



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 999 535**

⑮ Int. Cl.:

**C12Q 1/6832** (2008.01)

**C12Q 1/6837** (2008.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2021 PCT/US2021/036557**

⑧7 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2021 WO21252591**

⑨6 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2021 E 21737265 (5)**

⑨7 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2024 EP 4165207**

---

⑮ Título: **Métodos para determinar una ubicación de un analito en una muestra biológica**

---

⑩ Prioridad:

**10.06.2020 US 202063037458 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**26.02.2025**

⑬ Titular/es:

**10X GENOMICS, INC. (100.00%)  
6230 Stoneridge Mall Road  
Pleasanton, CA 94588-3260, US**

⑭ Inventor/es:

**RAMACHANDRAN IYER, ESWAR PRASAD;  
BENT, ZACHARY;  
YIN, YIFENG y  
DALIN, EILEEN**

⑯ Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 999 535 T3**

---

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

---

## DESCRIPCIÓN

Métodos para determinar una ubicación de un analito en una muestra biológica

Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm. 63/037,458, presentada el 10 de junio de 2020.

## 5 Antecedentes

Las células dentro de un tejido tienen diferencias en la morfología y/o función celular debido a niveles variados de analitos (por ejemplo, expresión génica y/o proteica) dentro de las diferentes células. La posición específica de una célula dentro de un tejido (por ejemplo, la posición de la célula con relación a las células vecinas o la posición de la célula con relación al microentorno del tejido) puede afectar, por ejemplo, la morfología, diferenciación, destino, viabilidad, proliferación, comportamiento, señalización y diafonía de la célula con otras células en el tejido.

10 La heterogeneidad espacial se ha estudiado previamente mediante el uso de técnicas que típicamente proporcionan datos para un puñado de analitos en el contexto de tejido intacto o una porción de un tejido (por ejemplo, sección de tejido), o proporcionan datos significativos de analitos de células aisladas, individuales, pero no proporcionan información con respecto a la posición de las células aisladas de la muestra biológica de origen (por ejemplo, tejido).

15 Algunas técnicas para estudiar la heterogeneidad espacial de una muestra biológica pueden provocar analitos (por ejemplo, ácido nucleico) de la muestra biológica para difundirse en áreas adyacentes a la muestra biológica y capturarse en tales áreas adyacentes a la muestra biológica en la matriz. El resultado de capturar analitos en áreas adyacentes a la muestra biológica en la matriz (por ejemplo, áreas que no se correlacionan con la muestra biológica) puede conducir a recursos desperdiciados, tales como costos innecesarios atribuidos a la secuenciación (por ejemplo, secuenciación de próxima generación). Por lo tanto, los métodos para mejorar la incidencia de analitos capturados en áreas adyacentes de la matriz a la muestra biológica, tales como sondas de bloqueo (por ejemplo, una sonda de bloqueo al dominio de captura de una sonda de captura), pueden mejorar la eficiencia, la conservación de recursos y la resolución de los resultados.

20 25 El documento WO2020047005 describe métodos para determinar la ubicación de una característica en una matriz espacial en donde una característica en un sustrato tiene una sonda de captura y donde la sonda de captura tiene un código de barras espacial y una secuencia constante. El documento WO2018091676 describe métodos para el marcado espacial de moléculas de ácido nucleico en muestras biológicas.

## Resumen

30 La presente invención proporciona un método para reducir la captura de un ácido nucleico diana en un área de una matriz no recubierta por una muestra biológica, el método comprende:

(a) disponer una muestra biológica no permeabilizada sobre una matriz en una primera área, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde:

35 la primera área comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprende (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura; y

una segunda área de la matriz comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprende (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura, y la segunda área de la matriz no está recubierta por la muestra biológica dispuesta en la matriz;

40 45 (b) poner en contacto la segunda área de la matriz con una sonda de bloqueo, en donde la sonda de bloqueo comprende una secuencia de ácido nucleico que se une al dominio de captura de la sonda de captura en la segunda área de la matriz;

(c) eliminar la sonda de bloqueo residual de al menos la segunda área de la matriz antes de permeabilizar la muestra biológica; y

(d) permeabilizar la muestra biológica, de manera que el dominio de captura de la sonda de captura de la primera área de la matriz se une al ácido nucleico diana; lo que reduce de esta manera la captura del ácido nucleico diana en la segunda área de la matriz no recubierta por la muestra biológica.

La presente invención proporciona además una composición, que comprende una matriz que tiene una primera área, una segunda área y una pluralidad de sondas de captura, en donde:

50 la primera área comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprende (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura unido a un ácido nucleico diana de una muestra biológica, en donde la muestra biológica se dispuso previamente en la primera área; y

una segunda área de la matriz comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprende (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura unido a una sonda de bloqueo, y la segunda área no estaba recubierta previamente por la muestra biológica.

5 La presente invención proporciona adicionalmente una composición, que comprende una matriz que tiene una primera área, una segunda área, y una pluralidad de sondas de captura, en donde:

la primera área comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprende (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura unido a un ácido nucleico diana de una muestra biológica, en donde la muestra biológica se dispone en la primera área; y

10 una segunda área de la matriz comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprende (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura unido a una sonda de bloqueo, y la segunda área no está recubierta por la muestra biológica.

15 Esta descripción proporciona un método para bloquear sondas de captura en una matriz espacial que no están directamente debajo de la muestra biológica. Los métodos descritos en la presente descripción pueden proporcionar una mejora en la conservación de recursos y una reducción y/o eliminación de la unión inespecífica de analitos a porciones no intencionadas de la matriz espacial durante el desempeño de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción para determinar una ubicación de un analito diana en una muestra biológica.

En la presente descripción se describen métodos para determinar una ubicación de un ácido nucleico diana en una muestra biológica que incluyen: (a) disponer una muestra biológica no permeabilizada sobre una matriz en una primera área, donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, donde:

20 la primera área comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprenden un código de barras espacial y un dominio de captura; y una segunda área de la matriz comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprenden un código de barras espacial y un dominio de captura, y la segunda área es adyacente a la muestra biológica dispuesta en la matriz; (b) poner en contacto la segunda área de la matriz con una solución que comprende una sonda de bloqueo, donde la sonda de bloqueo comprende una secuencia que se une específicamente al dominio de captura de la sonda de captura en la segunda área de la matriz; (c) eliminar la solución residual que comprende la sonda de bloqueo de la segunda área de la matriz; (d) permeabilizar la muestra biológica, de manera que el dominio de captura de la sonda de captura de la primera área de la matriz se une específicamente al ácido nucleico diana; y (e) determinar (i) toda o una porción de una secuencia correspondiente al código de barras espacial de la sonda de captura de la primera área de la matriz, o un complemento del mismo, y (ii) toda o una porción de una secuencia correspondiente al ácido nucleico diana, o un complemento del mismo, y usar las secuencias de (i) y (ii) para determinar la ubicación del ácido nucleico diana en la muestra biológica.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, un extremo 3' de la sonda de bloqueo es sustancialmente complementario a aproximadamente 5 a 100 nucleótidos del dominio de captura de la sonda de captura en la segunda área. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la sonda de bloqueo es monocatenaria. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la sonda de bloqueo es al menos parcialmente bicatenaria. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, un extremo 5' de la sonda de bloqueo se fosforila. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la etapa (b) comprende además ligar el extremo 5' de la sonda de bloqueo a un extremo 3' de la sonda de captura en la segunda área. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, un extremo 3' de la sonda de bloqueo se bloquea químicamente. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el extremo 3' de la sonda de bloqueo se bloquea químicamente por un grupo azidometilo. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la sonda de bloqueo comprende una estructura en horquilla. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la sonda de bloqueo comprende un ácido nucleico bloqueado.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el método comprende además, entre las etapas (a) y (b), fijar y/o teñir la muestra biológica. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la muestra biológica no permeabilizada se fija y/o se tiñe antes de la etapa (a). En algunas modalidades, la etapa de fijar la muestra biológica comprende el uso de un fijador seleccionado del grupo de etanol, metanol, acetona, formaldehído, paraformaldehído-Tritón, glutaraldehído y sus combinaciones. En algunas modalidades, la etapa de tinción de la muestra biológica comprende el uso de una tinción biológica seleccionada del grupo de: naranja de acridina, marrón Bismarck, carmín, azul Coomassie, violeta de Cresilo, DAPI, eosina, bromuro de etidio, fucsina ácida, hematoxilina, tinciones Hoechst, yodo, verde metilo, azul de metileno, rojo neutro, azul Nilo, rojo Nilo, tetróxido de osmio, yoduro de propio, rodamina, safranina o sus combinaciones. En algunas modalidades, la etapa de tinción de la muestra biológica comprende el uso de eosina y hematoxilina. En algunas modalidades, la etapa de tinción de la muestra biológica comprende el uso de un

marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en un radioisótopo, un fluoróforo, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto bioluminiscente, o sus combinaciones.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la muestra biológica es una muestra de tejido. En algunas modalidades, la muestra de tejido es una sección de tejido. En algunas

5 modalidades, la sección de tejido es una sección de tejido fresca, congelada. En algunas modalidades, la muestra biológica es una muestra clínica. En algunas modalidades, la muestra clínica se selecciona del grupo de sangre completa, productos derivados de la sangre, células sanguíneas y sus combinaciones. En algunas modalidades, la muestra clínica es un tejido en cultivo. En algunas modalidades, la muestra clínica es células en cultivo. En algunas modalidades, la muestra clínica es una suspensión celular.

10 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la muestra biológica es un organoide, células madre embrionarias, células madre pluripotentes y sus combinaciones. En algunas modalidades, el organoide se selecciona del grupo de un organoide cerebral, un organoide intestinal, un organoide estomacal, un organoide lingual, un organoide tiroideo, un organoide tímico, un organoide testicular, un organoide

15 hepático, un organoide pancreático, un organoide epitelial, un organoide pulmonar, un organoide renal, un gastruloides, un organoide cardiaco, un organoide retiniano y sus combinaciones. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la muestra biológica incluye células enfermas, células fetales, células inmunitarias, macromoléculas celulares, orgánulos, polinucleótidos extracelulares y sus combinaciones.

20 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la eliminación en la etapa (c) comprende lavado. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la matriz comprende un portaobjetos. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la matriz es una matriz de perlas. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la determinación en la etapa (e) comprende secuenciar (i) toda o una porción

25 de la secuencia correspondiente al código de barras espacial de la sonda de captura de la primera área de la matriz, o un complemento del mismo, y (ii) toda o una porción de la secuencia correspondiente al ácido nucleico diana o un complemento del mismo. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la secuenciación es una secuenciación de alto rendimiento. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la determinación en la etapa (e) comprende extender un extremo

30 3' de la sonda de captura de la primera área de la matriz mediante el uso del ácido nucleico diana como una plantilla. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, en donde el analito diana es ADN. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el ADN es ADN genómico. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el analito diana es ARN. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la

35 presente descripción, el ARN es ARNm. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el método comprende además obtener imágenes de la muestra biológica después de la etapa (a).

También se describen en la presente descripción métodos para determinar una ubicación de un analito diana en una muestra biológica, el método comprende: (a) disponer una muestra biológica no permeabilizada sobre una matriz en una primera área, donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, donde: la primera

40 área comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprenden un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito; y una segunda área comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprenden un código de barras espacial y un dominio de captura, cuya segunda área es adyacente a la muestra biológica dispuesta en la matriz;

45 (b) poner en contacto una pluralidad de agentes de captura de analitos con la muestra biológica no permeabilizada, donde un agente de captura de analito de la pluralidad de agentes de captura de analito comprende un código de barras de resto de unión de analito, una secuencia de captura de analito, y un resto de unión al analito que se une específicamente al analito diana; (c) poner en contacto la segunda área de la matriz con una solución que comprende una sonda de bloqueo, donde la sonda de bloqueo comprende una secuencia que se une específicamente al dominio de captura de la sonda de captura en la segunda área de la matriz;

50 (d) eliminar la solución residual que comprende la sonda de bloqueo de la segunda área de la matriz; (e) permeabilizar la muestra biológica, de manera que el dominio de captura de la sonda de captura de la primera área de la matriz se une específicamente a la secuencia de captura de analito; y (f) determinar (i) toda o una porción de la secuencia del código de barras espacial de la sonda de captura en la primera área de la matriz, o un complemento del mismo, y

55 (ii) toda o una porción de la secuencia del código de barras del resto de unión al analito, o un complemento del mismo, y usar las secuencias de (i) y (ii) para determinar la ubicación del analito diana en la muestra biológica.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, un extremo 3' de la sonda de bloqueo es sustancialmente complementario a aproximadamente 5 a 100 nucleótidos del dominio de captura de la sonda de captura en la segunda área. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la sonda de bloqueo es monocatenaria. En algunas modalidades de

60 cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la sonda de bloqueo es parcialmente bicatenaria. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, un extremo 5' de la sonda de bloqueo se fosforila. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente

descripción, la etapa (c) comprende además ligar el extremo 5' de la sonda de bloqueo a un extremo 3' de la sonda de captura en la segunda área. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, un extremo 3' de la sonda de bloqueo se bloquea químicamente. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el bloqueo químico es un grupo azidometilo. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la sonda de bloqueo comprende una estructura en horquilla. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la sonda de bloqueo comprende un ácido nucleico bloqueado.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el método comprende además, entre las etapas (b) y (c), fijar la muestra biológica. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la muestra biológica no permeabilizada se fija y/o se tiñe antes de la etapa (a).

