

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 994 976**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6841** (2008.01)

**C12Q 1/6837** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2021 PCT/US2021/039103**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2021 WO21263111**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2021 E 21745551 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2024 EP 4172362**

54 Título: **Análisis espacial de la metilación de ADN**

30 Prioridad:

**25.06.2020 US 202063044042 P**  
**21.12.2020 US 202063128783 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.02.2025**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KATIRAE, LAYLA;**  
**SCHNALL-LEVIN, MICHAEL;**  
**GALONSKA, CHRISTINA y**  
**STOECKIUS, MARLON**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 994 976 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**

Análisis espacial de la metilación de ADN

5 Campo técnico

En la presente descripción se proporcionan métodos para identificar un estado de metilación de un analito en una muestra biológica. También se proporcionan en la presente descripción métodos que combinan la identificación del estado de metilación con tecnología espacial para identificar la ubicación de un estado de metilación en una muestra biológica.

Antecedentes

15 Las células dentro de un tejido de un sujeto tienen diferencias en la morfología y/o función celular debido a niveles variados de analito (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, la diferenciación, el destino, la viabilidad, la proliferación, el comportamiento, y la señalización y el intercambio de la célula con otras células en el tejido.

20 La heterogeneidad espacial se ha estudiado previamente mediante el uso de técnicas que solo proporcionan datos para un pequeño número de analitos en el contexto de un tejido intacto o una porción de un tejido, o proporcionan muchos datos de analitos para células individuales, pero no proporcionan información con respecto a la posición de la célula individual en una muestra biológica parental (por ejemplo, muestra de tejido).

25 La metilación del ADN es una modificación epigenética crucial del genoma que está involucrada en la regulación de muchos procesos celulares. Estos procesos incluyen, pero no se limitan a, el desarrollo embrionario, la transcripción, la activación cromosómica, la estabilidad cromosómica y, como tal, la metilación del ADN, y también la metilación aberrante del ADN, se ha asociado con enfermedades humanas.

30 La metilación del ADN es una marca epigenética que puede heredarse a través de múltiples divisiones celulares. Sin embargo, los cambios en el estado de metilación también pueden ocurrir en una célula individual (por ejemplo, una célula cancerosa). Por lo tanto, en un entorno patológico, el estado de metilación de cada molécula de ADN puede variar, lo que hace que su análisis sea desafiante y engorroso. Esto se confunde además por el hecho de que las bases de citosina-metilada no se distinguen de las bases de citosina-no metilada en las tecnologías estándar de secuenciación de ADN. Para estudiar la metilación del ADN, muchos investigadores confían en el uso de bisulfito: un producto químico que convierte las citosinas no metiladas en timinas y deja las citosinas metiladas intactas. Idealmente, la conversión del bisulfito podría usarse para tecnologías de células individuales, sin embargo, el producto químico es tosco, fragmenta el ADN y a menudo no es compatible con enzimas y reactivos requeridos en etapas aguas abajo. Sin embargo, debido a las implicaciones diagnósticas y terapéuticas relacionadas con la orientación a la metilación del ADN, aún existe la necesidad de desarrollar métodos efectivos y rentables para determinar con precisión el estado de metilación de los ácidos nucleicos en ubicaciones espaciales de una muestra biológica.

45 Resumen

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. Esta descripción proporciona métodos de análisis espacial con identificación del estado de metilación del ADN. Los métodos proporcionados en la presente descripción son aplicables a condiciones fisiológicas normales, estudios de desarrollo y de células madre, y en entornos fisiopatológicos tales como el cáncer. Por ejemplo, en una modalidad, el estado de metilación del ADN (y los cambios del mismo) de uno o más analitos particulares pueden examinarse durante el suministro terapéutico. Y, debido a que la ubicación del analito (o complemento del mismo) puede identificarse mediante el uso de métodos de análisis espacial (por ejemplo, ligazón de ARN plantilla) como se describe en la presente descripción, pueden identificarse la ubicación del analito y/o los cambios en el estado de metilación. En algunos casos, los métodos descritos en la presente descripción también pueden combinarse con técnicas de obtención de imágenes que proporcionan una correlación entre una ubicación particular de una imagen (por ejemplo, la ubicación de un tumor en una muestra biológica) y tanto la expresión génica como el estado de metilación en esa ubicación. Por lo tanto, la descripción proporciona métodos poderosos para identificar la ubicación del ADN metilado en una muestra biológica.

60 En consecuencia, se describe en la presente descripción un método para identificar el estado de metilación de un analito en una muestra biológica, el método comprende: (a) poner en contacto la muestra biológica con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura en la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura que comprende al menos una citosina metilada; (b) desaminar el analito en la muestra biológica; (c) poner en contacto el analito con una pluralidad de sondas que comprenden una primera sonda y una segunda sonda, en donde la primera sonda comprende (i) una secuencia complementaria a al menos una primera secuencia del analito y (ii) una

- 5      secuencia complementaria al dominio de captura; y la segunda sonda comprende una secuencia complementaria a al menos una segunda secuencia del analito; (d) ligar la primera sonda y la segunda sonda, de esta manera se genera un producto de ligazón; (e) hibridar el producto de ligazón a la sonda de captura; (f) extender la sonda de captura mediante el uso del producto de ligazón como una plantilla; de esta manera se genera una sonda de captura extendida; y (g) determinar (i) toda o una porción de la secuencia del código de barras espacial o el complemento de la misma, y (ii) toda o una porción de la secuencia de la sonda de captura extendida, o un complemento de la misma, y usar las secuencias determinadas de (i) y (ii) para identificar el estado de metilación del analito en la muestra biológica.
- 10      En algunas modalidades, el primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido se hibridan con el analito en secuencias que tienen al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más nucleótidos separados.
- 15      En algunas modalidades, el método descrito en la presente descripción comprende además extender el primer oligonucleótido y/o el segundo oligonucleótido después de la etapa (c). En algunas modalidades, la primera sonda y/o la segunda sonda se extienden mediante el uso de una polimerasa.
- 20      En algunas modalidades, el método descrito en la presente descripción comprende además liberar el producto de ligazón del analito. En algunas modalidades, la liberación ocurre antes de hibridar el producto de ligazón a la sonda de captura.
- 25      En algunas modalidades, el método comprende además, antes de la etapa (b) poner en contacto la muestra biológica con un reactivo de permeabilización.
- 30      En algunas modalidades, la primera sonda y/o la segunda sonda comprenden una secuencia que se une a una secuencia en el analito que no tiene un dinucleótido de CG.
- 35      En algunas modalidades, el método comprende además lavar la muestra biológica entre la etapa (b) y la etapa (c).
- 40      En otro aspecto, se describe en la presente descripción un método para identificar un estado de metilación del ADN en una muestra biológica, el método comprende: (a) proporcionar uno o más transposomas a la muestra biológica, en donde los transposomas comprenden adaptadores metilados, en condiciones en donde el uno o más adaptadores metilados se insertan en el ADN, de esta manera se generan fragmentos de ADN fragmentomarcados que comprenden adaptadores metilados; (b) poner en contacto los fragmentos de ADN fragmentomarcados con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura en la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial, en donde si la sonda de captura comprende una o más citosinas, en donde la una o más citosinas son citosinas metiladas; (c) ligar la secuencia que comprende los fragmentos de ADN fragmentomarcados y el uno o más adaptadores metilados a la sonda de captura, crear de esta manera un producto de ligazón; (d) desaminar el producto de ligazón; y (e) determinar (i) toda o una porción de la secuencia del código de barras espacial o el complemento de la misma, y (ii) toda o una porción de la secuencia del producto de ligazón, o un complemento de la misma, y usar las secuencias determinadas de (i) y (ii) para identificar el estado de metilación del ADN, o una porción de las mismas, en la muestra biológica.
- 45      En algunas modalidades, la ligazón comprende añadir un oligonucleótido férula que comprende (i) una secuencia que se une específicamente a una porción de la sonda de captura; y (ii) una secuencia que se une específicamente a una porción del producto de ligazón. En algunas modalidades, el oligonucleótido férula comprende una secuencia que se une específicamente a una porción del uno o más adaptadores metilados.
- 50      En algunas modalidades, la enzima transposasa es una enzima transposasa Tn5, o un derivado funcional de la misma o una enzima transposasa Tn7, o el derivado funcional de la misma.
- 55      En algunas modalidades, el uno o más adaptadores metilados comprende un primer adaptador metilado y un segundo adaptador metilado.
- 60      En algunas modalidades, el método descrito en la presente descripción comprende además incubar el producto de ligazón con una transferasa terminal y una pluralidad de moléculas de trifosfato de desoxicitidina (dCTP), y extender de esta manera el producto de ligazón en el extremo 3'.
- 60      En algunas modalidades, el método descrito en la presente descripción comprende además amplificar el producto de ligazón. En algunas modalidades, el método descrito en la presente descripción comprende además amplificar el producto de ligazón mediante el uso de una secuencia de cebador que es complementaria a una secuencia de policisteína en el extremo 3' del producto de ligazón.

En algunas modalidades, la ligazón comprende ligazón enzimática o ligazón química. En algunas modalidades, la ligazón enzimática utiliza una ligasa. En algunas modalidades, la ligasa es una o más de una ligasa splintR, una ligasa de ADN monocatenario o una ligasa de ADN T4.

5 En algunas modalidades, el método descrito en la presente descripción comprende además una etapa de migración en donde el analito migra al sustrato. En algunas modalidades, la etapa de migración es una etapa de migración activa que comprende aplicar un campo eléctrico al ADN genómico. En algunas modalidades, la etapa de migración es una etapa de migración pasiva.

10 En otro aspecto, se describe en la presente descripción un método para identificar el estado de metilación de un ácido nucleico en una muestra biológica sobre un primer sustrato, que comprende: (a) desaminar el ácido nucleico; (b) hibridar una primera sonda y una segunda sonda con el ácido nucleico, en donde: la primera sonda comprende (i) una secuencia complementaria a al menos una primera secuencia del ácido nucleico y (ii) una secuencia complementaria a un dominio de captura de una sonda de captura en una matriz; y la segunda sonda  
15 comprende una secuencia complementaria a al menos una segunda secuencia del ácido nucleico; (c) ligar la primera sonda y la segunda sonda para generar un producto de ligazón; (d) alinear el primer sustrato con el segundo sustrato que comprende la matriz, de manera que al menos una porción de la muestra biológica se alinea con al menos una porción de la matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende: (i) un código de barras espacial y (ii) el dominio de captura; (e) cuando la muestra biológica se alinea con al menos una porción de la matriz, (i) liberar el producto de ligazón del analito y (ii) dejar que migre el producto de ligazón desde la muestra biológica hasta la matriz; y (f) capturar el producto de ligazón con el dominio de captura.

20 En algunas modalidades, el método descrito en la presente descripción comprende además determinar (i) toda o una porción de la secuencia del código de barras espacial o el complemento de la misma y (ii) toda o una porción de la secuencia del producto de ligazón, o un complemento de la misma.

25 En algunas modalidades, el método descrito en la presente descripción comprende además usar las secuencias determinadas de (i) y (ii) para identificar el estado de metilación del ácido nucleico en la muestra biológica.

30 En algunas modalidades, la primera sonda es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % complementaria al ácido nucleico. En algunas modalidades, la primera sonda es de aproximadamente 15 a aproximadamente 120 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la primera secuencia es de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud.

35 En algunas modalidades, la segunda sonda es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % complementaria al ácido nucleico. En algunas modalidades, la segunda sonda es de aproximadamente 15 a aproximadamente 120 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la segunda secuencia es de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud.

40 En algunas modalidades, la primera secuencia y la segunda secuencia son secuencias adyacentes.

45 En algunas modalidades, al menos un nucleótido desaminado se ubica entre la primera secuencia y la segunda secuencia. En algunas modalidades, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más nucleótidos desaminados se ubican entre la primera secuencia y la segunda secuencia.

50 En algunas modalidades, el método descrito en la presente descripción comprende además generar una primera sonda extendida y/o una segunda sonda extendida mediante el uso de una polimerasa, en donde la primera sonda extendida o la segunda sonda extendida comprenden una secuencia complementaria a una secuencia entre la primera secuencia y la segunda secuencia.

55 En algunas modalidades, al menos un nucleótido desaminado se ubica en la primera secuencia. En algunas modalidades, el al menos un nucleótido desaminado se ubica en la segunda secuencia.

60 En algunas modalidades, la liberación comprende calentar la muestra biológica. En algunas modalidades, la etapa (e) comprende además poner en contacto la muestra biológica con un medio reactivo que comprende un reactivo de permeabilización, opcionalmente en donde el reactivo de permeabilización comprende una proteasa.

65 En algunas modalidades, la ligazón de la primera sonda y la segunda sonda comprende la ligazón a través de una ligasa de la primera sonda y la segunda sonda. En algunas modalidades, la ligazón de la primera sonda y la segunda sonda comprende la ligazón a través de una ligasa: (a) la primera sonda y la segunda sonda

extendida; o (b) la primera sonda extendida y la segunda sonda. En algunas modalidades, la ligasa se selecciona de una ligasa splintR, una ligasa de ADN monocatenario o una ligasa de ADN T4.

5 En algunas modalidades, la primera sonda y la segunda sonda están en un ácido nucleico contiguo. En algunas modalidades, la ligazón utiliza un oligonucleótido férula. En algunas modalidades, el oligonucleótido férula comprende una primera secuencia de la férula que es sustancialmente complementaria a la primera sonda y una segunda secuencia de la férula que es sustancialmente complementaria a la segunda sonda.

10 En algunas modalidades, la captura del producto de ligazón comprende hibridar la secuencia complementaria a un dominio de captura con el dominio de captura. En algunas modalidades, la captura del producto de ligazón comprende ligar el producto de ligazón a la sonda de captura.

15 En algunas modalidades, el método descrito en la presente descripción comprende además extender la sonda de captura mediante el uso del producto de ligazón como una plantilla; y de esta manera se genera una sonda de captura extendida.

20 En otro aspecto, se describe en la presente descripción un método para identificar un estado de metilación de un ácido nucleico en una muestra biológica sobre un primer sustrato, el método comprende: (a) ligar un adaptador metilado a un ácido nucleico, generar un fragmento de ácido nucleico adaptado; (b) desaminar el fragmento de ácido nucleico adaptado; (c) alinear el primer sustrato con un segundo sustrato que comprende una matriz, de manera que al menos una porción de la muestra biológica se alinea con al menos una porción de la matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende: (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura; (d) cuando la muestra biológica se alinea con al menos una porción de la matriz, dejar que migre el fragmento de ácido nucleico adaptado desde la muestra biológica hasta la matriz; y (e) capturar el fragmento de ácido nucleico adaptado con el dominio de captura.

30 En algunas modalidades, el método descrito en la presente descripción comprende además determinar (i) toda o una porción de la secuencia del código de barras espacial o el complemento de la misma, y (ii) toda o una porción de la secuencia del producto de ligazón, o un complemento de la misma.

35 En algunas modalidades, el método descrito en la presente descripción comprende además usar las secuencias determinadas de (i) y (ii) para identificar el estado de metilación del ácido nucleico, o una porción del mismo, en la muestra biológica.

En algunas modalidades, el adaptador metilado se liga al ácido nucleico mediante fragmentomarcaje. En algunas modalidades, el adaptador metilado se liga al ácido nucleico en un extremo 5' del ácido nucleico. En algunas modalidades, el adaptador metilado se liga al ácido nucleico en un extremo 3' del ácido nucleico.

40 En algunas modalidades, el adaptador metilado tiene al menos de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, el adaptador metilado comprende al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más citosinas metiladas.

45 En algunas modalidades, el código de barras espacial comprende al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más citosinas metiladas.

50 En algunas modalidades, la ligazón del adaptador metilado al ácido nucleico comprende la unión del uno o más adaptadores metilados al extremo 5' y/o 3' del ácido nucleico mediante el uso de una enzima transposasa en complejo con un transposón, en donde la enzima transposasa es una enzima transposasa Tn5, o el derivado funcional de la misma.

55 En algunas modalidades, la captura del fragmento de ácido nucleico adaptado comprende hibridar el fragmento de ácido nucleico adaptado con el dominio de captura. En algunas modalidades, la captura del fragmento de ácido nucleico adaptado comprende ligar el fragmento de ácido nucleico adaptado con el dominio de captura, en donde la ligazón comprende ligazón enzimática o ligazón química.

60 En algunas modalidades, la ligazón utiliza un oligonucleótido férula, opcionalmente en donde el oligonucleótido férula comprende una primera secuencia de férula que es sustancialmente complementaria al fragmento de ácido nucleico adaptado y una segunda secuencia de férula que es sustancialmente complementaria a la sonda de captura.

65 En algunas modalidades, el método descrito en la presente descripción comprende además extender la sonda de captura mediante el uso del fragmento de ácido nucleico adaptado como una plantilla; de esta manera se genera una sonda de captura extendida.

En algunas modalidades, el método descrito en la presente descripción comprende además incubar el fragmento de ácido nucleico adaptado con una transferasa terminal y una pluralidad de moléculas de trifosfato de desoxicitidina (dCTP), de esta manera se genera un fragmento de ácido nucleico adaptado extendido.

5 En algunas modalidades, el método descrito en la presente descripción comprende además amplificar el fragmento de ácido nucleico adaptado extendido. En algunas modalidades, el método descrito en la presente descripción comprende además amplificar el fragmento de ácido nucleico adaptado extendido mediante el uso de una secuencia de cebador que es complementaria a una secuencia de policisteína en el extremo 3' del fragmento de ácido nucleico adaptado.

10 En algunas modalidades, la muestra biológica es una muestra de tejido canceroso. En algunas modalidades, la muestra biológica es de un sujeto tratado con una terapia contra el cáncer. En algunas modalidades, el ácido nucleico es ADN. En algunas modalidades, el ADN es ADN genómico.

15 La muestra biológica es una muestra de tejido, opcionalmente en donde la muestra de tejido es una muestra de tejido sólido, opcionalmente en donde la muestra de tejido es una sección de tejido. En algunas modalidades, la muestra biológica es una muestra fijada, una muestra congelada, una muestra fresca o una muestra congelada fresca. En algunas modalidades, la muestra biológica es una muestra fijada en formalina y embebida en parafina (FFPE).

20 En algunas modalidades, el primer sustrato es un portaobjetos. En algunas modalidades, el primer sustrato es un portaobjetos de vidrio. En algunas modalidades, el primer sustrato no comprende una matriz de sondas de captura.

25 En algunas modalidades, la desaminación comprende poner en contacto la muestra biológica con una composición que comprende bisulfito de sodio. En algunas modalidades, la desaminación comprende tratar la muestra biológica con una enzima. En algunas modalidades, la enzima es una citidina desaminasa.

30 En algunas modalidades, el segundo sustrato es un portaobjetos de vidrio. En algunas modalidades, un extremo 5' de la sonda de captura se une al segundo sustrato.

En algunas modalidades, la matriz es una matriz de perlas. En algunas modalidades, un extremo 5' de la sonda de captura se une a una perla de la matriz de perlas.

35 En algunas modalidades, la sonda de captura comprende además un identificador molecular único (UMI).

En algunas modalidades, la sonda de captura comprende además uno o más dominios funcionales, un identificador molecular único, un dominio de escisión y sus combinaciones.

40 En algunas modalidades, la migración es activa. En algunas modalidades, la migración es pasiva.

En algunas modalidades, la sonda de captura se extiende mediante el uso de una polimerasa.

45 En algunas modalidades, la determinación comprende secuenciar (i) toda o una parte de la secuencia del ácido nucleico o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de la secuencia del código de barras espacial o un complemento de la misma.

50 En algunas modalidades, el estado de metilación comprende identificar que de aproximadamente 1 % a aproximadamente 100 % de las citosinas comprenden un grupo metilo.

En algunas modalidades, el método descrito en la presente descripción comprende además obtener imágenes de la muestra biológica. En algunas modalidades, la obtención de imágenes se produce antes de desaminar la muestra biológica.

55 En otro aspecto, se describe en la presente descripción una composición que comprende reactivos para realizar cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción.

60 En algunas modalidades, la composición comprende un sustrato que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de primeras sondas de captura comprende (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura.

En algunas modalidades, la composición comprende una o más enzimas. En algunas modalidades, la una o más enzimas se seleccionan del grupo que consiste en una transposasa, una ligasa, una polimerasa; una transcriptasa inversa, una citidina desaminasa y una desmetilasa.

65 En algunas modalidades, la composición comprende además un complejo de transposoma que comprende una transposasa, una secuencia de transposón y/o una secuencia adaptadora.

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 específicos que caen dentro de tales intervalos independientemente de si se indica expresamente un valor numérico específico o un subintervalo específico.

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 indique expresamente de cualquier otra manera, o a menos que el contexto del uso indique claramente de cualquier otra manera.

La forma singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra manera. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una o más células, que comprenden sus mezclas. "A y/o B" se usa en la presente descripción para incluir todas las siguientes alternativas: "A", "B", "A o B" y "A y B".

Varias modalidades de las características de esta descripción se describen en la presente descripción. Sin embargo, debe entenderse que tales modalidades se proporcionan meramente a manera de ejemplo, y pueden ocurrir numerosas variaciones, cambios, y sustituciones para los expertos en la técnica.

#### Descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos ilustran ciertas modalidades de las características y ventajas de esta descripción. Estas modalidades no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones adjuntas de ninguna manera. Los símbolos de referencia similares en los dibujos indican elementos similares.

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 es un esquema que ilustra una sonda de captura escindible, en donde la sonda de captura escindida puede entrar en una célula no permeabilizada y unirse a analitos diana dentro de la muestra.

La Figura 3 es un diagrama esquemático ilustrativo de un elemento con código de barras espacial múltiple.

La Figura 4 es un esquema que muestra el arreglo de elementos con código de barras dentro de una matriz.

La Figura 5 es un esquema que ilustra una vista lateral de un medio resistente a la difusión, por ejemplo, una tapa.

Las Figuras 6A y 6B son esquemas que ilustran la vista expandida, Figura 6A, y vistas laterales, Figura 6B, de un sistema de transferencia electroforética configurado para dirigir los analitos transcritos hacia una matriz de sondas de captura con código de barras espacial.

La Figura 7 es un esquema que ilustra un protocolo de flujo de trabajo ilustrativo que utiliza un sistema de transferencia electroforética.

La Figura 8A muestra un esquema de un flujo de trabajo analítico ilustrativo en el que la migración electroforética de analitos se realiza después de la permeabilización.

La Figura 8B muestra un esquema de un flujo de trabajo analítico ilustrativo en el cual la migración electroforética de analitos y la permeabilización se realizan simultáneamente.

La Figura 9A muestra un ejemplo de configuración perpendicular de un solo portaobjetos para usar durante la electroforesis.

La Figura 9B muestra un ejemplo de configuración paralela de un solo portaobjetos para usar durante la electroforesis.

La Figura 9C muestra un ejemplo de configuración de múltiples portaobjetos para usar durante la electroforesis.

La Figura 10 muestra un esquema de un flujo de trabajo analítico ilustrativo de generación de un ácido nucleico desaminado en una muestra biológica e identificación de un estado de metilación de un ácido nucleico desaminado en una muestra biológica.

La Figura 11A muestra un esquema de un flujo de trabajo analítico ilustrativo de generación de un ácido nucleico desaminado en una muestra biológica.

La Figura 11B muestra un esquema de un flujo de trabajo analítico ilustrativo para identificar un estado de metilación de un ácido nucleico desaminado en una muestra biológica.

La Figura 12 muestra un diagrama esquemático que representa una modalidad ilustrativa de matriz espacial de dos portaobjetos.

La Figura 13 muestra una tabla que proporciona recuentos de la mediana de los genes por punto y la mediana de los identificadores moleculares únicos (UMI) por punto en una muestra de cerebro de ratón fijada con formalina.

La Figura 14 muestra los resultados del mapa visual de calor que muestra los recuentos del  $\text{Log}_{10}$  de UMI en un solo portaobjetos de control y una modalidad de configuración espacial de dos portaobjetos.

La Figura 15 muestra imágenes de análisis de agrupamiento espacial en modalidades de control y de matriz espacial y de dos portaobjetos.

La Figura 16 muestra un esquema de un flujo de trabajo analítico de generación de un ácido nucleico desaminado en una muestra biológica.

5 La Figura 17 muestra un esquema de un flujo de trabajo analítico de generación de un ácido nucleico desaminado en una muestra biológica.

La Figura 18A muestra un esquema de un flujo de trabajo analítico de fragmentomarcaje de moléculas de ADN en una muestra biológica y captura de los fragmentos de ADN fragmentomarcados en portaobjetos de expresión génica espacial.

10 La Figura 18B muestra un esquema de un flujo de trabajo analítico para generar una biblioteca para el perfil de metilación del genoma completo (por ejemplo, secuenciación por bisulfito del genoma completo) mediante el uso de los fragmentos de ADN fragmentomarcados capturados de la Figura 18A.

La Figura 19A muestra una modalidad ilustrativa de los métodos de desaminación espacial descritos en la presente descripción.

15 La Figura 19B muestra el producto de ácido nucleico desaminado después de la amplificación y antes de la captura en una matriz.

Las Figuras 20 y 21 muestran un electroferograma representativo de moléculas de ADN secuenciadas después de la captura en una matriz.

20 La Figura 22 muestra los resultados de la secuenciación para el analito diana capturado y desaminado con porcentajes representativos de adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T)

#### Descripción detallada

25 El solicitante ha identificado una necesidad en la comunidad científica de determinar, espacialmente, el estado de metilación de una muestra biológica. En particular, debido a la distribución heterogénea de células en una muestra biológica, es posible que la distribución de nucleótidos metilados (por ejemplo, ADN metilado) entre células en una muestra biológica pueda variar. La metilación del ADN es una modificación epigenética importante. El estado de metilación de cada molécula de ADN es variable y el estado de metilación del ADN en diferentes células es variable. Esto hace que el análisis de la metilación del ADN sea desafiante y engorroso.

30 Esto se confunde además por el hecho de que las bases de-citosina metilada no se distinguen de las bases de citosina no metilada en tecnologías estándar de secuenciación de ADN (por ejemplo, secuenciación por síntesis o secuenciación de Sanger).

35 La metilación del ADN es un proceso biológico mediante el cual se añaden grupos metilo a la molécula de ADN, y cambia de esta manera la actividad génica sin cambiar la secuencia de ADN subyacente. En mamíferos, se producen modificaciones epigenéticas tales como la metilación del ADN principalmente en dinucleótidos de citosina/guanina (CG). La metilación del ADN se encuentra típicamente en regiones promotoras (conocidas como islas CpG) y están asociadas con la represión transcripcional. Por ejemplo, un gen puede activarse (por ejemplo, "encendido") en presencia de cromatina abierta e histonas acetiladas. En este caso, los nucleótidos permanecen generalmente sin metilar. Sin embargo, en presencia de un nucleótido metilado (por ejemplo, una citosina metilada), un cromosoma puede condensarse, lo que da como resultado la desactivación de la expresión génica (por ejemplo, la expresión se "apaga"). Por lo tanto, cuando se ubica en un promotor génico, la metilación del ADN típicamente actúa para reprimir la transcripción génica. Dos bases de ADN, citosina y adenina, pueden metilarse. La metilación de la citosina está ampliamente generalizada tanto en eucariotas

40 como en procariontes. La metilación de la citosina para formar 5-metilcitosina se produce en la misma posición 5' en el anillo de pirimidina donde se ubica el grupo metilo de timina de la base de ADN; la misma posición distingue la timina de la base de ARN análoga uracilo, que no tiene grupo metilo. La desaminación espontánea de 5-metilcitosina la convierte en timina. Esto da como resultado una discrepancia T:G que puede identificarse mediante técnicas de secuenciación.

45

50 En décadas recientes, la metilación del ADN ha sido objeto de un estudio intenso, que incluye cómo se produce y dónde se produce, y se ha descubierto que la metilación es un componente importante en numerosos procesos celulares, que incluyen el desarrollo embrionario, la impresión genómica, la inactivación del cromosoma X y la conservación de la estabilidad cromosómica. La metilación del ADN se usa como marcador diferenciador en varios entornos, que incluyen cáncer, neurología, algunas enfermedades genéticas, desarrollo, diferenciación celular, comprensión de modelos de organismo y durante la terapia (por ejemplo, tratamiento con fármacos).

55

60 Dados los muchos procesos en los que la metilación juega un papel, los errores en la metilación también están vinculados con una variedad de consecuencias devastadoras, incluidas varias enfermedades humanas.

65 Para estudiar la metilación del ADN, muchos investigadores dependen del uso de un reactivo desaminante, bisulfito: puede usarse un producto químico en un proceso que convierte las citosinas no metiladas en timinas y deja las citosinas metiladas intactas. Sin embargo, el bisulfito se usa en condiciones duras que fragmentan el ADN, y a menudo no son compatibles con enzimas y reactivos requeridos para diversas aplicaciones. En la presente descripción se proporcionan técnicas efectivas y rentables para determinar un estado de metilación

de una muestra biológica. Los métodos y composiciones descritos en la presente descripción combinan análisis espacial, múltiples sustratos y técnicas de identificación por metilación.

Métodos y composiciones para el análisis espacial

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, mientras se retiene el contexto espacial nativo. Los métodos y composiciones de análisis espacial pueden incluir, por ejemplo, usar 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 composiciones de análisis espacial también pueden incluir usar 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 tejido.

20 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, 9,783,841, 9,727,810, 9,593,365, 8,951,726, 8,604,182, 7,709,198, publicaciones de solicitudes de patente 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, 25 2017/0016053, 2016/108458, 2015/000854, 2013/171621, WO 2018/091676, WO 2020/176788, Rodriques 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 disponibles en el sitio web de documentación 10x Genomics Support y puede usarse en la presente descripción en cualquier combinación. El documento WO 2019/126313 describe métodos para la cuantificación de marcadores de citosina metilados en ADN, que comprenden el tratamiento del ADN diana con un agente desaminante tal como bisulfito de sodio para convertir las citosinas no metiladas en uracilo, hibridar a la diana un par de sondas de ligazón, que luego se unen por una enzima ligasa, y detectar el producto ligado. El documento WO 2019/213294 describe métodos para el análisis del metiloma que comprenden proporcionar un transposoma y generar fragmentos de ADN fragmentomarcados que comprenden adaptadores en el sitio diana. El documento WO 2017/019456 describe una matriz de captura para la detección espacial de ácidos nucleicos en una muestra, en donde las sondas unidas en una superficie comprenden una región de unión al cebador y una región de dirección espacial. El documento WO 2020/123316 describe métodos y productos para el análisis espacial de ADN mediante el uso de matrices de sondas que comprenden una porción de captura y una porción de código de barras. En la presente descripción se describen aspectos adicionales no limitantes de las metodologías y composiciones de análisis espacial.

45 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. 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. El término "diana" puede referirse de manera similar a un analito de interés.

55 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, 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) subcelular(es), incluidas, 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 60 2020/176788 y/o en 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.

5 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  
10 limitantes de tinciones incluyen tinciones histológicas (por ejemplo, hematoxilina y/o eosina) y tinciones inmunológicas (por ejemplo, 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.

15 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.

20 Los métodos de análisis espaciales basados en matrices implican la transferencia de uno o más analitos de una muestra biológica a una matriz de elementos en un sustrato, donde cada elemento está asociado con una ubicación espacial única en la matriz. El análisis subsecuente de los analitos transferidos incluye determinar la  
25 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 el elemento al que está unido el analito (por ejemplo, directa o indirectamente) en la matriz, y la ubicación espacial relativa del elemento dentro de la matriz.

