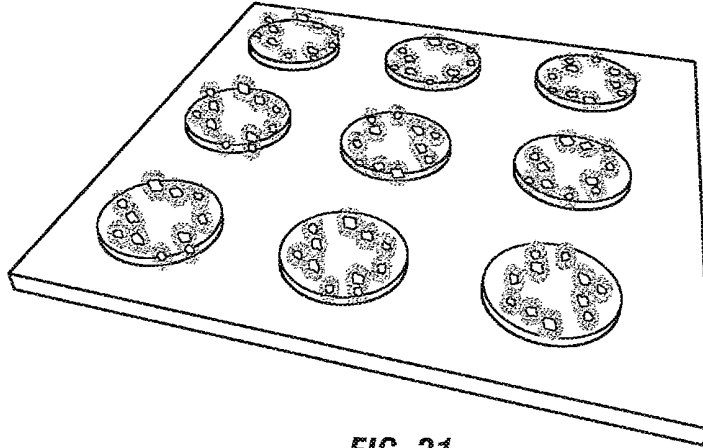
**FIG. 29**

*Etapa 4 – Adicionar Tintura de DNA/RNA Fluorescente e Lavagem*



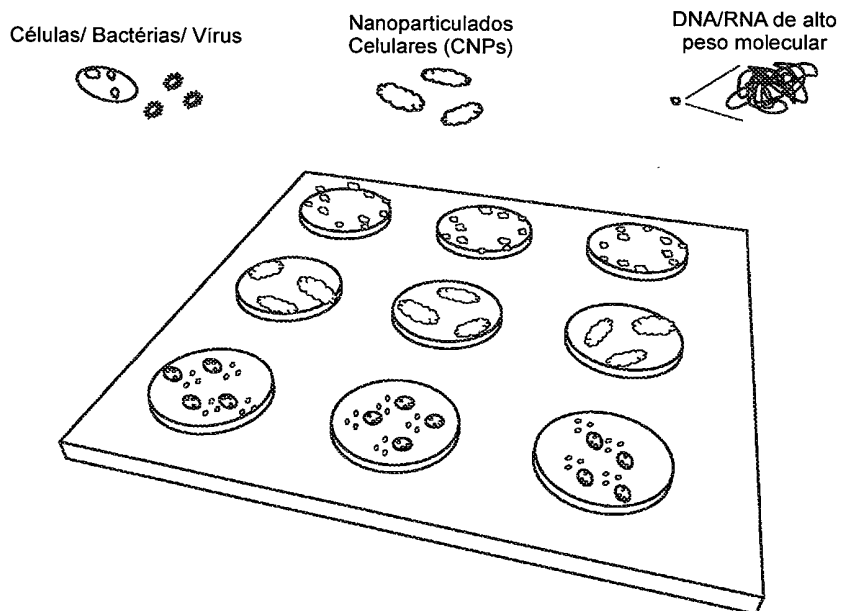
**FIG. 30**

*Etapa 5 – Detectar e Quantificar DNA/RNA Fluorescente*



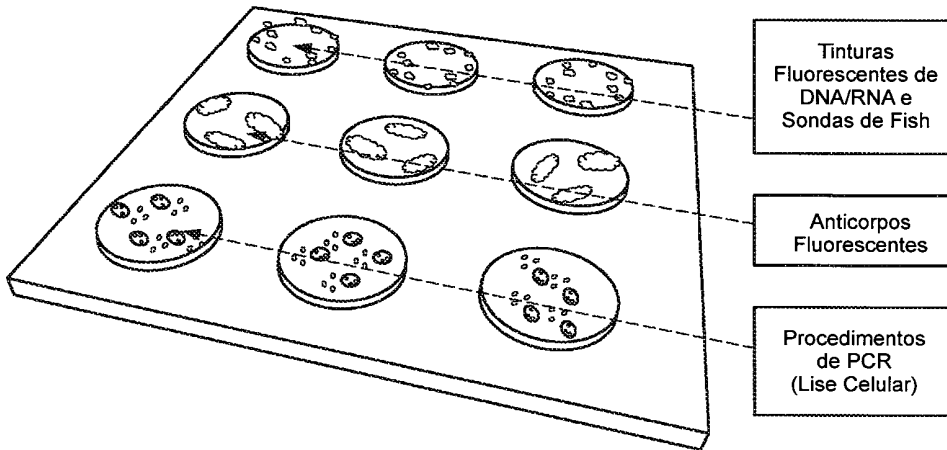
**FIG. 31**

*Outros Biomarcadores e Analisados*



**FIG. 32**

**PCR In Situ ou Análise de Anticorpos (15 minutos)**  
**Procedimentos para detectar variedade de biomarcadores**  
**e analisados incluindo bactérias/ vírus, biomarcadores, DNA/RNA**  
**de alto peso molecular e complexos de anticorpos**

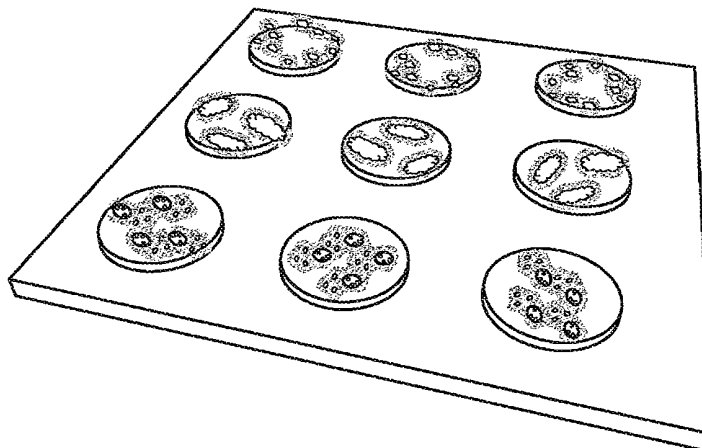


Dispositivo de Array de Separação / Detecção DEP

**FIG. 33**

**Pós Procedimentos de Tintura Fluorescente In Situ, Imunoensaio**  
**Fluorescente, de FISH e de PCR para uma Variedade de Biomarcadores**  
**e Analisados Incluindo Bactérias/ Vírus, Nanoparticulados Celulares**  
**(CNP), DNA/RNA de Alto Peso Molecular e Complexos de Anticorpos**

**"Amostra Inconsútil para Responder Diagnóstico"**



**FIG. 34**