En algunas modalidades, la etapa de fijar la muestra biológica comprende el uso de un fijador seleccionado del grupo de etanol, metanol, acetona, formaldehído, paraformaldehído-Tritón, glutaraldehído y sus combinaciones. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la tinción de la muestra biológica comprende el uso de una tinción biológica seleccionada del grupo de: naranja de acridina, marrón Bismarck, carmín, azul Coomassie, violeta de Cresilo, DAPI, eosina, bromuro de etidio, fucsina ácida, hematoxilina, tinciones Hoechst, yodo, verde metilo, azul de metileno, rojo neutro, azul Nilo, rojo Nilo, tetróxido de osmio, yoduro de propio, rodamina o safranina y sus combinaciones. En algunas modalidades, la etapa de tinción de la muestra biológica comprende el uso de eosina y hematoxilina. En algunas modalidades, la etapa de tinción de la muestra biológica comprende el uso de un marcador detectable seleccionado del grupo de un radioisótopo, un fluoróforo, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto bioluminiscente, o sus combinaciones.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la muestra biológica es una muestra de tejido. En algunas modalidades, la muestra de tejido es una sección de tejido. En algunas modalidades, la sección de tejido es una sección de tejido fresca, congelada. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la muestra biológica es una muestra clínica. En algunas modalidades, la muestra clínica se selecciona del grupo de sangre completa, productos derivados de la sangre, células sanguíneas y sus combinaciones. En algunas modalidades, la muestra clínica es un tejido en cultivo. En algunas modalidades, la muestra clínica es células en cultivo. En algunas modalidades, la muestra clínica es una suspensión celular. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la muestra biológica es un organoide, células madre embrionarias, células madre pluripotentes y sus combinaciones. En algunas modalidades, el organoide se selecciona del grupo de un organoide cerebral, un organoide intestinal, un organoide estomacal, un organoide lingual, un organoide tiroideo, un organoide tímico, un organoide testicular, un organoide hepático, un organoide pancreático, un organoide epitelial, un organoide pulmonar, un organoide renal, un gastruloide, un organoide cardíaco, un organoide retiniano y sus combinaciones.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la muestra biológica incluye células enfermas, células fetales, células inmunitarias, macromoléculas celulares, orgánulos, polinucleótidos extracelulares y sus combinaciones. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la eliminación en la etapa (d) comprende lavado. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la matriz comprende un portaobjetos. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la matriz es una matriz de perlas.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la determinación en la etapa (f) comprende la secuenciación de (i) toda o una porción de la secuencia correspondiente al código de barras espacial de la sonda de captura en la primera área de la matriz, o un complemento de la misma, y (ii) toda o una porción de la secuencia correspondiente al código de barras del resto de unión al analito, o un complemento de la misma. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la secuenciación es una secuenciación de alto rendimiento. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la determinación en la etapa (f) comprende extender un extremo 3' de la sonda de captura de la primera área de la matriz mediante el uso del código de barras del resto de unión al analito como una plantilla. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el analito diana es una proteína. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la proteína es una proteína intracelular. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la proteína es una proteína extracelular. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el resto de unión al analito es un anticuerpo o un resto de unión al antígeno del mismo. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, las etapas (a) y (b) se realizan sustancialmente al mismo tiempo. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la etapa (a) se realiza antes de la etapa (b). En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la etapa (b) se realiza antes de la etapa (a). En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el método comprende además obtener imágenes de la muestra biológica después de la etapa (b).

También se describen en la presente descripción kits que comprenden una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprende un código de barras espacial y un dominio de captura; y una solución que comprende una sonda de bloqueo, donde la sonda de bloqueo comprende una secuencia que se une específicamente al dominio de captura de la sonda de captura.

En algunas modalidades de cualquiera de los kits descritos en la presente descripción, el/los kit(s) comprende(n) además uno o más fijadores. En algunas modalidades de cualquiera de los kits descritos en la presente descripción, el/los kit(s) comprenden además una o más tinciones biológicas. En algunas modalidades, una o más tinciones biológicas son eosina y hematoxilina. En algunas modalidades de cualquiera de los kits descritos en la

5 presente descripción, el/los kit(s) comprenden además uno o más reactivo(s) de permeabilización. En algunas modalidades de cualquiera de los kits descritos en la presente descripción, uno o más reactivo(s) de permeabilización se seleccionan del grupo de un solvente orgánico, un agente reticulante, un detergente, una enzima y sus combinaciones. En algunas modalidades de cualquiera de los kits descritos en la presente descripción, el kit comprende además una transcriptasa inversa. En algunas modalidades de cualquiera de los kits descritos en la presente descripción, el kit comprende además una desoxinucleotidil transferasa terminal. En algunas modalidades de cualquiera de los kits descritos en la presente descripción, el kit comprende además un oligonucleótido que cambia de plantilla. En algunas modalidades de cualquiera de los kits descritos en la presente descripción, el kit comprende además una ADN polimerasa. En algunas modalidades de cualquiera de los kits descritos en la presente descripción, el kit comprende además un cebador de segunda hebra. En algunas modalidades de cualquiera de los kits descritos en la presente descripción, el kit comprende además un tampón de fragmentación y una enzima de fragmentación. En algunas modalidades de cualquiera de los kits descritos en la presente descripción, el kit comprende además una ADN ligasa. En algunas modalidades, la ADN ligasa es una ADN ligasa T4. En algunas modalidades de cualquiera de los kits descritos en la presente descripción, el kit comprende además uno o más adaptador(es). En algunas modalidades, uno o más adaptador(es) se selecciona/n del grupo de una secuencia del índice de la muestra i5, una secuencia del índice de la muestra i7, una secuencia del índice de la muestra P5, una secuencia del índice de la muestra P7 y sus combinaciones.

También se describen en la presente descripción composición(es), que comprende/n una matriz, donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, donde: la primera área comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprenden un código de barras espacial y un dominio de captura unido específicamente a un analito diana de la muestra biológica; y una segunda área de la matriz comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprenden un código de barras espacial y un dominio de captura unido específicamente a una sonda de bloqueo, y la segunda área es adyacente a la muestra biológica dispuesta en la matriz.

30 En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, un extremo 3' de la sonda de bloqueo es sustancialmente complementario a aproximadamente 5 a 100 nucleótidos del dominio de captura de la sonda de captura en la segunda área. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, la sonda de bloqueo es monocatenaria. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, la sonda de bloqueo es parcialmente bicatenaria. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, un extremo 5' de la sonda de bloqueo se fosforila. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, la sonda de bloqueo se liga a un extremo 3' de la sonda de captura en la segunda área. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, un extremo 3' de la sonda de bloqueo se bloquea químicamente. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, el bloqueo químico es un grupo azidometilo.

35 40 En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, la sonda de bloqueo comprende una estructura en horquilla. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, la sonda de bloqueo comprende un ácido nucleico bloqueado.

45 En algunas modalidades, una muestra biológica se dispone en la primera área de la matriz. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, la muestra biológica es una muestra de tejido. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, la muestra de tejido es una sección de tejido. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, la muestra biológica es una muestra clínica. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, la muestra clínica se selecciona del grupo de sangre completa, productos derivados de la sangre, células sanguíneas y sus combinaciones. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, la muestra clínica es un tejido en cultivo. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, la muestra clínica es células en cultivo. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, la muestra clínica es una suspensión celular. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, la muestra biológica es un organoide, células madre embrionarias, células madre pluripotentes y sus combinaciones. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, el organoide se selecciona del grupo de un organoide cerebral, un organoide intestinal, un organoide intestinal, un organoide lingual, un organoide tiroideo, un organoide tímico, un organoide testicular, un organoide hepático, un organoide pancreático, un organoide epitelial, un organoide pulmonar, un organoide renal, un gastrulóide, un organoide cardiaco, un organoide retiniano y sus combinaciones. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, la muestra biológica incluye células enfermas, células fetales, células inmunitarias, macromoléculas celulares, orgánulos, polinucleótidos extracelulares y sus combinaciones.

En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, la matriz comprende un portaobjetos. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, la matriz es una matriz de perlas. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, el analito diana es ADN. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, el ADN es ADN genómico. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, el analito diana es ARN. En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, el ARN es ARNm.

5 Cuando los valores se describen en términos de intervalos, debe entenderse que la descripción incluye la descripción de todos los posibles subintervalos dentro de tales intervalos, así como también valores numéricos 10 específicos que caen dentro de tales intervalos independientemente de si se indica expresamente un valor numérico específico o un subintervalo específico.

10 El término “cada uno”, cuando se usa en referencia a una recopilación de artículos, pretende identificar un artículo individual en la recopilación pero no necesariamente se refiere a cada artículo en la recopilación, a menos que se 15 indique expresamente de cualquier otra manera, o a menos que el contexto del uso indique claramente de cualquier otra manera.

15 En la presente descripción se describen diversas modalidades de las características de esta descripción.

#### Descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos ilustran ciertas modalidades de las características y ventajas de esta descripción. Los 20 símbolos de referencia similares en los dibujos indican elementos similares.

20 La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de una sonda de captura con código de barras, como se describe en la presente descripción.

La Figura 2 muestra un ejemplo de difusión de ácidos nucleicos diana lejos de una muestra biológica hacia un área 25 no intencional de una matriz.

La Figura 3A muestra una sonda de bloqueo ilustrativa que comprende una estructura en horquilla unida a un dominio de captura de una sonda de captura.

La Figura 3B muestra una sonda de bloqueo de doble hebra ilustrativa unida a un dominio de captura de una sonda 30 de captura.

La Figura 4 muestra una modalidad ilustrativa de sondas de captura bloqueadas en el área de una matriz espacial que no está debajo de una muestra biológica, donde el bloqueo es la estructura en horquilla de la Figura 3A.

30 La Figura 5 muestra un esquema de un flujo de trabajo ilustrativo que utiliza una modalidad ilustrativa de los métodos descritos en la presente descripción.

#### Descripción detallada

35 El bloqueo de uno o más dominios de captura de sondas de captura en matrices espaciales (o porciones de las mismas) puede aumentar la eficiencia y/o disminuir la unión inespecífica de analitos en matrices (o porciones de las mismas). En algunos casos, una o más sondas de captura (por ejemplo, el dominio de captura de las sondas de captura) pueden bloquearse con una o más sondas de bloqueo. Un extremo 3' de una sonda de bloqueo puede ser sustancialmente complementario a aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos del dominio de captura. En la presente descripción se describen métodos, composiciones y kits, por ejemplo, para llevar a cabo estos métodos. En algunos casos, una porción de una matriz puede bloquearse y/o desbloquearse selectivamente.

40 Los métodos para reducir las interacciones espaciales inespecíficas en una matriz espacial se describen en la presente descripción. Los métodos en la presente descripción pueden mejorar la resolución de los resultados de la matriz espacial al reducir la unión inespecífica de analitos diana. Por ejemplo, los métodos en la presente descripción pueden reducir la unión inespecífica de los analitos diana mediante sondas de captura (por ejemplo, al bloquear el dominio de captura de las sondas de captura) no proximal al analito diana. En algunos casos, los analitos de una muestra biológica pueden difundirse en áreas de la matriz que son adyacentes a la muestra 45 biológica. Esto puede provocar que los analitos se unan a dominio(s) de captura de una o más sondas de captura adyacentes a la muestra biológica. La unión inespecífica aumenta los resultados de fondo (por ejemplo, resultados inespecíficos), que disminuye de esta manera la resolución. El bloqueo del dominio de captura de las sondas de captura que están adyacentes a la muestra biológica puede disminuir la unión inespecífica y aumentar la resolución 50 de los resultados.

55 Los métodos descritos en la presente descripción también pueden conservar recursos. Por ejemplo, en algunos casos, el análisis de matrices espaciales puede incluir la secuenciación. La unión inespecífica de analitos al dominio de captura de una o más sondas de captura puede resultar en la secuenciación de dianas no deseadas. La captura de analito inespecífico puede provocar ineficiencias de secuenciación aguas abajo, por ejemplo, una

disminución en la cantidad de secuenciación de analito diana debido a la secuenciación de analitos capturados inespecíficos es ineficiente y el reactivo costoso y puede resultar en una disminución en la resolución espacial. La presente descripción proporciona soluciones para mejorar y/o prevenir la captura de analito inespecífica en un portaobjetos de matriz.

- 5 Las metodologías y composiciones de análisis espacial descritas en la presente descripción pueden proporcionar una gran cantidad de analito y/o datos de expresión para una variedad de analitos dentro de una muestra biológica con alta resolución espacial, lo que mantiene al mismo tiempo el contexto espacial nativo. Los métodos y 10 composiciones de análisis espacial pueden incluir, por ejemplo, el uso de una sonda de captura que incluye un código de barras espacial (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que proporciona información sobre la ubicación o posición de un analito dentro de una célula o una muestra de tejido (por ejemplo, una célula de mamífero o una muestra de tejido de mamífero) y un dominio de captura que es capaz de unirse a un analito (por ejemplo, una proteína y/o un ácido nucleico) producido por y/o presente en una célula. Los métodos y 15 composiciones de análisis espacial también pueden incluir el uso de una sonda de captura que tiene un dominio de captura que captura un agente intermedio para la detección indirecta de un analito. Por ejemplo, el agente intermedio puede incluir una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, un código de barras) asociada con el agente intermedio. Por lo tanto, la detección del agente intermedio es indicativa del analito en la muestra de células o 20 tejido.

Los aspectos no limitantes de las metodologías y composiciones de análisis espacial se describen en las patentes de Estados Unidos núms 10,774,374, 10,724,078, 10,480,022, 10,059,990, 10,041,949, 10,002,316, 9,879,313, 25 9,783,841, 9,727,810, 9,593,365, 8,951,726, 8,604,182, 7,709,198, publicaciones de solicitudes de patentes de Estados Unidos núms. 2020/239946, 2020/080136, 2020/0277663, 2020/024641, 2019/330617, 2019/264268, 2020/256867, 2020/224244, 2019/194709, 2019/161796, 2019/085383, 2019/055594, 2018/216161, 2018/051322, 2018/0245142, 2017/241911, 2017/089811, 2017/067096, 2017/029875, 2017/0016053, 2016/108458, 2015/000854, 2013/171621, WO 2018/091676, WO 2020/176788, Rodrigues y otros, Science 363(6434):1463-1467, 2019; Lee y otros, Nat. Protoc. 10(3):442-458, 2015; Trejo y otros, PLoS ONE 14(2):e0212031, 2019; Chen y otros, Science 348(6233):aaa6090, 2015; Gao y otros, BMC Biol. 15:50, 2017; y Gupta y otros, Nature Biotechnol. 36:1197-1202, 2018; la Guía del usuario de los kits de reactivos de expresión genética espacial de Visium (por ejemplo, Rev C, con fecha de junio de 2020) y/o la Guía del usuario de los kits de reactivos de optimización de tejidos espaciales de Visium (por ejemplo, Rev C, con fecha de julio de 2020), ambas 30 disponibles en el sitio web de documentación de soporte de 10x Genomics y puede usarse en la presente descripción en cualquier combinación. En la presente descripción se describen aspectos adicionales no limitantes de las metodologías y composiciones de análisis espacial.