30 Una "sonda de captura" se refiere a cualquier molécula capaz de capturar (directa o indirectamente) y/o etiquetar 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  
35 un dominio funcional (por ejemplo, un sitio de unión a cebador, tal como para secuenciación de próxima 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.

40 La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra una sonda de captura ilustrativa, como se describe en la presente descripción. Como se muestra, la sonda de captura 102 está opcionalmente acoplada a un elemento 101 por un dominio de escisión 103, tal como un enlazador disulfuro. La sonda de captura puede incluir una  
45 secuencia funcional 104 que sea útil para su procesamiento subsecuente. La secuencia funcional 104 puede incluir toda o una parte de la secuencia de unión de células de flujo específica del secuenciador (por ejemplo, una secuencia P5 o P7), toda o una parte de una secuencia de cebador de secuenciación (por ejemplo, un sitio de unión al cebador R1, un sitio de unión al cebador R2), o sus combinaciones. La sonda de captura también puede incluir un código de barras espacial 105. La sonda de captura también puede incluir una secuencia de  
50 identificador molecular único (UMI) 106. Mientras la Figura 1 muestra el código de barras espacial 105 como ubicado aguas arriba (5') de la secuencia UMI 106, debe entenderse que las sondas de captura en donde la secuencia UMI 106 está ubicada aguas arriba (5') del código de barras espacial 105 también es adecuada para usar en cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción. La sonda de captura también puede incluir un dominio de captura 107 para facilitar la captura de un analito diana. El dominio de captura puede tener una secuencia complementaria a una secuencia de un analito de ácido nucleico. El dominio de captura puede tener una secuencia complementaria a un producto de ligazón descrito en la presente descripción. El dominio de captura puede tener una secuencia complementaria a una secuencia de mango de captura presente en un agente de captura del analito. El dominio de captura puede tener una secuencia complementaria a un oligonucleótido férula. Tal oligonucleótido férula, además de tener una secuencia complementaria a un dominio  
55 de captura de una sonda de captura, puede tener una secuencia complementaria a una secuencia de un analito de ácido nucleico, una porción de un producto de ligazón descrito en la presente descripción, una secuencia de mango de captura descrita en la presente descripción y/o un adaptador metilado descrito en la presente descripción.

60 Las secuencias funcionales generalmente pueden seleccionarse para compatibilidad con cualquiera de una variedad de sistemas de secuenciación diferentes, por ejemplo, Ion Torrent Proton o PGM, instrumentos de

secuenciación Illumina, PacBio, Oxford Nanopore, etc., y los requisitos de los mismos. En algunas modalidades, las secuencias funcionales pueden seleccionarse para compatibilidad con sistemas de secuenciación no comercializados. Ejemplos de tales sistemas y técnicas de secuenciación, para los cuales pueden usarse secuencias funcionales adecuadas, incluyen (pero no se limitan a) secuenciación Ion Torrent Proton o PGM, secuenciación Illumina, secuenciación PacBio SMRT y secuenciación Oxford Nanopore. Además, en algunas modalidades, las secuencias funcionales pueden seleccionarse para que sean compatibles con otros sistemas de secuenciación, incluidos sistemas de secuenciación no comercializados.

En algunas modalidades, el código de barras espacial 105 y secuencias funcionales 104 es común a todas las sondas unidas a un elemento determinado. En algunas modalidades, la secuencia UMI 106 de una sonda de captura unida a un elemento dado es diferente de la secuencia UMI de una sonda de captura diferente unida al elemento dado.

La Figura 2 es un esquema que ilustra una sonda de captura escindible, en donde la sonda de captura escindida puede entrar en una célula no permeabilizada y unirse a analitos dentro de la muestra. La sonda de captura 201 contiene un dominio de escisión 202, un péptido penetrantes en células 203, una molécula reportera 204, y un enlace disulfuro (-S-S-). 205 representa todas las demás partes de una sonda de captura, por ejemplo, un código de barras espacial y un dominio de captura. Las sondas de captura escindibles se describen con más detalle en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663 A1.

Para múltiples sondas de captura que están unidas a un elemento de matriz común, la una o más secuencias de códigos de barras espaciales de las múltiples sondas de captura pueden incluir secuencias que son las mismas para todas las sondas de captura acopladas al elemento, y/o secuencias que son diferentes en todas las sondas de captura acopladas al elemento.

La Figura 3 es un diagrama esquemático ilustrativo de un elemento con código de barras espacial múltiple. En la Figura 3, el elemento 301 puede acoplarse a sondas de captura con códigos de barras espaciales, en donde las sondas con códigos de barras espaciales de un elemento particular pueden poseer el mismo código de barras espacial, pero tienen diferentes dominios de captura diseñados para asociar el código de barras espacial del elemento con más de un analito diana. Por ejemplo, un elemento puede acoplarse a cuatro tipos diferentes de sondas de captura con códigos de barras espaciales, donde cada tipo de sonda de captura con códigos de barras espaciales posee el código de barras espacial 302. Un tipo de sonda de captura asociada con el elemento incluye el código de barras espacial 302 en combinación con un dominio de captura poli(T) 303, diseñado para capturar analitos diana de ARNm. Un segundo tipo de sonda de captura asociada con el elemento incluye el código de barras espacial 302 en combinación con un dominio de captura N-mer aleatorio 304 para análisis de ADNg. Un tercer tipo de sonda de captura asociada con el elemento incluye el código de barras espacial 302 en combinación con un dominio de captura complementario a una secuencia de mango de captura de un agente de captura de un analito de interés 305. Un cuarto tipo de sonda de captura asociada con el elemento incluye el código de barras espacial 302 en combinación con un dominio de captura que puede unirse específicamente a una molécula de ácido nucleico 306 que puede funcionar en un ensayo CRISPR (por ejemplo, CRISPR/Cas9). Si bien solo se muestran cuatro constructos diferentes con códigos de barras de sonda de captura en la Figura 3, los constructos con código de barras de sonda de captura pueden adaptarse para el análisis de cualquier analito determinado asociado con un ácido nucleico y capaz de unirse a tal constructo. Por ejemplo, los esquemas mostrados en la Figura 3 también pueden usarse para el análisis simultáneo de otros analitos descritos en la presente descripción, incluidos, pero sin limitarse a: (a) ARNm, un constructo de rastreo de linaje, proteínas y metabolitos de la superficie celular o intracelulares, y ADNg; (b) ARNm, cromatina accesible (por ejemplo, ATAC-seq, DNase-seq y/o MNase-seq), proteínas y metabolitos de la superficie celular o intracelulares y un agente de perturbación (por ejemplo, una CRISPR crRNA/sgRNA, TALEN, nucleasa en dedo de zinc, y/o oligonucleótido antisentido como se describe en la presente descripción); (c) ARNm, proteínas y/o metabolitos de la superficie celular o intracelulares, un agente de etiquetado con código de barras (por ejemplo, los multímeros MHC descritos en la presente descripción) y una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias (por ejemplo, receptor de células T). En algunas modalidades, un agente de perturbación puede ser una molécula pequeña, un anticuerpo, un fármaco, un aptámero, un miARN, un entorno físico (por ejemplo, cambio de temperatura) o cualquier otro agente de perturbación conocido. 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.

Las sondas de captura unidas a un único elemento de matriz pueden incluir secuencias de códigos de barras espaciales idénticas (o comunes), secuencias de códigos de barras espaciales diferentes o una combinación de ambas. Las sondas de captura unidas a un elemento pueden incluir múltiples conjuntos de sondas de captura. Las sondas de captura de un conjunto dado pueden incluir secuencias de códigos de barras espaciales idénticas. Las secuencias de códigos de barras espaciales idénticas pueden ser diferentes de las secuencias de códigos de barras espaciales de sondas de captura de otro conjunto.

La pluralidad de sondas de captura puede incluir secuencias de códigos de barras espaciales (por ejemplo, secuencias de códigos de barras de ácidos nucleicos) que están asociadas con ubicaciones específicas en una matriz espacial. Por ejemplo, una primera pluralidad de sondas de captura puede asociarse con una primera región, basándose en una secuencia de código de barras espacial común a las sondas de captura dentro de la primera región, y una segunda pluralidad de sondas de captura puede asociarse con una segunda región, basándose en una secuencia de código de barras espacial común a las sondas de captura dentro de la segunda región. La segunda región puede estar asociada o no con la primera región. Pueden asociarse pluralidades adicionales de sondas de captura con secuencias de códigos de barras espaciales comunes a las sondas de captura dentro de otras regiones. En algunas modalidades, las secuencias de códigos de barras espaciales pueden ser las mismas en una pluralidad de moléculas de sonda de captura.

En algunas modalidades, se incorporan múltiples códigos de barras espaciales diferentes en una única matriz de sonda de captura. Por ejemplo, un conjunto mixto pero conocido de secuencias de códigos de barras espaciales puede proporcionar una dirección o atribución más sólida de los códigos de barras espaciales a un lugar o ubicación determinados, al proporcionar una confirmación duplicada o independiente de la identidad de la ubicación. En algunas modalidades, los múltiples códigos de barras espaciales representan una especificidad creciente de la ubicación del punto de la matriz particular.

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.

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 a un elemento) 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 o secuencia de mango de captura. 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” o “secuencia de mango de captura” 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 algunas modalidades, una secuencia de mango de captura es complementaria a 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.

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 la una o más células, y/o el contenido de la 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, incluidas 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 adentro y/o sobre la muestra biológica.

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, 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, 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 para 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 cerca de 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 un candidato a diana farmacológica 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 colocalización 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 un soporte para la unión directa o indirecta de sondas de captura a elementos de la matriz. Un "elemento" es una entidad que actúa como soporte o repositorio para varias entidades moleculares usadas en el análisis espacial. En algunas modalidades, algunos o todos los elementos 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 elementos 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.

La Figura 4 representa un arreglo ilustrativo de elementos con código de barras dentro de una matriz. De izquierda a derecha, la Figura 4 muestra (L) un portaobjetos que incluye seis matrices con código de barras espacial, (C) un esquema ampliado de una de las seis matrices con código de barras espacial, que muestra una cuadrícula de elementos con código de barras en relación con una muestra biológica, y (R) un esquema ampliado de una sección de una matriz, que muestra la identificación específica de múltiples elementos dentro de la matriz (etiquetados como ID578, ID579, ID560, etcétera).

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

5 sustrato con sondas de captura embebidas, manchadas, impresas, elaboradas sobre el sustrato, o un sustrato con elementos (por ejemplo, perlas, pocillos) que comprenden sondas de captura). Como se usa en la presente descripción, "contactar", "contactado" y/o "que entra 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 pueden interactuar (por ejemplo, unirse covalente o no covalentemente (por ejemplo, hibridar)) con analitos de la muestra biológica. La captura puede lograrse activamente (por ejemplo, mediante el uso de electroforesis) o pasivamente (por ejemplo, mediante el uso de difusión). La captura de analitos se describe además en la sección (II)(e) del documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

10 La Figura 5 es una ilustración de un uso ilustrativo de un medio resistente a la difusión. Un medio/tapa resistente a la difusión 502 puede ponerse en contacto con una muestra 503. En la Figura 5, un portaobjetos de vidrio 504 se rellena con sondas de captura codificadas espacialmente 506, y la muestra 503, 505 se pone en contacto con la matriz 504, 506. Un medio/tapa resistente a la difusión 502 puede aplicarse a la muestra 503, en donde la muestra 503 se dispone entre un medio resistente a la difusión 502 y un portaobjetos recubierto de la sonda de captura 504. Cuando se aplica una solución de permeabilización 501 a la muestra, el medio/tapa resistente a la difusión 502 dirige la migración de los analitos 505 hacia las sondas de captura proximales 506 al reducir la difusión de los analitos hacia el medio. Alternativamente, el medio/tapa resistente a la difusión puede contener reactivos de permeabilización.

15 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 usar 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.

20 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, la ligasa SplintR) liga los dos oligonucleótidos juntos, creando 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 secuenciarse, para determinar de este modo la ubicación y opcionalmente la abundancia del analito en la muestra biológica.

25 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 matriz de elementos 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.

30 Alternativamente, pueden depositarse códigos de barras espaciales específicos en ubicaciones predeterminadas en una matriz de elementos 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 un único elemento 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 los elementos de la matriz, y este mapeo puede almacenarse como se describió anteriormente.

5 Cuando se obtiene información de secuencia para sondas y/o analitos de captura durante el análisis de la información espacial, las ubicaciones de las sondas de captura y/o analitos pueden determinarse al hacer referencia a la información almacenada que asocia de forma única cada código de barras espacial con una ubicación de elementos de la matriz. De esta manera, las sondas de captura específicas y los analitos capturados se asocian con ubicaciones específicas en la matriz de elementos. Cada ubicación de elemento 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 elemento tiene una "dirección" o ubicación en el espacio de coordenadas de la matriz.

15 Algunos flujos de trabajo ilustrativos de análisis espacial 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).

25 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.

30 Los sistemas adecuados para realizar análisis espacial pueden incluir componentes tales como una cámara (por ejemplo, una celda de flujo o una cámara que pueda sellarse, hermética) 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 soporte para muestras a través de conductos de fluido, y los fluidos pueden suministrarse a la cámara y/o al soporte para muestras a través de bombas fluidicas, 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 puede conectarse una o más válvulas a conductos de fluido para regular el flujo de reactivos desde los depósitos hasta la cámara y/o el soporte para muestras.

40 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 componentes de la misma) 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) remotos puede 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 elementos, analitos de una muestra biológica capturada en un sustrato y diversos medios de control y calibración.

55 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.

60 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 solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2021/0150707 A1 se describen métodos ilustrativos para detectar la muestra biológica en una matriz.

65 Antes de transferir analitos desde la muestra biológica hasta la matriz de elementos en el sustrato, la muestra biológica puede alinearse con la matriz. La alineación de una muestra biológica y una matriz de elementos 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 solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2021/0150707 A1.

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 obtención de imágenes que aparecen en la imagen producida, como se describió en la Sección *Substrate Attributes, Control Slide for Imaging* del documento WO 2020/123320, solicitud PCT núm. 2020/061066 y/o solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2021/0158522 A1. 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.

#### Determinación del estado de metilación en un ácido nucleico

En la presente descripción se describen métodos y composiciones para determinar el estado de metilación de una muestra biológica. El estado de metilación puede determinarse mediante el uso de métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, desaminación de un ácido nucleico). Los métodos descritos en la presente descripción combinan el estado de metilación con el análisis espacial para determinar la ubicación de un ácido nucleico metilado (por ejemplo, una molécula de ADN) en una ubicación espacial en una muestra. Además, los métodos descritos en la presente descripción permiten obtener el perfil espacial del estado de metilación de una muestra biológica colocada sobre un sustrato histológico estándar, por ejemplo, un portaobjetos estándar.

En los métodos ilustrativos descritos en la presente descripción, se proporciona una muestra biológica sobre un primer sustrato, que puede ser cualquier portaobjetos (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio), y una etapa de desaminación puede realizarse in situ sobre el portaobjetos de vidrio. Las sondas (por ejemplo, una primera sonda, una segunda sonda o un adaptador metilado) interactúan con un ácido nucleico de la muestra biológica. La muestra biológica se permeabiliza y un ácido nucleico que contiene sonda migra a un segundo sustrato, que incluye una matriz que tiene una pluralidad de sondas de captura. La secuencia y ubicación del ácido nucleico que contiene la sonda pueden determinarse, y en base a la secuencia, puede determinarse el estado de metilación en una ubicación particular.

#### Métodos para identificar el estado de metilación de un analito en una muestra biológica

En la presente descripción se proporcionan métodos para identificar un estado de metilación de un analito en una muestra biológica. "Estado de metilación" como se usa en la presente descripción se refiere a identificar la presencia o ausencia de uno o más grupos metilo en un analito. En algunos casos, el uno o más grupos metilo está en una o más citosinas. En algunos casos, la descripción presenta un método para identificar un estado de metilación de un analito en una muestra biológica, el método comprende: (a) poner en contacto la muestra biológica con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura en la pluralidad de sondas comprende (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura que comprende al menos una citosina metilada; (b) desaminar el analito; (c) poner en contacto el analito con una pluralidad de sondas que comprenden una primera sonda y una segunda sonda, en donde la primera sonda comprende (i) una secuencia complementaria a al menos una primera secuencia del analito y (ii) una secuencia complementaria al dominio de captura; y la segunda sonda comprende una secuencia complementaria a al menos una segunda secuencia del analito; (d) ligar la primera sonda y la segunda sonda, de esta manera se genera un producto de ligazón; (e) hibridar el producto de ligazón a la sonda de captura; (f) extender la sonda de captura mediante el uso del producto de ligazón como una plantilla; de esta manera se genera una sonda de captura extendida; (g) amplificar la sonda de captura extendida para producir una pluralidad de ácidos nucleicos; y (h) determinar (i) toda o una porción de la secuencia del código de barras espacial o el complemento de la misma, y (ii) toda o una porción de la secuencia del analito, o un complemento de la misma, y usar las secuencias determinadas de (i) y (ii) para identificar el estado de metilación del analito en la muestra biológica.

En otra presentación, se describe en la presente descripción un método que comprende: (a) poner en contacto la muestra biológica con una matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura en la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura; (b) desaminar el analito; (c) poner en contacto el analito con una pluralidad de sondas, en donde una sonda en la pluralidad de sondas comprende (i) un resto de unión que se une específicamente a al menos una porción del analito y (ii) una secuencia saliente; (d) extender la sonda mediante el uso del analito como plantilla, de esta manera se genera una sonda extendida; (e) hibridar la sonda extendida con la sonda de captura; (f) extender la sonda de captura mediante el uso de la sonda extendida como plantilla, de esta manera se genera una sonda de captura extendida; (g) amplificar la sonda de captura extendida para

producir una pluralidad de ácidos nucleicos; y (h) determinar (i) toda o una porción de la secuencia del código de barras espacial o el complemento de la misma, y (ii) toda o una porción de la secuencia del analito, o un complemento de la misma, y usar las secuencias determinadas de (i) y (ii) para identificar el estado de metilación del analito en la muestra biológica.

5 También se proporcionan en la presente descripción métodos para identificar un estado de metilación de un analito en una muestra biológica, el método comprende: (a) poner en contacto la muestra biológica con una matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura en la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura; en donde el dominio de captura comprende al menos una citosina metilada; (b) desaminar el analito; (c) poner en contacto el analito con una pluralidad de sondas que comprenden una primera sonda y una segunda sonda, en donde la primera sonda comprende (i) un primer resto de unión que se une específicamente a al menos una porción del analito y (ii) una primera secuencia saliente; y la segunda sonda comprende (i) un segundo resto de unión que se une específicamente a al menos una porción del analito que está adyacente a la porción del analito que se une al primer resto de unión y (ii) una segunda secuencia saliente; y (d) extender la primera sonda mediante el uso del analito como una plantilla; (e) ligar la primera sonda y la segunda sonda, de esta manera se genera una sonda extendida; (f) hibridar la sonda extendida con la sonda de captura; (g) extender la sonda de captura mediante el uso de la sonda extendida como una plantilla; de esta manera se genera una sonda de captura extendida; (h) amplificar la sonda de captura extendida para producir una pluralidad de ácidos nucleicos; y (i) determinar (i) toda o una porción de la secuencia del código de barras espacial o el complemento de la misma, y (ii) toda o una porción de la secuencia del analito, o un complemento de la misma, y usar las secuencias determinadas de (i) y (ii) para identificar el estado de metilación del analito en la muestra biológica. En algunas modalidades, la ligazón comprende una ligazón enzimática o una ligazón química. En algunas modalidades, la ligazón enzimática utiliza una ligasa.

25 También se proporcionan en la presente descripción métodos para identificar un estado de metilación de un analito, por ejemplo, un ácido nucleico, en una muestra biológica. "Estado de metilación", como se usa en la presente descripción, se refiere a identificar la presencia o ausencia de uno o más grupos metilo en un analito (por ejemplo, en una citosina). En algunos casos, el estado de metilación puede ser un número absoluto de citosinas metiladas o citosinas no metiladas en un ácido nucleico. En algunos casos, el estado de metilación puede ser un porcentaje de citosinas que están metiladas o no metiladas en un ácido nucleico.

35 En algunos casos, la descripción presenta un método para identificar un estado de metilación de un ácido nucleico en una muestra biológica. En algunos casos, la muestra biológica se coloca sobre un sustrato que no incluye sondas de captura. De esta manera, todas las etapas de desaminación se llevan a cabo sobre este sustrato. Los métodos proporcionados en la presente descripción permiten que las etapas de desaminación se separen del análisis espacial del analito, por ejemplo, ácido nucleico. En una modalidad ilustrativa, la muestra biológica se coloca en un portaobjetos regular, por ejemplo, un portaobjetos de vidrio que no tiene sondas de captura. Debido a que la desaminación se separa de la captura de moléculas en la matriz espacial, las sondas de captura de la matriz espacial no se afectan por los reactivos de desaminación.

45 En algunos métodos ilustrativos, se proporcionan en la presente descripción métodos para identificar el estado de metilación de un ácido nucleico en una muestra biológica sobre un primer sustrato. En algunos casos, los métodos incluyen (a) desaminar el ácido nucleico; (b) hibridar una primera sonda y una segunda sonda con el ácido nucleico, en donde: la primera sonda comprende (i) una secuencia complementaria a al menos una primera secuencia del ácido nucleico y (ii) una secuencia complementaria a un dominio de captura de una sonda de captura en una matriz; y la segunda sonda comprende una secuencia complementaria a al menos una segunda secuencia del ácido nucleico; (c) ligar la primera sonda y la segunda sonda para generar un producto de ligazón; (d) alinear el primer sustrato con el segundo sustrato que comprende la matriz, de manera que al menos una porción de la muestra biológica se alinea con al menos una porción de la matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende: (i) un código de barras espacial y (ii) el dominio de captura; (e) cuando la muestra biológica se alinea con al menos una porción de la matriz, (i) liberar el producto de ligazón del analito y (ii) dejar que migre el producto de ligazón desde la muestra biológica hasta la matriz; y (f) capturar el producto de ligazón con el dominio de captura.

60 En otros métodos ilustrativos, se proporcionan en la presente descripción métodos para identificar un estado de metilación de un ácido nucleico en una muestra biológica sobre un primer sustrato. En algunos casos, los métodos incluyen (a) ligar un adaptador metilado a un ácido nucleico, generar un adaptado (por ejemplo, fragmento de ácido nucleico fragmentomarcado); (b) desaminar el fragmento de ácido nucleico adaptado (por ejemplo, fragmentomarcado); (c) alinear el primer sustrato con un segundo sustrato que comprende una matriz, de manera que al menos una porción de la muestra biológica se alinea con al menos una porción de la matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende: (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura; (d) cuando la muestra biológica se alinea con al menos una porción de la matriz, dejar que migre el fragmento de

ácido nucleico adaptado (por ejemplo, fragmentomarcado) desde la muestra biológica hasta la matriz; y (e) capturar el fragmento de ácido nucleico adaptado (por ejemplo, fragmentomarcado) con el dominio de captura.

#### Preparación de la muestra biológica

5

#### Muestras biológicas y analitos

La muestra biológica como se usa en la presente descripción puede ser cualquier muestra biológica adecuada descrita en la presente descripción o conocida en la técnica. La muestra biológica es una muestra de tejido. En algunas modalidades, la muestra biológica es una sección de tejido. En algunas modalidades, el tejido se congela instantáneamente y se corta en secciones. Cualquiera de los métodos adecuados descritos en la presente descripción o conocidos en la técnica pueden usarse para congelar instantáneamente y seccionar la muestra de tejido. En algunas modalidades, la muestra biológica, por ejemplo, el tejido, se congela instantáneamente mediante el uso de nitrógeno líquido antes del seccionamiento. En algunas modalidades, el seccionamiento se realiza mediante el uso de la criosección. En algunas modalidades, los métodos comprenden además una etapa de descongelación, después de la criosección. En algunas modalidades, la muestra biológica, por ejemplo, la muestra de tejido se fija, por ejemplo en metanol, acetona, PFA o se fija con formalina y se embebe en parafina (FFPE).

La muestra biológica, por ejemplo, muestra de tejido, puede teñirse y obtener imágenes antes, durante y/o después de cada etapa de los métodos descritos en la presente descripción. Cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción o conocidos en la técnica pueden usarse para teñir y/o obtener imágenes de la muestra biológica. En algunas modalidades, la obtención de imágenes se produce antes de desaminar la muestra. En algunas modalidades, la muestra biológica se tiñe mediante el uso de un método de tinción con H&E. En algunas modalidades, la muestra de tejido se tiñe y se toman imágenes durante de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 2 horas (o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descrito en la presente descripción). Puede ser necesario tiempo adicional para la tinción y la obtención de imágenes de diferentes tipos de muestras biológicas.

La muestra de tejido puede obtenerse de cualquier ubicación adecuada en un tejido u órgano de un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano. En algunas modalidades, la muestra de tejido se obtiene de una ubicación donde el ADN se metila diferencialmente en comparación con una ubicación de referencia. La ubicación donde el ADN se metila diferencialmente puede ser, por ejemplo, una célula, tejido u órgano enfermos, una célula, tejido u órgano infectados, una célula, tejido u órgano dañados, una célula, tejido u órgano cancerosos (por ejemplo, una célula, tejido u órgano tumoral), o una célula, tejido u órgano en diferenciación (por ejemplo, una célula madre o un tejido u órgano que comprende una o más células madre). En algunas modalidades, la ubicación en donde el ADN se metila diferencialmente es una célula, tejido u órgano al que se le ha administrado uno o más fármacos, por ejemplo, fármacos terapéuticos. Otras ubicaciones que incluyen ADN metilado diferencialmente se conocen en la técnica.

40

En algunas modalidades, la muestra biológica es una célula, tejido u órgano tumoral. Ejemplos no limitantes de cánceres referidos a cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción incluyen: sarcomas, carcinomas, carcinomas corticosuprarrenal, cánceres relacionados con SIDA, cáncer anal, cáncer del apéndice, astrocitomas, tumor basal atípico teratoide/rabdoide, carcinoma de células basales, carcinoma de vejiga, glioma del tallo cerebral, tumores cerebrales (incluye glioma del tallo cerebral, tumor atípico teratoide/rabdoide del sistema nervioso central, tumores embrionarios del sistema nervioso central, astrocitomas, craneofaringioma, ependimoblastoma, ependimoma, meduloblastoma, meduloepitelioma, tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia, tumores neuroectodérmicos supratentoriales primitivos y pineoblastoma), cáncer de mama, tumores bronquiales, cáncer de sitio primario desconocido, tumor carcinoide, carcinoma de sitio primario desconocido, tumor teratoide/rabdoide atípico del sistema nervioso central, tumores embrionarios del sistema nervioso central, cáncer cervical, cánceres de la infancia, cordoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, tumores de células endocrinas de los islotes del páncreas, cáncer de endometrio, ependimoblastoma, ependimoma, cáncer esofágico, estesionuroblastoma, sarcoma de Ewing, tumor extracraneal de células germinales, tumor extragonadal de células germinales, cáncer extrahepático del conducto biliar, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor gastrointestinal de células estromales, tumor estromal gastrointestinal (GIST), tumor trofoblástico gestacional, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer del corazón, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, tumores de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer laríngeo, cáncer de labio, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de hueso, histiocitoma fibroso maligno, meduloblastoma, meduloepitelioma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, carcinoma de piel de células de Merkel, mesotelioma, carcinoma escamoso metastásico de cuello con primario oculto, cáncer de boca, síndromes endocrinos de neoplasia múltiple, mieloma múltiple, mieloma múltiple/neoplasma de células plasmáticas, micosis fungoides, síndromes mielodisplásicos, neoplasmas mieloproliferativos, cáncer de la cavidad nasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer oral, cáncer de la cavidad oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, otros tumores cerebrales y de la médula espinal, cáncer de ovario, cáncer del epitelio ovárico, tumor de células germinales

65

ováricas, tumor potencial ovárico de baja malignidad, cáncer pancreático, papilomatosis, cáncer de senos paranasales, cáncer de paratiroides, cáncer pélvico, cáncer de pene, cáncer faríngeo, tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia, pineoblastoma, tumor pituitario, blastoma pleuropulmonar, cáncer de hígado hepatocelular primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de células renales (riñón),  
 5 cáncer renal, cáncer del tracto respiratorio, retinoblastoma, rhabdomiocarcinoma, cáncer de glándulas salivares, síndrome de Sezary, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer del intestino delgado, sarcoma de partes blandas, carcinoma de células escamosas, cáncer escamoso de cuello, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos supratentoriales primitivos, cáncer testicular, cáncer de garganta, carcinoma tímico, timoma, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales, cáncer de células transicionales de la pelvis renal y el uréter, tumor trofoblástico, cáncer de uréter, cáncer de la uretra, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer vulvar, macroglobulinemia de Waldenström y tumor de Wilm.

En algunas modalidades, la muestra biológica es una muestra de cáncer. En algunas modalidades, el cáncer puede tratarse mediante el uso de una terapia epigenética (por ejemplo, un agente hipometilante).

En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), un cáncer colorrectal con microsatélites estables (CRC), un cáncer de cabeza y cuello, un carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC), un melanoma, una leucemia mieloide aguda (AML), un síndrome mielodisplásico (MDS), un adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), un cáncer de ovario, un cáncer primario peritoneal o de las trompas de Falopio, un linfoma periférico de células T (PTCL), un cáncer de ovario de tipo II o un cáncer de mama positivo para receptores de estrógenos y HER2-negativo, un linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), un tumor sólido del sistema nervioso central (CNS), un cáncer de pulmón, un cáncer renal, un carcinoma hepatocelular, un adenocarcinoma pancreático, un colangiocarcinoma, o una leucemia mielomonocítica crónica (CMML).

La metilación de marcadores clave se usa para el diagnóstico del cáncer. Estos marcadores clave se describen, por ejemplo, en Locke WJ y otros, DNA Methylation Cancer Biomarkers: Translation to the Clinic. *Front. Genet.* 10:1150, 2019; Nassiri, F. y otros, Detection and discrimination of intracranial tumors using plasma cell-free DNA methylomes. *Nat Med* 26, 1044–1047, 2020; y Nuzzo, P.V. y otros, Detection of renal cell carcinoma using plasma and urine cell-free DNA methylomes. *Nat Med* 26, 1041–1043 (2020).

Los agentes adecuados tales como agentes hipometilantes pueden usarse como terapias epigenéticas para el tratamiento del cáncer. 5-Azacitidina (5-Aza), 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina) y SGI-110 (guadecitabina) son análogos del nucleósido citidina que secuestran irreversiblemente las proteínas DNMT al ADN, lo que conduce a la hipometilación global del ADN.

En algunas modalidades, la muestra de cáncer es de un sujeto tratado con una terapia contra el cáncer. En algunas modalidades, la terapia contra el cáncer es la terapia con análogo de nucleósido citidina. En algunas modalidades, la terapia contra el cáncer es una terapia con 5-Azacitidina (5-Aza), 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina) o SGI-110 (guadecitabina).

El analito puede ser cualquier analito adecuado descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, el analito es un ácido nucleico. En algunas modalidades, el analito es un ADN. En algunas modalidades, el analito es un ADN genómico. En algunas modalidades, el analito es un ADN no genómico. En algunas modalidades, el ADN está dentro de una región codificante de un gen. En algunas modalidades, el ADN está dentro de una región promotora de un gen. En algunas modalidades, el ADN está fuera de la región codificante de un gen. En algunas modalidades, el ADN abarca una región codificante y una región no codificante de un gen. En algunas modalidades, el ADN abarca la región codificante y/o la región no codificante de más de un gen.