Alguna terminología general que puede usarse en esta descripción puede encontrarse en la Sección (I)(b) del documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663. 35 Típicamente, un "código de barras" es una etiqueta o identificador que transmite o es capaz de transmitir información (por ejemplo, información sobre un analito en una muestra, una perla y/o una sonda de captura). Un código de barras puede ser parte de un analito o independiente de un analito. Un código de barras puede unirse a un analito. Un código de barras particular puede ser único con relación a otros códigos de barras. A los efectos de esta descripción, un "analito" puede incluir cualquier sustancia, estructura, resto o componente biológico a analizar. 40 El término "diana" puede referirse de manera similar a un analito de interés.

Los analitos pueden clasificarse en términos generales en uno de dos grupos: analitos de ácidos nucleicos y analitos no ácidos nucleicos. Los ejemplos de analitos no ácidos nucleicos incluyen, pero sin limitarse a, lípidos, 45 carbohidratos, péptidos, proteínas, glicoproteínas (unidas a N o unidas a O), lipoproteínas, fosfoproteínas, variantes específicas de proteínas fosforiladas o acetiladas, variantes de amidación de proteínas, variantes de hidroxilación de proteínas, variantes de metilación de proteínas, variantes de ubiquitinación de proteínas, variantes de sulfatación de proteínas, proteínas virales (por ejemplo, cápside viral, envoltura viral, cubierta viral, accesorio viral, glicoproteínas virales, pico viral, etc.), proteínas extracelulares e intracelulares, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno. En algunas modalidades, el(los) analito(s) puede(n) localizarse en ubicación(ones) 50 subcelular(es), incluida(s), por ejemplo, orgánulos, por ejemplo, mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, cloroplastos, vesículas endocíticas, vesículas exocíticas, vacuolas, lisosomas, etc. En algunas modalidades, el(los) analito(s) puede(n) ser péptidos o proteínas, incluidos sin limitación, anticuerpos y enzimas. Pueden encontrarse ejemplos adicionales de analitos en la Sección (I)(c) del documento WO 2020/176788 y/o en 55 la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663. En algunas modalidades, un analito puede detectarse indirectamente, tal como mediante la detección de un agente intermedio, por ejemplo, un producto de ligazón o un agente de captura del analito (por ejemplo, un anticuerpo conjugado con oligonucleótido), tales como los descritos en la presente descripción.

Una "muestra biológica" se obtiene típicamente del sujeto para su análisis mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas que incluyen, pero sin limitarse a, biopsia, cirugía y microscopía de captura láser (LCM), y generalmente incluye células y/u otro material biológico del sujeto. En algunas modalidades, una muestra biológica puede ser una sección de tejido. En algunas modalidades, una muestra biológica puede ser una muestra biológica fijada y/o teñida (por ejemplo, una sección de tejido fijada y/o teñida). Los ejemplos no limitantes de tinciones incluyen tinciones histológicas (por ejemplo, hematoxilina y/o eosina) y tinciones inmunológicas (por ejemplo, 60

tinciones fluorescentes). En algunas modalidades, pueden obtenerse imágenes de una muestra biológica (por ejemplo, una muestra biológica fijada y/o teñida). Las muestras biológicas también se describen en la Sección (I)(d) del documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

5 En algunas modalidades, una muestra biológica se permeabiliza con uno o más reactivos de permeabilización. Por ejemplo, la permeabilización de una muestra biológica puede facilitar la captura del analito. Las condiciones y agentes de permeabilización ilustrativos se describen en la Sección (I)(d)(ii)(13) o la Sección de modalidades ilustrativas del documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

10 Los métodos de análisis espacial basados en matrices implican la transferencia de uno o más analitos de una muestra biológica a una serie de características en un sustrato, donde cada característica está asociada con una ubicación espacial única en la matriz. El análisis subsecuente de los analitos transferidos incluye determinar la identidad de los analitos y la ubicación espacial de los analitos dentro de la muestra biológica. La ubicación espacial de un analito dentro de la muestra biológica se determina basándose en la característica a la que está unido el analito (por ejemplo, directa o indirectamente) en la matriz, y la ubicación espacial relativa de la característica dentro de la matriz.

15 Una "sonda de captura" se refiere a cualquier molécula capaz de capturar (directa o indirectamente) y/o marcar un analito (por ejemplo, un analito de interés) en una muestra biológica. En algunas modalidades, la sonda de captura es un ácido nucleico o un polipéptido. En algunas modalidades, la sonda de captura incluye un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un identificador molecular único (UMI)) y un dominio de captura. En algunas modalidades, una sonda de captura puede incluir un dominio de escisión y/o un dominio funcional (por ejemplo, un sitio de unión a cebador, tal como para secuenciación de nueva generación (NGS)). Ver, por ejemplo, la Sección (II)(b) (por ejemplo, las subsecciones (i)-(vi)) del documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663. La generación de sondas de captura puede lograrse mediante cualquier método apropiado, incluidos los descritos en la Sección (II)(d)(ii) del documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

20 En algunas modalidades, puede detectarse más de un tipo de analito (por ejemplo, ácidos nucleicos y proteínas) de una muestra biológica (por ejemplo, simultánea o secuencialmente) mediante el uso de cualquier técnica en formato múltiple apropiada, tales como las descritas en la Sección (IV) del documento WO 2020/176788 y/o publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

25 En algunas modalidades, la detección de uno o más analitos (por ejemplo, analitos proteicos) puede realizarse mediante el uso de uno o más agentes de captura del analito. Como se usa en la presente, un "agente de captura del analito" se refiere a un agente que interactúa con un analito (por ejemplo, un analito en una muestra biológica) y con una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura unida a un sustrato o una característica) para identificar el analito. En algunas modalidades, el agente de captura del analito incluye: (i) un resto de unión al analito (por ejemplo, que se une a un analito), por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo; (ii) código de barras del resto de unión al analito; y (iii) una secuencia de captura del analito. Como se usa en la presente, el término "código de barras del resto de unión al analito" se refiere a un código de barras que está asociado con, o de cualquier otra manera, identifica el resto de unión al analito. Como se usa en la presente, el término "secuencia de captura del analito" se refiere a una región o resto configurado para hibridarse, unirse, acoplarse o interactuar de cualquier otra manera con un dominio de captura de una sonda de captura. En algunos casos, un código de barras del resto de unión al analito (o una porción del mismo) puede eliminarse (por ejemplo, escindirse) del agente de captura del analito. Puede encontrarse una descripción adicional de los agentes de captura del analito en la Sección (II)(b)(ix) del documento WO 2020/176788 y/o en la Sección (II)(b)(viii) de la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

30 Existen al menos dos métodos para asociar un código de barras espacial con una o más células vecinas, de manera que el código de barras espacial identifique una o más células, y/o el contenido de una o más células, como asociado con una ubicación espacial particular. Un método es promover analitos o sustitutos de analitos (por ejemplo, agentes intermedios) fuera de una célula y hacia una matriz con código de barras espacial (por ejemplo, incluyendo sondas de captura con código de barras espaciales). Otro método consiste en escindir sondas de captura con códigos de barras espaciales de una matriz y promover las sondas de captura con códigos de barras espaciales hacia y/o dentro o sobre la muestra biológica.

35 En algunos casos, las sondas de captura pueden configurarse para cebar, replicar y, en consecuencia, producir productos de extensión opcionalmente con códigos de barra a partir de una plantilla (por ejemplo, una plantilla de ADN o ARN, tal como un analito o un agente intermedio (por ejemplo, un producto de ligazón o un agente de captura de analito), o una porción del mismo), o derivados de los mismos (ver, por ejemplo, la Sección (II)(b)(vii) del documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663 con respecto a sondas de captura extendidas). En algunos casos, las sondas de captura pueden configurarse para formar productos de ligazón con una plantilla (por ejemplo, una plantilla de ADN o ARN, tal como un analito o un

agente intermedio, o una porción del mismo), para crear de esta manera productos de ligazón que sirven como sustitutos de una plantilla.

Como se usa en la presente, una "sonda de captura extendida" se refiere a una sonda de captura que tiene nucleótidos adicionales añadidos al extremo (por ejemplo, extremo 3' o 5') de la sonda de captura, para extender de esta manera la longitud total de la sonda de captura. Por ejemplo, un "extremo 3' extendido" indica que se añadieron nucleótidos adicionales al nucleótido más 3' de la sonda de captura para extender la longitud de la sonda de captura, por ejemplo, mediante reacciones de polimerización usadas para extender moléculas de ácido nucleico, incluida la polimerización con plantilla catalizada por una polimerasa (por ejemplo, una ADN polimerasa o una transcriptasa inversa). En algunas modalidades, extender la sonda de captura incluye añadir a un extremo 3' de una sonda de captura una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico de un analito o agente intermedio unido específicamente al dominio de captura de la sonda de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura se extiende mediante el uso de transcripción inversa. En algunas modalidades, la sonda de captura se extiende mediante el uso de una o más ADN polimerasas. Las sondas de captura extendidas incluyen la secuencia de la sonda de captura y la secuencia del código de barras espacial de la sonda de captura.

En algunas modalidades, las sondas de captura extendidas se amplifican (por ejemplo, en solución a granel o en la matriz) para producir cantidades que son suficientes para el análisis aguas abajo, por ejemplo, mediante secuenciación de ADN. En algunas modalidades, las sondas de captura extendidas (por ejemplo, moléculas de ADN) actúan como plantillas para una reacción de amplificación (por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa).

Variantes adicionales de métodos de análisis espacial, que incluyen, en algunas modalidades, una etapa de obtención de imágenes, se describen en la Sección (II)(a) del documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663. Análisis de analitos capturados (y/o agentes intermedios o porciones de los mismos), por ejemplo, incluyendo extracción de muestras, extensión de sondas de captura, secuenciación (por ejemplo, de una sonda de captura extendida escindida y/o una molécula de ADNc complementaria a una sonda de captura extendida), la secuenciación en la matriz (por ejemplo, mediante el uso de, por ejemplo, enfoques de hibridación *in situ* o ligazón *in situ*), análisis temporal y/o captura de proximidad, se describe en la Sección (II)(g) del documento WO 2020/176788 y/o publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663. Algunas mediciones de control de calidad se describen en la Sección (II)(h) del documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

La información espacial puede proporcionar información de importancia biológica y/o médica. Por ejemplo, los métodos y composiciones descritos en la presente descripción pueden permitir: la identificación de uno o más biomarcadores (por ejemplo, de diagnóstico, pronóstico y/o para la determinación de la eficacia de un tratamiento) de una enfermedad o trastorno; identificación de una diana farmacológica candidato para el tratamiento de una enfermedad o trastorno; identificación (por ejemplo, diagnóstico) de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno; identificación de la etapa y/o pronóstico de una enfermedad o trastorno en un sujeto; identificación de un sujeto que tiene una mayor posibilidad de desarrollar una enfermedad o trastorno; seguimiento de la progresión de una enfermedad o trastorno en un sujeto; determinación de la eficacia de un tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto; identificación de una subpoblación de pacientes para la cual un tratamiento es efectivo para una enfermedad o trastorno; modificación de un tratamiento de un sujeto con una enfermedad o trastorno; selección de un sujeto para la participación en un ensayo clínico; y/o selección de un tratamiento para un sujeto con una enfermedad o trastorno.

La información espacial puede proporcionar información de importancia biológica. Por ejemplo, los métodos y composiciones descritos en la presente descripción pueden permitir: identificación de perfiles de expresión del transcriptoma y/o proteoma (por ejemplo, en tejido sano y/o enfermo); identificación de múltiples tipos de analitos muy cercanos (por ejemplo, análisis del vecino más cercano); determinación de genes y/o proteínas regulados positivamente y/o negativamente en tejido enfermo; caracterización de microambientes tumorales; caracterización de respuestas inmunitarias tumorales; caracterización de tipos celulares y su colocación en tejido; e identificación de variantes genéticas dentro de los tejidos (por ejemplo, basadas en los perfiles de expresión de genes y/o proteínas asociados con biomarcadores de enfermedades o trastornos específicos).

Típicamente, para los métodos basados en matrices espaciales, un sustrato funciona como soporte para la unión directa o indirecta de sondas de captura a características de la matriz. Una "característica" es una entidad que actúa como soporte o depósito de diversas entidades moleculares usadas en el análisis espacial. En algunas modalidades, algunas o todas las características de una matriz están funcionalizadas para la captura del analito. Se describen sustratos ilustrativos en la Sección (II)(c) del documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663. Pueden encontrarse características y atributos geométricos ilustrativos de una matriz en las Secciones (II)(d)(i), (II)(d)(iii) y (II)(d)(iv) del documento WO 2020/176788 y/o publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

Generalmente, los analitos y/o agentes intermedios (o porciones de los mismos) pueden capturarse cuando se pone en contacto una muestra biológica con un sustrato que incluye sondas de captura (por ejemplo, un sustrato

con sondas de captura incrustadas, manchadas, impresas, fabricadas sobre el sustrato, o un sustrato con características (por ejemplo, perlas, pocillos) que comprenden sondas de captura). Como se usa en la presente, "contacto", "contactado" y/o "poner en contacto", una muestra biológica con un sustrato se refiere a cualquier contacto (por ejemplo, directo o indirecto) de manera que las sondas de captura puedan interactuar (por ejemplo, unirse covalentemente o no covalentemente (por ejemplo, hibridarse)) con analitos de la muestra biológica. La captura puede lograrse de forma activa (por ejemplo, mediante el uso de electroforesis) o pasivamente (por ejemplo, mediante el uso de difusión). La captura de analitos se describe con más detalle en la Sección (II)(e) del documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

5 En algunos casos, el análisis espacial puede realizarse mediante la unión y/o introducción de una molécula (por ejemplo, un péptido, un lípido o una molécula de ácido nucleico) que tiene un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial) a una muestra biológica (por ejemplo, a una célula en una muestra biológica). En algunas modalidades, una pluralidad de moléculas (por ejemplo, una pluralidad de moléculas de ácido nucleico) que tienen una pluralidad de códigos de barras (por ejemplo, una pluralidad de códigos de barras espaciales) se introducen en una muestra biológica (por ejemplo, en una pluralidad de células en una muestra biológica) para su uso en análisis espacial. En algunas modalidades, después de unir y/o introducir una molécula que tiene un código de barras a una muestra biológica, la muestra biológica puede separarse físicamente (por ejemplo, disociarse) en células individuales o grupos de células para su análisis. Algunos de estos métodos de análisis espacial se describen en la Sección (III) del documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

10 15 En algunos casos, el análisis espacial puede realizarse mediante la detección de múltiples oligonucleótidos que se hibridan con un analito. En algunos casos, por ejemplo, el análisis espacial puede realizarse mediante el uso de ligazón con plantilla de ARN (RTL). Los métodos de RTL se han descrito anteriormente. Ver, por ejemplo, Credle y otros, *Nucleic Acids Res.* 21 de agosto de 2017;45(14):e128. Típicamente, RTL incluye la hibridación de dos oligonucleótidos con secuencias adyacentes en un analito (por ejemplo, una molécula de ARN, tal como una molécula de ARNm). En algunos casos, los oligonucleótidos son moléculas de ADN. En algunos casos, uno de los oligonucleótidos incluye al menos dos bases de ácido ribonucleico en el extremo 3' y/o el otro oligonucleótido incluye un nucleótido fosforilado en el extremo 5'. En algunos casos, uno de los dos oligonucleótidos incluye un dominio de captura (por ejemplo, una secuencia poli(A), una secuencia no homopolimérica). Después de la hibridación con el analito, una ligasa (por ejemplo, ligasa SplintR) liga los dos oligonucleótidos juntos, lo que crea un producto de ligazón. En algunos casos, los dos oligonucleótidos se hibridan con secuencias que no son adyacentes entre sí. Por ejemplo, la hibridación de los dos oligonucleótidos crea un espacio entre los oligonucleótidos hibridados. En algunos casos, una polimerasa (por ejemplo, una ADN polimerasa) puede extender uno de los oligonucleótidos antes de la ligazón. Después de la ligazón, el producto de ligazón se libera del analito. En algunos casos, el producto de ligazón se libera mediante el uso de una endonucleasa (por ejemplo, ARNasa H). El producto de ligazón liberado puede capturarse a continuación mediante sondas de captura (por ejemplo, en lugar de la captura directa de un analito) en una matriz, opcionalmente amplificarse y secuenciararse, para determinar de este modo la ubicación y opcionalmente la abundancia del analito en la muestra biológica.

20 25 30 35 40 45 Durante el análisis de información espacial, se obtiene información de secuencia para un código de barras espacial asociado con un analito, y la información de secuencia puede usarse para proporcionar información sobre la distribución espacial del analito en la muestra biológica. Pueden usarse varios métodos para obtener la información espacial. En algunas modalidades, sondas de captura específicas y los analitos que capturan están asociados con ubicaciones específicas en una serie de características en un sustrato. Por ejemplo, pueden asociarse códigos de barras espaciales específicos con ubicaciones de matriz específicas antes de la fabricación de la matriz, y las secuencias de los códigos de barras espaciales pueden almacenarse (por ejemplo, en una base de datos) junto con información de ubicación de matriz específica, de modo que cada código de barras espacial se asigne de forma única a una ubicación particular de la matriz.

50 Alternativamente, pueden depositarse códigos de barras espaciales específicos en ubicaciones predeterminadas en una serie de características durante la fabricación, de manera que en cada ubicación, solo esté presente un tipo de código de barras espacial, de modo que los códigos de barras espaciales estén asociados de forma única con una única característica de la matriz. Cuando sea necesario, las matrices pueden decodificarse mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción de modo que los códigos de barras espaciales se asocien de forma única con las ubicaciones de las características de la matriz, y este mapeo puede almacenarse como se describió anteriormente.

55 60 Cuando se obtiene información de secuencia para sondas y/o analitos de captura durante el análisis de información espacial, las ubicaciones de las sondas y/o analitos de captura pueden determinarse haciendo referencia a la información almacenada que asocia de forma única cada código de barras espacial con una ubicación de característica de matriz. De esta manera, las sondas de captura específicas y los analitos capturados se asocian con ubicaciones específicas en el conjunto de características. Cada ubicación de característica de matriz representa una posición con relación a un punto de referencia de coordenadas (por ejemplo, una ubicación de matriz, un marcador fiducial) para la matriz. En consecuencia, cada ubicación de característica tiene una "dirección" o ubicación en el espacio de coordenadas de la matriz.

- Algunos flujos de trabajo de análisis espacial ilustrativos se describen en la sección modalidades ilustrativas del documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663. Ver, por ejemplo, la modalidad ilustrativa que comienza con "En algunos ejemplos no limitantes de los flujos de trabajo descritos en la presente descripción, la muestra puede sumergirse..." del documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663. Ver también, por ejemplo, la Guía del usuario de los kits de reactivos de expresión genética espacial de Visium (por ejemplo, Rev C, con fecha de junio de 2020) y/o la Guía del usuario de los kits de reactivos de optimización de tejidos espaciales de Visium (por ejemplo, Rev C, con fecha de julio de 2020).
- En algunas modalidades, el análisis espacial puede realizarse mediante el uso de hardware y/o software dedicado, tal como cualquiera de los sistemas descritos en las Secciones (II)(e)(ii) y/o (V) de los documentos WO 2020/176788 y/o publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663, o cualquiera de uno o más de los dispositivos o métodos descritos en las Secciones *Control Slide for Imaging, Methods of Using Control Slides and Substrates for, Systems of Using Control Slides and Substrates for Imaging, y/o Sample and Array Alignment Devices and Methods, Informational labels* del documento WO 2020/123320.
- Los sistemas adecuados para realizar análisis espacial pueden incluir componentes tales como una cámara (por ejemplo, una celda de flujo o una cámara hermética y sellable) para contener una muestra biológica. La muestra biológica puede montarse, por ejemplo, en un soporte para muestras biológicas. Pueden conectarse una o más cámaras de fluido a la cámara y/o al portamuestras a través de conductos de fluido, y los fluidos se pueden suministrar a la cámara y/o al portamuestras a través de bombas fluídicas, fuentes de vacío u otros dispositivos acoplados a los conductos de fluido que crean un gradiente de presión para impulsar el flujo de fluido. También pueden conectarse una o más válvulas a conductos de fluido para regular el flujo de reactivos desde los depósitos hasta la cámara y/o el portamuestras.
- Los sistemas pueden incluir opcionalmente una unidad de control que incluye uno o más procesadores electrónicos, una interfaz de entrada, una interfaz de salida (tal como una pantalla) y una unidad de almacenamiento (por ejemplo, un medio de almacenamiento de estado sólido tal como, pero sin limitarse a, un medio de almacenamiento magnético, óptico u otro de estado sólido, persistente, grabable y/o regrabable). Opcionalmente, la unidad de control puede conectarse a uno o más dispositivos remotos a través de una red. La unidad de control (y sus componentes) generalmente puede realizar cualquiera de las etapas y funciones descritas en la presente descripción. Cuando el sistema está conectado a un dispositivo remoto, el dispositivo (o dispositivos) remoto(s) puede(n) realizar cualquiera de las etapas o características descritas en la presente descripción. Los sistemas pueden incluir opcionalmente uno o más detectores (por ejemplo, CCD, CMOS) usados para capturar imágenes. Los sistemas también pueden incluir opcionalmente una o más fuentes de luz (por ejemplo, basadas en LED, basadas en diodos, láseres) para iluminar una muestra, un sustrato con características, analitos de una muestra biológica capturada en un sustrato y diversos medios de control y calibración.
- Los sistemas pueden incluir opcionalmente instrucciones de software codificadas y/o implementadas en uno o más medios de almacenamiento tangibles y componentes de hardware tales como circuitos integrados de aplicaciones específicas. Las instrucciones de software, cuando son ejecutadas por una unidad de control (y en particular, un procesador electrónico) o un circuito integrado, pueden hacer que la unidad de control, circuito integrado u otro componente que ejecuta las instrucciones de software realice cualquiera de las etapas o funciones del método descritos en la presente descripción.
- En algunos casos, los sistemas descritos en la presente descripción pueden detectar (por ejemplo, registrar una imagen) la muestra biológica en la matriz. En la solicitud PCT núm. 2020/061064 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2021/0150707 se describen métodos ilustrativos para detectar la muestra biológica en una matriz.
- Antes de transferir analitos de la muestra biológica al conjunto de características del sustrato, la muestra biológica puede alinearse con la matriz. La alineación de una muestra biológica y una matriz de características que incluyen sondas de captura pueden facilitar el análisis espacial, que puede usarse para detectar diferencias en la presencia y/o nivel de analito dentro de diferentes posiciones en la muestra biológica, por ejemplo, para generar un mapa tridimensional de la presencia y/o nivel del analito. En la solicitud PCT núm. 2020/053655 se describen métodos ilustrativos para generar un mapa bidimensional y/o tridimensional de la presencia y/o nivel del analito y los métodos de análisis espacial se describen generalmente en el documento WO 2020/061108 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2021/0155982.
- En algunos casos, un mapa de presencia y/o nivel de analito puede alinearse con una imagen de una muestra biológica mediante el uso de uno o más marcadores fiduciales, por ejemplo, objetos colocados en el campo de visión de un sistema de imágenes que aparecen en la imagen producida, como se describe en la Sección *Substrate Attributes, Control Slide for Imaging* del documento WO 2020/123320, solicitud PCT núm. 2020/061066 y/o publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2021/018522. Los marcadores fiduciales pueden usarse como punto de referencia o escala de medición para la alineación (por ejemplo, para alinear una muestra y una matriz, para alinear dos sustratos, para determinar una ubicación de una muestra o matriz en un sustrato con relación a un marcador fiducial) y/o para mediciones cuantitativas de tamaños y/o distancias.

## Métodos para reducir las interacciones espaciales inespecíficas en una matriz espacial

Las matrices de tejidos espaciales permiten a un investigador identificar la expresión génica, las ubicaciones de las proteínas y otro seguimiento de la actividad celular de manera espacial. Los beneficios de correlacionar las relaciones biológicas espaciales con enfermedades y trastornos hacen, y seguirán haciendo avanzar muchos

5 campos del estudio científico. Sin embargo, las mejoras en la resolución de las relaciones espaciales entre las activaciones celulares y las enfermedades y los trastornos mejorarían esos datos. Por ejemplo, cuando una muestra biológica (por ejemplo, una sección de tejido) fija a un portaobjetos de matriz espacial se permeabiliza para liberar analitos de interés algunos de los analitos del tejido pueden, mediante difusión, moverse a áreas de la matriz donde no hay muestra biológica (por ejemplo, sección de tejido), por ejemplo adyacente a una muestra biológica, donde puede ocurrir la captura de analito espacial inespecífica. Este tipo de captura de analito espacial inespecífica puede disminuir la resolución de los datos de analito espacial deseados. Además, la captura de analito inespecífica puede provocar ineficiencias en la secuenciación aguas abajo; una disminución en la cantidad de secuenciación de analito diana debido a que la secuenciación de analitos capturados inespecíficos es ineficiente y el reactivo costoso. La presente descripción proporciona soluciones para mejorar y/o prevenir la captura de analito inespecífica en un portaobjetos de matriz.

10 En la presente descripción se describen métodos para reducir la captura de analito inespecífica en una muestra biológica no permeabilizada (por ejemplo, cualquiera de las muestras biológicas ilustrativas descritas en la presente descripción) que incluyen: (a) disponer una muestra biológica no permeabilizada sobre una matriz (por ejemplo, cualquiera de las matrices descritas en la presente descripción) en una primera área (por ejemplo, cualquiera de

20 las primeras áreas descritas en la presente descripción), donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura (por ejemplo, cualquiera de las sondas de captura ilustrativas descritas en la presente descripción), donde: la primera área comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprenden un código de barras espacial (por ejemplo, cualquiera de los códigos de barras espaciales ilustrativos descritos en la presente descripción) y un dominio de captura (por ejemplo, cualquiera de los dominios de captura ilustrativos descritos en

25 la presente descripción); y una segunda área (por ejemplo, cualquiera de las segundas áreas descritas en la presente descripción) de la matriz comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura (por ejemplo, cualquiera de las sondas de captura descritas en la presente descripción) que comprende un código de barras espacial (por ejemplo, cualquiera de los códigos de barras espaciales descritos en la presente descripción) y un dominio de captura (por ejemplo, cualquiera de los dominios de captura descritos en la presente descripción),

30 y la segunda área es adyacente a la muestra biológica dispuesta en la matriz; (b) poner en contacto la matriz con una solución que comprende al menos una sonda de bloqueo (por ejemplo, cualquiera de las sondas de bloqueo ilustrativas descritas en la presente descripción), donde al menos una sonda de bloqueo comprende una secuencia que se une específicamente al dominio de captura de la sonda de captura en la segunda área de la matriz; (c) eliminar la solución residual de la matriz (por ejemplo, lavar la matriz mediante el uso de cualquiera de los métodos

35 para eliminar soluciones y/o bloquear sondas descritas en la presente descripción); (d) permeabilizar la muestra biológica (por ejemplo, mediante el uso de cualquiera de los métodos para permeabilizar una muestra biológica descrita en la presente descripción), de manera que el dominio de captura de la sonda de captura de la primera área de la matriz se une específicamente al ácido nucleico diana y se reduce la captura de ácido nucleico diana en la segunda área.

40 40 La muestra biológica puede ser cualquiera de las muestras biológicas descritas en la presente descripción. Por ejemplo, en algunas modalidades, la muestra biológica es una muestra de tejido (por ejemplo, una sección de tejido). En otras modalidades, la muestra biológica es una muestra clínica (por ejemplo, sangre completa, productos derivados de la sangre, células sanguíneas, tejido en cultivo, células en cultivo o una suspensión celular). En algunas modalidades, la muestra biológica es un organoide, células madre embrionarias, células madre

45 pluripotentes o cualquiera de sus combinaciones. Los ejemplos no limitantes de un organoide incluyen un organoide cerebral, un organoide intestinal, un organoide estomacal, un organoide lingual, un organoide tiroideo, un organoide tímico, un organoide testicular, un organoide hepático, un organoide pancreático, un organoide epitelial, un organoide pulmonar, un organoide renal, un gastrulóide, un organoide cardiaco, un organoide retiniano o cualquiera de sus combinaciones. En otras modalidades ilustrativas, la muestra biológica puede incluir células

50 enfermas, células fetales, células inmunitarias, macromoléculas celulares, orgánulos, polinucleótidos extracelulares o cualquiera de sus combinaciones.

Los ejemplos no limitantes de un ácido nucleico diana incluyen analitos de ADN tales como ADN genómico, ADN metilado, secuencias de ADN metilado específicas, ADN fragmentado, ADN mitocondrial, productos de PCR sintetizados in situ y ADN viral.