En algunas modalidades, el ADN es un ADN metilado, por ejemplo, un ADN que comprende una o más citosinas metiladas. En algunas modalidades, el ADN es un ADN no metilado, por ejemplo, un ADN que no comprende ninguna citosina metilada. En algunas modalidades, el ADN es un ADN que se metila diferencialmente en una ubicación en comparación con una ubicación de referencia.

El tamaño del analito, por ejemplo, ADN, puede ser cualquier tamaño adecuado de una molécula de ácido nucleico en una muestra biológica. En algunas modalidades el tamaño del ácido nucleico diana es de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 100 000 nucleótidos (por ejemplo, de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos, de aproximadamente 200 nucleótidos a aproximadamente 500 nucleótidos, de aproximadamente 500 nucleótidos a aproximadamente 1000 nucleótidos, de aproximadamente 1000 nucleótidos a aproximadamente 2000 nucleótidos, de aproximadamente 2000 nucleótidos a aproximadamente 4000 nucleótidos, de aproximadamente 4000 nucleótidos a aproximadamente 6000 nucleótidos, de aproximadamente 6000 nucleótidos a aproximadamente 8000 nucleótidos, de aproximadamente 8000 nucleótidos a aproximadamente 10 000 nucleótidos, de aproximadamente 10 000 nucleótidos a aproximadamente 20 000 nucleótidos, de aproximadamente 20 000 nucleótidos a aproximadamente 30 000 nucleótidos, de aproximadamente 30 000 nucleótidos a aproximadamente 40 000

nucleótidos, de aproximadamente 40 000 nucleótidos a aproximadamente 50 000 nucleótidos, de aproximadamente 50 000 nucleótidos a aproximadamente 60 000 nucleótidos, de aproximadamente 60 000 nucleótidos a aproximadamente 70 000 nucleótidos, de aproximadamente 70 000 nucleótidos a aproximadamente 80 000 nucleótidos, de aproximadamente 80 000 nucleótidos a aproximadamente 90 000 nucleótidos, o de aproximadamente 90 000 nucleótidos a aproximadamente 100 000 nucleótidos).

En algunas modalidades, el ADN incluye al menos una porción de un gen de biomarcador tumoral. En algunas modalidades, el biomarcador tumoral es un antígeno tumoral. Los antígenos tumorales ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, matrices de antígenos de antígeno asociado a melanoma (MAGE) (por ejemplo, MAGE-C1 (antígeno de cáncer/testículo CT7), antígeno MAGE-B1 (antígeno MAGE-XP, DAM10), antígeno MAGE-B2 (DAM6), antígeno MAGE-2, antígeno MAGE-4a y antígeno MAGE-4b), tirosinasa, glicoproteína 100 (gp100), disialogangliósido GD-2, disialogangliósido O-acetilado GD-3, gangliósido GM-2, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), antígeno B-Raf mutante asociado con melanoma y cáncer de colon, antígeno del receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2/neu), antígeno asociado a melanoma reconocido por células T (MART-1) (por ejemplo, péptido MART-1 26-35 o péptido MART-1 27-35), proteína de unión a proteína cinasa C, proteína transcriptasa inversa, proteína de anclaje a cinasa A (proteína AKAP), cinasa relacionada con vaccinia Serina/treonina cinasa 1 (VRK1), fucosiltransferasa (T6-7), proteína de dedos de zinc 258 (T11-6), proteína de unión a p53 (T1-52), T5-15 (KIAA1735), T5-13 (Sos1), T11-5 (proteína hipotética MGC4170), T11-9 (proteína hipotética AF225417), T11-3 (repetición de anquirina trap), T7-1 (KIAA1288), un péptido ras mutante o de tipo salvaje, fermento de telomerasa de Homo sapiens (hTRT), citoqueratina-19 (CYFRA21-1), antígeno 1 del carcinoma de células escamosas (SCCA-1), proteína T4-A, antígeno 2 del carcinoma de células escamosas (SCCA-2), antígeno del carcinoma de ovario CA125 (1A1-3B) (KIAA0049), MUCINA 1 asociada a la superficie celular (por ejemplo, MUCINA asociada a tumores, MUCINA asociada a carcinoma, MUCINA epitelial polimórfica, MUCINA urinaria reactiva al maní, mucina epitelial polimórfica (PEM), PEMT, episialina, antígeno de membrana epitelial asociado a tumores, antígeno de membrana epitelial (EMA), antígeno H23 (H23AG), PUM y antígeno asociado a carcinoma de mama DF3), antígeno tumoral CTCL se1-1, antígeno tumoral CTCL se14-3, antígeno tumoral CTCL se20-4, antígeno tumoral CTCL se20-9, antígeno tumoral CTCL se33-1, antígeno tumoral CTCL se37-2, antígeno tumoral CTCL se57-1, antígeno tumoral CTCL se89-1, antígeno de membrana específico de la próstata, glicoproteína del trofoblasto oncofetal 5T4, herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi Orf73, antígeno de cáncer de colon NY-CO-45, antígeno de cáncer de pulmón NY-LU-12 variante A, antígeno de superficie asociado al cáncer, antígeno de adenocarcinoma ART1, antígeno de cáncer de cerebro-testículo asociado paraneoplásico (antígeno onconeuronal MA2; antígeno neuronal paraneoplásico), antígeno ventral neurooncológico 2 (NOVA2), gen del antígeno del carcinoma hepatocelular 520, antígeno asociado a tumor CO-029, antígeno asociado a tumor MAGE-X2, antígeno del sarcoma sinovial, punto de ruptura X 2, antígeno del carcinoma de células escamosas reconocido por célula T, antígeno 1 de cáncer de colon definido serológicamente, antígeno de cáncer de mama definido serológicamente NY-BR-15, antígeno de cáncer de mama definido serológicamente NY-BR-16, cromogranina A, proteína secretora de paratiroides 1, antígeno asociado al cáncer de páncreas (DUPAN-2), antígeno carbohidrato CA 19-9, antígeno carbohidrato CA 72-4, antígeno carbohidrato CA 195 y antígeno carcinoembrionario (CEA).

En algunas modalidades, el antígeno tumoral es BRCA1, CDKN2A (p16<sup>INK4a</sup>), CDKN2B (p15<sup>INK4b</sup>), GSTP1, MGMT, RASSF1A, o SFRP2.

#### Primer y segundo sustratos ilustrativos

En algunos casos, la muestra biológica se coloca (por ejemplo, se monta o se inmoviliza de cualquier otra manera) sobre un primer sustrato. El primer sustrato puede ser cualquier soporte sólido o semisólido sobre el cual puede montarse una muestra biológica. En algunos casos, el primer sustrato es un portaobjetos. En algunos casos, el portaobjetos es un portaobjetos de vidrio. En algunas modalidades, el sustrato se fabrica de vidrio, silicio, papel, hidrogel, monolitos de polímero, u otro material conocido en la técnica. En algunas modalidades, el primer sustrato comprende un material o matriz inerte (por ejemplo, portaobjetos de vidrio) que se ha funcionalizado, por ejemplo, al tratar el sustrato con un material que comprende grupos reactivos que facilitan el montaje de la muestra biológica.

En algunas modalidades, el primer sustrato no comprende una pluralidad (por ejemplo, una matriz) de sondas de captura, que comprende cada una un código de barras espacial.

Un sustrato, por ejemplo, un primer sustrato y/o un segundo sustrato, puede tener generalmente cualquier forma o formato adecuado. Por ejemplo, un sustrato puede ser plano, curvo, por ejemplo, convexo o cóncavo. Por ejemplo, un primer sustrato puede ser curvado hacia el área donde se produce la interacción entre una muestra biológica, por ejemplo, muestra de tejido, y un primer sustrato. En algunas modalidades, un sustrato es plano, por ejemplo, plano, chip o portaobjetos. Un sustrato puede contener una o más superficies con patrones dentro del sustrato (por ejemplo, canales, pocillos, proyecciones, crestas, hendiduras, etc.).

- Un sustrato, por ejemplo, un primer sustrato y/o un segundo sustrato, puede tener cualquier forma conveniente. Por ejemplo, un sustrato puede tener típicamente una forma delgada y plana (por ejemplo, un cuadrado o un rectángulo). En algunas modalidades, una estructura de sustrato tiene esquinas redondas (por ejemplo, para una mayor seguridad o robustez). En algunas modalidades, una estructura de sustrato tiene una o más esquinas cortadas (por ejemplo, para su uso con una abrazadera de portaobjetos o mesa de fijación). En algunas modalidades, en donde una estructura del sustrato es plana, la estructura del sustrato puede ser cualquier tipo apropiado de soporte que tenga una superficie plana (por ejemplo, un chip o un portaobjetos tal como un portaobjetos de microscopio).
- Los primeros y/o los segundos sustratos pueden incluir opcionalmente varias estructuras tales como, pero sin limitarse a, proyecciones, crestas y canales. Un sustrato puede microestamparse para limitar la difusión lateral de analitos (por ejemplo, para mejorar la resolución del análisis espacial). Un sustrato modificado con tales estructuras puede modificarse para permitir la asociación de analitos, elementos (por ejemplo, perlas) o sondas en sitios individuales. Por ejemplo, los sitios donde un sustrato se modifica con varias estructuras pueden ser contiguos o no contiguos con otros sitios.
- En algunas modalidades, la superficie de un primero y/o segundo sustrato se modifica para contener uno o más pocillos, mediante el uso de técnicas tales como (pero sin limitarse a) técnicas de estampado, micrograbado o moldeo. En algunas modalidades en las que un primero y/o segundo sustrato incluye uno o más pocillos, el primer sustrato puede ser un portaobjetos de concavidad o portaobjetos de cavidad. Por ejemplo, los pocillos pueden formarse por una o más depresiones poco profundas en la superficie del primero y/o segundo sustrato. En algunas modalidades, donde un primero y/o segundo sustrato incluye uno o más pocillos, los pocillos pueden formarse mediante la unión de un casete (por ejemplo, un casete que contiene una o más cámaras) a una superficie de la primera estructura del sustrato.
- En algunas modalidades donde el primero y/o segundo sustrato se modifica para contener una o más estructuras, que incluyen pero no se limitan a, pocillos, proyecciones, crestas, elementos, o marcas, las estructuras pueden incluir sitios físicamente alterados. Por ejemplo, un primero y/o segundo sustrato modificado con varias estructuras puede incluir propiedades físicas, que incluyen, pero no se limitan a, configuraciones físicas, fuerzas magnéticas o de compresión, sitios químicamente funcionalizados, sitios químicamente alterados y/o sitios alterados electrostáticamente. En algunas modalidades donde el primer sustrato se modifica para contener varias estructuras, que incluyen pero no se limitan a pocillos, proyecciones, crestas, elementos, o marcas, las estructuras se aplican en un patrón. Alternativamente, las estructuras pueden distribuirse aleatoriamente.
- En algunas modalidades, un primer sustrato incluye una o más marcas en su superficie, por ejemplo, para proporcionar orientación para alinear al menos una porción de la muestra biológica con una pluralidad de sondas de captura en el segundo sustrato durante un proceso de tipo intercalamiento descrito en la presente descripción. Por ejemplo, el primer sustrato puede incluir un indicador del área de muestra que identifica el área de muestra. En algunas modalidades, el indicador del área de muestra en el primer sustrato se alinea con un área del segundo sustrato que comprende una pluralidad de sondas de captura. En algunas modalidades, el primer y/o segundo sustrato puede incluir una marca fiducial. En algunas modalidades, el primer y/o segundo sustrato no comprende una marca fiducial. En algunas modalidades, el primer sustrato no comprende una marca fiducial y el segundo sustrato comprende una marca fiducial. Tales marcas pueden hacerse mediante el uso de técnicas que incluyen, pero sin limitarse a, impresión, pulimento y deposición sobre la superficie.
- En algunas modalidades, las imágenes pueden realizarse mediante el uso de uno o más marcadores fiduciales, es decir, objetos colocados en el campo visual de un sistema de obtención de imágenes que aparecen en la imagen producida. Los marcadores fiduciales se usan típicamente como un punto de referencia o escala de medición. Los marcadores fiduciales pueden incluir, pero no se limitan a, etiquetas detectables tales como etiquetas fluorescentes, radiactivas, quimioluminiscentes y colorimétricas. El uso de marcadores fiduciales para estabilizar y orientar muestras biológicas se describe, por ejemplo, en Carter y otros, Applied Optics 46:421-427, 2007). En algunas modalidades, un marcador fiducial puede ser una partícula física (por ejemplo, una nanopartícula, una microesfera, una nanoesfera, una perla, un poste o cualquiera de las otras partículas físicas ilustrativas descritas en la presente descripción o conocidas en la técnica).
- En algunas modalidades, un marcador fiducial puede estar presente en un primer sustrato para proporcionar orientación de la muestra biológica. En algunas modalidades, una microesfera puede acoplarse a un primer sustrato para ayudar en la orientación de la muestra biológica. En algunos ejemplos, una microesfera acoplada a un primer sustrato puede producir una señal óptica (por ejemplo, fluorescencia). En algunas modalidades, un punto de cuantificación puede acoplarse al primer sustrato para ayudar en la orientación de la muestra biológica. En algunos ejemplos, un punto de cuantificación acoplado a un primer sustrato puede producir una señal óptica.
- En algunas modalidades, un marcador fiducial puede ser una molécula inmovilizada con la que una molécula señal detectable puede interactuar para generar una señal. Por ejemplo, un ácido nucleico marcador puede

enlazarse o acoplarse a un resto químico capaz de fluorescer cuando se somete a luz de una longitud de onda específica (o intervalo de longitudes de onda). Aunque no se requiere, puede ser ventajoso usar un marcador que pueda detectarse mediante el uso de las mismas condiciones (por ejemplo, condiciones de obtención de imágenes) usadas para detectar un ADNc etiquetado.

5 En algunas modalidades, un marcador fiducial puede colocarse aleatoriamente en el campo visual. Por ejemplo, un oligonucleótido que contiene un fluoróforo puede imprimirse, estamparse, sintetizarse o unirse aleatoriamente a un primer sustrato (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio) en una posición aleatoria en el primer sustrato. Una sección de tejido puede ponerse en contacto con el primer sustrato de manera que el  
10 oligonucleótido que contiene el fluoróforo entre en contacto, o esté cerca de, una célula de la sección de tejido o un componente de la célula (por ejemplo, un ARNm o molécula de ADN). Puede obtenerse una imagen del primer sustrato y la sección de tejido, y puede determinarse la posición del fluoróforo dentro de la imagen de la sección de tejido (por ejemplo, al revisar una imagen óptica de la sección de tejido superpuesta con la detección del fluoróforo). En algunas modalidades, los marcadores fiduciales pueden colocarse con precisión en el campo  
15 visual (por ejemplo, en ubicaciones conocidas sobre un primer sustrato). En este caso, un marcador fiducial puede estamparse, unirse o sintetizarse en el primer sustrato y ponerse en contacto con una muestra biológica. Típicamente, se toma una imagen de la muestra y el marcador fiducial, y la posición del marcador fiducial en el primer sustrato puede confirmarse al ver la imagen.

20 En algunas modalidades, un marcador fiducial puede ser una molécula inmovilizada (por ejemplo, una partícula física) unida al primer sustrato. Por ejemplo, un marcador fiducial puede ser una nanopartícula, por ejemplo, una nanovarilla, un nanoalambre, un nanocubo, una nanopirámide, o una nanopartícula esférica. En algunos ejemplos, la nanopartícula puede fabricarse de un metal pesado (por ejemplo, oro).

25 Una amplia variedad de diferentes primeros sustratos puede usarse para los propósitos anteriores. En general, un primer sustrato puede ser cualquier material de soporte adecuado. Los primeros soportes sólidos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, vidrio y vidrio modificado y/o funcionalizado, hidrogeles, películas, membranas, plásticos (que incluyen, por ejemplo, acrílicos, poliestireno, copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflon<sup>TM</sup>, olefinas cíclicas, poliimidadas, etc.), nailon,  
30 cerámica, resinas, Zeonor, sílice o materiales a base de sílice, que incluyen silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, haces de fibras ópticas y polímeros, como poliestireno, copolímeros de olefinas cíclicas (COC), polímeros de olefinas cíclicas (COP), polipropileno, policarbonato de polietileno o sus combinaciones.

35 Entre los ejemplos de materiales de primer sustrato mencionados anteriormente, el poliestireno es un material hidrófobo adecuado para unir macromoléculas cargadas negativamente porque normalmente contiene pocos grupos hidrófilos. Para los ácidos nucleicos inmovilizados sobre portaobjetos de vidrio, al aumentar la hidrofobicidad de la superficie vítrea puede aumentarse la inmovilización de ácidos nucleicos. Tal mejora puede permitir una formación relativamente más densamente empaquetada (por ejemplo, proporcionar una  
40 especificidad y resolución mejoradas).

En otro ejemplo, un primer sustrato puede ser una celda de flujo. Las celdas de flujo pueden formarse de cualquiera de los materiales anteriores, y pueden incluir canales que permiten que los reactivos, solventes, elementos, y analitos pasen a través de la celda de flujo. En algunas modalidades, una muestra biológica  
45 embebida en hidrogel se ensambla en una celda de flujo (por ejemplo, la celda de flujo se utiliza para introducir el hidrogel en la muestra biológica). En algunas modalidades, una muestra biológica embebida en hidrogel no se ensambla en una celda de flujo. En algunas modalidades, la muestra biológica embebida en hidrogel puede prepararse y/o expandirse isométricamente como se describe en la presente descripción.

50 Los sustratos ilustrativos similares al primer sustrato (por ejemplo, un sustrato que no tiene sondas de captura) y/o el segundo sustrato se describen en el documento WO 2020/123320.

#### Tinción y obtención de imágenes de la muestra biológica

55 Después de la colocación de la muestra biológica sobre el primer sustrato, las muestras biológicas pueden teñirse mediante el uso de una amplia variedad de colorantes y técnicas de tinción. En algunas modalidades, una muestra puede teñirse mediante el uso de cualquier número de tinciones biológicas, que incluyen, pero no se limitan a, naranja acridina, marrón Bismarck, carmín, azul coomassie, violeta cresílica, DAPI, eosina, bromuro de etidio, fucsina ácida, hematoxilina, tinciones Hoechst, yodo, verde metilo, azul de metileno, rojo  
60 neutro, azul Nilo, rojo Nilo, tetróxido de osmio, yoduro de propidio, rodamina o safranina. En algunos casos, los métodos descritos en la presente descripción incluyen obtener imágenes de la muestra biológica. En algunos casos, la obtención de imágenes de la muestra se produce antes de desaminar la muestra biológica.

65 La muestra puede teñirse mediante el uso de técnicas de tinción conocidas, que incluyen Can-Grunwald, Giemsa, hematoxilina y eosina (H&E), Jenner, Leishman, tricrómica de Masson, Papanicolaou, Romanowsky,

plata, Sudán, Wright, y/o técnicas de tinción con Ácido Periódico Schiff (PAS). La tinción con PAS se realiza típicamente después de la fijación en formalina o acetona. En algunos casos, la tinción es una tinción de H&E.

5 En algunas modalidades, la muestra biológica puede teñirse mediante el uso de una etiqueta detectable (por ejemplo, radioisótopos, fluoróforos, compuestos quimioluminiscentes, compuestos bioluminiscentes y colorantes) como se describió en otra parte en la presente descripción. En algunas modalidades, una muestra biológica se tiñe mediante el uso de solo un tipo de tinción o una técnica. En algunas modalidades, la tinción incluye técnicas de tinción biológica tales como la tinción con H&E. En algunas modalidades, la tinción incluye identificar analitos mediante el uso de anticuerpos conjugados con fluorescencia. En algunas modalidades, una muestra biológica se tiñe mediante el uso de dos o más tipos diferentes de tinciones, o dos o más técnicas diferentes de tinción. Por ejemplo, una muestra biológica puede prepararse mediante tinción y obtención de imágenes mediante el uso de una técnica (por ejemplo, tinción con H&E y obtención de imágenes de campo claro), seguido de tinción y obtención de imágenes mediante el uso de otra técnica (por ejemplo, tinción con IHC/IF y microscopía de fluorescencia) para la misma muestra biológica.

15 En algunas modalidades, las muestras biológicas pueden decolorarse. Los métodos para desteñir o decolorar una muestra biológica se conocen en la técnica, y generalmente dependen de la naturaleza de la(s) tinción(ones) aplicada(s) a la muestra. Por ejemplo, la tinción con H&E puede decolorarse al lavar la muestra en HCl, o cualquier otro ácido (por ejemplo, ácido selénico, ácido sulfúrico, ácido hidroyódico, ácido benzoico, ácido carbónico, ácido málico, ácido fosfórico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido salicílico, ácido tartárico, ácido sulfuroso, ácido tricloroacético, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido ortofosfórico, ácido arsénico, ácido selenoso, ácido crómico, ácido cítrico, ácido fluorhídrico, ácido nitroso, ácido isocianico, ácido fórmico, selenuro de hidrógeno, ácido molíbdico, ácido láctico, ácido acético, ácido carbónico, sulfuro de hidrógeno, o sus combinaciones). En algunas modalidades, la decoloración puede incluir 1, 2, 3, 4, 5 o más lavados en un ácido (por ejemplo, HCl). En algunas modalidades, la decoloración puede incluir añadir HCl a una solución aguas abajo (por ejemplo, solución de permeabilización). En algunas modalidades, la decoloración puede incluir disolver una enzima usada en los métodos descritos (por ejemplo, pepsina) en una solución ácida (por ejemplo, HCl). En algunas modalidades, después de decolorar la hematoxilina con un ácido, pueden añadirse otros reactivos a la solución de decoloración para elevar el pH para usar en otras aplicaciones. Por ejemplo, puede añadirse SDS a una solución ácida de decoloración con el fin de elevar el pH en comparación con la solución de decoloración de ácido sola. Como otro ejemplo, en algunas modalidades, se aplican una o más tinciones de inmunofluorescencia a la muestra mediante acoplamiento de anticuerpos. Tales tinciones pueden eliminarse mediante el uso de técnicas tales como escisión de enlaces disulfuro mediante el tratamiento con un agente reductor y lavado con detergente, tratamiento con sal caotrópica, tratamiento con solución de recuperación de antígeno y tratamiento con un tampón de glicina ácida. Los métodos múltiples para teñir y decolorar se describen, por ejemplo, en Bolognesi y otros, *J. Histochem. Cytochem.* 2017; 65(8): 431-444, Lin y otros, *Nat Commun.* 2015; 6:8390, Pirici y otros, *J. Histochem. Cytochem.* 2009; 57:567-75, y Glass y otros, *J. Histochem. Cytochem.* 2009; 57:899-905.

40 En algunas modalidades, los protocolos de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica (técnicas de tinción directa e indirecta) pueden realizarse como parte de, o además de, los flujos de trabajo espaciales ilustrativos presentados en la presente descripción. Por ejemplo, las secciones de tejido pueden fijarse de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. La muestra biológica puede transferirse a una matriz (por ejemplo, matriz de sondas de captura), en donde los analitos (por ejemplo, proteínas) se sondan mediante el uso de protocolos de inmunofluorescencia. Por ejemplo, la muestra puede rehidratarse, bloquearse y permeabilizarse (SSC 3X, BSA 2 %, Tritón X 0,1 %, inhibidor de ARNasa 1 U/μl durante 10 minutos a 4 °C) antes de teñirse con anticuerpos primarios fluorescentes (1:100 en 3XSSC, BSA 2 %, Tritón X 0,1 %, inhibidor de ARNasa 1 U/μl durante 30 minutos a 4 °C). La muestra biológica puede lavarse, cubrirse con cubreobjetos (en glicerol + inhibidor de ARNasa de 1 U/μl), obtener imágenes (por ejemplo, mediante el uso de un microscopio confocal u otro aparato capaz de detección fluorescente), lavarse y procesarse de acuerdo con la captura de analito o flujos de trabajo espaciales descritos en la presente descripción.

55 Como se usa en la presente descripción, un tampón de recuperación de antígeno puede mejorar la captura por anticuerpos en protocolos IF/IHC. Un protocolo ilustrativo para la recuperación de antígeno puede ser precalentar el tampón de recuperación de antígeno (por ejemplo, a 95 °C), sumergir la muestra biológica en el tampón de recuperación de antígeno calentado durante un tiempo predeterminado y luego eliminar la muestra biológica del tampón de recuperación de antígeno y lavar la muestra biológica.

60 En algunas modalidades, la optimización de la permeabilización puede usarse para identificar analitos intracelulares. La optimización de la permeabilización puede incluir la selección de agentes de permeabilización, la concentración de agentes de permeabilización y la duración de la permeabilización. La permeabilización tisular se discute en otra parte en la presente descripción.

65 En algunas modalidades, el bloqueo de una matriz y/o una muestra biológica en una preparación para etiquetar la muestra biológica disminuye la unión inespecífica de los anticuerpos a la matriz y/o muestra biológica (disminuye el fondo). Algunas modalidades proporcionan tampones de bloqueo/soluciones de bloqueo que

pueden aplicarse antes y/o durante la aplicación de la etiqueta, en donde el tampón de bloqueo puede incluir un agente de bloqueo y opcionalmente un surfactante y/o una solución salina. En algunas modalidades, un agente de bloqueo puede ser albúmina sérica bovina (BSA), suero, gelatina (por ejemplo, gelatina de pescado), leche (por ejemplo, leche seca sin grasa), caseína, polietilén glicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), o polivinilpirrolidona (PVP), reactivo de bloqueo de biotina, un reactivo de bloqueo de peroxidasa, levamisol, solución de Carnoy, glicina, lisina, borohidruro de sodio, azul cielo de pontamina, negro de Sudán, azul de tripán, agente de bloqueo de FITC y/o ácido acético. El tampón de bloqueo/solución de bloqueo puede aplicarse a la matriz y/o muestra biológica antes y/o durante el etiquetado (por ejemplo, la aplicación de anticuerpos conjugados con fluoróforo) a la muestra biológica.

Desaminación de ácidos nucleicos en la muestra biológica

En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción incluyen desaminar el analito. En algunas modalidades, ya sea antes o después de la desaminación, los métodos descritos en la presente descripción incluyen una etapa de permeabilización de la muestra biológica. En algunos casos, la etapa de permeabilización ocurre antes de desaminar el analito en la muestra. En algunos casos, la permeabilización incluye poner en contacto la muestra biológica con un reactivo de permeabilización. Puede usarse cualquier reactivo de permeabilización adecuado descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, el reactivo de permeabilización es una endopeptidasa. Las endopeptidasas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, tripsina, quimotripsina, elastasa, termolisina, pepsina, clostripán, glutamil endopeptidasa (GluC), ArgC, peptidil-asp endopeptidasa (ApsN), endopeptidasa LysC y endopeptidasa LysN. En algunas modalidades, la endopeptidasa es pepsina.

En algunas modalidades, la desaminación del analito se logra al poner en contacto el analito con uno o más agentes desaminantes enzimáticos o químicos. En algunos casos, el agente desaminante fragmenta el analito (por ejemplo, ADN). Cualquier agente desaminante adecuado puede usarse en los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, el analito, por ejemplo, ADN, se desnaturaliza en una molécula monocatenaria antes del tratamiento del(de los) agente(s) desaminante(s). En algunas modalidades, la etapa de desaminación incluye poner en contacto la muestra con una composición que comprende bisulfito. En algunas modalidades, el bisulfito es bisulfito de sodio.

En algunos casos, la etapa de desaminación se realiza antes de la hibridación de una o más sondas con los analitos (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico) y la captura de las sondas ligadas (por ejemplo, ligazón) en una matriz espacial. Por ejemplo, la muestra biológica se coloca en un portaobjetos regular (diferente de una matriz espacial) sin sondas de captura, y las moléculas de ácido nucleico en la muestra biológica se desaminan como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, la desaminación comprende tratar la muestra enzimáticamente. En algunas modalidades, la muestra se trata con una desaminasa. Cualquier enzima adecuada conocida en la técnica puede usarse en los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, la enzima es la enzima de edición del ARNm de la apolipoproteína B, similar al polipéptido catalítico (APOBEC, citidina desaminasa).

En algunas modalidades, las citosinas no metiladas, si están presentes en el analito en la muestra, se desaminan en uracilos. Después de la unión de la sonda con el analito desaminado, la sonda se extiende en donde cada uracilo, si está presente en el analito, se empareja de base con una adenina. En algunas modalidades, la sonda extendida comprende una adenina en cada posición correspondiente a las citosinas no metiladas en el analito en la muestra. En algunas modalidades, todas las citosinas no metiladas en el analito se convierten en uracilos mediante la etapa de desaminación. En algunos casos, las citosinas que se metilan no se convierten en uracilo. En su lugar, las citosinas metiladas permanecen como citosinas.

En algunos casos, antes de la adición de las sondas descritas en la siguiente sección, la muestra se trata con un agente de permeabilización. En algunos casos, el agente de permeabilización es un agente de permeabilización diluido. En algunos casos, el agente de permeabilización diluido incluye, pero no se limita a, solventes orgánicos (por ejemplo, acetona, etanol, y metanol), agentes reticulantes (por ejemplo, paraformaldehído), detergentes (por ejemplo, saponina, Triton X-100™, Tween-20™, o dodecilsulfato de sodio (SDS)) y enzimas (por ejemplo, tripsina, proteasas (por ejemplo, proteinasa K). En algunas modalidades, el detergente es un detergente aniónico (por ejemplo, SDS o solución salina de sodio de N-lauroilsarcosina). Los reactivos de permeabilización ilustrativos se describen en la publicación de solicitud de patente PCT núm. WO 2020/123320. En algunos casos, la dilución del agente de permeabilización es de aproximadamente 10 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces, aproximadamente 200 veces, aproximadamente 300 veces, aproximadamente 400 veces, aproximadamente 500 veces o más.

En algunas modalidades, el método comprende además lavar la muestra biológica. En algunos casos, se produce una etapa de lavado entre la etapa de desaminación y la etapa donde se añaden las sondas. En algunas modalidades, la etapa de lavado se lleva a cabo para eliminar todo o parte del agente desaminante.

- En algunas modalidades, la etapa de lavado no elimina el analito en la muestra biológica. En algunas modalidades, la etapa de lavado elimina una cantidad insignificante del analito en la muestra biológica. En algunos casos, se produce una etapa de lavado después de hibridar los oligonucleótidos. En algunos casos, esta etapa de lavado elimina cualquier oligonucleótido no unido y puede realizarse mediante el uso de cualquier técnica o solución descrita en la presente descripción o conocida en la técnica. En algunas modalidades, se realizan múltiples etapas de lavado para eliminar oligonucleótidos no unidos.
- 5 Adición de sondas a la muestra biológica
- 10 Adición de la primera y la segunda sondas
- Después de la desaminación, en algunos casos, se añaden una o más sondas a la muestra biológica. En algunos casos, la una o más sondas (p. ej., una primera sonda; una segunda sonda) es al menos 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, al menos aproximadamente 105, al menos aproximadamente 110, al menos aproximadamente 115, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 125, al menos aproximadamente 135, al menos aproximadamente 140, o más nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la sonda incluye secuencias que son complementarias o sustancialmente complementarias a un analito, por ejemplo, un ácido nucleico. Por sustancialmente complementaria, se entiende que la sonda es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % complementaria a una secuencia en un analito. En algunos casos, la primera sonda y la segunda sonda se hibridan con secuencias adyacentes en un analito.
- 15
- 20
- 25 En algunos casos, las sondas se hibridan con una secuencia que tiene de 5 a 140 nucleótidos de longitud (por ejemplo, es aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, o 140 nucleótidos de longitud). En algunos casos, las sondas se hibridan con una secuencia que es de 15 a 120 nucleótidos de longitud.
- 30
- 35 En algunos casos, las sondas son sondas de ADN. En algunos casos, la primera sonda incluye al menos dos bases de ácido ribonucleico en el extremo 3' y una segunda sonda incluye un nucleótido fosforilado en el extremo 5'.
- 40 Las sondas (por ejemplo, una primera sonda y una segunda sonda) pueden diseñarse mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Además, las sondas pueden diseñarse de manera que (1) una o ambas sondas se hibriden directamente con una región potencial de metilación o (2) las sondas flanqueen una región potencial de metilación.
- 45 En algunos casos, las sondas usadas en la presente descripción se diseñan para hibridar con secuencias que están mutadas (por ejemplo, de citosina a timina) como resultado de la etapa de desaminación (es decir, ácido nucleico desaminado). En algunos casos, las sondas usadas en la presente descripción se diseñan para hibridar con secuencias que no están mutadas (por ejemplo, las citosinas que están metiladas no están mutadas durante la etapa de desaminación) como resultado de la etapa de desaminación. En algunos casos, las sondas usadas en la presente descripción se diseñan para hibridar con secuencias que incluyen al menos un nucleótido que muta como resultado de la etapa de desaminación. En algunos casos, las sondas usadas en la presente descripción se diseñan para hibridar con secuencias que incluyen más de un (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) nucleótido que se muta como resultado de la etapa de desaminación.
- 50
- 55 En algunos casos, las sondas se diseñan para flanquear (es decir, rodear) secuencias que son sitios de investigación de metilación. En algunos casos, la secuencia entre las dos regiones de un analito donde las sondas se hibridan (es decir, la secuencia que interviene) incluye uno o más nucleótidos que mutan (por ejemplo, de citosina a timina) durante la etapa de desaminación. En algunos casos, la secuencia que interviene incluye al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más nucleótidos que han mutado durante la etapa de desaminación descrita en la presente descripción. Por ejemplo, en algunos casos, una primera sonda puede diseñarse para hibridar un sitio 5' con un sitio de investigación de metilación, y una segunda sonda puede diseñarse para hibridar un sitio 5' con un sitio de investigación de metilación (o viceversa). Una vez hibridado, puede determinarse la secuencia entre los dos sitios de hibridación, al proporcionar información sobre si un nucleótido particular (por ejemplo, una citosina) se ha metilado. En algunos casos, las sondas se hibridan con secuencias que tienen al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más nucleótidos separados. En algunas modalidades, al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) nucleótido desaminado se ubica en la secuencia entre las sondas hibridadas.
- 60
- 65

En algunos casos, más de una (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) sondas se hibridan con una molécula de ADN diana. En algunos casos, dos sondas se hibridan con secuencias que son adyacentes entre sí. En algunos casos, las sondas se acoplan. En algunos casos, las sondas se acoplan a través de ligazón. En algunos casos, debido a que las sondas se hibridan con secuencias adyacentes, la ligazón puede ocurrir entre las sondas adyacentes después de la hibridación (es decir, no se requiere ninguna etapa de extensión como se describe en la presente descripción). En algunas modalidades, dos sondas se hibridan a secuencias de un analito que están separadas por al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 125, aproximadamente 150, aproximadamente 175, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente 400, aproximadamente 450, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900, o aproximadamente 1000 nucleótidos. En algunos casos, las sondas se hibridan con una secuencia que se ha modificado (por ejemplo, incluye una mutación) después de la desaminación. En algunos casos, la mutación es una citosina a una timina. En algunos casos, el analito incluye más de una mutación como resultado de la etapa de desaminación. En algunos casos, hay 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más citosinas que mutan a una timina (es decir, las citosinas no se metilan). En algunos casos, hay 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más citosinas que no mutan a una timina (es decir, las citosinas están metiladas). En algunos casos, la sonda está diseñada para detectar una o más mutaciones de desaminación.

La una o más sondas incluyen una secuencia que se une específicamente a una secuencia en el analito diana. En algunas modalidades, el resto de unión comprende una secuencia que se une específicamente a una región que no tiene un dinucleótido CG. En algunos casos, el resto de unión comprende una secuencia que se une específicamente a una región que incluye dinucleótidos AA, AT, AC, AG, CA, CT, CC, GA, GC, GT, GG, TA, TC, TG o TT. En algunas modalidades, la unión del resto de unión al analito diana no afecta la identificación del estado de metilación del analito diana.

En algunos casos, la una o más sondas (por ejemplo, una primera sonda; una segunda sonda) incluyen además una secuencia que puede hibridarse con una secuencia de sonda de captura (por ejemplo, en una matriz, como se describe en la presente descripción). En algunos casos, la secuencia que se hibrida con la sonda de captura es una secuencia de poliadenilación (poli(A)). En algunos casos, la secuencia que se hibrida con la sonda de captura es una secuencia degenerada (por ejemplo, aleatoria). En algunos casos, la secuencia que se hibrida con la sonda de captura se diseña para ser una secuencia específica, por ejemplo una secuencia que es complementaria a una secuencia diana específica en una molécula de ADN o ARN.

En algunas modalidades, al menos una de las sondas se extiende mediante el uso de una polimerasa. En algunos casos, los métodos descritos en la presente descripción incluyen generar una primera sonda extendida. En algunos casos, los métodos descritos en la presente descripción incluyen generar una segunda sonda extendida. En algunos casos, la primera sonda extendida o la segunda sonda extendida incluyen una secuencia complementaria a una secuencia entre la primera secuencia y la segunda secuencia. En algunos casos, una de las sondas se extiende para rellenar el espacio entre las dos sondas hibridadas. En algunas modalidades, la sonda de captura se extiende mediante el uso de una polimerasa. En algunas modalidades, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas modalidades, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa termoestable que incluye, pero no se limita a, ADN polimerasa tal como Phusion, ADN polimerasa Hot Start Taq y ADN Hot Start Taq EpiMark®.

En algunos casos, las sondas (por ejemplo, la primera sonda y la segunda sonda) se ligan entre sí. En casos de ligazón, cualquier ligasa adecuada puede usarse en los métodos descritos en la presente descripción. En algunos casos, las sondas pueden someterse a una reacción de ligazón enzimática, mediante el uso de una ligasa (por ejemplo, ligasa 2 de ARN T4, una ligasa splintR, una ligasa de ADN monocatenario). En algunas modalidades, la ligasa es una ligasa ADN T4. En algunos casos, la ligasa es ligasa 2 de ARN T4, también conocida como Rnl2, que liga el extremo hidroxilo 3' de un ARN al 5'fosfato de ADN en una estructura bicatenaria. La ligasa de ADN T4 es una enzima que pertenece a la familia de enzimas de ligasa de ADN que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster covalente a partir de un grupo hidroxilo 3' libre en una molécula de ADN y un grupo fosfato 5' libre de una segunda molécula de ADN separada, que une así covalentemente las dos cadenas de ADN entre sí para formar una única hebra de ADN. En algunos casos, la ligasa es una ligasa splintR. La ligasa SplintR, también conocida como Ligasa PBCV-1 DNA o ADN ligasa de Chorella virus, cataliza eficientemente el acoplamiento (por ejemplo, la ligazón) de oligonucleótidos de ADN monocatenario adyacentes ferulizados por una hebra de ARN complementaria. En algunos casos, la ligasa es una ligasa de ADN monocatenario. En algunas modalidades, la ligasa es una ligasa de ADN T4 preactivada. Los métodos para utilizar una ligasa de ADN T4 preactivada se describen además en la publicación de los Estados Unidos núm. 2010-0184618-A1.

En algunas modalidades, se añade trifosfato de adenosina (ATP) durante la reacción de ligazón. El sellado catalizado por la ligasa de ADN de los sustratos de ADN con muescas se activa primero a través de la hidrólisis de ATP, lo que da como resultado la adición covalente de un grupo AMP a la enzima. Después de la unión a un sitio con muesca en un dúplex de ADN, la ligasa transfiere ese AMP al extremo 5' fosforilado en la muesca, lo que forma un enlace pirofosfato 5'-5'. Finalmente, la ligasa cataliza un ataque en este enlace de pirofosfato por el grupo OH en el extremo 3' de la muesca, lo sella de esta manera, después de lo cual se liberan la ligasa y el AMP. Si la ligasa se desprende del sustrato antes del ataque 3', por ejemplo, debido a la recarga prematura de AMP de la enzima, entonces el AMP 5' se deja en el extremo 5', lo que bloquea los intentos de acoplamiento adicionales (por ejemplo, intentos de ligazón). En algunos casos, el ATP se añade a una concentración de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 1000  $\mu\text{M}$  o aproximadamente 10 000  $\mu\text{M}$  durante la reacción de acoplamiento (por ejemplo, ligazón).

En algunos casos, se añaden cofactores que ayudan en la ligazón de las sondas durante el proceso de ligazón. En algunos casos, los cofactores incluyen iones magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ). En algunos casos, los cofactores incluyen iones manganeso ( $\text{Mn}^{2+}$ ). En algunos casos,  $\text{Mg}^{2+}$  se añade en forma de  $\text{MgCl}_2$ . En algunos casos,  $\text{Mn}^{2+}$  se añade en forma de  $\text{MnCl}_2$ . En algunos casos, la concentración de  $\text{MgCl}_2$  es de aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 100 mM o de aproximadamente 1000 mM. En algunos casos, la concentración de  $\text{MnCl}_2$  es de aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 100 mM o de aproximadamente 1000 mM.

En algunos casos, la reacción de ligazón se produce a un pH en el intervalo de aproximadamente 6,5 a 9,0, de aproximadamente 6,5 a 8,0, o de aproximadamente 7,5 a 8,0, de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,0.

En algunos casos, se usa una única sonda que tiene múltiples secuencias que se hibridan con un ácido nucleico. Por ejemplo, en algunos casos, la primera sonda y la segunda sonda están en un ácido nucleico contiguo. En algunos casos, la primera sonda está en el extremo 3' del ácido nucleico contiguo y la segunda sonda está en el extremo 5' del ácido nucleico contiguo (o viceversa). Como se describió anteriormente, en algunos casos, las dos secuencias de hibridación pueden ser adyacentes entre sí, o pueden hibridarse con secuencias que tienen una secuencia de separación entre los dos sitios de hibridación. En algunos casos, un ácido nucleico circular puede formarse y amplificarse (por ejemplo, mediante el uso de amplificación de círculo rodante). En algunos casos, la secuencia circularizada puede digerirse (por ejemplo, mediante el uso de una endonucleasa), y crearse un ácido nucleico lineal que puede capturarse e identificarse mediante el uso de dos métodos de portaobjetos descritos en la presente descripción. Por lo tanto, en algunos casos, la sonda única incluye uno o más sitios de restricción que se diseñan para ser exclusivos para la sonda y no se encuentran en un análisis de interés. Cualquier endonucleasa conocida en la técnica puede usarse siempre que cumpla con estos criterios.

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan métodos para amplificar el ácido nucleico contiguo, donde la amplificación del ácido nucleico contiguo aumenta el número de copias del ácido nucleico contiguo. En algunas modalidades donde se amplifica un ácido nucleico contiguo, la amplificación se realiza mediante la amplificación de círculo rodante. En algunas modalidades, el ácido nucleico contiguo a amplificar incluye secuencias (por ejemplo, secuencias de acoplamiento, secuencias funcionales y/o secuencias de cebadores) que permiten la amplificación de círculo rodante. En un ejemplo, el ácido nucleico contiguo puede incluir una secuencia funcional que es capaz de unirse a un cebador usado para la amplificación. En otro ejemplo, el ácido nucleico contiguo puede incluir una o más secuencias de acoplamiento (por ejemplo, una primera secuencia de acoplamiento y una segunda secuencia de acoplamiento) que pueden hibridarse con uno o más oligonucleótidos (por ejemplo, una(s) sonda(s) de bloqueo) usados para la amplificación de círculo rodante.

Como se usa en la presente descripción, una "sonda de bloqueo" se refiere a un oligonucleótido que tiene, en sus extremos 5' y 3', secuencias que son complementarias a secuencias diana adyacentes o cercanas (por ejemplo, secuencias de acoplamiento) en una secuencia de ácido nucleico diana. Tras la hibridación con las secuencias diana (por ejemplo, secuencias de acoplamiento), los dos extremos de la sonda de bloqueo se ponen en contacto o un extremo se extiende hasta que los dos extremos se ponen en contacto, lo que permite la circularización de la sonda de bloqueo mediante ligazón (por ejemplo, ligazón mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción). En algunas modalidades, después de la circularización del oligonucleótido, puede usarse la amplificación de círculo rodante para amplificar el producto de ligazón, lo cual incluye el ácido nucleico contiguo.

En algunos casos, las sondas (por ejemplo, una primera sonda y una segunda sonda) se ligan con la ayuda de un oligonucleótido férula. En algunos casos, el oligonucleótido férula incluye una primera secuencia de la férula que es sustancialmente complementaria a la primera sonda o a una porción de la misma y una segunda secuencia de la férula que es sustancialmente complementaria a la segunda sonda o a una porción de la misma. El oligonucleótido férula puede estar entre 10 y 100 (por ejemplo, aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43,

44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100) nucleótidos de longitud. En algunos casos, el oligonucleótido férula ayuda en la ligazón de la primera sonda y la segunda sonda. Los métodos que incluyen un oligonucleótido férula se han descrito en la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2019/0055594A1.

En algunas modalidades, después de la etapa de hibridación de las sondas al ácido nucleico, se realiza una etapa de lavado para eliminar las sondas no unidas. La etapa de lavado puede realizarse mediante el uso de cualquiera de los métodos y soluciones de lavado descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, después de la etapa de lavado, la primera sonda y la segunda sonda se unen a (por ejemplo, se hibridan a) el analito, y el oligonucleótido férula se une a (por ejemplo, se hibrida a) el primer y segundo oligonucleótidos (por ejemplo, en porciones de la primera y segunda sondas que no se unen al analito). En algunas modalidades, la primera sonda, la segunda sonda y/o el oligonucleótido férula se añaden a la muestra biológica al mismo tiempo. En algunas modalidades, la primera sonda y la segunda sonda se añaden en un primer punto temporal, y el oligonucleótido férula se añade a la muestra biológica en un segundo punto temporal.

#### Adición de adaptadores metilados

En la presente descripción se proporcionan métodos para identificar un estado de metilación del ADN en una muestra biológica, el método comprende: (a) proporcionar uno o más adaptadores metilados y una enzima transposasa a la muestra biológica en condiciones en donde el uno o más adaptadores metilados se insertan en el ADN; (b) poner en contacto la secuencia que comprende el analito y el uno o más adaptadores metilados con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura en la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial, en donde si la sonda de captura comprende una o más citosinas, entonces la una o más citosinas son citosinas metiladas; (c) ligar la secuencia que comprende el analito y el uno o más adaptadores metilados a la sonda de captura, y crear de esta manera un producto de ligazón; (d) desaminar el producto de ligazón; (e) determinar (i) toda o una porción de la secuencia del código de barras espacial o complemento de la misma, y (ii) toda o una porción de la secuencia del producto de ligazón, o un complemento de la misma, y usar las secuencias determinadas de (i) y (ii) para identificar el estado de metilación del analito en la muestra biológica.

En algunas modalidades, el método comprende además permitir que la enzima transposasa fragmente el ADN e inserte los adaptadores metilados, de esta manera se genera una secuencia que comprende un analito y el uno o más adaptadores metilados, antes de la etapa (b).

También se proporcionan en la presente descripción métodos para identificar un estado de metilación de un ácido nucleico en una muestra biológica en una matriz espacial, el método comprende: (a) ligar adaptadores metilados sobre los extremos 5' y/o 3' de los ácidos nucleicos fragmentados, de esta manera se genera un fragmento de ácido nucleico adaptado; (b) desaminar el fragmento de ácido nucleico adaptado; (c) capturar el fragmento de ácido nucleico adaptado en una matriz espacial que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura comprende un código de barras espacial; (d) determinar (i) toda o una porción de la secuencia del código de barras espacial o un complemento de la misma, y (ii) toda o una porción de la secuencia del adaptador/ácido nucleico metilado, o un complemento de la misma, y usar las secuencias determinadas de (i) y (ii) para identificar el estado de metilación del analito, o una porción de las mismas, en la muestra biológica.

En algunos casos, un adaptador metilado se liga a un ácido nucleico en un extremo 5' del ácido nucleico. En algunos casos, un adaptador metilado se liga a un ácido nucleico en un extremo 3' del ácido nucleico. En algunos casos, los adaptadores metilados se ligan a un ácido nucleico en el extremo 5' y el extremo 3' del ácido nucleico. En algunas modalidades, el adaptador metilado es un mango de captura metilado.

En algunos casos, un adaptador metilado es de 10 a 75 (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, o 75) nucleótidos de longitud. En algunos casos, el adaptador metilado es monocatenario. En algunos casos, el adaptador metilado es bicatenario. En algunos casos, el adaptador metilado es una molécula de ADN. En algunos casos, el adaptador metilado incluye una o más citosinas metiladas, las cuales están protegidas de las mutaciones provocadas durante la desaminación. Por ejemplo, en algunas modalidades, el adaptador metilado incluye al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más citosinas metiladas.

En algunos casos, el adaptador metilado se liga a ácidos nucleicos mediante fragmentomarcaje.

En algunas modalidades, la etapa (a) comprende además permitir que una enzima transposasa fragmente los analitos, por ejemplo, ácidos nucleicos, e inserte los adaptadores metilados, de esta manera se generan una o

más secuencias, cada una que comprende un analito de ácido nucleico y el uno o más adaptadores metilados (es decir, un fragmento de ácido nucleico adaptado (por ejemplo, fragmentomarcado)).

5 Un método para el análisis del transcriptoma espacial mediante el uso de una enzima transposasa se describe en el documento WO 2020/047002.

10 Como se usa en la presente descripción, "fragmentomarcaje" se refiere a un proceso de fragmentación mediada por transposasa y marcaje de ADN. El fragmentomarcaje típicamente implica la modificación del ADN por un complejo transposoma y da como resultado la formación de "fragmentos marcados", o fragmentos de ADN marcados.

15 Como se usa en la presente descripción, un "transposoma" o "complejo transposoma" es un complejo de una enzima transposasa y ADN de que comprende secuencias de extremos de transposones (también conocidas como "secuencias de reconocimiento de transposasas" o "extremos del mosaico" (ME)).

Una "transposasa" es una enzima que se une al final de un transposón y cataliza su movimiento hacia otra parte del genoma mediante un mecanismo de corte y pegado o un mecanismo de transposición replicativa.

20 El ADN que forma un complejo con una enzima transposasa (es decir, las secuencias de transposones o ME) contiene un oligonucleótido parcialmente bicatenario (por ejemplo, ADN), en donde cada hebra contiene una secuencia específica de transposasa que forma la parte de doble hebra del oligonucleótido. La porción monocatenaria del oligonucleótido está en el extremo 5' del oligonucleótido (es decir, forma un saliente 5') y puede comprender una secuencia funcional (por ejemplo, un sitio de unión de la sonda de captura, una secuencia adaptadora, etc.). Por lo tanto, los oligonucleótidos parcialmente bicatenarios en el transposoma  
25 pueden verse como adaptadores que pueden ligarse al ADN fragmentado. Un transposoma comprende una enzima transposasa en complejo con uno o más adaptadores que comprenden secuencias de extremos de transposones (o extremos de mosaico) y el fragmentomarcaje da como resultado la fragmentación simultánea de ADN y la ligazón (por ejemplo, etiquetado) de los adaptadores a los extremos 5' de ambos extremos de fragmentos dúplex de ADN. En algunas modalidades, un adaptador se metila (por ejemplo, que comprende  
30 una o más citosinas metiladas).

35 Será evidente que el fragmentomarcaje puede usarse para proporcionar ADN fragmentado con un dominio capaz de hibridar y/o ligar al dominio de captura de las sondas de captura. Además, el dominio puede proporcionarse directa o indirectamente.

40 Por ejemplo, en algunas modalidades, los adaptadores del transposoma comprenden un dominio o secuencia funcional que puede configurarse para hibridarse con todo o una porción de un dominio de captura. El dominio o secuencia funcional puede ser un dominio capaz de hibridarse con el dominio de captura de las sondas de captura (por ejemplo, una secuencia homopolimérica, por ejemplo, una secuencia poli-A). En otras palabras, la porción monocatenaria de un adaptador comprende un dominio capaz de hibridarse con el dominio de  
45 captura de las sondas de captura. En consecuencia, el fragmentomarcaje da como resultado la fragmentación del ADN del espécimen biológico y la ligazón del dominio capaz de hibridar con el dominio de captura de las sondas de captura al ADN del espécimen biológico, es decir, proporciona al ADN del espécimen biológico un dominio complementario directamente al dominio de captura de la sonda de captura.

50 En una modalidad, el dominio o secuencia funcional se configura para unirse a una porción del dominio de captura a través de la química clic. Como se usa en la presente descripción, el término "química clic", generalmente se refiere a reacciones que son modulares, de amplio alcance, dan altos rendimientos, generan solo subproductos inofensivos, tales como aquellos que pueden eliminarse mediante métodos no cromatográficos, y son estereoespecíficos (pero no necesariamente enantioselectivos). Véase, por ejemplo, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40(11):2004-2021. En algunos casos, la química clic puede describir pares de grupos funcionales que pueden reaccionar selectivamente entre sí en condiciones leves y acuosas.

55 En algunas modalidades, un adaptador de un transposoma comprende (i) un dominio capaz de (es decir, adecuado para) facilitar la introducción de un(os) resto(s) de química clic configurado(s) para interactuar con otro(s) resto(s) de química clic que pueden asociarse con el dominio de captura de las sondas de captura.

60 Un ejemplo de una reacción de química clic puede ser la cicloadición dipolar de Huisgen 1,3- de una azida y un alquino, es decir, la reacción catalizada por cobre de una azida con un alquino para formar un anillo heteroátomo de 5 miembros llamado 1,2,3-triazol. La reacción también puede conocerse como una cicloadición de azida-alquino catalizada por Cu(I) (CuAAC), una química clic de Cu(I) o una química clic de Cu+. El catalizador para la química clic puede ser sales de Cu(I) o sales de Cu(I) producidas in situ mediante la reducción del reactivo Cu(II) al reactivo Cu(I) con un reactivo reductor (*Pharm Res.* 2008, 25(10): 2216–2230). Los reactivos Cu(II) conocidos para la química clic pueden incluir, pero no se limitan a, el complejo Cu(II)-(TBTA) y el complejo Cu(II) (THPTA). TBTA, que es tris-[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina, también conocida como tris-(benciltriazolilmetil)amina, puede ser un ligando estabilizante para las sales de Cu(I). La  
65

THPTA, que es tris-(hidroxipropiltriazolilmetil)amina, puede ser otro ejemplo de agente estabilizante para Cu(I). También pueden lograrse otras condiciones para construir el anillo de 1,2,3-triazol a partir de una azida y un alquino mediante el uso de una química clic sin cobre, tal como por la reacción azida-alquino por química clic promovida por deformación (SPAAC, ver, por ejemplo, Chem. Commun., 2011, 47:6257-6259 y Nature, 2015, 519(7544):486-90).

En otra modalidad, un adaptador de un transposoma puede comprender una secuencia de nucleótidos que sirve de plantilla a la ligazón de un adaptador universal al ADN fragmentomarcado. El adaptador universal comprende un dominio capaz de hibridar con el dominio de captura de las sondas de captura. Por lo tanto, en algunas modalidades, el fragmentomarcaje proporciona al ADN del espécimen biológico un dominio capaz de hibridarse indirectamente con el dominio de captura de una sonda de captura.

En otra modalidad, un adaptador de un transposoma puede comprender una secuencia de nucleótidos que es un sustrato en una reacción de ligazón que introduce un adaptador universal al ADN fragmentomarcado, por ejemplo, un dominio al cual puede unirse un adaptador universal. Por ejemplo, el adaptador universal puede ser un oligonucleótido parcialmente bicatenario que tiene una primera hebra que comprende un dominio que contiene una porción monocatenaria que se une a la secuencia adaptadora ligada al ADN fragmentado (es decir, fragmentomarcado) y una segunda hebra que comprende un dominio que se une a la primera hebra y un dominio capaz de unirse (hibridarse) al dominio de captura de las sondas de captura. La ligazón del adaptador universal al ADN fragmentado (es decir, fragmentomarcado) proporciona al ADN fragmentomarcado un dominio que se une al dominio de captura de las sondas de captura. Por lo tanto, en algunas modalidades, el fragmentomarcaje proporciona indirectamente al ADN del espécimen biológico un dominio de unión.

Como el fragmentomarcaje da como resultado un ADN que comprende espacios entre los extremos 3' del ADN del espécimen biológico y los extremos 5' en la porción bicatenaria de los adaptadores (es decir, los extremos 5' de los adaptadores que contienen los ME no se ligan a los extremos 3' del ADN fragmentado del espécimen biológico), lo que proporciona al ADN fragmentomarcado un dominio de unión capaz de unirse (hibridarse) al dominio de captura de las sondas de captura puede requerir una etapa de "llenado de espacios" del ADN fragmentomarcado.

El llenado de espacios puede lograrse mediante el uso de una enzima polimerasa adecuada, es decir, una ADN polimerasa (por ejemplo, seleccionada de la lista más abajo). Con respecto a esto, los extremos 3' del ADN fragmentomarcado se extienden mediante el uso de las hebras complementarias del ADN fragmentomarcado como plantillas. Una vez que los espacios se han llenado, los extremos 3' del ADN fragmentomarcado se unen a los extremos 5' de los adaptadores mediante una etapa de ligazón, mediante el uso de una enzima ligasa adecuada.

Se entenderá con respecto a esto que el extremo 5' de los adaptadores que contienen el ME se fosforila para permitir que se produzca la ligazón. El transposoma puede comprender un adaptador en el cual uno o ambos extremos 5' se fosforilan. En modalidades donde el transposoma comprende un adaptador en el cual el extremo 5' del adaptador que contiene el ME no se fosforila, el proceso de llenado de espacios puede comprender una etapa adicional de fosforilación del extremo 5' del adaptador, por ejemplo, mediante el uso de una enzima cinasa, tal como la polinucleótido cinasa T4.

En algunas modalidades, los extremos 3' del ADN fragmentomarcado pueden extenderse mediante el uso de una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de la hebra mediante el uso de las hebras complementarias del ADN fragmentomarcado como plantillas. Esto resulta en el desplazamiento de las hebras de los adaptadores que no se ligan al ADN fragmentado y la generación de moléculas de ADN totalmente bicatenario. Estas moléculas pueden estar provistas de un dominio capaz de unirse al dominio de captura de las sondas de captura por cualquier medio adecuado, por ejemplo, ligazón de adaptadores, "en cola" con una enzima de transferasa terminal, etc.

Por lo tanto, en algunas modalidades, el método comprende una etapa de extender los extremos 3' del ADN fragmentado (es decir, fragmentomarcado) mediante el uso de una polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra para producir moléculas de ADN completamente bicatenario.

En algunas modalidades, las moléculas de ADN completamente bicatenario pueden proporcionarse con un dominio de unión capaz de unirse al dominio de captura de las sondas de captura en una matriz espacial. En algunas modalidades, un dominio de unión puede proporcionarse mediante la ligazón de adaptadores a las moléculas de ADN bicatenario o a través del uso de una enzima activa transferasa terminal para incorporar una cola de polinucleótido, por ejemplo, secuencia homopolimérica (por ejemplo, una cola de poli-A), en los extremos 3' de las moléculas de ADN bicatenario.

La transposasa Tn5 es un miembro de la superfamilia de proteínas ARNasa. El transposón Tn5 es un transposón compuesto en el que dos secuencias de inserción casi idénticas (IS50L e IS50R) flanquean tres

genes de resistencia a antibióticos. Cada IS50 contiene dos secuencias de extremo (ES) de 19 pb invertidas, un extremo exterior (OE) y un extremo interior (IE).

5 Una variante hiperactiva de la transposasa Tn5 es capaz de mediar la fragmentación de ADN bicatenario y la  
ligazón de oligonucleótidos sintéticos (adaptadores) en ambos extremos 5' del ADN en una reacción que toma  
aproximadamente 5 minutos. Sin embargo, como las secuencias finales de tipo silvestre tienen una actividad  
relativamente baja, se reemplazan preferentemente in vitro por secuencias hiperactivas del extremo del  
mosaico (ME). Un complejo de la transposasa Tn5 con ME de 19 pb es, por lo tanto, todo lo que es necesario  
10 para que se produzca la transposición, siempre y cuando el ADN que interviene sea lo suficientemente largo  
como para acercar dos de estas secuencias para formar un homodímero activo de la transposasa Tn5.

Los métodos, composiciones y kits para tratar el ácido nucleico, y en particular, los métodos y composiciones  
para fragmentar y etiquetar ADN mediante el uso de composiciones transposónicas se describen en detalle en  
los documentos US2010/0120098 y US2011/0287435.

15 Por lo tanto, cualquier enzima transposasa con actividad de fragmentomarcaje, es decir, capaz de fragmentar  
ADN y ligar oligonucleótidos a los extremos del ADN fragmentado, puede usarse en los métodos de la presente  
invención. En algunas modalidades, la transposasa es una transposasa Tn5, Tn7 o Mu o una variante funcional  
o derivado de la misma.

20 El fragmentomarcaje del ácido nucleico en la muestra biológica puede realizarse antes o después de la  
desaminación del ácido nucleico. En algunas modalidades, el ácido nucleico se desamina antes del  
fragmentomarcaje. En algunas modalidades, el ácido nucleico se desamina después del fragmentomarcaje.

25 En algunas modalidades, el método comprende además lavar la muestra biológica. En algunos casos, se  
produce una etapa de lavado antes o después de la etapa de desaminación. En algunas modalidades, la etapa  
de lavado se lleva a cabo para eliminar todo o parte del agente desaminante. En algunas modalidades, la etapa  
de lavado no elimina el analito en la muestra biológica. En algunas modalidades, la etapa de lavado elimina  
una cantidad insignificante del analito en la muestra biológica. En algunos casos, se produce una etapa de  
30 lavado después de hibridar los oligonucleótidos. En algunos casos, esta etapa de lavado elimina cualquier  
oligonucleótido no unido y puede realizarse mediante el uso de cualquier técnica o solución descrita en la  
presente descripción o conocida en la técnica. En algunas modalidades, se realizan múltiples etapas de lavado  
para eliminar oligonucleótidos no unidos.

35 Procesos del método de dos portaobjetos

En algunas modalidades, la alineación del primer sustrato y el segundo sustrato se facilita mediante un proceso  
de intercalamiento. En consecuencia, se describen en la presente descripción métodos para colocar juntos el  
primer sustrato como se describe en la presente descripción con un segundo sustrato que tiene una matriz con  
40 sondas de captura.

La Figura 12 es un diagrama esquemático que representa un proceso de intercalamiento ilustrativo 1201 entre  
un primer sustrato que comprende una muestra biológica (por ejemplo, una sección de tejido 1202 en un  
portaobjetos de patología 1203) y un segundo sustrato que comprende una matriz con código de barras  
45 espaciales, por ejemplo, un portaobjetos 1204 que se rellena con sondas de captura con código de barras  
espaciales 1206. Durante el proceso de intercalamiento ilustrativo, el primer sustrato se alinea con el segundo  
sustrato, de manera que al menos una porción de la muestra biológica se alinea con al menos una porción de  
la matriz (por ejemplo, se alinea con el área superior o inferior de la matriz a la muestra biológica). Como se  
muestra, el portaobjetos con matriz 1204 está en una posición superior al portaobjetos de patología 1203. En  
50 algunas modalidades, el portaobjetos de patología 1203 puede colocarse superior al portaobjetos con matriz  
1204. En algunas modalidades, el primer y segundo sustratos se alinean para mantener un espacio o distancia  
de separación 1207 entre los dos sustratos. Cuando el primer y segundo sustratos se alinean, se liberan uno o  
más analitos de la muestra biológica y migran activa o pasivamente a la matriz para la captura. En algunas  
modalidades, la migración se produce mientras las porciones alineadas de la muestra biológica y la matriz se  
55 ponen en contacto con un medio reactivo 1205. El uno o más analitos liberados pueden migrar activa o  
pasivamente a través del espacio 1207 a través del medio reactivo 1205 hacia las sondas de captura 1206 y  
ser capturado por las sondas de captura 1206.