55 Los ejemplos no limitantes de un ácido nucleico diana incluyen además analitos de ARN tales como diversos tipos de ARN codificante y no codificante. Los ejemplos de los diferentes tipos de analitos de ARN incluyen ARN mensajero (ARNm), ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), microARN (miARN) y ARN viral. El ARN puede ser un transcripto (por ejemplo, presente en una sección de tejido). El ARN puede ser pequeño (por ejemplo, menor que 200 bases de ácido nucleico de longitud) o grande (por ejemplo, ARN mayor que 200 bases de ácido nucleico de longitud). Los ARN pequeños incluyen principalmente ARN ribosómico (ARNr) 5.8S, ARNr

60 5S, ARN de transferencia (ARNt), microARN (miARN), ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN nucleolar pequeño (ARNnp), ARN de interacción Piwi (ARNp), ARN derivado de ARNt pequeño (ARNatp) y ARN derivado

de ADNr pequeño (ARNarp). El ARN puede ser ARN bicatenario o ARN monocatenario. El ARN puede ser ARN circular. El ARN puede ser un ARNr bacteriano (por ejemplo, ARNr 16s o ARNr 23s). El ARN puede ser de un virus de ARN, por ejemplo, virus de ARN del Grupo III, IV o V del sistema de clasificación Baltimore. El ARN puede ser de un retrovirus, tal como un virus del Grupo VI del sistema de clasificación Baltimore.

- 5 En algunas modalidades, el ácido nucleico diana puede incluir al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 mutaciones que provocan enfermedades (por ejemplo, mutaciones que provocan cáncer). En algunas modalidades, el ácido nucleico diana incluye un polimorfismo de un solo nucleótido, amplificación génica o translocación, eliminación o inserción cromosómica.

10 En algunas modalidades, la muestra biológica puede fijarse (por ejemplo, entre las etapas (a) y (b)) la muestra biológica puede fijarse mediante el uso de cualquiera de las técnicas descritas en la presente descripción o conocidas en la técnica). En algunas modalidades, la fijación de la muestra biológica comprende el uso de un fijador seleccionado del grupo de etanol, metanol, acetona, formaldehído, formalina, paraformaldehído-Tritón, glutaraldehído, o cualquiera de sus combinaciones. En algunas modalidades, una muestra biológica es una muestra de tejido fijada en formalina y embebida en parafina.

- 15 En algunas modalidades, la muestra biológica puede teñirse y/u obtener imágenes mediante el uso de cualquiera de las técnicas descritas en la presente descripción o conocidas en la técnica (por ejemplo, la muestra biológica puede teñirse y/u obtener imágenes entre las etapas (a) y (b)). En algunas modalidades, la tinción incluye marcadores ópticos como se describe en la presente descripción, que incluyen, pero sin limitarse a, marcadores detectables fluorescentes (por ejemplo, fluoróforos), radioactivos (por ejemplo, radioisótopos), quimioluminiscentes (por ejemplo, un compuesto quimioluminiscente), un compuesto bioluminiscente, calorimétrico o colorimétrico. En algunas modalidades, la tinción incluye un anticuerpo fluorescente dirigido a un analito diana (por ejemplo, proteínas de la superficie celular o intracelulares) en la muestra biológica. En algunas modalidades, la tinción incluye una tinción inmunohistoquímica dirigida a un analito diana (por ejemplo, proteínas de la superficie celular o intracelulares) en la muestra biológica. En algunas modalidades, la tinción incluye una tinción química, tal como 20 hematoxilina y eosina (H&E) o ácido peryódico de Schiff (PAS). En algunas modalidades, la tinción de la muestra biológica comprende el uso de una tinción biológica que incluye, pero sin limitarse a, naranja de acridina, marrón Bismarck, carmín, azul Coomassie, violeta de Cresilo, DAPI, eosina, bromuro de etidio, fucsina ácida, hematoxilina, tinciones Hoechst, yodo, verde metilo, azul de metileno, rojo neutro, azul Nilo, rojo Nilo, tetróxido de osmio, yoduro de propidio, rodamina, safranina o cualquiera de sus combinaciones. En algunas modalidades, puede transcurrir 25 un tiempo significativo (por ejemplo, días, meses o años) entre la tinción y/o la obtención de imágenes de la muestra biológica.
- 30

#### Métodos para determinar la ubicación de un analito diana

También se describen en la presente descripción métodos para determinar una ubicación de un analito diana en una muestra biológica no permeabilizada que incluyen: (a) disponer una muestra biológica no permeabilizada sobre 35 una matriz (por ejemplo, cualquiera de las matrices ilustrativas descritas en la presente descripción) en una primera área (por ejemplo, cualquiera de las primeras áreas descritas en la presente descripción), donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura (por ejemplo, cualquiera de las sondas de captura ilustrativas descritas en la presente descripción), donde: la primera área comprende una sonda de captura (por ejemplo, cualquiera de las sondas de captura descritas en la presente descripción) de la pluralidad de sondas de captura 40 que comprenden un código de barras espacial (por ejemplo, cualquiera de los códigos de barras espaciales descritos en la presente descripción) y un dominio de captura (por ejemplo, cualquiera de los dominios de captura descritos en la presente descripción) que se unen específicamente a la secuencia de captura del analito; y una segunda área (por ejemplo, cualquiera de las segundas áreas descritas en la presente descripción) comprende una sonda de captura (por ejemplo, cualquiera de las sondas de captura descritas en la presente descripción) de 45 la pluralidad de sondas de captura que comprenden un código de barras espacial (por ejemplo, cualquiera de los códigos de barras espaciales descritos en la presente descripción) y un dominio de captura (por ejemplo, cualquiera de los dominios de captura descritos en la presente descripción), cuya segunda área es adyacente a la muestra biológica dispuesta en la matriz; (b) poner en contacto una pluralidad de agentes capturadores de analitos (por ejemplo, cualquiera de los agentes de captura de analito descritos en la presente descripción) con la muestra biológica no permeabilizada (por ejemplo, cualquiera de las muestras biológicas descritas en la presente descripción), donde un agente de captura de analito de la pluralidad de agentes de captura de analito comprende 50 un código de barras del resto de unión al analito (por ejemplo, cualquiera de los códigos de barras del resto de unión al analito descritos en la presente descripción), una secuencia de captura de analito (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de captura de analito descritas en la presente descripción), y un resto de unión al analito (por ejemplo, cualquiera de los restos de unión al analito descritos en la presente descripción) que se unen específicamente al analito diana; (c) poner en contacto la matriz con una solución que comprende una sonda de 55 bloqueo (por ejemplo, cualquiera de las sondas de bloqueo descritas en la presente descripción), donde la sonda de bloqueo comprende una secuencia que se une específicamente al dominio de captura de la sonda de captura en la segunda área de la matriz; (d) eliminar la solución residual (por ejemplo, lavar la matriz mediante el uso de cualquiera de los métodos para eliminar soluciones y/o sondas de bloqueo descritas en la presente descripción) que comprenden la sonda de bloqueo de la segunda área de la matriz; (e) permeabilizar la muestra biológica (por ejemplo, mediante el uso de cualquiera de los métodos para permeabilizar la muestra biológica descrita en la 60

presente descripción), de manera que el dominio de captura de la sonda de captura de la primera área de la matriz se une específicamente a la secuencia de captura de analito; y (f) determinar (i) toda o una porción de una secuencia correspondiente al código de barras espacial de la sonda de captura en la primera área de la matriz, o un complemento de la misma, y (ii) toda o una porción de una secuencia correspondiente al código de barras del resto de unión al analito, o un complemento de la misma, y usar las secuencias de (i) y (ii) para determinar la ubicación del analito diana en la muestra biológica.

## Primera y segunda áreas

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, una matriz puede tener una primera área sobre la cual se dispone una muestra biológica y una segunda área que es adyacente a la muestra biológica. Por ejemplo, algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción incluyen disponer una muestra biológica (por ejemplo, una muestra biológica no permeabilizada) sobre una matriz (por ejemplo, cualquiera de las matrices ilustrativas descritas en la presente descripción), donde la matriz tiene entonces una primera área cubierta por la muestra biológica no permeabilizada y una segunda área no cubierta por la muestra biológica no permeabilizada.

40 La segunda área representa una porción de la matriz que no está recubierta por la muestra biológica.

La Figura 2 muestra un ejemplo de difusión de ácidos nucleicos diana lejos de la primera área de la matriz hacia la segunda área de la matriz, las áreas adyacentes a una muestra biológica en una matriz. La Figura 2 muestra un sustrato 260 que incluye una primera área 262 recubierta por una muestra biológica no permeabilizada 266 y una o más segundas áreas 264-A y 264-B, donde no hay muestra biológica (por ejemplo, las áreas adyacentes a la muestra biológica). Las sondas de captura 268 son inferiores a la muestra biológica 266 y adyacentes a la misma (264-A y 264-B). La muestra biológica 266 incluye un analito, por ejemplo uno o más ácidos nucleicos diana 270. Aunque dos segundas áreas 264-A y 264-B se muestran en la Figura 2, las segundas áreas descritas en la presente descripción no están tan limitadas. Por ejemplo, una segunda área de una matriz es cualquier área que no está recubierta por una muestra biológica, por lo que las áreas alrededor de la muestra biológica y las áreas distales a la muestra biológica en todas las direcciones se consideran segundas áreas. Igualmente, aunque la Figura 2 muestra una única primera área 262, las primeras áreas descritas en la presente descripción no están tan limitadas. Por ejemplo, una primera área es cualquier área que tiene una muestra biológica en ella, por lo que un área en donde las sondas de captura en la matriz están recubiertas por una muestra biológica (por ejemplo, la muestra biológica es superior a las sondas de captura). La primera o segunda áreas descritas en la presente descripción pueden tener una forma regular o irregular.

60 La primera y segunda áreas pueden comprender una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura 268 que comprende un código de barras espacial y un dominio de captura. Durante la permeabilización y/o la permeabilización selectiva mediante el uso de cualquiera de los métodos discutidos en la presente descripción (por ejemplo, acetona, electroforesis, permeabilización selectiva, etc.), los ácidos nucleicos diana 270 pueden, en algunos ejemplos, (indicados por las flechas de la Figura 2) difundirse en las segundas áreas 264-A y 264-B. La captura de los ácidos nucleicos diana 270 en una o más segundas áreas 264-A y 264-B resulta en una captura de analito diana espacial inespecífica que puede resultar en un desperdicio de recursos, por ejemplo, lecturas de secuenciación de las regiones inespecíficas de las segundas áreas 264-A y 264-B y una posible disminución de la

resolución espacial. En algunas modalidades, poner en contacto una o más de las segundas áreas 264-A y 264-B con una solución que incluye una o más sondas de bloqueo, donde la sonda de bloqueo comprende una secuencia que se une al dominio de captura de la sonda de captura en la segunda área 264-A y 264-B, antes de que la muestra biológica 266 se permeabilice, puede evitar la captura de los ácidos nucleicos diana 270 a las segundas áreas 264-A y 264-B. En algunas modalidades, una solución que incluye una o más sondas de bloqueo puede aplicarse a la primera área 262 y una o más de las segundas áreas 264-A y 264-B.

#### Sondas de bloqueo

Los ejemplos no limitantes de sondas de bloqueo pueden incluir sondas de ADN estándar que se modifican para la amplificación de no cebadores, sondas de ácido nucleico peptídico (PNA), nucleótidos de ARN modificados tales como ácidos nucleicos bloqueados (LNA), entre otros. En algunas modalidades, se usa la sonda de bloqueo para

10 bloquear o modificar el extremo 3' libre del dominio de captura de las sondas de captura en la segunda área de la matriz. En algunas modalidades, la sonda de bloqueo puede incluir una estructura en horquilla. En algunos ejemplos, la sonda de bloqueo puede incluir una estructura en horquilla. En algunas modalidades, las sondas de bloqueo pueden hibridarse al dominio de captura de las sondas de captura en la segunda área de la matriz, al 15 bloquear o enmascarar de esta manera el extremo 3' libre del dominio de captura, por ejemplo, PNA, LNA, sondas de ADN estándar, sondas en horquilla, sondas parcialmente bicatenarias o secuencias complementarias. En algunas modalidades, un extremo 3' libre de un dominio de captura de las sondas de captura incluidas en la 20 segunda área puede bloquearse mediante modificación química, por ejemplo, la adición de un grupo azidometilo como un resto protector químicamente reversible, de manera que las sondas de captura no incluyan un extremo 3' libre. Bloquear o modificar las sondas de captura en la segunda área de la matriz, particularmente el extremo 3' libre de un dominio de captura de las sondas de captura evita la captura de un analito diana, tal como una cola polí(A) de un ARNm, al extremo 3' libre de las sondas de captura, lo que disminuye o elimina de esta manera la 25 captura de analito inespecífica en esas áreas.

La Figura 3A muestra una sonda de bloqueo ilustrativa 380 unida a un dominio de captura de una sonda de captura y la Figura 3B muestra una sonda de bloqueo ilustrativa unida a un dominio de captura de una sonda de captura. La sonda de bloqueo ilustrativa 380 mostrada en la Figura 3A comprende una estructura en horquilla y un extremo 35 5' fosforilado 369 que puede ligarse al dominio de captura de la sonda de captura 368 en la segunda área de una matriz. La sonda de bloqueo 380 mostrada en la Figura 3A puede incluir opcionalmente modificaciones 372 para mejorar la hibridación. Un ejemplo no limitante de una modificación opcional para mejorar la hibridación incluye la 40 utilización de ácidos nucleicos bloqueados. El extremo 3' 374 de la sonda de bloqueo ilustrativa 380 que se muestra en la Figura 3A puede bloquearse químicamente para evitar la extensión por las polimerasas. Un ejemplo no limitante del grupo de bloqueo químico es un grupo azidometilo, que cuando se añade a un extremo 3' de la sonda de bloqueo evita la extensión del extremo 3' de la sonda de bloqueo.

La Figura 3B muestra otro ejemplo de una sonda de bloqueo que incluye una estructura parcialmente bicatenaria. 45 El ejemplo de sonda de bloqueo que se muestra en la Figura 3B puede tener un extremo 5' fosforilado 369 que puede ligarse al extremo 3' del dominio de captura de la sonda de captura 368 en la segunda área de una matriz. Un extremo 3' 374a y/o 374b de la sonda de bloqueo ilustrativa mostrada en la Figura 3B puede bloquearse químicamente para evitar la extensión por las polimerasas. Un ejemplo no limitante de un grupo de bloqueo químico es un grupo azidometilo.

50 En algunas modalidades, la sonda de bloqueo puede ser sustancialmente complementaria de aproximadamente 5 a aproximadamente 150 nucleótidos (por ejemplo, de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 140 nucleótidos, de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 120 nucleótidos, de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 15 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 150 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 120 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 15 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 150 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 120 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 150 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 120 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 60 nucleótidos a aproximadamente 150 nucleótidos, de aproximadamente 60 nucleótidos a aproximadamente 120 nucleótidos, de aproximadamente 60 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 60 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 60 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 80 nucleótidos a aproximadamente 150 nucleótidos, de aproximadamente 80 nucleótidos a aproximadamente 120 nucleótidos, de aproximadamente 80 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 80 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 80 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 150 nucleótidos, de aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 120 nucleótidos, de aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 120 nucleótidos a aproximadamente 150 nucleótidos, de aproximadamente 120 nucleótidos a aproximadamente 120 nucleótidos, de aproximadamente 120 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 120 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 120 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 150 nucleótidos a aproximadamente 150 nucleótidos, de aproximadamente 150 nucleótidos a aproximadamente 120 nucleótidos, de aproximadamente 150 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 150 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 150 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 150 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 150 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, de aproximadamente 150 nucleótidos a aproximadamente 10 nucleótidos, de aproximadamente 150 nucleótidos a aproximadamente 5 nucleótidos, de aproximadamente 150 nucleótidos a aproximadamente 1 nucleótido, de aproximadamente 150 nucleótidos a aproximadamente 0 nucleótidos).

nucleótidos a aproximadamente 120 nucleótidos, de aproximadamente 80 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 150 nucleótidos, o de aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 130 nucleótidos), del dominio de captura de la sonda de captura en la segunda área y/o el dominio de captura de la sonda de captura en la primera área.

- 5 La Figura 4 muestra una modalidad ilustrativa de sondas de captura bloqueadas en el área de una matriz espacial que no está debajo de una muestra biológica, donde el bloqueo es la estructura en horquilla de la Figura 3A. La Figura 4 muestra un sustrato 460 de una matriz que incluye una primera área 462 recubierta por una muestra biológica no permeabilizada 466 y segundas áreas 464-A y 464-B. La matriz comprende una pluralidad de sondas de captura 468. La muestra biológica 466 incluye un ácido nucleico diana 470. Aunque dos segundas áreas 464-A y 464-B se muestran en la Figura 4, los métodos descritos en la presente descripción no están tan limitados. La primera área 462 puede incluir una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura 468 que comprende un código de barras espacial y un dominio de captura. Una o más segundas áreas 464-A y 464-B pueden comprender una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura 468 que comprenden un código de barras espacial y un dominio de captura. Durante la permeabilización y/o la permeabilización selectiva mediante el uso de cualquier método descrito en la presente descripción (por ejemplo, acetona, electroforesis, lisado selectivo, etc.) el ácido nucleico diana 470 puede, en algunos ejemplos, difundir (indicado por las flechas de la Figura 4) a las segundas áreas 464-A y 464-B de la matriz. La unión del ácido nucleico diana 470 a dominios de captura de sondas de captura en una o más segundas áreas 464-A y 464-B puede provocar una captura de analito inespecífica que puede resultar en un desperdicio de recursos. Para evitar la captura de analito inespecífica del ácido nucleico diana 470 a las segundas áreas 464-A y 464-B de la matriz, las sondas de bloqueo como se describió en la Figura 3A pueden ponerse en contacto con la segunda área (opcionalmente en combinación con una ligasa). Ponerse en contacto con las segundas áreas 464-A y 464-B de la matriz, y no la primera área 462 de la matriz (debido a que está protegida por la muestra biológica 466), con una solución que incluye una sonda de bloqueo, donde la sonda de bloqueo comprende una secuencia que se une específicamente al dominio de captura de la sonda de captura en las segundas áreas 464-A y 464-B de la matriz evita la captura de analito del ácido nucleico diana a las segundas áreas 464-A y 464-B de la matriz. Una sonda de bloqueo de la Figura 3B también podría usarse en la Figura 4, sin embargo esto no se muestra.

Poner en contacto la segunda área de la matriz con una solución que comprende una sonda de bloqueo.

- 30 En algunas modalidades, la solución que comprende una o más sondas de bloqueo se añade automáticamente (por ejemplo, mediante un dispositivo por ejemplo, un robot) o manualmente (por ejemplo, mediante pipeteado) a la segunda área de la matriz. En algunas modalidades, la solución que comprende una sonda de bloqueo se añade gota a gota mediante una pipeta. En algunas modalidades, la solución que comprende una sonda de bloqueo se añade para entrar en contacto con toda o una porción de la segunda área de la matriz. En algunas modalidades, la solución que comprende una sonda de bloqueo se añade a toda o una porción de una superficie de la muestra biológica no permeabilizada que no se orienta ni entra en contacto con la matriz. En algunas modalidades, la solución que comprende la sonda de bloqueo se añade a toda la matriz.

35

En algunas modalidades, la solución se añade verticalmente por encima de la segunda área de la matriz. En algunas modalidades, la solución está presente en forma líquida, de manera que la segunda área está recubierta por la solución. En modalidades alternativas, la sonda de bloqueo se pone en contacto con la segunda área en forma de gel.

En algunas modalidades, la solución que incluye la sonda de bloqueo puede incluir una ligasa. Los ejemplos no limitantes de ligasas adecuadas incluyen ADN ligasa Tth, ADN ligasa Taq, ADN ligasa de *Thermococcus* sp. (cepa 9oN) (ligasa de ADN 9oNTM, New England Biolabs), AMPLIGASE™ (disponible de LUCIGEN®, Middleton, WI) y SplintR (disponible de New ENGLAND BIOLABS®, Ipswich, MA).

En algunas modalidades, la segunda área de la matriz puede ponerse en contacto con la solución, por ejemplo, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 50 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 40 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 20 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 50 minutos, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 40 minutos, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 20 minutos, de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 50 minutos, de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 40 minutos, de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 50 minutos, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 40 minutos, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 40 minutos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 40 minutos a aproximadamente 50 minutos, o de aproximadamente 50 minutos a aproximadamente 1 hora, a una temperatura de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 35 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 25 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 20 °C, de aproximadamente 4 °C a

aproximadamente 15 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 10 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 35 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 25 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 20 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 15 °C, de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 35 °C, de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 15 °C, de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 20 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 35 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 35 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C, o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 35 °C.

10 Retirar la sonda de bloqueo de la segunda área de la matriz

En algunas modalidades, la solución que comprende una o más sondas de bloqueo se elimina mediante pipeteado. En algunas modalidades, la sonda de bloqueo se elimina por capilaridad (por ejemplo, mediante un papel de absorción). En algunas modalidades, la sonda de bloqueo se elimina mediante lavado (por ejemplo, mediante el uso de un tampón de lavado). En algunas modalidades, puede añadirse un tampón de lavado para entrar en contacto con la primera y/o la segunda área de la matriz luego eliminarse mediante pipeteado, capilaridad u otros métodos conocidos en la técnica. En algunas modalidades, puede usarse una combinación de métodos de eliminación. En algunas modalidades, las etapas de poner en contacto y eliminar pueden repetirse (por ejemplo, al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces o más). En algunas modalidades, puede realizarse una etapa de secado después del lavado (por ejemplo, secado al aire).

20 En algunas modalidades, el tampón de lavado se añade automáticamente (por ejemplo, por un robot) o manualmente (por ejemplo, por pipeteado). En algunas modalidades, el tampón de lavado se añade verticalmente por encima de la matriz. En algunas modalidades, el tampón de lavado se añade verticalmente por encima de la segunda área de la matriz. En algunas modalidades, el tampón de lavado se añade gota a gota mediante una pipeta. En algunas modalidades, el tampón de lavado se añade para entrar en contacto con toda o una porción de la segunda área de la matriz. En algunas modalidades, el tampón de lavado se añade a toda o una porción de una superficie de la muestra biológica no permeabilizada que no se orienta ni entra en contacto con la matriz. En algunas modalidades, se añade un tampón de lavado a toda la matriz que incluye la primera y la segunda área. En algunas modalidades, el tampón de lavado es tampón TE 1X, tampón TAE 1X, tampón TBE 1X o PBS. En algunas modalidades, el tampón de lavado contiene un tampón (por ejemplo, Tris, MOPS, HEPES, MES o cualquier otro tampón conocido en la técnica), agentes quelantes (por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)) y/o iones metálicos (por ejemplo, Mg<sup>2+</sup>). En algunas modalidades, el tampón de lavado puede tener un pH que es aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9,0, aproximadamente 9,5, o aproximadamente 10,0, o de aproximadamente 5,0 a 5,5, de aproximadamente 5,5 a 6,0, de aproximadamente 6,0 a 6,5, de aproximadamente 6,5 a 7,0, de aproximadamente 7,0 a 7,5, de aproximadamente 7,5 a 8,0, de aproximadamente 8,0 a 8,5, de aproximadamente 8,5 a 9,0, de aproximadamente 9,0 a 9,5, o de aproximadamente 9,5 a 10,0.

40 En algunas modalidades, la segunda área de la matriz se pone en contacto con el tampón de lavado durante de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 50 minutos, de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 40 minutos, de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 20 minutos, de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 5 minutos, de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 1 minuto, de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 30 segundos, de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 50 minutos, de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 40 minutos, de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 5 minutos, de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 1 minuto, de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 30 segundos, de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 50 minutos, de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 40 minutos, de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 20 minutos, de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 5 minutos, de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 1 minuto, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 50 minutos, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 40 minutos, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 20 minutos, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 50 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 40 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 20 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 20 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos a

aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 50 minutos, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 40 minutos, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 20 minutos, de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 50 minutos, de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 40 minutos, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 50 minutos, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 40 minutos, de aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 40 minutos a aproximadamente 50 minutos, o de aproximadamente 50 minutos a aproximadamente 1 hora, a una temperatura de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 35 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 25 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 20 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 15 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 10 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 35 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 25 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 20 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 15 °C, de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 35 °C, de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C, de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 20 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 35 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 35 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C, o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 35 °C.

En algunas modalidades, la solución que comprende la sonda de bloqueo contiene un material precursor de gel (por ejemplo, poliacrilamida) y la sonda de bloqueo se elimina al añadir primero una solución que comprende un agente reticulante (por ejemplo, APS/TEMED) para polimerizar o gelificar el material precursor, seguido de separar el gel formado de la segunda área de la matriz.

En algunas modalidades, la solución que comprende la sonda de bloqueo está presente como un gel, y el gel puede eliminarse al separar el gel de la segunda área de la matriz. En algunas modalidades, la sonda de bloqueo está unida a una perla magnética (o una partícula magnética u otra sustancia magnética de la misma) y la sonda de bloqueo puede eliminarse al aplicar un campo magnético.

La Figura 5 muestra un esquema de un flujo de trabajo ilustrativo que utiliza sondas de bloqueo. En la etapa 590, el flujo de trabajo ilustrativo coloca la muestra biológica no permeabilizada en una primera área de la matriz que contiene sondas de captura. En la etapa 592, la muestra biológica no permeabilizada se fija y/o se tiñe. Por ejemplo, una muestra puede fijarse mediante inmersión en etanol, metanol, acetona, paraformaldehído formalina, paraformaldehído-Tritón, glutaraldehído, o cualquiera de sus combinaciones.

En algunas modalidades, la muestra biológica no permeabilizada puede teñirse. En algunas modalidades, la tinción incluye marcadores ópticos como se describe en la presente descripción, que incluyen, pero sin limitarse a, marcadores detectables fluorescentes (por ejemplo, fluoróforos), radioactivos (por ejemplo, radioisótopos), quimioluminiscentes (por ejemplo, un compuesto quimioluminiscente), un compuesto bioluminiscente, calorimétrico o colorimétrico. En algunas modalidades, la tinción incluye un anticuerpo fluorescente dirigido a un analito diana (por ejemplo, proteínas de la superficie celular o intracelulares) en la muestra biológica. En algunas modalidades, la tinción incluye una tinción inmunohistoquímica dirigida a un analito diana (por ejemplo, proteínas de la superficie celular o intracelulares) en la muestra biológica. En algunas modalidades, la tinción incluye una tinción química, tal como hematoxilina y eosina (H&E) o ácido peryódico de Schiff (PAS). En algunas modalidades, la tinción de la muestra biológica comprende el uso de una tinción biológica que incluye, pero sin limitarse a, naranja de acridina, marrón Bismarck, carmín, azul Coomassie, violeta de Cresilo, DAPI, eosina, bromuro de etidio, fucsina ácida, hematoxilina, tinciones Hoechst, yodo, verde metilo, azul de metileno, rojo neutro, azul Nilo, rojo Nilo, tetróxido de osmio, yoduro de propidio, rodamina, safranina o cualquiera de sus combinaciones. En algunas modalidades, puede transcurrir un tiempo significativo (por ejemplo, días, meses o años) entre la tinción y/o la obtención de imágenes de la muestra biológica.

En la etapa 594, el flujo de trabajo ilustrativo bloquea las sondas de captura en la segunda área (por ejemplo, no directamente debajo de la muestra biológica no permeabilizada) mediante el uso de una solución que comprende una sonda de bloqueo. En algunas modalidades, las sondas de bloqueo pueden ligarse a las sondas de captura en la segunda área de la matriz (por ejemplo, el área no directamente debajo de la muestra biológica).

En la etapa 596, el flujo de trabajo lava el exceso de solución que comprende las sondas de bloqueo de la matriz. Como se menciona en la presente descripción, la solución que comprende las sondas de bloqueo puede eliminarse de la matriz mediante el uso de cualquiera de los métodos ilustrativos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, en algunas modalidades, la solución que comprende una sonda de bloqueo se elimina mediante pipeteado. En algunas modalidades, la sonda de bloqueo se elimina por capilaridad (por ejemplo, mediante un papel de absorción). En algunas modalidades, la sonda de bloqueo se elimina mediante lavado (por ejemplo, mediante el uso de un tampón de lavado). En algunas modalidades, el tampón de lavado puede añadirse para entrar en contacto con la segunda área de la matriz y luego eliminarse mediante pipeteado, capilaridad u otros métodos conocidos en la técnica.

En la etapa 597, el flujo de trabajo ilustrativo permeabilizó la muestra biológica. En general, una muestra biológica puede permeabilizarse al exponer la muestra a uno o más agentes permeabilizantes descritos en la presente descripción.