60 En algunas modalidades, la distancia de separación en el espacio 1207 entre el primero y el segundo sustrato  
se mantiene entre 2 micras y 1 mm (por ejemplo, entre 2 micras y 800 micras, entre 2 micras y 700 micras,  
entre 2 micras y 600 micras, entre 2 micras y 500 micras, entre 2 micras y 400 micras, entre 2 micras y 300  
micras, entre 2 micras y 200 micras, entre 2 micras y 100 micras, entre 2 micras y 25 micras, entre 2 micras y  
10 micras), medida en una dirección ortogonal a la superficie del primer sustrato que soporta la muestra. En  
algunos casos, la distancia es de 2 micras. En algunos casos, la distancia es de 2,5 micras. En algunos casos,  
65 la distancia es de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23,  
24, o 25 micras. En algunas modalidades, el segundo sustrato se coloca en contacto directo con la muestra

sobre el primer sustrato lo que asegura que no haya pérdidas difusivas de resolución espacial. En algunas modalidades, la distancia de separación se mide en una dirección ortogonal a una superficie del primer sustrato que soporta la muestra biológica.

5 En algunas modalidades, el primer y segundo sustratos se colocan en un soporte de sustrato, (por ejemplo, un dispositivo de alineación de matrices) configurado para alinear el primer sustrato y la matriz. En algunas modalidades, el dispositivo comprende un soporte para muestras. En algunas modalidades, el soporte para muestras incluye un primer y segundo miembros que reciben un primer y segundo sustratos, respectivamente. El dispositivo puede incluir un mecanismo de alineación que se conecta a al menos uno de los miembros y  
10 alinea el primer y segundo miembros. Por lo tanto, los dispositivos de la descripción pueden alinear ventajosamente el primer sustrato y el segundo sustrato y cualquier muestra, sonda con código de barras o reactivo de permeabilización que pueda estar en la superficie del primer y segundo sustratos. Los dispositivos ilustrativos y los soporte para muestras ilustrativos se describen en la publicación de solicitud de patente PCT núm. WO 2020/123320.

15 En algunas modalidades, el medio del reactivo comprende un agente de permeabilización. Los agentes adecuados para este propósito incluyen, pero no se limitan a, solventes orgánicos (por ejemplo, acetona, etanol, y metanol), agentes reticulantes (por ejemplo, paraformaldehído), detergentes (por ejemplo, saponina, Triton X-100™, Tween-20™, o dodecilsulfato de sodio (SDS)) y enzimas (por ejemplo, tripsina, proteasas (por ejemplo, proteinasa K). En algunas modalidades, el detergente es un detergente aniónico (por ejemplo, SDS o solución salina de sodio de N-lauroilsarcosina). Los reactivos de permeabilización ilustrativos se describen en la publicación de solicitud de patente PCT núm. WO 2020/123320.

20 En algunas modalidades, el medio reactivo comprende un reactivo de lisis. Las soluciones de lisis pueden incluir surfactantes iónicos tales como, por ejemplo, sarcosilo y dodecilsulfato de sodio (SDS). Más generalmente, los agentes de lisis química pueden incluir, sin limitación, solventes orgánicos, agentes quelantes, detergentes, surfactantes y agentes caotrópicos. Los reactivos de lisis ilustrativos se describen en la publicación de solicitud de patente PCT núm. WO 2020/123320.

25 En algunas modalidades, el medio reactivo comprende una proteasa. Las proteasas ilustrativas incluyen, por ejemplo, pepsina, tripsina, pepsina, elastasa y proteinasa K. Las proteasas ilustrativas se describen en la publicación de solicitud de patente PCT núm. WO 2020/123320.

30 En algunas modalidades, el medio reactivo comprende un detergente. Los detergentes ilustrativos incluyen dodecilsulfato de sodio (SDS), sarcosilo, saponina, Triton X-100™ y Tween-20™. Los detergentes ilustrativos se describen en la publicación de solicitud de patente PCT núm. WO 2020/123320.

35 En algunas modalidades, el medio reactivo comprende una nucleasa. En algunas modalidades, la nucleasa comprende una ARNasa. En algunas modalidades, la ARNasa se selecciona de ARNasa A, ARNasa C, ARNasa H y ARNasa I. En algunas modalidades, el medio reactivo comprende uno o más de dodecilsulfato de sodio (SDS), proteinasa K, pepsina, N-lauroilsarcosina, ARNasa y una sal de sodio de la misma.

40 El soporte para muestras es compatible con una variedad de diferentes esquemas para poner en contacto las porciones alineadas de la muestra biológica y la matriz con el medio reactivo para promover la captura del analito. En algunas modalidades, el medio reactivo se deposita directamente sobre el segundo sustrato (por ejemplo, formando un medio reactivo que incluye el reactivo de permeabilización y la matriz de elementos), y/o directamente sobre el primer sustrato. En algunas modalidades, el medio reactivo se deposita sobre el primero y/o el segundo sustrato, y luego el primer y segundo sustratos se alinean en la configuración descrita de manera que el medio reactivo entra en contacto con las porciones alineadas de la muestra biológica y la matriz. En  
45 algunas modalidades, el medio reactivo se introduce en el espacio 1207 mientras que el primer y segundo sustratos se alinean en la configuración descrita.

50 En ciertas modalidades un reactivo de permeabilización seco se aplica o se forma como una capa sobre el primer sustrato o el segundo sustrato o ambos antes de entrar en contacto con la muestra y la matriz de elementos. Por ejemplo, un reactivo puede depositarse en solución sobre el primer sustrato o el segundo sustrato o ambos y luego secarse. Los métodos de secado incluyen, pero no se limitan a, recubrir mediante centrifugación una solución delgada del reactivo y luego evaporar un solvente incluido en el reactivo o el propio reactivo. Alternativamente, en otras modalidades, el reactivo puede aplicarse en forma seca directamente sobre el primer sustrato o el segundo sustrato o ambos. En algunas modalidades, el proceso de recubrimiento puede realizarse antes del flujo de trabajo analítico y el primer sustrato y el segundo sustrato pueden almacenarse recubiertos previamente. Alternativamente, el proceso de recubrimiento puede realizarse como parte del flujo de trabajo analítico. En algunas modalidades, el reactivo es un reactivo de permeabilización. En algunas modalidades, el reactivo es una enzima de permeabilización, un tampón, un detergente o cualquiera de sus combinaciones. En algunas modalidades, la enzima de permeabilización es pepsina. En algunas modalidades, el reactivo es un reactivo seco (por ejemplo, un reactivo libre de humedad o líquido). En algunos casos, el sustrato que incluye la muestra (por ejemplo, una sección histológica de tejido) se hidrata. La muestra puede  
55  
60  
65

hidratarse al poner en contacto la muestra con un medio reactivo, por ejemplo, un tampón que no incluye un reactivo de permeabilización. En algunas modalidades, la hidratación se realiza mientras que el primer y segundo sustratos se alinean en una configuración de estilo intercalada.

5 En algunos casos, las porciones alineadas de la muestra biológica y la matriz están en contacto con el medio reactivo 1205 en el espacio 1207 durante aproximadamente 1 minuto. En algunos casos, las porciones alineadas de la muestra biológica y la matriz se ponen en contacto con el medio reactivo 1205 durante aproximadamente 5 minutos. En algunos casos, las porciones alineadas de la muestra biológica y la matriz están en contacto con el medio reactivo 1205 en el espacio 1207 durante aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 12 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 18 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 25 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 36 minutos, aproximadamente 45 minutos o aproximadamente una hora. En algunos casos, las porciones alineadas de la muestra biológica y la matriz se ponen en contacto con un medio reactivo 1205 durante aproximadamente 1-60 minutos. En algunos casos, las porciones alineadas de la muestra biológica y la matriz se ponen en contacto con el medio reactivo 1205 durante aproximadamente 30 minutos.

En algunas modalidades, después del contacto inicial entre una muestra y un agente de permeabilización, el agente de permeabilización puede retirarse del contacto con la muestra (por ejemplo, al abrir el soporte para muestras) antes de completar la permeabilización de la muestra. Por ejemplo, en algunas modalidades, solo una porción de la muestra se permeabiliza, y solo una porción de los analitos en la muestra puede capturarse mediante la matriz de elementos. En algunos casos, la cantidad reducida de analito capturado y disponible para la detección puede compensarse con la reducción de la difusión lateral que resulta de la permeabilización incompleta de la muestra. En general, la resolución espacial del ensayo se determina por la extensión de la difusión del analito en la dirección transversal (es decir, ortogonal a la dirección normal a la superficie de la muestra). Cuanto mayor sea la distancia entre la muestra en el primer sustrato y la matriz de elementos en el segundo sustrato, mayor será la extensión de la difusión en la dirección transversal, y la pérdida concomitante de resolución. Los analitos liberados de una porción de la muestra más cercana a la matriz de elementos tienen una trayectoria de difusión más corta y, por lo tanto, no se difunden tanto lateralmente como los analitos de las porciones de la muestra más alejadas de la matriz de elementos. Como resultado, en algunos casos, la permeabilización incompleta de la muestra (al reducir el intervalo de contacto entre el agente de permeabilización y la muestra) puede usarse para mantener una resolución espacial adecuada en el ensayo.

En algunos casos, el dispositivo se configura para controlar una temperatura del primer y segundo sustratos. En algunas modalidades, la temperatura del primero y del segundo miembros se baja a una primera temperatura que está más abajo de la temperatura ambiente (por ejemplo, 25 grados Celsius) (por ejemplo, 20 grados Celsius o inferior, 15 grados Celsius o inferior, 10 grados Celsius o inferior, 5 grados Celsius o inferior, 4 grados Celsius o inferior, 3 grados Celsius o inferior, 2 grados Celsius o inferior, 1 grado Celsius o inferior, 0 grados Celsius o inferior, -1 grados Celsius o inferior, -5 grados Celsius o inferior). En algunas modalidades, el dispositivo incluye un sistema de control de temperatura (por ejemplo, bobinas conductoras de calentamiento y enfriamiento) para controlar la temperatura del soporte para muestras. Alternativamente, en otras modalidades, la temperatura del soporte para muestras se controla externamente (por ejemplo, por refrigeración o por una placa caliente). En una primera etapa, el segundo miembro, establecido a o a la primera temperatura, entra en contacto con el primer sustrato, y el primer miembro, establecido a o a la primera temperatura, entra en contacto con el segundo sustrato, y baja de esta manera la temperatura del primer sustrato y el segundo sustrato a una segunda temperatura. En algunas modalidades, la segunda temperatura es equivalente a la primera temperatura. En algunas modalidades, la primera temperatura es menor que la temperatura ambiente (por ejemplo, 25 grados Celsius). En algunas modalidades, la segunda temperatura varía de aproximadamente -10 grados Celsius a aproximadamente 4 grados Celsius. En algunas modalidades, la segunda temperatura está más abajo de la temperatura ambiente (por ejemplo, 25 grados Celsius) (por ejemplo, 20 grados Celsius o inferior, 15 grados Celsius o inferior, 10 grados Celsius o inferior, 5 grados Celsius o inferior, 4 grados Celsius o inferior, 3 grados Celsius o inferior, 2 grados Celsius o inferior, 1 grado Celsius o inferior, 0 grados Celsius o inferior, -1 grados Celsius o inferior, -5 grados Celsius o inferior).

En una modalidad ilustrativa, el segundo sustrato se pone en contacto con el reactivo de permeabilización. En algunas modalidades, el reactivo de permeabilización se seca. En algunas modalidades, el reactivo de permeabilización es un gel o un líquido. Además, en las modalidades ilustrativas, la muestra biológica se pone en contacto con un tampón. Tanto el primero como el segundo sustratos se colocan a una temperatura más baja para ralentizar la difusión y la eficiencia de permeabilización. Alternativamente, en algunas modalidades, la muestra puede ponerse en contacto directamente con un reactivo de permeabilización líquido sin inducir un inicio no deseado de la permeabilización debido a que los sustratos están a la segunda temperatura. En algunas modalidades, la baja temperatura ralentiza o evita el inicio de la permeabilización. En una segunda etapa, mantener el soporte para muestras y los sustratos a una temperatura fría (por ejemplo, a la primera o a la segunda temperaturas) continúa la ralentización o prevención de la permeabilización de la muestra. En una tercera etapa, el soporte para muestras (y consecuentemente el primer y segundo sustratos) se calientan para iniciar la permeabilización. En algunas modalidades, el soporte para muestras se calienta hasta una tercera

temperatura. En algunas modalidades, la tercera temperatura está por encima de la temperatura ambiente (por ejemplo, 25 grados Celsius) (por ejemplo, 30 grados Celsius o superior, 35 grados Celsius o superior, 40 grados Celsius o superior, 50 grados Celsius o superior, 60 grados Celsius o superior). En algunas modalidades, los analitos que se liberan del tejido permeabilizado de la muestra se difunden a la superficie del segundo sustrato y se capturan en la matriz (por ejemplo, sondas con código de barras) del segundo sustrato. En una cuarta etapa, el primer sustrato y el segundo sustrato se separan (por ejemplo, se apartan) y se detiene el control de temperatura.

En algunas modalidades, donde el primer sustrato o el segundo sustrato (o ambos) incluyen pocillos, puede introducirse una solución de permeabilización en algunos o en todos los pocillos, y la muestra y la matriz de elementos pueden ponerse en contacto al cerrar el soporte para muestras para permeabilizar la muestra. En ciertas modalidades, una solución de permeabilización puede empaparse en una película de hidrogel que se aplica directamente a la muestra, y/o empaparse en los elementos (por ejemplo, perlas) de la matriz. Cuando el primer y segundo sustratos se alinean en la configuración de tipo intercalado, la solución de permeabilización promueve la migración de los analitos desde la muestra hacia la matriz.

En ciertas modalidades, pueden infundirse diferentes agentes de permeabilización o diferentes concentraciones de agentes de permeabilización en elementos de la matriz (por ejemplo, perlas) o en una capa de hidrogel como se describió anteriormente. Al variar localmente la naturaleza del(de los) reactivo(s) de permeabilización, el proceso de captura de analito de la muestra puede ajustarse espacialmente.

En algunos casos, la migración del analito desde la muestra biológica al segundo sustrato es pasiva (por ejemplo, por difusión). Alternativamente, en ciertas modalidades, la migración del analito desde la muestra biológica se realiza activamente (por ejemplo, electroforética, mediante la aplicación de un campo eléctrico para promover la migración). En algunos casos, el primer y segundo sustratos pueden incluir un epoxi conductor. Los alambres eléctricos de un suministro de energía pueden conectarse al epoxi conductor, y permitir de esta manera que un usuario aplique una corriente y genere un campo eléctrico entre el primer y segundo sustratos. En algunas modalidades, la migración electroforética da como resultado una mayor eficiencia de captura de analitos y una mejor fidelidad espacial de los analitos capturados (por ejemplo, en una matriz de elementos) que la difusión aleatoria sobre sustratos coincidentes sin la aplicación de un campo eléctrico (por ejemplo, mediante alineación manual de los dos sustratos). Los métodos ilustrativos de migración electroforética, que incluyen los ilustrados en las Figuras 6-9, se describen en el documento WO 2020/176788, que incluye en las Figuras 14A-14B, 15, 24A-24B y 25A-25C.

La pérdida de resolución espacial puede producirse cuando los analitos migran desde la muestra a matriz de elementos y un componente de migración difusiva se produce en la dirección transversal (por ejemplo, lateral), aproximadamente paralela a la superficie del primer sustrato en el cual se monta la muestra. Para abordar esta pérdida de resolución, en algunas modalidades, un agente de permeabilización depositado o infundido en un material con difusión anisotrópica puede aplicarse a la muestra o a la matriz de elementos. el primer y segundo sustratos se alinean por el soporte para muestras y entran en contacto. Una capa de permeabilización que incluye una solución de permeabilización infundida en un material anisotrópico se coloca sobre el segundo sustrato.

En algunas modalidades, la matriz de elementos puede construirse sobre una capa de hidrogel infundida con un agente de permeabilización. La capa de hidrogel puede montarse sobre el segundo sustrato, o alternativamente, la capa de hidrogel en sí misma puede funcionar como el segundo sustrato. Cuando el primer y segundo sustratos se alinean, el agente de permeabilización se difunde fuera de la capa de hidrogel y a través o alrededor de la matriz de elementos para alcanzar la muestra. Los analitos de la muestra migran a la matriz de elementos. El contacto directo entre la matriz de elementos y la muestra ayuda a reducir la difusión lateral de los analitos, al mitigar la pérdida de resolución espacial que ocurriría si la trayectoria de difusión de los analitos fuera más larga.

Los flujos de trabajo de análisis espacial pueden incluir un proceso de tipo intercalado descrito en la presente descripción, por ejemplo, un proceso como se describió en la Figura 12. En algunas modalidades, el flujo de trabajo incluye la provisión del primer sustrato que comprende la muestra biológica. En algunas modalidades, el flujo de trabajo incluye, montar la muestra biológica sobre el primer sustrato. En algunas modalidades en donde la muestra biológica es una muestra de tejido, el flujo de trabajo incluye seccionar la muestra de tejido (por ejemplo, seccionamiento por criostato). En algunas modalidades, el flujo de trabajo incluye una etapa de fijación. En algunos casos, la etapa de fijación puede incluir la fijación con metanol. En algunos casos, la etapa de fijación incluye formalina (por ejemplo, formalina al 2 %).

En algunas modalidades, la muestra biológica en el primer sustrato se tinte mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción. En algunos casos, se obtienen imágenes de la muestra biológica, y se captura el patrón de tinción creado durante la etapa de tinción. En algunos casos, la muestra biológica luego se decolora antes del proceso de dos portaobjetos 1201.

La muestra biológica puede teñirse mediante el uso de técnicas de tinción conocidas, que incluyen, sin limitación, técnicas de tinción con Can-Grunwald, Giemsa, hematoxilina y eosina (H&E), hematoxilina, Jenner, Leishman, tricrómica de Masson, Papanicolaou, Romanowsky, plata, Sudán, Wright, y/o ácido peryódico Schiff (PAS). La tinción con PAS se realiza típicamente después de la fijación en formalina o acetona. En algunas modalidades, la muestra biológica puede teñirse mediante el uso de una etiqueta detectable (por ejemplo, radioisótopos, fluoróforos, compuestos quimioluminiscentes, compuestos bioluminiscentes y colorantes) como se describió en otra parte en la presente descripción. En algunas modalidades, una muestra biológica se tiñe mediante el uso de solo un tipo de tinción o una técnica. En algunas modalidades, la tinción incluye técnicas de tinción biológica tales como la tinción con H&E. En algunas modalidades, la tinción incluye la tinción biológica mediante el uso de hematoxilina. En algunas modalidades, la tinción incluye identificar analitos mediante el uso de anticuerpos conjugados con fluorescencia, por ejemplo, por inmunofluorescencia. En algunas modalidades, una muestra biológica se tiñe mediante el uso de dos o más tipos diferentes de tinciones, o dos o más técnicas diferentes de tinción. Por ejemplo, una muestra biológica puede prepararse mediante tinción y obtención de imágenes mediante el uso de una técnica (por ejemplo, tinción con H&E y obtención de imágenes de campo claro), seguido de tinción y obtención de imágenes mediante el uso de otra técnica (por ejemplo, tinción con IHC/IF y microscopía de fluorescencia) para la misma muestra biológica. En algunos casos, se tiñe una muestra biológica en el primer sustrato.

En algunos casos, los métodos de inmunofluorescencia incluyen una etapa de bloqueo. La etapa de bloqueo puede incluir el uso de sondas de bloqueo para disminuir la unión inespecífica de los anticuerpos. La etapa de bloqueo puede incluir opcionalmente además poner en contacto la muestra biológica con un detergente. En algunos casos, el detergente puede incluir Triton X-100™. El método puede incluir además una etapa de incubación de anticuerpos. En algunas modalidades, la etapa de incubación del anticuerpo efectúa la unión selectiva del anticuerpo a antígenos de interés en la muestra biológica. En algunas modalidades, el anticuerpo se conjuga a un oligonucleótido (por ejemplo, un conjugado oligonucleótido-anticuerpo como se describe en la presente descripción). En algunas modalidades, el anticuerpo no se conjuga con un oligonucleótido. En algunas modalidades, el método comprende además una etapa de tinción de anticuerpos. La etapa de tinción de anticuerpos puede incluir un método directo de inmunotinción en el cual un anticuerpo etiquetado se une directamente al analito que se tiñe. Alternativamente, la etapa de tinción de anticuerpos puede incluir un método indirecto de inmunotinción en el cual un primer anticuerpo se une al analito que se tiñe, y un segundo anticuerpo etiquetado se une al primer anticuerpo. En algunas modalidades, la etapa de tinción de anticuerpos se realiza antes del ensamble de matriz espacial de dos portaobjetos. En algunas modalidades en donde un conjugado oligonucleótido-anticuerpo se usa en la etapa de incubación de anticuerpos, el método no comprende una etapa de tinción de anticuerpos.

En algunos casos, los métodos incluyen obtener imágenes de la muestra biológica. En algunos casos, la obtención de imágenes se produce antes de un ensamble de dos portaobjetos. En algunos casos, la obtención de imágenes se produce mientras se ensambla la configuración de dos portaobjetos. En algunos casos, la obtención de imágenes se produce durante la permeabilización de la muestra biológica. En algunos casos, la imagen se captura mediante el uso de técnicas de alta resolución (por ejemplo, que tienen 300 puntos por pulgada cuadrada (dpi) o más). Por ejemplo, las imágenes pueden capturarse mediante el uso de imágenes de campo claro (por ejemplo, en la configuración de hematoxilina o tinción con H&E), o mediante el uso de microscopía de fluorescencia para detectar etiquetas adheridas. En algunos casos, las imágenes de alta resolución se capturan temporalmente mediante el uso de, por ejemplo, microscopía confocal. En algunos casos, se captura una imagen de baja resolución. Una imagen de baja resolución (por ejemplo, imágenes que son de aproximadamente 72 dpi y que normalmente tienen una configuración de color RGB) puede capturarse en cualquier punto del flujo de trabajo, que incluye, pero no se limita a, tinción, decoloración, permeabilización, ensamble de dos portaobjetos y migración de los analitos. En algunos casos, se toma una imagen de baja resolución durante la permeabilización de la muestra biológica.

En algunas modalidades, la ubicación del uno o más analitos en una muestra biológica se determina mediante inmunofluorescencia. En algunas modalidades, uno o más etiquetas detectables (por ejemplo, anticuerpos etiquetados con fluoróforo) se unen al uno o más analitos que se capturan (hibridan a) mediante una sonda en el primer portaobjetos y la ubicación del uno o más analitos se determina mediante la detección de las etiquetas en condiciones adecuadas. En algunas modalidades, uno o más anticuerpos etiquetados con fluoróforo se usan para conjugarse con un resto que se asocia con una sonda en el primer portaobjetos o el analito que se hibrida con la sonda en el primer portaobjetos. En algunos casos, la(s) ubicación(ones) del uno o más analitos se determinan mediante la obtención de imágenes de los anticuerpos etiquetados con fluoróforo cuando los fluoróforos se excitan por una luz de una longitud de onda adecuada. En algunas modalidades, la ubicación del uno o más analitos en la muestra biológica se determina mediante la correlación de los datos de inmunofluorescencia con una imagen de la muestra biológica. En algunos casos, se obtienen imágenes del tejido a lo largo de la etapa de permeabilización.

En algunos casos, las muestras biológicas pueden decolorarse. En algunos casos, la decoloración se hace antes de la permeabilización de la muestra biológica. A manera de ejemplo solamente, la tinción con H&E puede decolorarse mediante el lavado de la muestra en HCl. En algunos casos, la hematoxilina de la tinción con H&E se decolora mediante el lavado de la muestra en HCl. En algunas modalidades, la decoloración puede

incluir 1, 2, 3, o más lavados en HCl. En algunas modalidades, la decoloración puede incluir añadir HCl a una solución aguas abajo (por ejemplo, solución de permeabilización).

5 Entre cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, los métodos pueden incluir una etapa de lavado (por ejemplo, con SSC (por ejemplo, SSC 0,1x)). Las etapas de lavado pueden realizarse una o varias veces (por ejemplo, 1x, 2x, 3x, entre las etapas descritas en la presente descripción). En algunos casos, las etapas de lavado se realizan durante aproximadamente 10 segundos, aproximadamente 15 segundos, aproximadamente 20 segundos, aproximadamente 30 segundos o aproximadamente un minuto. En algunos casos, se producen tres lavados durante 20 segundos cada uno. En algunos casos, la etapa de lavado se hace antes de teñir la muestra, después de decolorar la muestra, antes de permeabilizar la muestra, después de permeabilizar la muestra, o cualquiera de sus combinaciones.

15 En algunos casos, después del proceso de tipo intercalamiento 1201 el primer sustrato y el segundo sustrato se separan (por ejemplo, de manera que ya no se alinean en una configuración de tipo intercalamiento). En algunas modalidades, el análisis subsecuente (por ejemplo, síntesis de ADNc, preparación de bibliotecas y secuencias) puede realizarse en los analitos capturados después de que se separan el primer sustrato y el segundo sustrato.

20 En algunas modalidades, el proceso de transferir el producto de ligazón o ácido nucleico que contiene adaptador metilado del primer sustrato al segundo sustrato se denomina indistintamente en la presente descripción como un "proceso de tipo intercalamiento o estilo intercalamiento", o "proceso de dos portaobjetos". El proceso de dos portaobjetos se describe además en la publicación de solicitud de patente PCT núm. WO 2020/123320.

25 Liberación de ácido nucleico desaminado, captura en una matriz y determinación del estado de metilación

30 En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción comprenden además liberar el producto de ligazón del analito, por ejemplo, ácido nucleico, sobre el primer sustrato y se captura sobre un segundo sustrato mediante el uso de los métodos de tipo intercalamiento descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, la liberación se produce antes de capturar el producto de ligazón a la sonda de captura en la matriz espacial.

35 En algunos casos, el producto de ligazón se deshíbrida del analito al calentar la muestra. En algunos casos, el producto de ligazón se deshíbrida a aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 65 °C, aproximadamente 70 °C o aproximadamente 75 °C. En algunos casos, el producto de ligazón se deshíbrida del analito electroquímicamente. En algunos casos, el producto de ligazón se deshíbrida mediante el uso de una solución que comprende una base. En algunos casos, la base es hidróxido de potasio (KOH). En algunos casos, la base es hidróxido de sodio (NaOH). En algunos casos, para restaurar el pH neutro después de esta etapa, puede añadirse un ácido (por ejemplo, un ácido débil) que tiene un pH más abajo de 7 (por ejemplo, pH de 5, 5,5, 6, 6,5).

Como se describió anteriormente, después de la liberación del producto de ligazón, puede migrar (activa o pasivamente) al segundo sustrato y puede capturarse en la matriz en el segundo sustrato.

45 En algunos casos, el segundo sustrato comprende una matriz. En algunos casos, la matriz incluye una pluralidad de sondas de captura, cada una de las cuales incluye un dominio de captura y un código de barras espacial. En algunas modalidades, la sonda de captura se fija al sustrato en un extremo 5'. En algunas modalidades, la pluralidad de sondas de captura se distribuye uniformemente sobre una superficie del sustrato. En algunas modalidades, la pluralidad de sondas de captura se ubica en una superficie del sustrato pero no se distribuyen sobre el sustrato de acuerdo con un patrón. En algunas modalidades, el sustrato (por ejemplo, un segundo sustrato) incluye una pluralidad de sondas de captura, donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura incluye un dominio de captura y un código de barras espacial.

55 En algunas modalidades, el dominio de captura incluye una secuencia que es al menos parcialmente complementaria al analito o a la molécula derivada del analito. En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura incluye una secuencia poli(T). En algunas modalidades, el dominio de captura incluye un dominio funcional. En algunas modalidades, el dominio funcional incluye una secuencia de cebador. En algunas modalidades, la sonda de captura incluye un dominio de escisión. En algunas modalidades, el dominio de escisión incluye un enlazador escindible del grupo que consiste en un enlazador fotoescindible, un enlazador escindible por UV, un enlazador escindible por enzima o un enlazador escindible sensible al pH.

65 La matriz puede ser cualquier matriz adecuada descrita en la presente descripción. En algunas modalidades, la matriz comprende un portaobjetos. En algunas modalidades, la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura. En algunas modalidades, un extremo 5' de una sonda de captura en la pluralidad se une al portaobjetos. En algunas modalidades, la matriz es una matriz de perlas. En algunas modalidades, un extremo 5' de la sonda de captura se une a una perla de la matriz de perlas. En algunas modalidades, la sonda de

captura comprende además un identificador molecular único (UMI). El UMI puede ser cualquier UMI adecuado descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, el UMI se coloca 5' con relación al dominio de captura en la sonda de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura comprende además una secuencia funcional. En algunas modalidades, la secuencia funcional es una secuencia de cebador. En algunas modalidades, la secuencia de cebador se usa para extender la sonda de captura.

En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura comprende una secuencia que se une específicamente a la secuencia saliente de una o más sondas. El código de barras espacial puede ser cualquier código de barras espacial descrito en la presente descripción.

En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción incluyen poner en contacto una muestra biológica con un sustrato, en donde la sonda de captura se fija al sustrato (por ejemplo, se inmoviliza al sustrato, directa o indirectamente). En algunas modalidades, la sonda de captura incluye un código de barras espacial y un dominio de captura. En algunas modalidades, el dominio de unión a la sonda de captura del producto de ligazón se une específicamente al dominio de captura. Después de la hibridación del producto de ligazón con la sonda de captura, el producto de ligazón se extiende en el extremo 3' para fabricar una copia de los componentes adicionales (por ejemplo, el código de barras espacial) de la sonda de captura. En algunas modalidades, los métodos de captura del producto de ligazón como se proporcionan en la presente descripción incluyen la permeabilización de la muestra biológica de manera que la sonda de captura puede hibridarse más fácilmente al producto de ligazón (es decir, en comparación con la ausencia de permeabilización).

En algunos casos, después de que el producto de ligazón se hibrida con la sonda de captura, el método descrito en la presente descripción incluye extender la sonda de captura mediante el uso del producto de ligazón como una plantilla; de esta manera se genera una sonda de captura extendida. En algunos casos, la sonda de captura se extiende en donde cada adenina, si está presente en la sonda extendida, se empareja con base con una timina. En algunas modalidades, la sonda de captura extendida comprende una timina en cada posición que corresponde a las citosinas no metiladas en el analito en la muestra biológica. En algunas modalidades, las citosinas metiladas, por ejemplo, 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina, si están presentes en el analito en la muestra, permanecen sin cambio.

En algunas modalidades, los reactivos de amplificación pueden añadirse al segundo sustrato. La incubación con los reactivos de amplificación puede producir secuencias de ADN con códigos de barras espaciales. Los reactivos de la segunda hebra (por ejemplo, cebadores de la segunda hebra, enzimas) pueden añadirse a la muestra biológica en el portaobjetos para iniciar la síntesis de la segunda hebra de ADN.