- 5 En la etapa 598, el flujo de trabajo ilustrativo describe el análisis de un analito que ocurre después de que las sondas de captura capturen el ácido nucleico diana inferior a la muestra biológica en la matriz. Por ejemplo, el análisis espacial de los nucleótidos diana capturados puede realizarse al determinar (i) una secuencia correspondiente a las secuencias de código de barras espaciales de las sondas de captura en la primera área, o un complemento de las mismas, y (ii) una secuencia correspondiente a un analito de ácido nucleico, o un complemento de la misma, en la primera área. La determinación de las secuencias de (i) y (ii) permite la determinación de la ubicación espacial del analito de ácido nucleico en la muestra biológica.
- 10

#### Kits

- También se describen en la presente descripción kits que incluyen una matriz (por ejemplo, cualquiera de las matrices descritas en la presente descripción) que comprenden una pluralidad de sondas de captura (por ejemplo, cualquiera de las sondas de captura descritas en la presente descripción), donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial (por ejemplo, cualquiera de los códigos de barras espaciales descritos en la presente descripción) y un dominio de captura (por ejemplo, cualquiera de los dominios de captura descritos en la presente descripción); y una solución que comprende una sonda de bloqueo (por ejemplo, cualquiera de las sondas de bloqueo descritas en la presente descripción), donde la sonda de bloqueo comprende una secuencia que se une específicamente al dominio de captura de la sonda de captura.
- 15
- 20 En algunas modalidades, el kit puede comprender además uno o más fijadores (por ejemplo, cualquiera de los fijadores descritos en la presente descripción) para fijar la muestra biológica y/o preservar la estructura de la muestra biológica. Los ejemplos no limitantes de un fijador incluyen etanol, metanol, acetona, formaldehído (por ejemplo, formaldehído al 2 %), formalina, paraformaldehído-Tritón, glutaraldehído, o cualquiera de sus combinaciones.
- 25
- 30 En algunas modalidades, el kit puede incluir además una o más tinciones biológicas (por ejemplo, cualquiera de las tinciones biológicas como se describe en la presente descripción). Por ejemplo, el kit puede comprender además eosina y hematoxilina. En otros ejemplos, el kit puede incluir una tinción biológica seleccionada del grupo que consiste en naranja de acridina, marrón Bismarck, carmín, azul Coomassie, violeta de Cresilo, DAPI, eosina, bromuro de etidio, fucsina ácida, hematoxilina, tinciones Hoechst, yodo, verde metilo, azul de metileno, rojo neutro, azul Nilo, rojo Nilo, tetróxido de osmio, yoduro de propidio, rodamina, safranina o cualquiera de sus combinaciones.

En algunas modalidades, el kit puede comprender además uno o más reactivo(s) de permeabilización (por ejemplo, cualquiera de los reactivos de permeabilización descritos en la presente descripción). Por ejemplo, el kit puede incluir uno o más reactivo(s) de permeabilización seleccionados del grupo que consiste en un solvente orgánico, un agente reticulante, un detergente, una enzima o cualquiera de sus combinaciones.

- 35 En algunas modalidades, el kit puede incluir además una enzima. Por ejemplo, en algunas modalidades, el kit puede incluir además una transcriptasa inversa. En otras modalidades, el kit puede incluir además una ADN polimerasa. Por ejemplo, en algunas modalidades, el kit puede incluir además una desoxinucleotidil transferasa terminal. En algunas modalidades, el kit puede incluir además un oligonucleótido. Por ejemplo, en algunas modalidades, el kit puede incluir un oligonucleótido que cambia de plantilla. En algunas modalidades, el kit puede incluir además un segundo cebador de hebra. En algunas modalidades, el kit puede incluir además un tampón de fragmentación y una enzima de fragmentación. En algunas modalidades, el kit puede incluir además una ADN ligasa. En algunos ejemplos, la ADN ligasa es una ADN ligasa T4 o cualquiera de las otras ADN ligasas ilustrativas descritas en la presente descripción. En algunas modalidades, el kit puede incluir además uno o más adaptadores. En algunos ejemplos, uno o más adaptador(es) se selecciona/n del grupo de una secuencia del índice de la muestra i5, una secuencia del índice de la muestra i7, una secuencia de la plataforma de la secuencia P5, una secuencia de la plataforma de la secuencia P7 o cualquiera de sus combinaciones.
- 40
- 45

#### Composiciones

- También se describen en la presente descripción composiciones que comprenden una matriz (por ejemplo, cualquiera de las matrices descritas en la presente descripción, por ejemplo, una matriz de perlas o un portaobjetos) que tiene una primera área (por ejemplo, cualquiera de las primeras áreas descritas en la presente descripción), donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura (por ejemplo, cualquiera de las sondas de captura descritas en la presente descripción), donde la primera área comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprenden un código de barras espacial (por ejemplo, cualquiera de los códigos de barras espaciales descritos en la presente descripción) y un dominio de captura (por ejemplo, cualquiera de los dominios de captura descritos en la presente descripción) unidos específicamente a un analito diana (por ejemplo, cualquiera de los analitos diana descritos en la presente descripción) a partir de la muestra biológica; y una segunda área (por ejemplo, cualquiera de las segundas áreas descritas en la presente descripción) de la matriz comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprenden un código
- 50
- 55

de barras espacial y un dominio de captura unido específicamente a una sonda de bloqueo, y la segunda área es adyacente a la muestra biológica dispuesta en la matriz.

5 En algunas modalidades, el extremo 3' de la sonda de bloqueo es sustancialmente complementario a aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos (o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descritos en la presente descripción) del dominio de captura de la sonda de captura en la segunda área. Los ejemplos no limitantes de sondas de bloqueo incluyen sondas de bloqueo monocatenarias y sondas de bloqueo parcialmente bicatenarias. En algunos ejemplos, un extremo 5' de la sonda de bloqueo se fosforila. En algunos ejemplos, la sonda de bloqueo se liga a un extremo 3' de la sonda de captura en la segunda área. En algunas modalidades, un extremo 3' de la sonda de bloqueo se bloquea químicamente. Por ejemplo, en algunas modalidades, el bloqueo químico es un grupo azidometilo.

10 En algunas modalidades, la sonda de bloqueo incluye una estructura en horquilla. En algunos ejemplos, la sonda de bloqueo incluye una estructura en horquilla. En algunos ejemplos, la sonda de bloqueo incluye un ácido nucleico bloqueado.

15 En algunas modalidades, la muestra biológica es una muestra de tejido (por ejemplo, una sección de tejido). En algunas modalidades, la muestra biológica es una muestra clínica (por ejemplo, sangre completa, productos derivados de la sangre, células sanguíneas, tejido en cultivo, células en cultivo, una suspensión celular o cualquiera de sus combinaciones). En algunas modalidades, la muestra biológica es un organoide, células madre embrionarias, células madre pluripotentes o cualquiera de sus combinaciones. Los ejemplos no limitantes de organoides incluyen un organoide cerebral, un organoide intestinal, un organoide estomacal, un organoide lingual, un organoide tiroideo, un organoide tímico, un organoide testicular, un organoide hepático, un organoide pancreático, un organoide epitelial, un organoide pulmonar, un organoide renal, un gastruloides, un organoide cardiaco, un organoide retiniano o cualquiera de sus combinaciones. En algunas modalidades, la muestra biológica incluye células enfermas, células fetales, células inmunitarias, macromoléculas celulares, orgánulos, polinucleótidos extracelulares o cualquiera de sus combinaciones.

20 25 En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, el analito diana es ADN (por ejemplo, ADN genómico). En algunas modalidades de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, el analito diana es ARN (por ejemplo, ARNm).

## REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir la captura de un ácido nucleico diana en un área de una matriz no recubierta por una muestra biológica, el método comprende:
- 5 (a) disponer una muestra biológica no permeabilizada sobre una matriz en una primera área, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde:
- 10 la primera área comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprende (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura; y
- 15 una segunda área de la matriz comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprende (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura, y la segunda área de la matriz no está recubierta por la muestra biológica dispuesta en la matriz;
- 20 (b) poner en contacto la segunda área de la matriz con una sonda de bloqueo, en donde la sonda de bloqueo comprende una secuencia de ácido nucleico que se une al dominio de captura de la sonda de captura en la segunda área de la matriz;
- 25 (c) eliminar la sonda de bloqueo residual de al menos la segunda área de la matriz antes de permeabilizar la muestra biológica; y
- 30 (d) permeabilizar la muestra biológica, de manera que el dominio de captura de la sonda de captura de la primera área de la matriz se une al ácido nucleico diana; lo que reduce de esta manera la captura del ácido nucleico diana en la segunda área de la matriz no recubierta por la muestra biológica.
- 35 2. El método de la reivindicación 1, en donde un extremo 3' de la sonda de bloqueo es sustancialmente complementario a aproximadamente 5 a 100 nucleótidos del dominio de captura de la sonda de captura en la segunda área.
- 40 3. El método de la reivindicación 1, en donde la sonda de bloqueo comprende una de una sonda de bloqueo monocatenaria, una sonda de bloqueo parcialmente bicatenaria, una estructura en horquilla o un ácido nucleico bloqueado.
- 45 4. El método de la reivindicación 1, en donde un extremo 5' de la sonda de bloqueo se fosforila.
- 50 5. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa (b) comprende además ligar el extremo 5' de la sonda de bloqueo a un extremo 3' de la sonda de captura en la segunda área de la matriz.
- 55 6. El método de la reivindicación 1, en donde un extremo 3' de la sonda de bloqueo comprende un bloqueo químico, opcionalmente, en donde el bloqueo químico es un grupo azidometilo.
- 60 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el método comprende además, antes de la etapa (a) o entre las etapas (a) y (b), fijar la muestra biológica, en donde la etapa de fijar la muestra biológica comprende el uso de un fijador seleccionado del grupo que consiste en: etanol, metanol, acetona, formaldehído, paraformaldehído-Tritón, glutaraldehído, y sus combinaciones y/o
- 65 teñir la muestra biológica en donde la etapa de teñir de la muestra biológica comprende: el uso de una tinción biológica seleccionada del grupo que consiste en: naranja de acridina, marrón Bismarck, carmín, azul Coomassie, violeta de Cresilo, DAPI, eosina, bromuro de etidio, fucsina ácida, hematoxilina, tinciones Hoechst, yodo, verde metilo, azul de metileno, rojo neutro, azul Nilo, rojo Nilo, tetróxido de osmio, yoduro de propídio, rodamina, safranina y sus combinaciones; o
- 70 el uso de un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en: un radioisótopo, un fluoróforo, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto bioluminiscente, y sus combinaciones.
- 75 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en: una muestra de tejido, una sección de tejido fresca, congelada, una sección de tejido fijada, un organoide, células madre embrionarias, células madre pluripotentes, células enfermas, células fetales, células inmunitarias, macromoléculas celulares, orgánulos, polinucleótidos extracelulares y sus combinaciones;
- 80 o en donde la muestra biológica es una muestra clínica seleccionada del grupo que consiste en: sangre completa, productos derivados de la sangre, células sanguíneas, tejido en cultivo, células en cultivo, una suspensión celular y sus combinaciones.
- 85 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la eliminación en la etapa (c) comprende lavado.
- 90 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el ácido nucleico diana es ARN o ADN genómico.
- 95 11. El método de la reivindicación 10, en donde el ARN es ARNm.
- 100 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el método comprende además:

5 (e) determinar (i) una secuencia correspondiente al código de barras espacial de la sonda de captura de la primera área de la matriz, o un complemento de la misma, y (ii) toda o una porción de una secuencia correspondiente al ácido nucleico diana, o un complemento de la misma, y usar las secuencias de (i) y (ii) para determinar la ubicación del ácido nucleico diana en la muestra biológica.

10 13. El método de la reivindicación 12, en donde la determinación en la etapa (e) comprende la secuenciación (i) del código de barras espacial de la sonda de captura de la primera área de la matriz, o un complemento de la misma, y (ii) todo o una porción del ácido nucleico diana, o un complemento del mismo.

15 14. Una composición, que comprende una matriz que tiene una primera área, una segunda área y una pluralidad de sondas de captura, en donde:

la primera área comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprende (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura unido a un ácido nucleico diana de una muestra biológica, en donde la muestra biológica se dispuso previamente en la primera área; y

20 15. Una composición, que comprende una matriz que tiene una primera área, una segunda área y una pluralidad de sondas de captura, en donde:

la primera área comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprende (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura unido a un ácido nucleico diana de una muestra biológica, en donde la muestra biológica se dispone en la primera área; y

25 una segunda área de la matriz comprende una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que comprende (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura unido a una sonda de bloqueo, y la segunda área no estaba recubierta previamente por la muestra biológica.

DIBUJOS

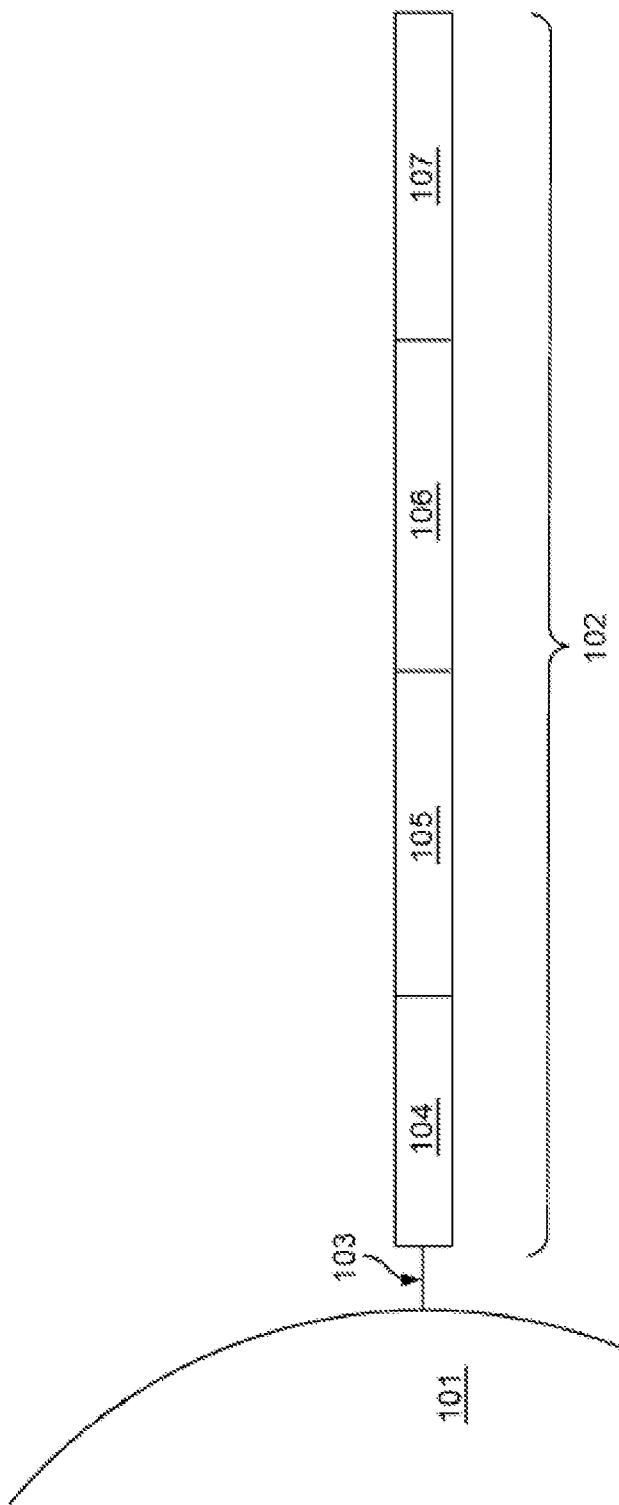


FIGURA 1

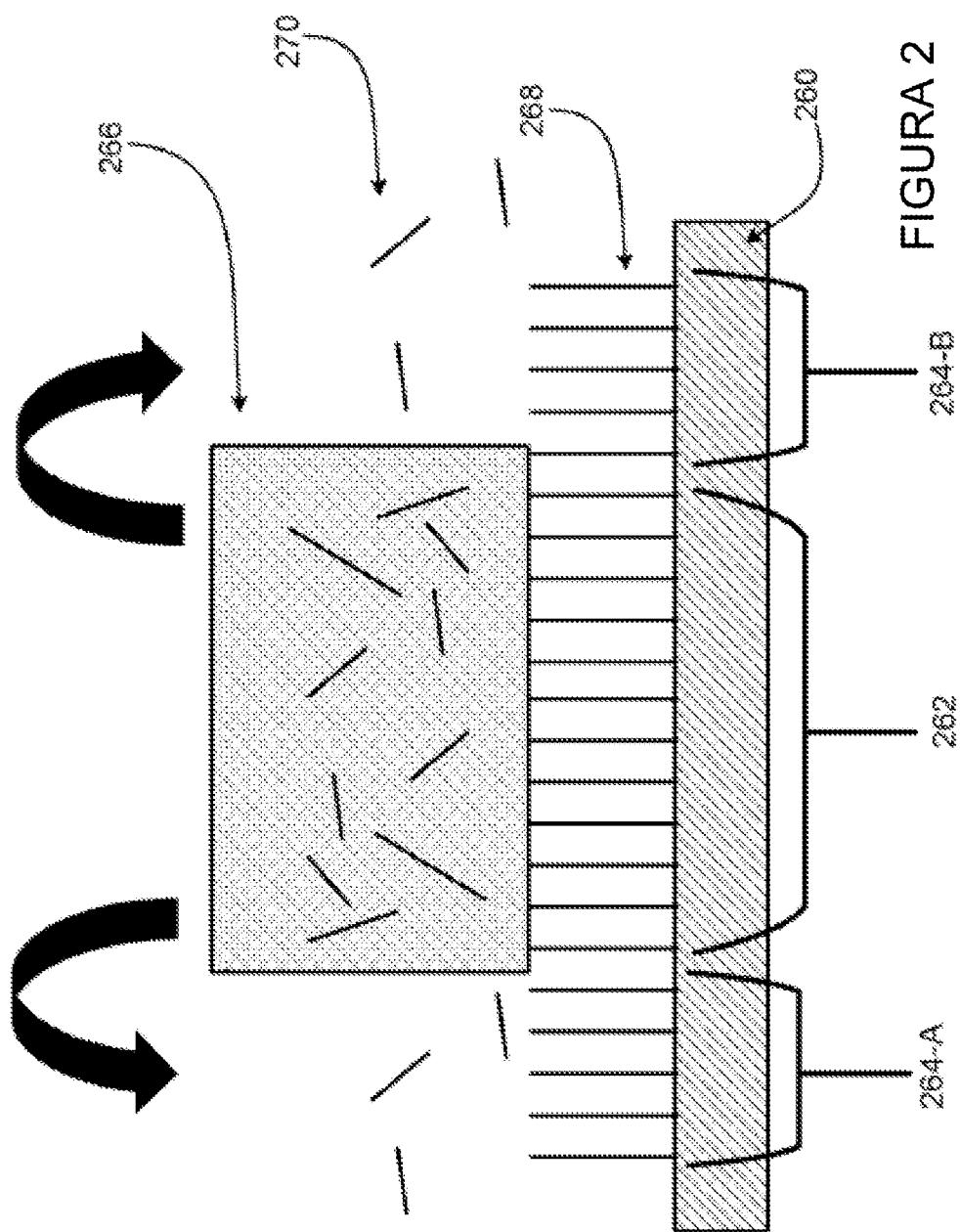


FIGURA 2

264-B

262

264-A

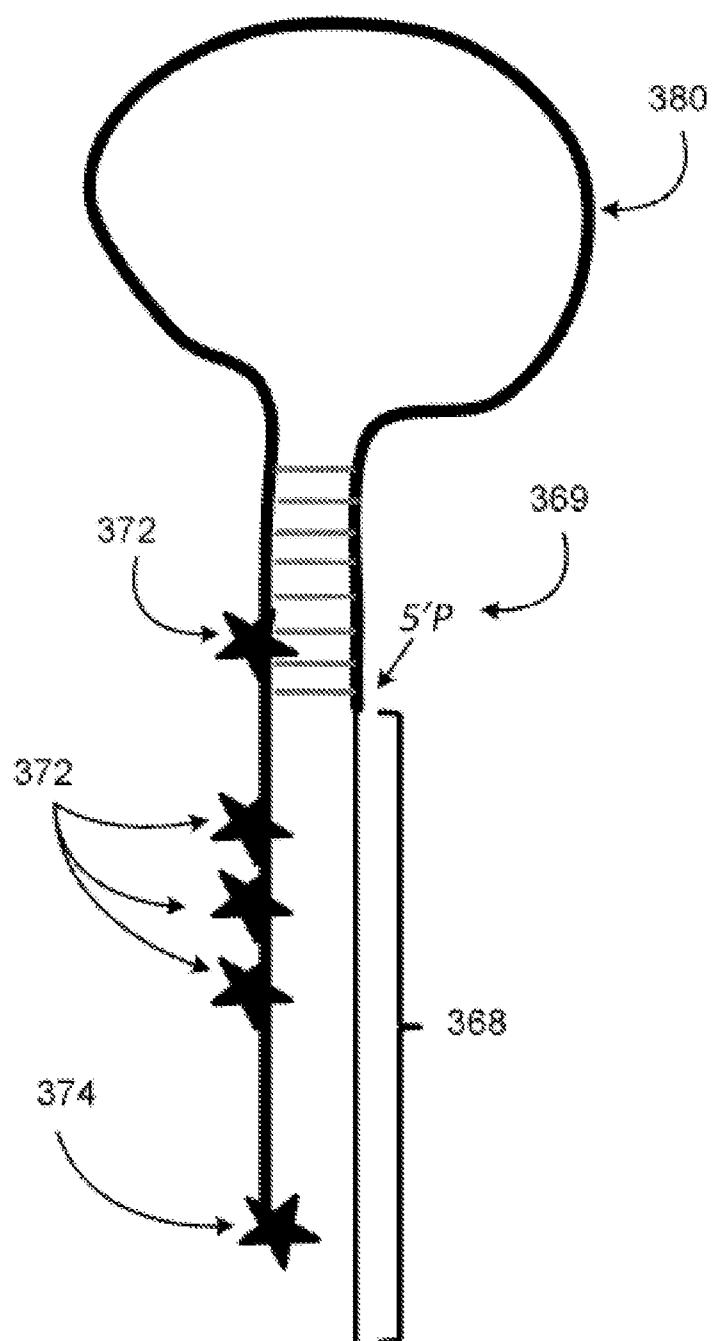


FIGURA 3A

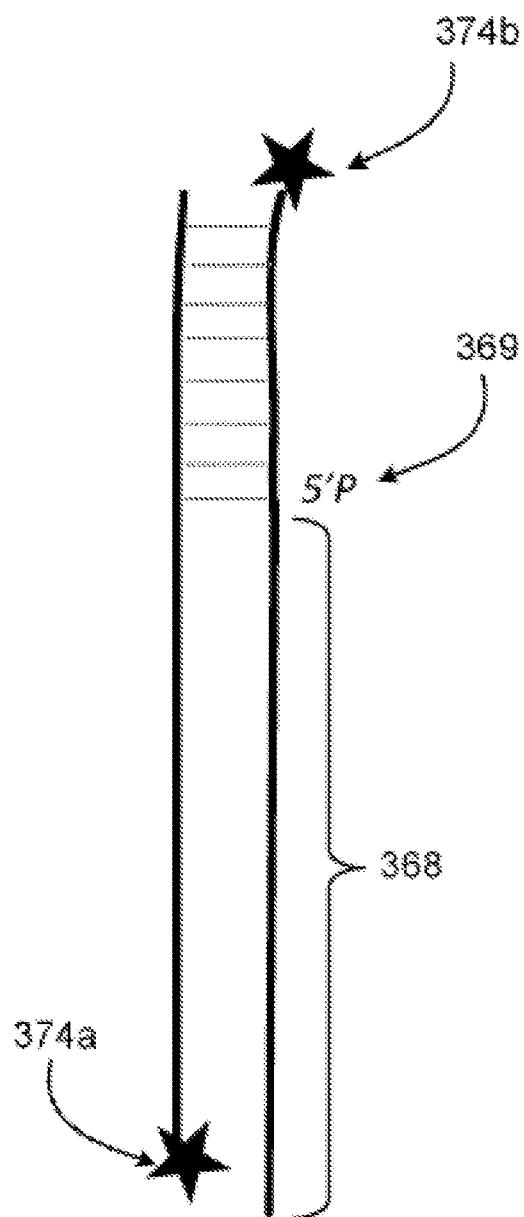


FIGURA 3B

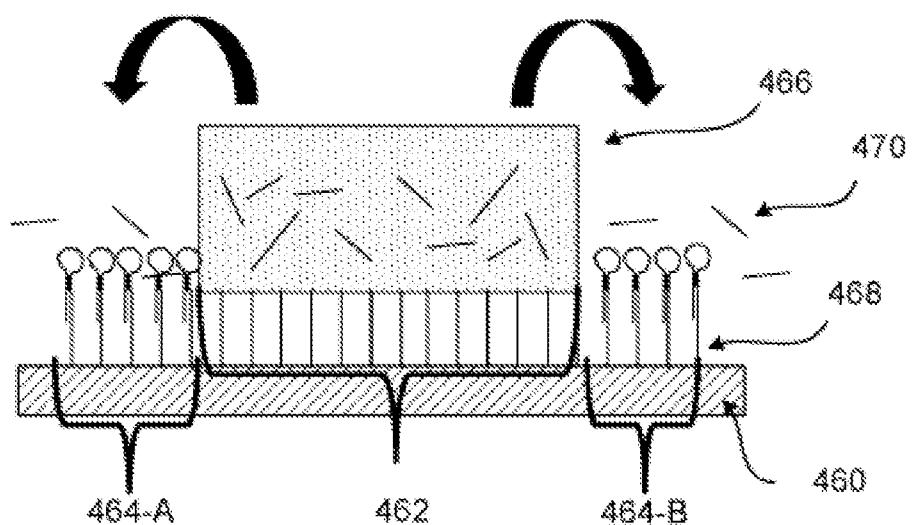


FIGURA 4

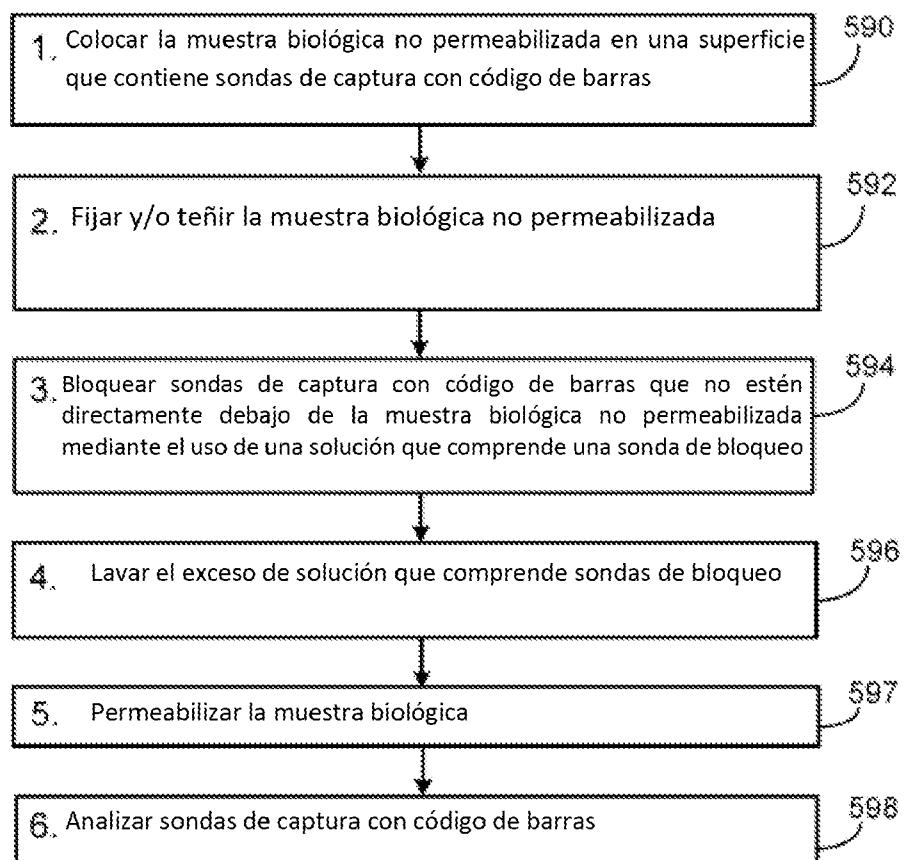


FIGURA 5