El ADN resultante puede desnaturalizarse desde la plantilla de la sonda de captura y transferirse (por ejemplo, a un tubo limpio) para la amplificación, y/o construcción de la biblioteca como se describe en la presente descripción. El ADN con código de barras espacial, de longitud completa, puede amplificarse mediante PCR antes de la construcción de la biblioteca. El ADN puede entonces fragmentarse enzimáticamente y seleccionarse por tamaño con el fin de optimizar el tamaño del amplicón del ADN. La secuenciación de secuencias específicas de ácidos nucleicos tales como P5, P7, índices de muestra tales como i7 e i5 y la secuenciación de secuencias de cebadores tales como TruSeq Lectura 2 (secuencias ilustrativas que se usan en flujos de trabajo de secuenciación NGS de Illumina) pueden añadirse a través de reparación de extremos, adición de poliA, ligazón de adaptadores y PCR. Los fragmentos de ADNc pueden entonces secuenciarse mediante el uso de secuenciación de extremo emparejado mediante el uso de TruSeq Lectura 1 y TruSeq Lectura 2 como secuenciación de sitios de cebadores. En algunos casos, la biblioteca de ADN se secuencia mediante el uso de cualquier método descrito en la presente descripción.

En algunas modalidades, puede secuenciarse la sonda de captura, el producto de ligazón o un complemento de los mismos, y/o el adaptador metilado del analito. En algunos casos, esto se realiza mediante el uso de una etapa de determinación. En algunos casos, la etapa de determinación comprende la secuenciación (i) de toda o parte de la secuencia del analito, o un complemento de la misma, y (ii) de toda o parte de la secuencia del código de barras espacial, o un complemento de la misma. La secuenciación puede realizarse mediante el uso de cualquiera de los métodos adecuados descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, la secuenciación es una secuenciación de alto rendimiento. En algunas modalidades, la secuenciación es secuenciación mediante hibridación. En algunas modalidades, la secuenciación es secuenciación por síntesis. En algunas modalidades, la secuenciación es secuenciación por ligazón. En algunas modalidades, la secuenciación es secuenciación de tipo nanoporo.

En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción comprenden además transferir un analito a una matriz espacial (por ejemplo, una matriz espacial sobre un sustrato). En algunas modalidades, los métodos comprenden además una etapa de migración en donde el analito migra al sustrato. En algunas modalidades, la migración es una etapa de migración activa. Por ejemplo, la migración es a través de un sistema microfluídico o un gradiente de concentración de un reactivo. En algunas modalidades, la migración activa se efectúa por medios electroforéticos. En algunas modalidades, la migración es una etapa de migración pasiva. Por ejemplo, la migración sigue a la gravedad. En algunas modalidades, el analito es un producto de

ligazón (por ejemplo, una sonda ligada). En algunas modalidades, el analito es un fragmento de ácido nucleico adaptado (por ejemplo, fragmentomarcado). En algunas modalidades, el fragmento de ácido nucleico adaptado (por ejemplo, fragmentomarcado) se desamina.

5 En algunas modalidades, la identificación de las citosinas metiladas es indicativa del estado de metilación del analito, por ejemplo, ácido nucleico. En algunas modalidades, el estado de metilación del analito se indica por el porcentaje de citosinas metiladas sobre todas las citosinas del analito. En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción comprenden además comparar la secuencia determinada del analito con una secuencia de referencia del analito, por ejemplo, la secuencia del analito sin desaminación. En algunas modalidades, la comparación comprende identificar timinas en la secuencia determinada del analito y comparar con los nucleótidos en las posiciones correspondientes en la secuencia de referencia del analito, y determinar que una o más timinas en la secuencia determinada mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción son citosinas no metiladas. En algunas modalidades, una o más citosinas en el analito, por ejemplo, ADN, pueden ser citosinas metiladas. En algunas modalidades, la secuencia determinada del analito comprende una o más citosinas, en donde la una o más citosinas son citosinas metiladas. En algunas modalidades, de aproximadamente 0 0001 % a aproximadamente 50 % (por ejemplo, de aproximadamente 0 0001 % a aproximadamente 0,001 %, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,01 %, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 %, de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 0,2 %, de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 0,3 %, de aproximadamente 0,3 % a aproximadamente 0,4 %, de aproximadamente 0,4 % a aproximadamente 0,5 %, de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 0,6 %, de aproximadamente 0,6 % a aproximadamente 0,7 %, de aproximadamente 0,7 % a aproximadamente 0,8 %, de aproximadamente 0,8 % a aproximadamente 0,9 %, de aproximadamente 0,9 % a aproximadamente 1 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 2 %, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 %, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 4 %, de aproximadamente 4 % a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 6 %, de aproximadamente 6 % a aproximadamente 7 %, de aproximadamente 7 % a aproximadamente 8 %, de aproximadamente 8 % a aproximadamente 9 %, de aproximadamente 9 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 15 %, de aproximadamente 15 % a aproximadamente 20 %, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 25 %, de aproximadamente 25 % a aproximadamente 30 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 35 %, de aproximadamente 35 % a aproximadamente 40 %, de aproximadamente 40 % a aproximadamente 45 %, o de aproximadamente de 45 % a aproximadamente el 50 %) de las citosinas en un analito se metilan. En algunas modalidades, ninguna citosina en un analito se metila.

35 En algunos casos, el porcentaje o abundancia de nucleótidos metilados puede determinarse y convertirse en una imagen, tal como un mapa de calor como se muestra en la Figura 11B. En algunos casos, el mapa se genera en base al porcentaje de nucleótidos metilados (por ejemplo, citosinas) o la abundancia de nucleótidos metilados (por ejemplo, citosinas) mediante la determinación de la ubicación de los nucleótidos metilados (por ejemplo, citosinas) mediante el uso de la ubicación del código de barras espacial en la sonda de captura como se proporciona por los resultados de la secuenciación.

40 En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción comprenden comparar el estado de metilación del analito en una ubicación en la muestra de tejido con el estado de metilación del ADN de una ubicación de referencia en una muestra de tejido de referencia. En algunas modalidades, la ubicación de referencia es una ubicación en un tejido sano, por ejemplo, un tejido sano correspondiente al tejido donde se obtiene la muestra de tejido. En algunas modalidades, la ubicación de referencia es una ubicación en un tejido no canceroso. En algunas modalidades, la ubicación de referencia es tejido no tumoral. En algunas modalidades, la ubicación de referencia es una ubicación en una muestra de tejido sin anomalías tales como tumor, cáncer, o enfermedad. En algunas modalidades, la ubicación de referencia está en una muestra identificada como que tiene cáncer. En algunos casos, la ubicación de referencia es una ubicación que incluye un tumor.

55 En algunas modalidades, el estado de metilación del analito en la muestra de tejido es diferente del estado de metilación de un analito en una ubicación de referencia en una muestra de tejido de referencia. En algunas modalidades, la metilación del analito en la muestra de tejido es mayor que la metilación de un analito en una ubicación de referencia. En algunas modalidades, la metilación del analito en la muestra de tejido es menor que la metilación de un analito en una ubicación de referencia. En algunos casos, el estado de metilación de una citosina particular de un analito es diferente de una citosina en un analito en una ubicación de referencia. En algunos casos, un grupo metilo se ubica en una citosina particular en comparación con una citosina correspondiente en la ubicación de referencia. En algunos casos, un grupo metilo no está presente en una citosina particular en comparación con un grupo metilo presente en una citosina en la ubicación de referencia. En algunos casos, el estado de metilación del analito incluye al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50 o más grupos metilo en comparación con las citosinas correspondientes en la ubicación de referencia. En algunos casos, el estado de metilación del analito no incluye al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos

50 o más grupos metilo en comparación con las citosinas correspondientes en la ubicación de referencia de una muestra de tejido de referencia.

#### Kits y composiciones

5 Los kits a los que se hace referencia en esta sección son solo parte de la presente descripción y no forman parte de la presente invención. En algunas modalidades, también se proporcionan en la presente descripción kits y composiciones que incluyen uno o más reactivos para detectar el estado de metilación de un ácido nucleico en una muestra biológica.

10 En algunos casos, el kit o composición incluye un primer sustrato como se describe en la presente descripción. En algunos casos, el kit o composición incluye un segundo sustrato como se describe en la presente descripción. En algunos casos, el kit o composición incluye medios para liberar uno o más ácidos nucleicos y/o sondas de una muestra biológica y permitir que uno o más ácidos nucleicos y/o sondas migren al segundo sustrato. En algunas modalidades, el kit o composición incluye un sustrato que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de primeras sondas de captura comprende (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura.

15 En algunos casos, el kit o composición incluye una o más mezclas, reactivos o soluciones para desaminar un nucleótido o ácido nucleico. En algunos casos, la una o más mezclas, reactivos o soluciones es bisulfito de sodio.

20 En algunas modalidades, los reactivos pueden incluir uno o más anticuerpos (y/o fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno), sondas de hibridación etiquetadas y cebadores. Por ejemplo, en algunas modalidades, un anticuerpo (y/o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno) puede usarse para visualizar uno o más elementos de una muestra de tejido (por ejemplo, mediante el uso de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica). En algunas modalidades, un anticuerpo (y/o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno) puede ser un resto de unión a analito, por ejemplo, como parte de un agente de captura de analito. Por ejemplo, en algunas modalidades, un kit puede incluir un anticuerpo anti-PMCH, tal como el Producto Núm. HPA046055 (Atlas Antibodies), Cat. Núms. PA5-25442, PA5-84521, PA5-83802 (ThermoFisher Scientific) o Núm. de producto AV13054 (MilliporeSigma). Otros anticuerpos disponibles comercialmente útiles serán evidentes para un experto en la técnica.

25 En algunas modalidades, las sondas de hibridación etiquetadas pueden usarse para la secuenciación in situ de uno o más biomarcadores y/o candidatos a biomarcadores. En algunas modalidades, los cebadores pueden usarse para la amplificación (por ejemplo, amplificación clonal) de un analito oligonucleotídico capturado.

30 En algunas modalidades, un kit o composición puede incluir sistemas enzimáticos para llevar a cabo el fragmentomarcaje con ADN en un analito diana. Los sistemas enzimáticos pueden incluir una o más transposasas, secuencias de transposones, secuencias adaptadoras, ya sea por separado o combinadas en complejos transposómicos. En algunas modalidades, la enzima se selecciona del grupo que consiste en una transposasa, una ligasa, una polimerasa; una transcriptasa inversa, una citidina desaminasa y una desmetilasa.

35 En algunas modalidades, un kit o composición puede incluir además instrucciones para realizar cualquiera de los métodos o etapas proporcionados en la presente descripción. En algunas modalidades, un kit o composición puede incluir un sustrato con una o más sondas de captura que comprenden un código de barras espacial y un dominio de captura que captura un ácido nucleico. En algunos casos, los métodos incluyen medios para la secuenciación del ácido nucleico. En algunos casos, el kit incluye reactivos para detectar y secuenciar el analito. En algunas modalidades, el kit o composición incluye además, pero no se limita a, uno o más anticuerpos (y/o fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno), sondas de hibridación etiquetadas, cebadores o cualquiera de sus combinaciones para visualizar uno o más elementos de una muestra de tejido.

#### Ejemplos

55 Ejemplo 1: Captura eficiente de analitos a partir de secciones de cerebro de ratón recién congeladas montadas en portaobjetos con matriz espacial

60 La captura de analitos en matrices con código de barras espacial y la secuenciación posterior se demostró en condiciones de dos portaobjetos y control (no dos portaobjetos). Para la condición de dos portaobjetos, se usaron portaobjetos de vidrio estándar archivados montados con tejido que contenían secciones de cerebro de ratón fresco congelado teñidas con hematoxilina/eosina. Para la condición de control, se usaron portaobjetos con matriz de expresión génica con secciones cerebrales de ratón congeladas frescas teñidas con hematoxilina/eosina montadas directamente sobre el área de matriz. En ambas condiciones, las secciones de tejido se sometieron a una etapa de decoloración de la hematoxilina. Los portaobjetos procesados de acuerdo con la condición de dos portaobjetos se secaron brevemente a 37 °C, luego se montaron en un instrumento  
65 junto con un portaobjetos de expresión génica y un tampón de permeabilización que comprende sarcosilo y

proteinasas K. Tras el cierre del instrumento (por ejemplo, se colocaron dos portaobjetos juntos en una configuración de tipo intercalado), las secciones de tejido se permeabilizaron durante 1 minuto. Para los portaobjetos de expresión génica montados con un tejido procesados de acuerdo con la condición de control, las secciones se permeabilizaron durante 5 minutos mediante el uso del mismo tampón de permeabilización. Para ambas condiciones, después de la permeabilización, los transcritos de ARNm que contenían poliA capturados en los portaobjetos de expresión génica se transcribieron de forma inversa en ADNc, seguido de la preparación y secuenciación de la biblioteca de secuenciación estándar.

Los resultados que representan medianas de genes por punto y medianas de recuentos de UMI por punto se muestran en la Figura 13.

Los resultados visuales del mapa de calor que muestran Log10 de las UMI se muestran en la Figura 14. Los patrones espaciales de los recuentos de Log10 UMI fueron similares en las condiciones de dos portaobjetos y de control.

El análisis de conglomerado espacial (hilera superior 1505) y el análisis del transcrito del hipocampo Hpca (hilera de la parte inferior 1510) se representan en la Figura 15. Los patrones espaciales fueron comparables en las condiciones de dos portaobjetos y de control.

Ejemplo 2: Método para identificar el estado de metilación de un analito.

La Figura 10 es un flujo de trabajo ilustrativo de los métodos descritos en la presente descripción para identificar el estado de metilación de una muestra biológica.

Específicamente, se proporciona un portaobjetos regular (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio). La muestra biológica (por ejemplo, un tejido) se coloca en el portaobjetos, se tiñe y se toman imágenes. El tejido se permeabiliza, y se aplica al tejido un reactivo de bisulfito o una enzima desaminante. Durante la desaminación, los fragmentos de ADN bicatenario se vuelven monocatenarios debido a la pérdida de paridad cuando las citosinas metiladas se convierten en uracilos. Después de lavar el reactivo bisulfito o desaminante, una o más sondas dirigidas a regiones de interés (tales como islas CpG) en los analitos en el tejido se hibridan con los analitos en la muestra biológica y se extienden. Las sondas se diseñan para dirigirse (por ejemplo, hibridar con) a regiones que no tienen dinucleótidos CG. También están diseñadas para incluir salientes que se hibridan específicamente con el dominio de captura de las sondas de captura en una matriz espacial. Después de la hibridación de las sondas con el analito, en este ejemplo una de las sondas se extiende mediante el uso de una polimerasa, lo que crea un oligonucleótido que es complementario a las regiones entre las sondas hibridadas. Las sondas se ligan, se crea un producto de ligazón que incluye una secuencia complementaria al analito desaminado de interés. El producto de ligazón (a través de una de las sondas) incluye una secuencia (por ejemplo, una secuencia saliente) complementaria a una sonda de captura en una matriz espacial.

Como se muestra en el panel inferior de la Figura 10, se proporciona una matriz espacial en un portaobjetos que comprende una pluralidad de sondas de captura con ubicación UMI. El producto de ligazón se transfiere sobre el portaobjetos con matriz espacial mediante el uso de un método adecuado descrito en la presente descripción. Mediante el uso del saliente del producto de ligazón, el producto de ligazón se hibrida con las sondas de captura en la superficie del portaobjetos con matriz espacial. Las sondas de captura se extienden mediante el uso del producto de ligazón como una plantilla. El producto de ligazón se desnaturaliza, y mediante el uso de una secuencia de cebador de la sonda de captura, se sintetiza una pluralidad de ácidos nucleicos que incluyen la secuencia del UMI y el código de barras espacial, o un complemento del mismo, y la secuencia de la región de interés en el analito, o un complemento de la misma.

La pluralidad de ácidos nucleicos se secuencian subsecuentemente, y se determina la secuencia de la totalidad o una parte del UMI y el código de barras espacial, así como también la secuencia de la totalidad o una parte de la región de interés en el analito y se lleva a cabo un análisis para determinar el % de fragmentos metilados por sonda diana en una región de interés (metilación del gen HPCA en este ejemplo).

Ejemplo 3: Método para identificar el estado de metilación en un analito mediante el uso de muestras fragmentomarcadas.

Las Figuras 11A-11B son un flujo de trabajo ilustrativo de los métodos descritos en la presente descripción.

Como se muestra en la Figura 11A, la muestra biológica (por ejemplo, una sección de tejido) se coloca en un portaobjetos regular sin sondas de captura (el tejido se tiñe opcionalmente y se obtienen imágenes en este ejemplo). El tejido se permeabiliza, y los analitos (por ejemplo, ADN) se someten a fragmentomarcado mediante una transposasa (Tn5) en complejo con transposones que incluyen adaptadores metilados, extendidos y ligados para crear ADNbc fragmentomarcado. El ADN fragmentomarcado bicatenario se desamina mediante el uso de un reactivo de bisulfito o una enzima de desaminación y se desnaturaliza para formar un ADN fragmentomarcado monocatenario. El ADN fragmentomarcado monocatenario se transfiere luego a una matriz

espacial en un portaobjetos que comprende una pluralidad de sondas de captura con códigos de barras localizados y UMI. El ADN fragmentomarcado monocatenario transferido se liga a las sondas de captura en el portaobjetos mediante el uso de un oligonucleótido férula para traer los extremos del ADN fragmentomarcado cerca de la sonda de captura para que se produzca la ligazón. El ADN capturado se trata entonces con transferasa terminal, dCTP y una polimerasa amigable con uracilo para añadir una cola poli(C) al ADN capturado, el cual sirve como un sitio de hibridación para que un cebador poli(G) forme una pluralidad de ácidos nucleicos amplificables.

Como se muestra en la Figura 11B, estos ácidos nucleicos se preparan para la secuenciación, se secuencian y se determina la secuencia de la totalidad o una parte del UMI y el código de barras espacial, así como también la secuencia de la totalidad o una parte de la región de interés en el analito. Los datos se analizan y se determina espacialmente un porcentaje o grado de metilación de los fragmentos de ADN (metilación génica de HPCA en este ejemplo).

Ejemplo 4: Método para identificar el estado de metilación de un analito.

La Figura 16 es un flujo de trabajo ilustrativo de los métodos descritos en la presente descripción.

Específicamente, se proporciona una matriz en un portaobjetos que comprende una pluralidad de sondas de captura metiladas (es decir, citosinas metiladas) con ubicación UMI. Debido a que las sondas de captura incluyen citosinas metiladas, las sondas de captura se quedan intactas en presencia de agentes desaminantes. Como se muestra en la Figura 16, la muestra (por ejemplo, un tejido) se coloca en un portaobjetos, se tiñe y se toman imágenes. El tejido se permeabiliza, y se aplica al tejido un reactivo de bisulfito o una enzima desaminante. Durante la desaminación, los fragmentos de ADN bicatenario se vuelven monocatenarios debido a la pérdida de paridad cuando las citosinas metiladas se convierten en uracilos. Después de lavar el reactivo bisulfito o desaminante, una o más sondas dirigidas a regiones de interés (tales como islas CpG) en los analitos en el tejido se hibridan con los analitos en la muestra biológica y se extienden. Las sondas se diseñan para dirigirse (por ejemplo, hibridar con) a regiones que no tienen dinucleótidos CG. También están diseñadas para incluir salientes que se hibridan específicamente con el dominio de captura de las sondas de captura en la superficie del portaobjetos. Después de la hibridación de las sondas con el analito, en este ejemplo una de las sondas se extiende mediante el uso de una polimerasa, lo que crea un oligonucleótido que es complementario a las regiones entre las sondas hibridadas. Las sondas se ligan, se crea un producto de ligazón que incluye una secuencia complementaria al analito desaminado de interés. El producto de ligazón (a través de una de las sondas) incluye una secuencia (por ejemplo, una secuencia saliente) complementaria a una sonda de captura en la matriz.

Mediante el uso del saliente, el producto de ligazón se une a las sondas de captura en la superficie del portaobjetos. Las sondas de captura se extienden mediante el uso del producto de ligazón como una plantilla. El producto de ligazón se desnaturaliza, y mediante el uso de una secuencia de cebador de la sonda de captura, se sintetiza una pluralidad de ácidos nucleicos que incluyen la secuencia del UMI y el código de barras espacial, o un complemento del mismo, y la secuencia de la región de interés en el analito, o un complemento de la misma.

Estos ácidos nucleicos se secuencian subsecuentemente, y se determina la secuencia de la totalidad o una parte del UMI y el código de barras espacial, así como también la secuencia de la totalidad o una parte de la región de interés en el analito y se lleva a cabo un análisis para determinar el % de fragmentos metilados por sonda diana en una región de interés (metilación génica de HPCA en este ejemplo).

Ejemplo 5: Método para identificar el estado de metilación en un analito mediante el uso de muestras fragmentomarcadas.

La Figura 17 es un flujo de trabajo ilustrativo de los métodos descritos en la presente descripción.

Específicamente, se proporciona una matriz en un portaobjetos que comprende una pluralidad de sondas de captura metiladas (es decir, citosinas metiladas) con códigos de barras localizados y UMI. Debido a que las sondas de captura incluyen citosinas metiladas, las sondas de captura se quedan intactas en presencia de agentes desaminantes. Como se muestra en la Figura 17, la muestra (por ejemplo, un tejido) se coloca en un portaobjetos (teñido opcionalmente y obtenida la imagen en este ejemplo). El tejido se permeabiliza, y los analitos (por ejemplo, ADN) se someten a fragmentomarcado mediante una transposasa (Tn5 en complejo con transposones que incluyen adaptadores metilados), se extienden y se ligan para crear ADNbc fragmentomarcado. El ADN fragmentomarcado bicatenario se desnaturaliza para formar un ADN fragmentomarcado monocatenario. El ADN fragmentomarcado monocatenario se liga a las sondas de captura en el portaobjetos mediante el uso de un oligonucleótido férula para traer los extremos del ADN fragmentomarcado cerca de la sonda de captura para que se produzca la ligazón. El producto de ligazón se desamina mediante el uso de un reactivo de bisulfito o una enzima de desaminación. El ADN capturado se trata entonces con transferasa terminal, dCTP y una polimerasa amigable con uracilo para añadir una cola poli(C)

al ADN capturado, el cual sirve como un sitio de hibridación para que un cebador poli(G) forme una pluralidad de ácidos nucleicos amplificables.

5 Estos ácidos nucleicos se preparan para la secuenciación, se secuencian y se determina la secuencia de la todo o una parte del UMI y el código de barras espacial, así como también la secuencia de toda o una parte de la región de interés en el analito. Luego se analizan los datos y se determina un porcentaje o grado de metilación de los fragmentos de ADN (metilación del gen de HPCA en este ejemplo).

10 Ejemplo 6. Determinación del perfil de metilación del genoma completo mediante el uso de la plataforma de expresión génica espacial y en gotitas

Las Figuras 18A-18B muestran un flujo de trabajo ilustrativo de los métodos de fragmentomarcaje descritos en la presente descripción.

15 Específicamente, la determinación del perfil de metilación del ADN se logra en portaobjetos o gotitas de expresión génica espacial mediante el uso del fragmentomarcaje mediado por transposasa (por ejemplo, Tn5, Tn7, Mu, Mariner, Sleeping Beauty, etc.) para agregar adaptadores metilados o mediante el uso de un enfoque de unión enzimática para un fragmentomarcaje más dirigido, por ejemplo, mediante la fusión de una transposasa con una enzima de restricción inactiva como MspI (sitio de reconocimiento: CCGG, usado en la representación reducida de la secuenciación del bisulfito (RRBS) o Dnmt1, la metiltransferasa de mantenimiento).

20 Como se muestra en la Figura 18A, los analitos (por ejemplo, ADN) en una muestra biológica se fragmentan y marcan mediante procesos de fragmentomarcaje mediante, por ejemplo, Tn5, fusión MspI-Tn5 o fusión Dnmt1-Tn5. Los mangos R2 metilados se añaden a los extremos 3' y/o 5' de los fragmentos de ADN.

30 La muestra biológica (por ejemplo, muestra de tejido) se permeabiliza y las moléculas de ADN fragmentomarcadas se unen a una matriz de sondas de captura en un portaobjetos de expresión génica o un soporte sólido en una gota mediante la ligazón de los mangos (por ejemplo, mangos X2 o R2) sobre los fragmentos de ADN y las sondas de captura en la superficie del portaobjetos o la superficie sólida en la gota, por ejemplo mediante el uso de un oligonucleótido férula.

35 Los fragmentos de ADN ligados se extienden mediante el uso de una mezcla de dNTP que incluye 5' metil CTP y los fragmentos de ADN extendidos se desnaturalizan y se retiran de los portaobjetos o soporte sólido en gotitas mediante el uso de un reactivo de desnaturalización (por ejemplo, KOH).

40 Los fragmentos de ADN desnaturalizado se tratan con un reactivo de desaminación (por ejemplo, un reactivo de bisulfito). Los mangos y los códigos de barras de las sondas de captura están premetilados para que no se afecten por el proceso de desaminación. Para la captura dirigida, se usa un panel de sondas para enriquecer las regiones metiladas diferencialmente (DMR). Los paneles de sonda disponibles comercialmente tales como el panel Agilent SureSelect XT Human Methyl-Seq (Agilent, Santa Clara, CA) pueden usarse en el método descrito en la presente descripción.

45 Los fragmentos de ADN desaminado se amplifican mediante el uso de PCR de indexación con una polimerasa adecuada tal como Takara EpiTaq HS (Takara, Mountain View, CA). Opcionalmente, los fragmentos de ADN amplificados se capturan y el ADN mitocondrial se elimina antes de la secuenciación.

Ejemplo 7: Método para identificar el estado de metilación en un analito.

50 La Figura 19A muestra un flujo de trabajo ilustrativo usado en la presente descripción. En particular, se seccionó una muestra de tejido cerebral de ratón y se colocó en un portaobjetos de microscopía. La sección de tejido 1901 se fijó, se tiñó con H&E y se obtuvieron imágenes. Después de la decoloración con HCl, la muestra se permeabilizó durante 15 minutos a temperatura ambiente con una proteasa en solución salina amortiguadora de fosfato (PBS). La sección de tejido se trató con una solución que comprende ARNasa durante 15 minutos a temperatura ambiente con el fin de eliminar cualquier ARN que pudiera competir con el ADN para hibridarse con una sonda de captura en una matriz. Luego, la muestra se lavó con agua libre de nucleasas y desaminación enzimática (New England Biolabs® Inc.). Específicamente, se mezcló Tet metilcitosina dioxigenasa 2 (TET2) en una solución a una concentración de 1x, y la muestra se incubó durante 1 hora a 37 °C. Luego, la muestra se lavó en 1x SSC. Después, la muestra se incubó en formamida al 20 % durante 10 minutos a 85 °C. La muestra se trató con enzima de edición de ARNm de apolipoproteína B, polipéptido catalítico (APOBEC) durante 4 horas a 37 °C para convertir la citosina que se desamina en uracilo. Después de una etapa de lavado con 2x SSC, los ácidos nucleicos en la muestra se amplificaron 1903 mediante el uso de una ADN polimerasa y los cebadores 1902 que comprenden un hexámero aleatorio (por ejemplo, aleatómeros) y un saliente de politimina (n = 30 nucleótidos de timina). Los ácidos nucleicos amplificados, mostrados en la Figura 19B y que comprenden una secuencia desaminada, secuencias de aleatómeros, una cola poli-A y un oligo de conmutación de plantilla (TSO), se desnaturalizaron con una solución de KOH durante 5 minutos.

Una matriz que comprende sondas de captura que tienen un dominio de captura con una secuencia de politimina se intercaló 1904 sobre la muestra. La sección de tejido se permeabilizó y los ácidos nucleicos desnaturalizados se capturaron en la matriz a 37 °C durante 30 minutos. Se usó una ADN polimerasa para extender 1905 la sonda de captura mediante el uso del ácido nucleico capturado como una plantilla. Después, se realizó qPCR; los productos amplificados resultantes se fragmentaron, se indexaron y se secuenciaron 1906.

Las Figuras 20 y 21 proporcionan resúmenes de electroferogramas para dos muestras. En la Figura 20, la muestra de tejido cerebral de ratón se desaminó después de la amplificación de ADN y la limpieza por inmovilización reversible en fase sólida (SPRI) 1X, el electroferograma demuestra el intervalo de productos de amplificación a partir de amplificación basada en aleatómeros como se esperaba. La Figura 21 muestra un electroferograma después de una dilución 1:10 de la biblioteca final, con limpieza SPRI adicional que de esta manera se centra en una biblioteca de secuenciación de aproximadamente 400 fragmentos de pares de bases. Los gráficos de las Figuras 20 y 21 muestran que las secuencias que varían de 400-700 pares de bases se obtuvieron mediante secuenciación. Además, como se muestra en la Figura 22, los datos de secuenciación mostraron un aumento en los nucleótidos de adenina y una disminución en citosina y guanina. Estos datos demuestran una prueba de concepto de que una muestra biológica puede desaminarse y los ácidos nucleicos de la muestra biológica pueden capturarse en una matriz espacial, secuenciarse y analizarse. Por lo tanto, mediante el uso de los métodos de aquí, pueden examinarse espacialmente patrones de metilación en una muestra biológica.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar el estado de metilación de un analito de ácido nucleico en una muestra biológica que es una muestra de tejido, el método comprende:
  - 5 (a) poner en contacto la muestra biológica con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura en la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura que comprende al menos una citosina metilada;
  - (b) desaminar el analito de ácido nucleico en la muestra biológica;
  - 10 (c) poner en contacto el analito de ácido nucleico con una pluralidad de sondas que comprenden una primera sonda y una segunda sonda, en donde la primera sonda comprende (i) una secuencia complementaria a al menos una primera secuencia del analito de ácido nucleico y (ii) una secuencia complementaria al dominio de captura; y la segunda sonda comprende una secuencia complementaria a al menos una segunda secuencia del analito de ácido nucleico;
  - 15 (d) ligar la primera sonda y la segunda sonda, de esta manera se genera un producto de ligazón;
  - (e) hibridar el producto de ligazón a la sonda de captura;
  - (f) extender la sonda de captura mediante el uso del producto de ligazón como una plantilla; de esta manera se genera una sonda de captura extendida; y
  - 20 (g) determinar (i) la secuencia del código de barras espacial o el complemento de la misma y (ii) toda o una porción de la secuencia de la sonda de captura extendida, o un complemento de la misma, y mediante el uso de determinadas secuencias de (i) y (ii) identificar el estado de metilación del analito de ácido nucleico en la muestra biológica.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además liberar el producto de ligazón del analito de
   
25 ácido nucleico.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la ligazón comprende ligazón enzimática o ligazón
   
química, opcionalmente en donde la ligazón enzimática utiliza una ligasa, preferentemente en donde la ligasa
   
es una o más de una ligasa splintR, una ligasa de ADN monocatenario o una ligasa de ADN T4.
   
30
4. Un método para identificar el estado de metilación de un ácido nucleico en una muestra biológica que
   
es una muestra de tejido en un primer sustrato, que comprende:
  - (a) desaminar el ácido nucleico;
  - 35 (b) hibridar una primera sonda y una segunda sonda al ácido nucleico, en donde: la primera sonda comprende (i) una secuencia complementaria a al menos una primera secuencia del ácido nucleico y (ii) una secuencia complementaria a un dominio de captura de una sonda de captura en una matriz; y la segunda sonda comprende una secuencia complementaria a al menos una segunda secuencia del ácido nucleico;
  - 40 (c) ligar la primera sonda y la segunda sonda para generar un producto de ligazón;
  - (d) alinear el primer sustrato con un segundo sustrato que comprende la matriz, de manera que al menos una porción de la muestra biológica se alinee con al menos una porción de la matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende: (i) un código de barras espacial y (ii) el dominio de captura;
  - 45 (e) cuando la muestra biológica se alinea con al menos una porción de la matriz, (i) liberar el producto de ligazón del ácido nucleico y (ii) dejar que migre el producto de ligazón desde la muestra biológica hasta la matriz;
  - (f) capturar el producto de ligazón con el dominio de captura;
  - 50 (g) determinar (i) la secuencia del código de barras espacial o el complemento de la misma y (ii) toda o una porción de la secuencia del producto de ligazón, o un complemento de la misma; y
  - (h) usar las secuencias determinadas de (i) y (ii) para identificar el estado de metilación del ácido nucleico en la muestra biológica.
5. El método de la reivindicación 4, que comprende además generar una primera sonda extendida y/o una
   
55 segunda sonda extendida mediante el uso de una polimerasa, en donde la primera sonda extendida o la segunda sonda extendida comprenden una secuencia complementaria a una secuencia entre la primera secuencia y la segunda secuencia.
6. El método de la reivindicación 5, en donde al menos un nucleótido desaminado se ubica en la primera
   
60 secuencia, opcionalmente en donde el al menos un nucleótido desaminado se ubica en la segunda secuencia.
7. El método de las reivindicaciones 4 o 6, en donde la ligazón de la primera sonda y la segunda sonda
   
comprende la ligazón a través de una ligasa de la primera sonda y la segunda sonda, opcionalmente en donde
   
la ligazón de la primera sonda y la segunda sonda comprende la ligazón a través de una ligasa:
  - 65 (a) la primera sonda y la segunda sonda extendida; o

(b) la primera sonda extendida y la segunda sonda, opcionalmente en donde la ligasa se selecciona de una ligasa splintR, una ligasa de ADN monocatenario o una ligasa de ADN T4.

- 5 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en donde la ligazón utiliza un oligonucleótido férula, opcionalmente en donde el oligonucleótido férula comprende una primera secuencia de férula que es sustancialmente complementaria a la primera sonda y una segunda secuencia de férula que es sustancialmente complementaria a la segunda sonda.
- 10 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en donde la captura del producto de ligazón comprende hibridar la secuencia complementaria a un dominio de captura con el dominio de captura.
- 15 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-9, que comprende además extender la sonda de captura mediante el uso del producto de ligazón como una plantilla; de esta manera se genera una sonda de captura extendida.
- 20 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el ácido nucleico es ADN, preferentemente en donde el ADN es ADN genómico.
- 25 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la muestra de tejido es una muestra de tejido sólido, opcionalmente en donde la muestra de tejido es una sección de tejido.
- 30 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la muestra biológica es una muestra fijada, una muestra congelada, una muestra fresca o una muestra fresca congelada o una muestra fijada en formalina y embebida en parafina (FFPE).
- 35 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-13, en donde el primer sustrato es un portaobjetos de vidrio, opcionalmente en donde el primer sustrato no comprende una matriz de sondas de captura, opcionalmente en donde el segundo sustrato es un portaobjetos de vidrio.
- 40 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde la desaminación comprende poner en contacto la muestra biológica con una composición que comprende bisulfito de sodio y/o en donde la desaminación comprende tratar la muestra biológica con una enzima, preferentemente en donde la enzima es una citidina desaminasa.
- 45 16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-15, en donde un extremo 5' de la sonda de captura se une al segundo sustrato.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde la sonda de captura comprende además uno o más dominios funcionales, un identificador molecular único, un dominio de escisión o sus combinaciones.
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde la determinación comprende secuenciar (i) toda o una parte de la secuencia del ácido nucleico, o un complemento de la misma, y (ii) la secuencia del código de barras espacial, o un complemento de misma.
19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, que comprende además obtener imágenes de la muestra biológica, opcionalmente en donde la obtención de imágenes se producen antes de desaminar la muestra biológica.

DIBUJOS

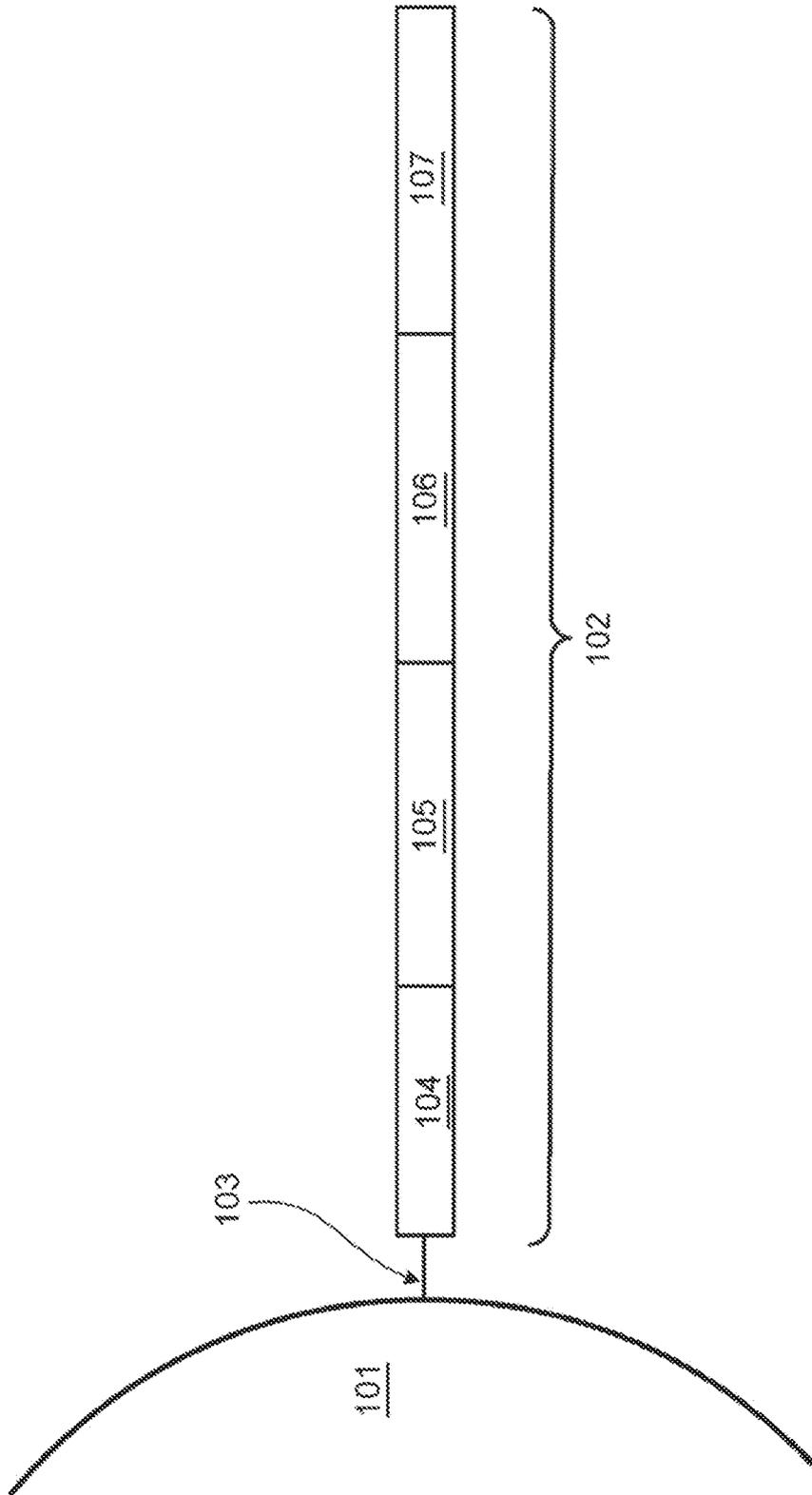
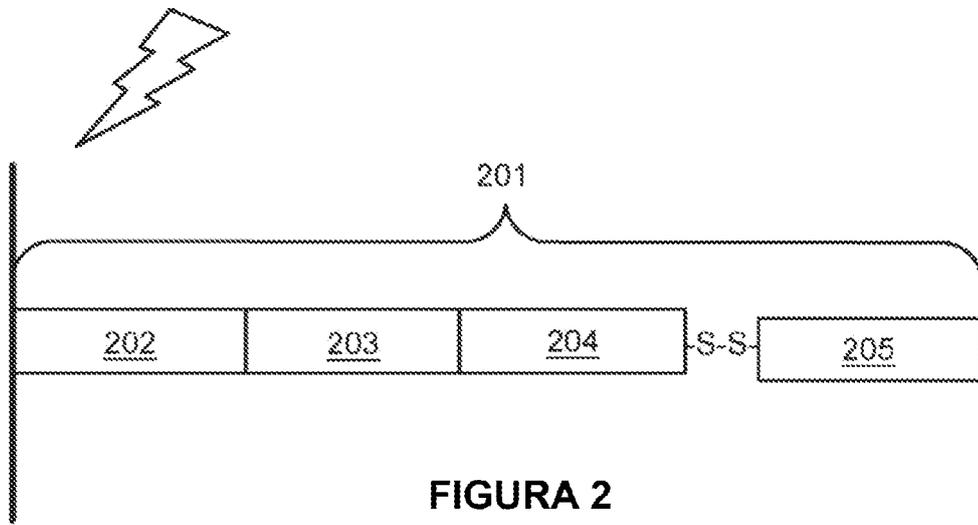


FIGURA 1



**FIGURA 2**

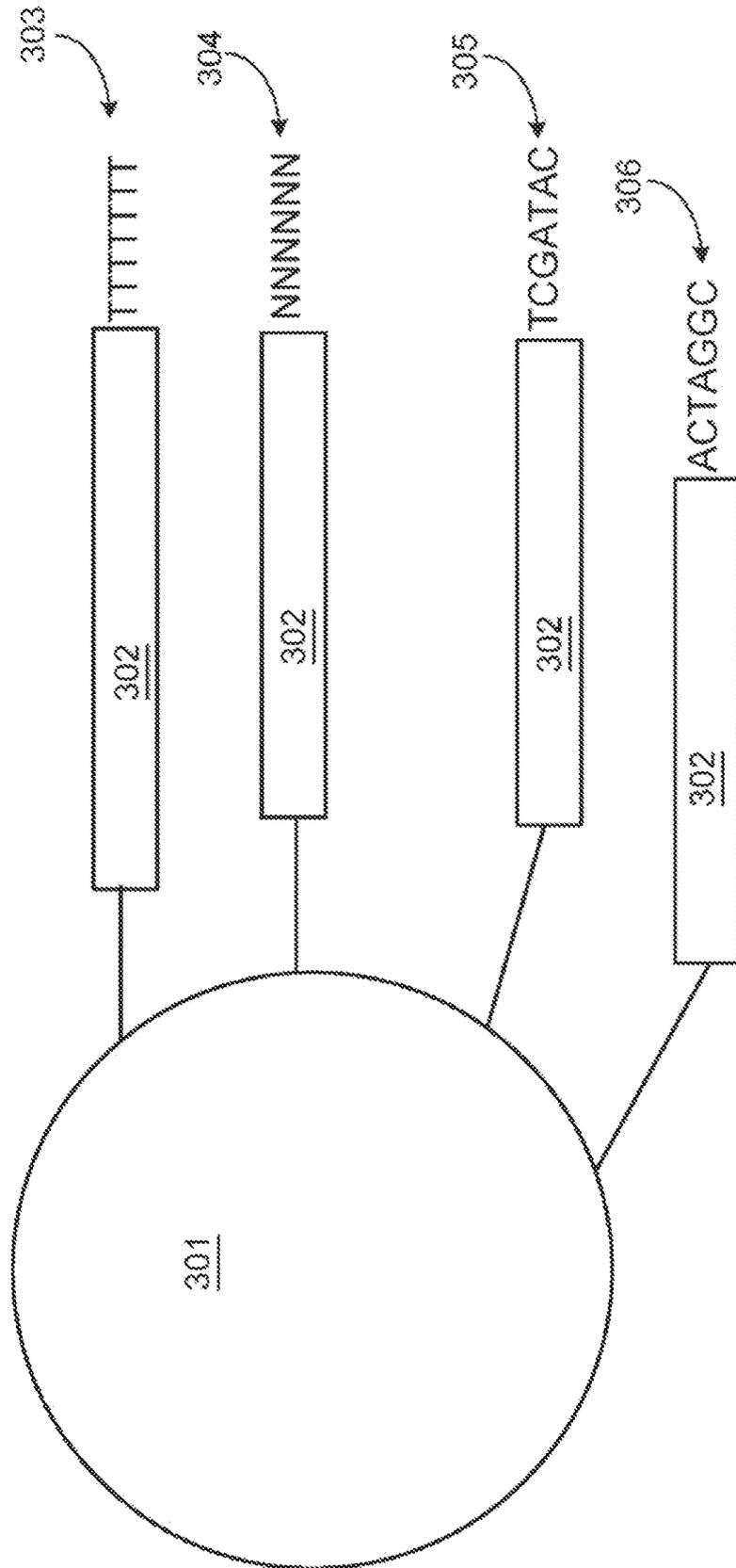


FIGURA 3

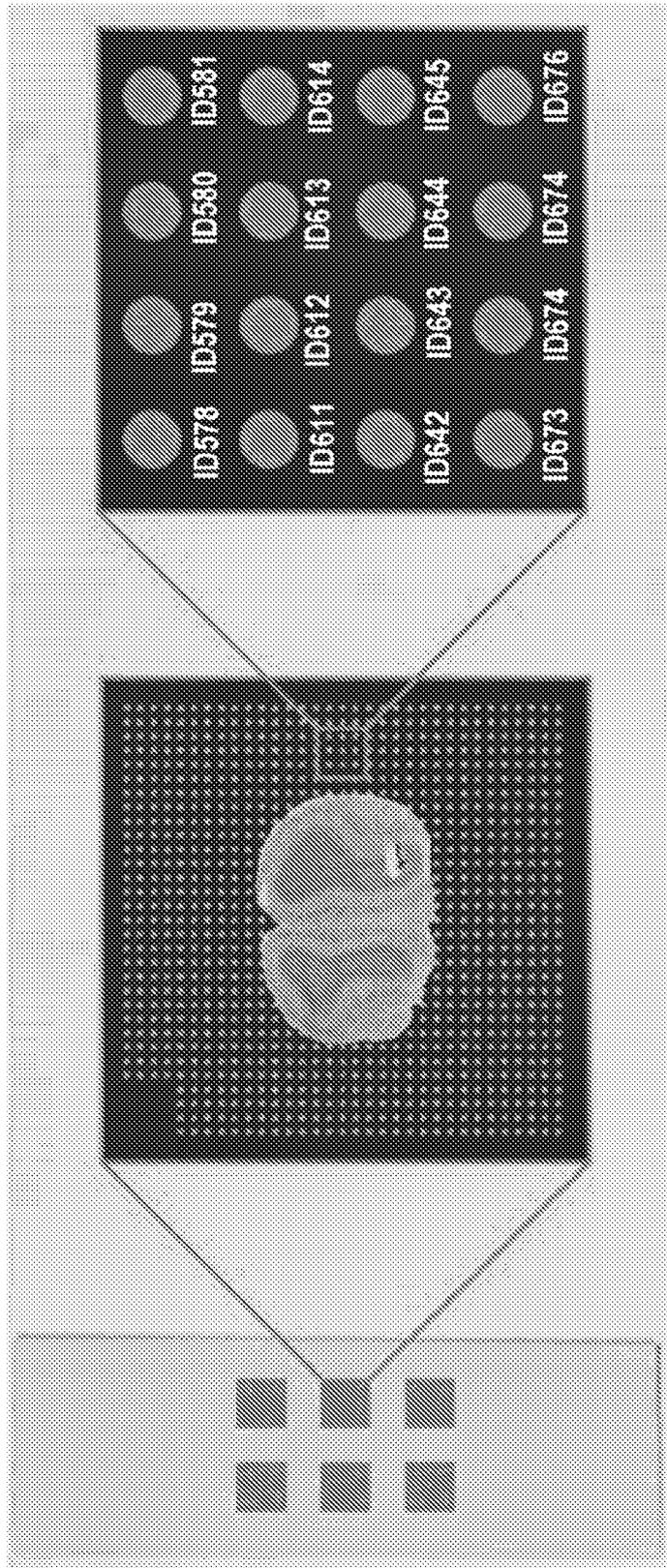
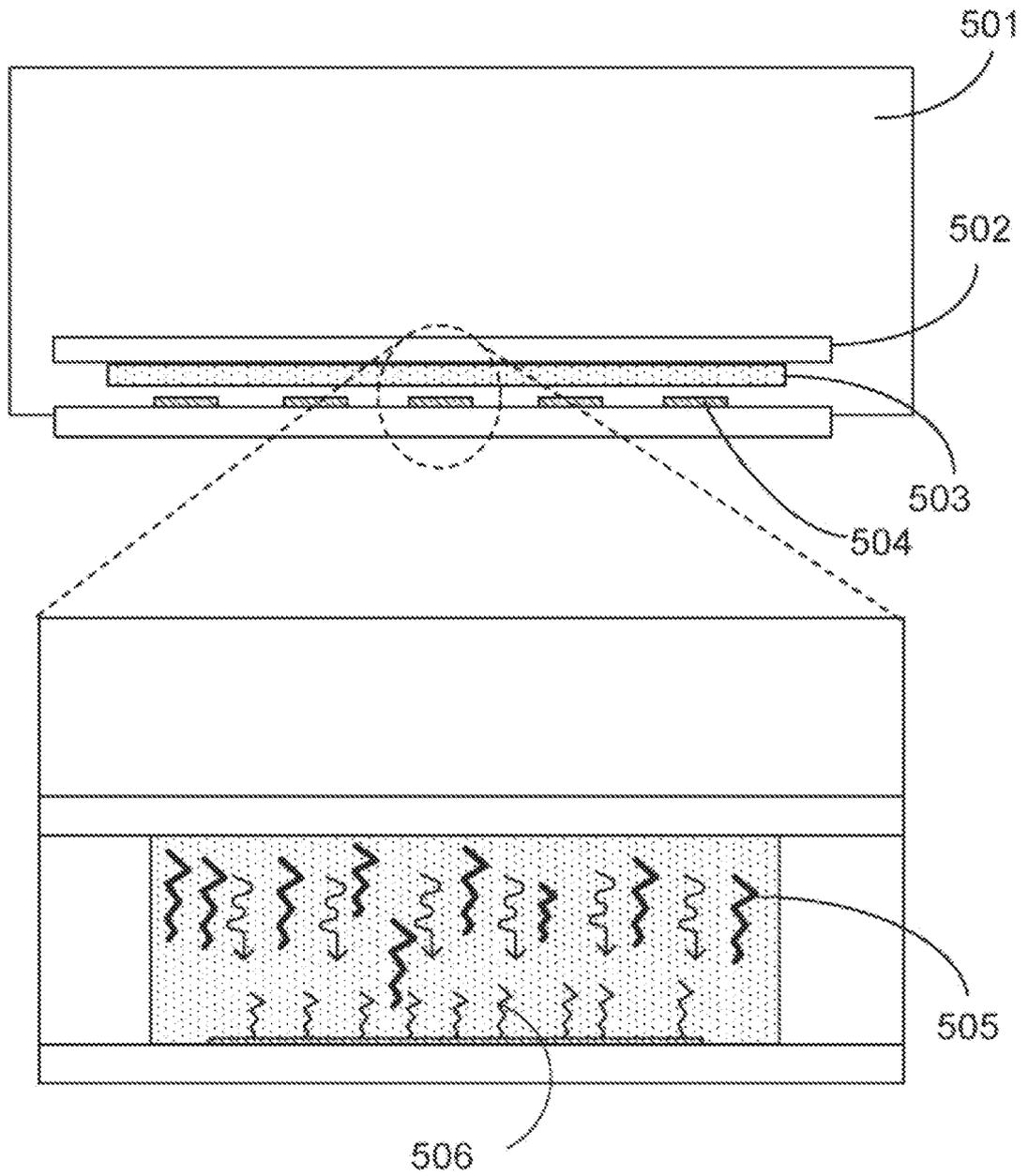
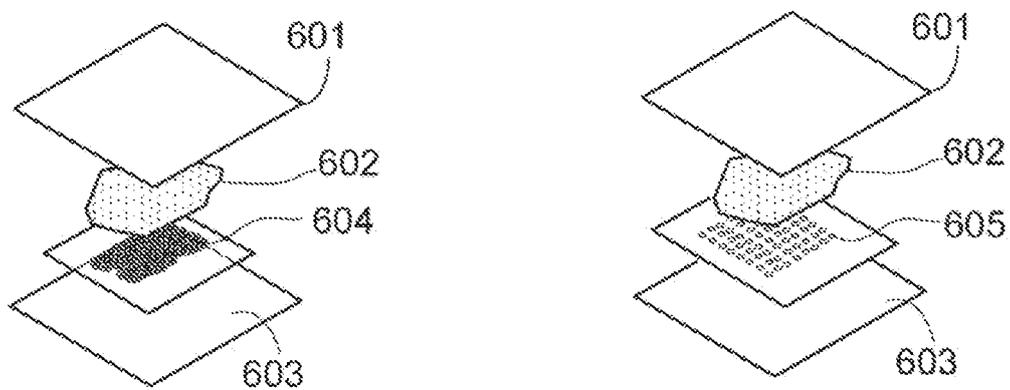


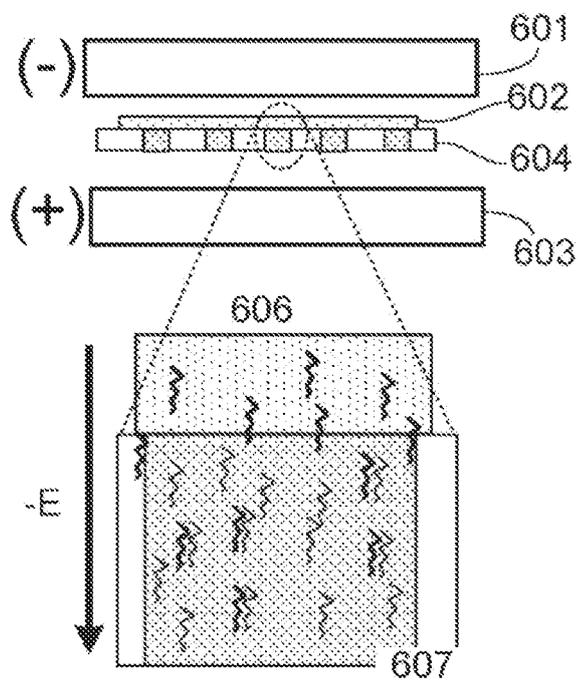
FIGURA 4



**FIGURA 5**



**FIGURA 6A**



**FIGURA 6B**

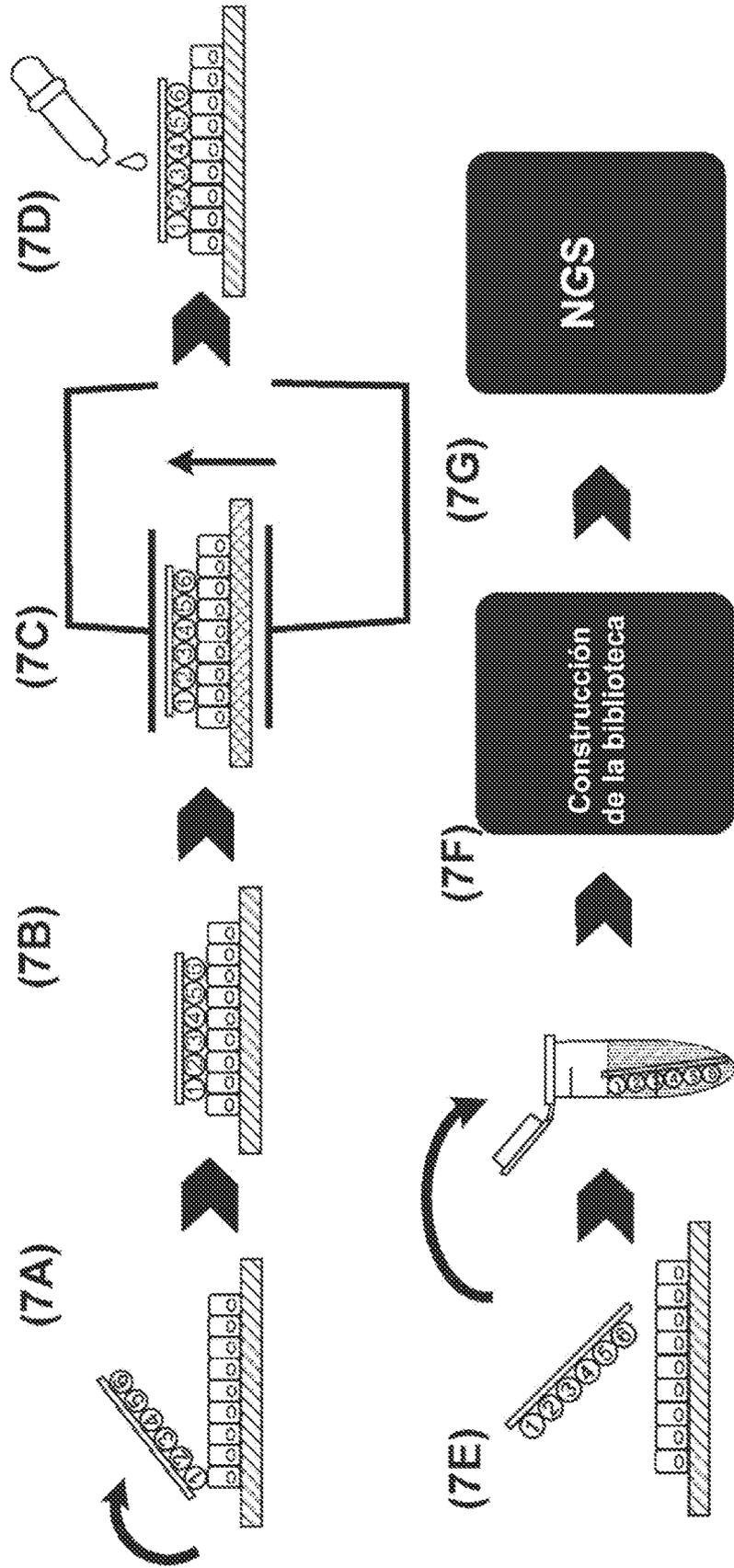


FIGURA 7

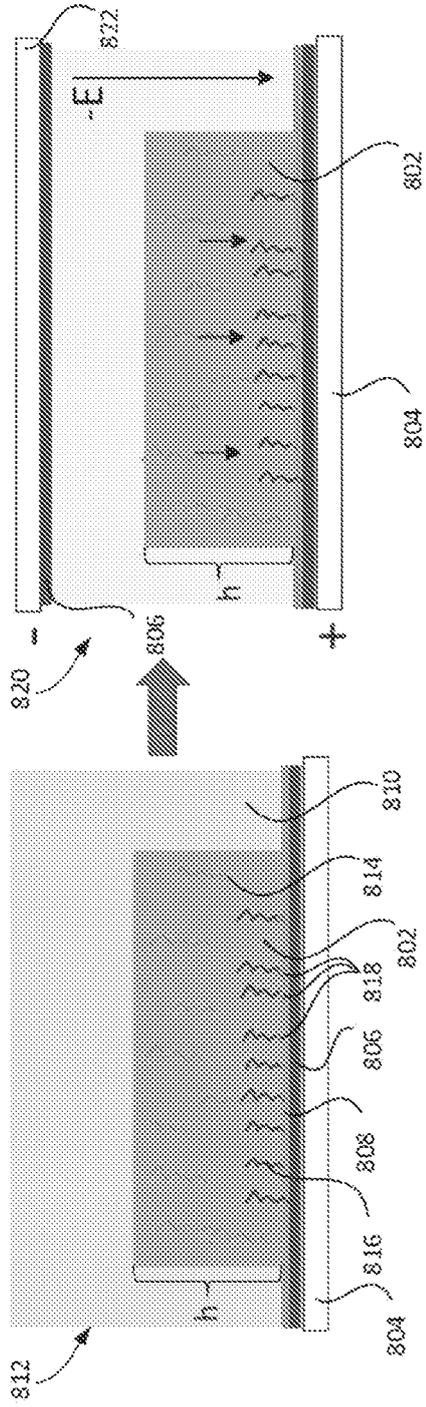


FIGURE 8A

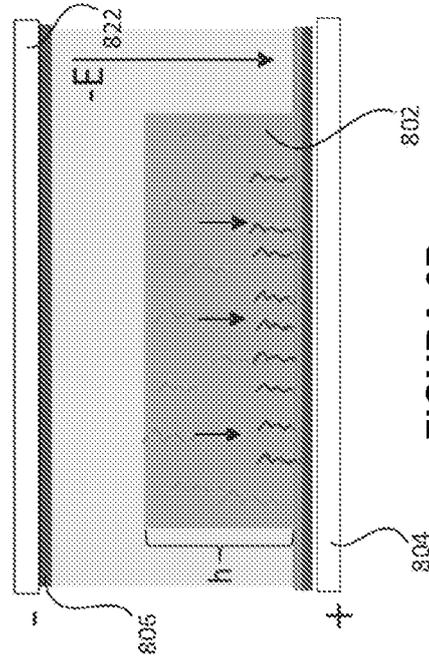


FIGURE 8B

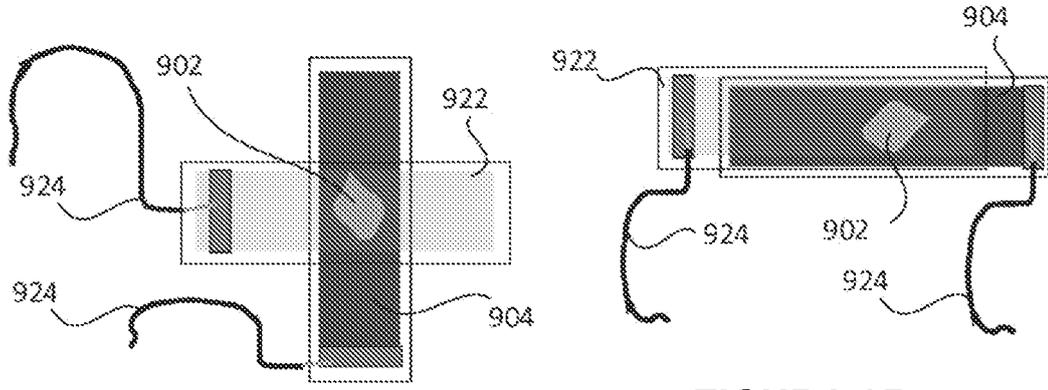


FIGURA 9A

FIGURA 9B

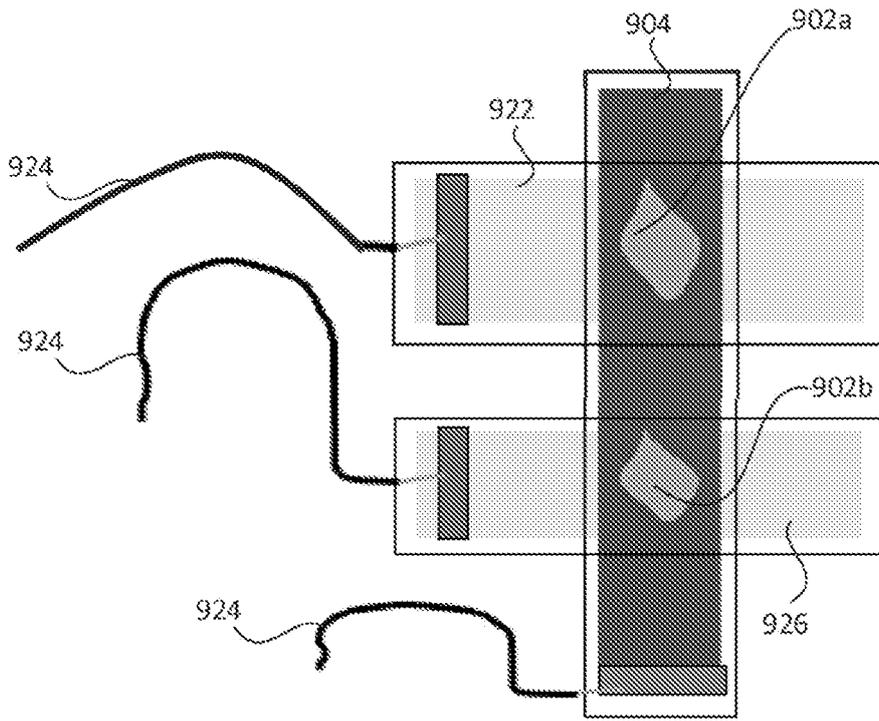
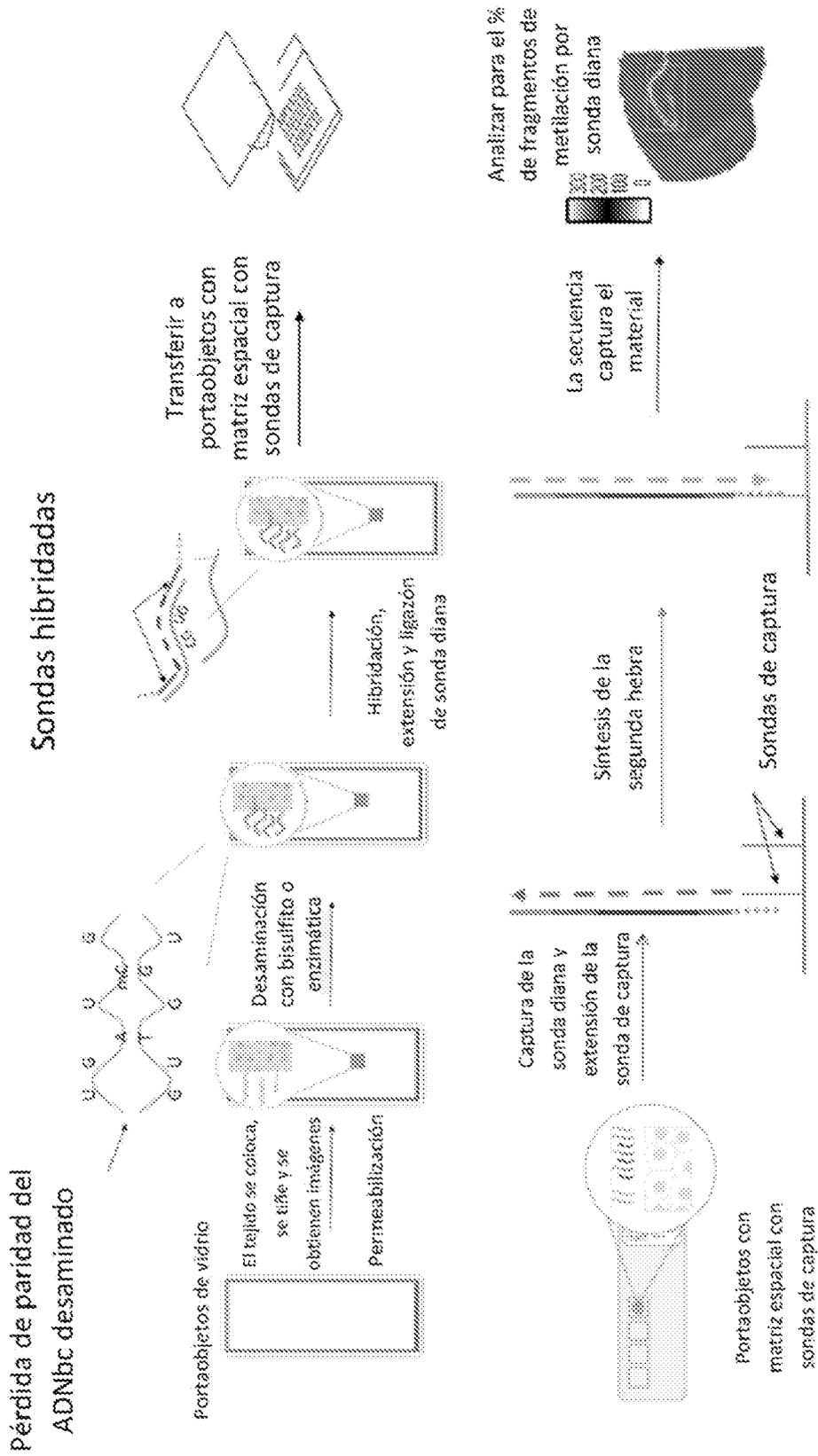


FIGURA 9C



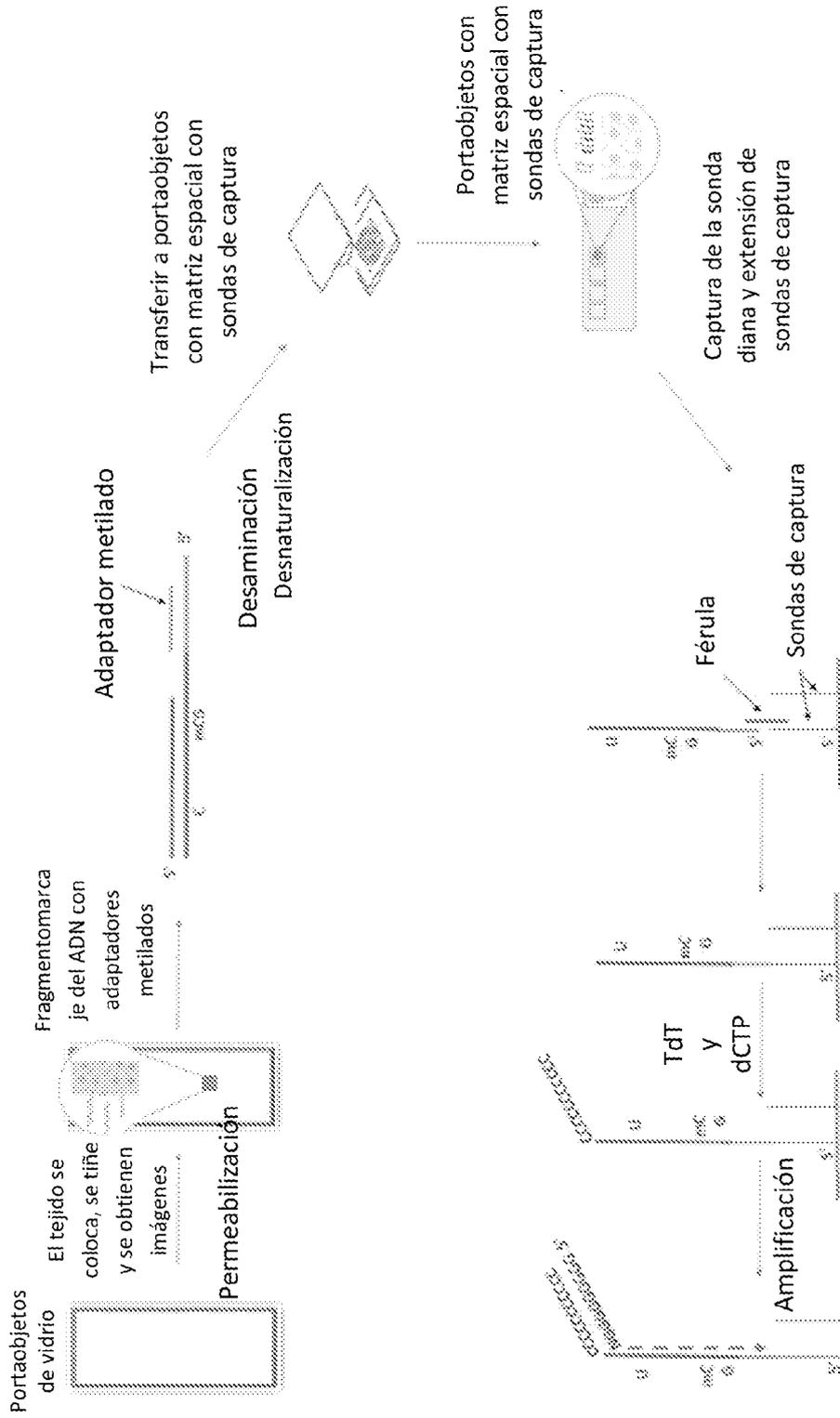


FIGURA 11A

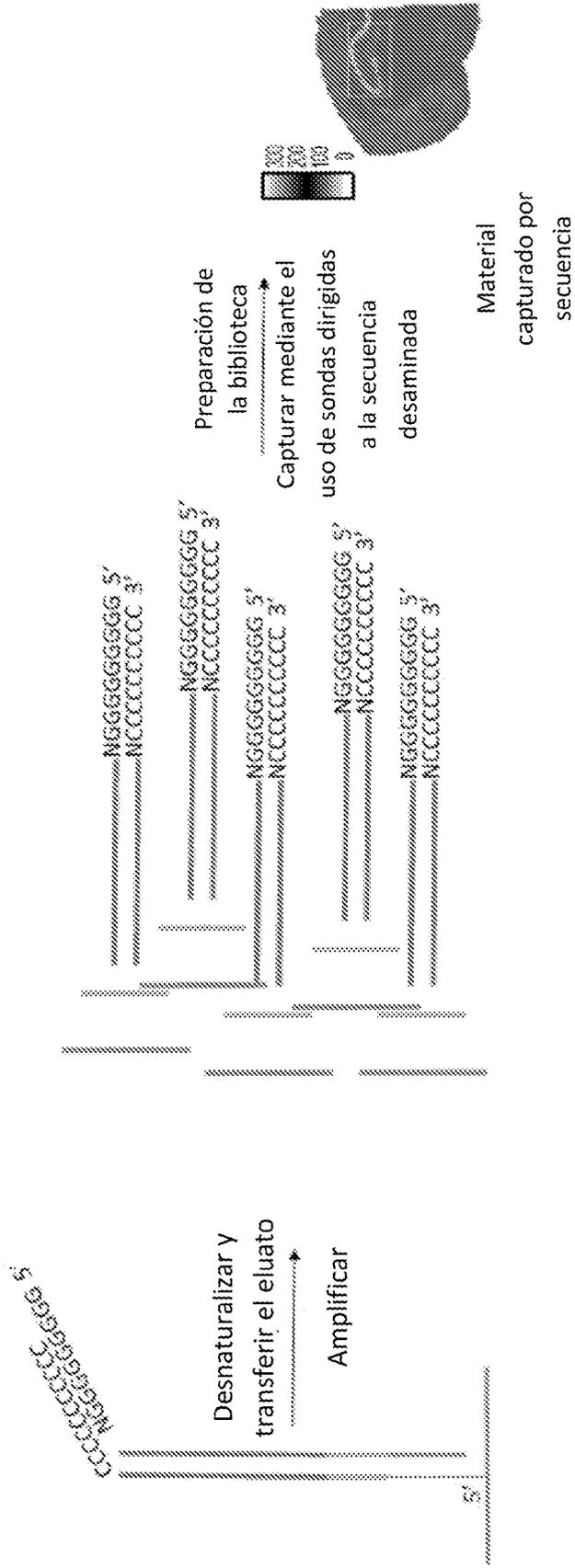


FIGURA 11B

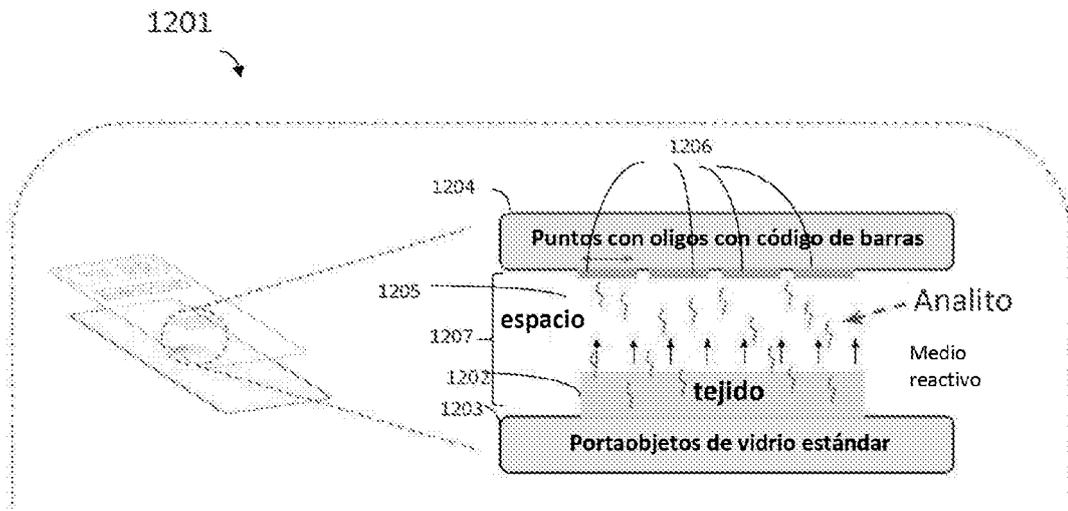


FIGURA 12

ID de análisis	Muestra	Descripción	Tiempo de permeabilización	mm10 Mediana de genes por punto (30k lecturas sin procesar por punto)	mm10 Mediana de los recuentos de umi por punto (30k lecturas sin procesar por punto)
1046321	Cerebro de ratón (FF)	Control de un solo portaobjetos	5 minutos	5194	17 660
1046322				4592	13 083
1046514		Permeabilización en ensamble de dos portaobjetos	1 minuto	4072	14 017
1046515				3758	13 731

FIGURA 13

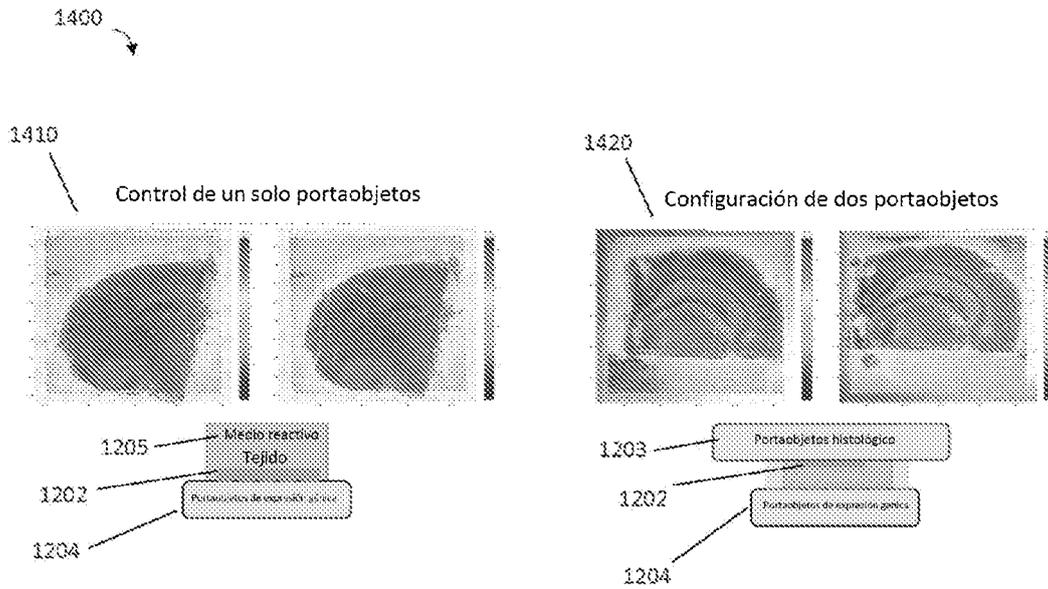
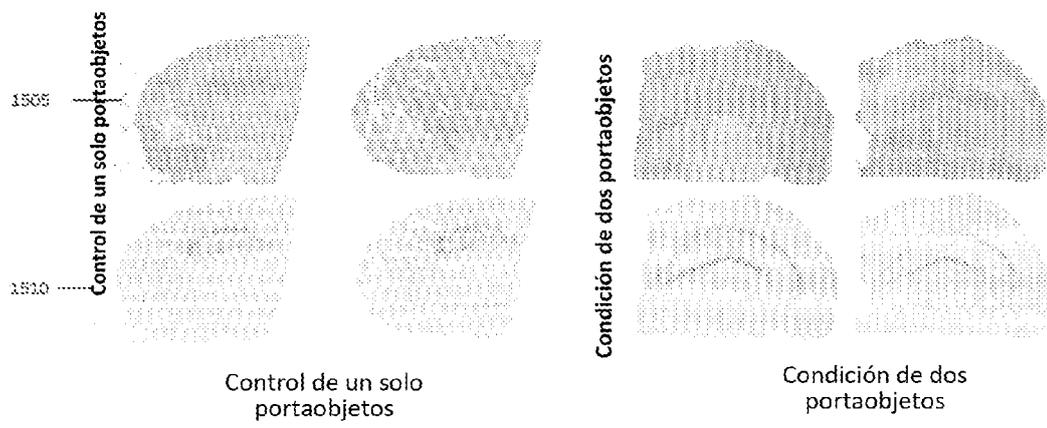


FIGURA 14



**FIGURA 15**

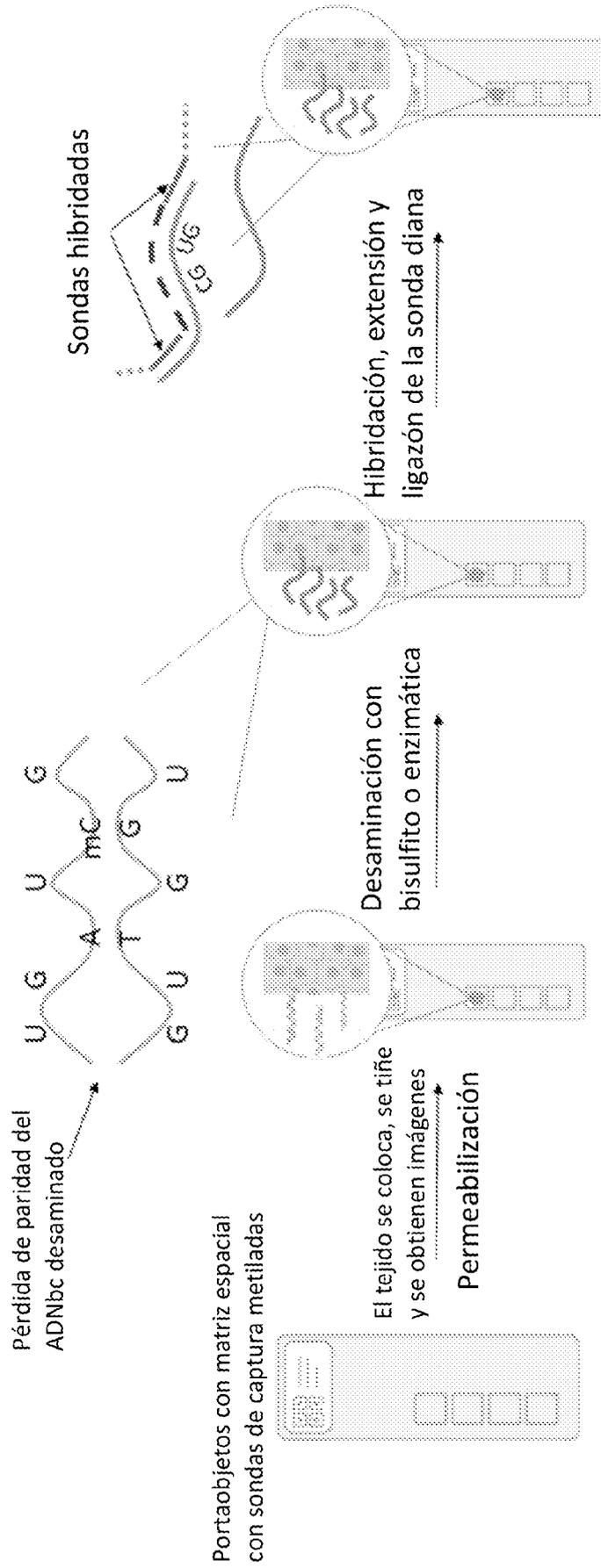


FIGURA 16

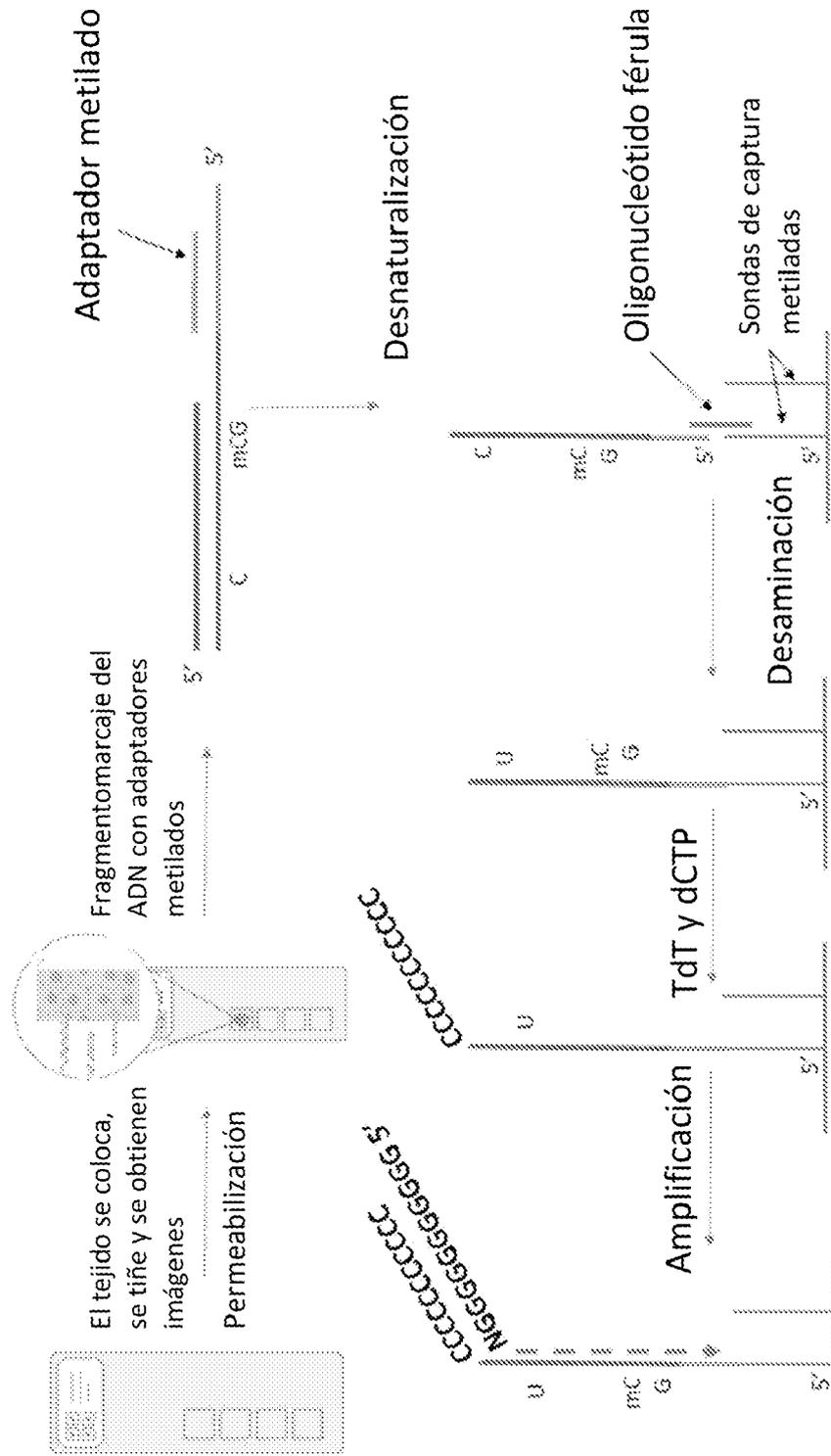


FIGURA 17

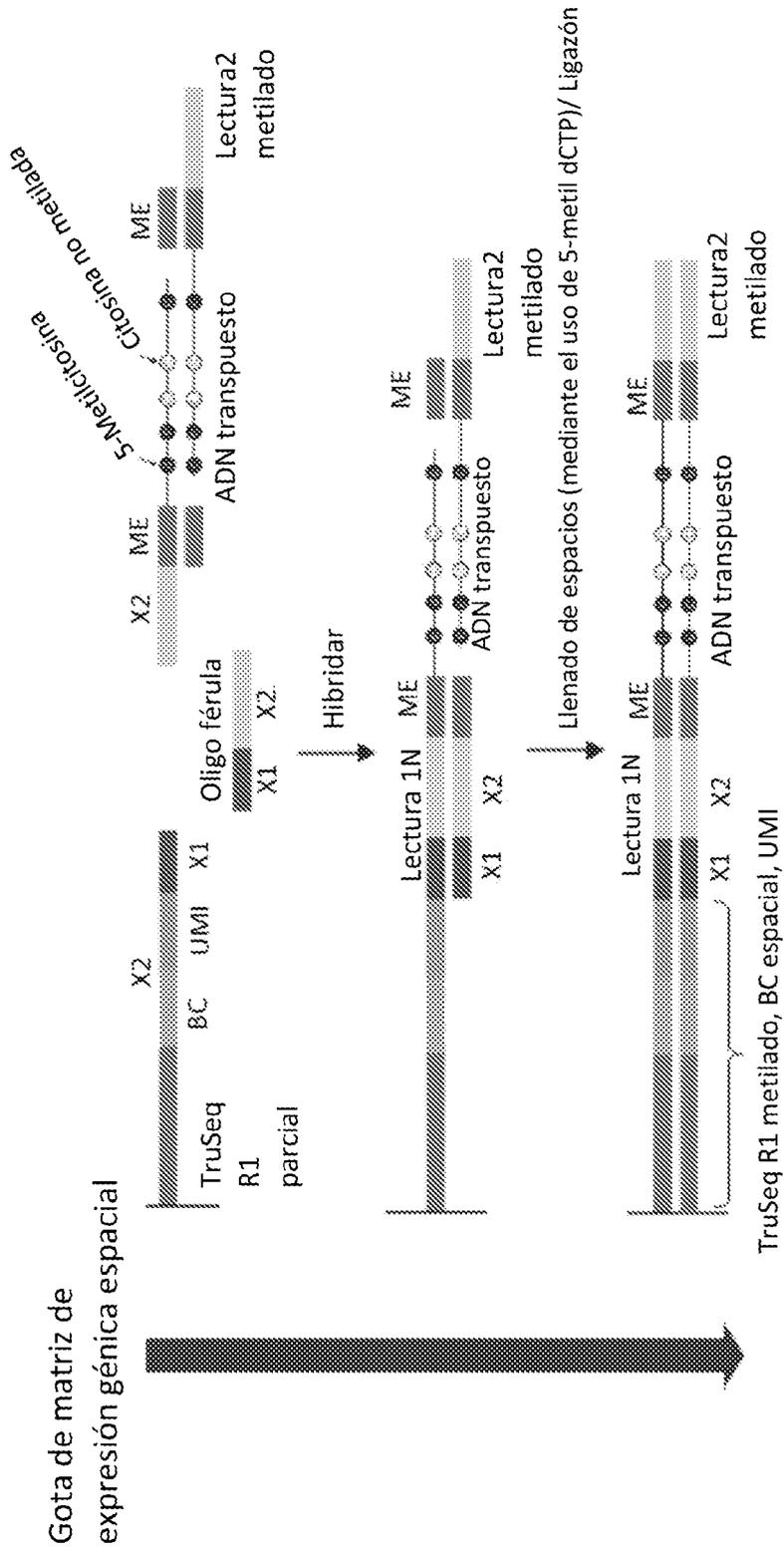
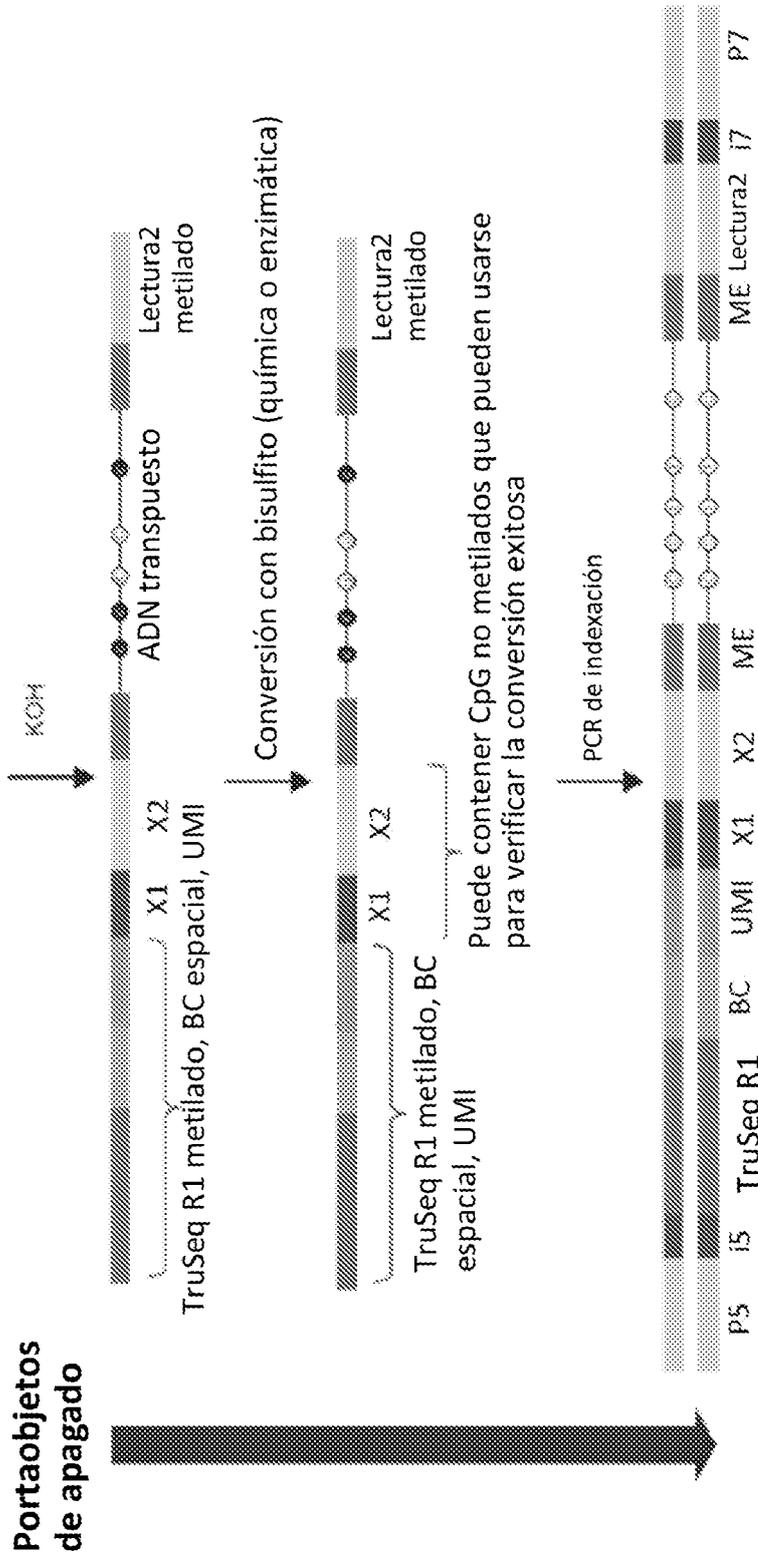


FIGURA 18A



**FIGURA 18B**

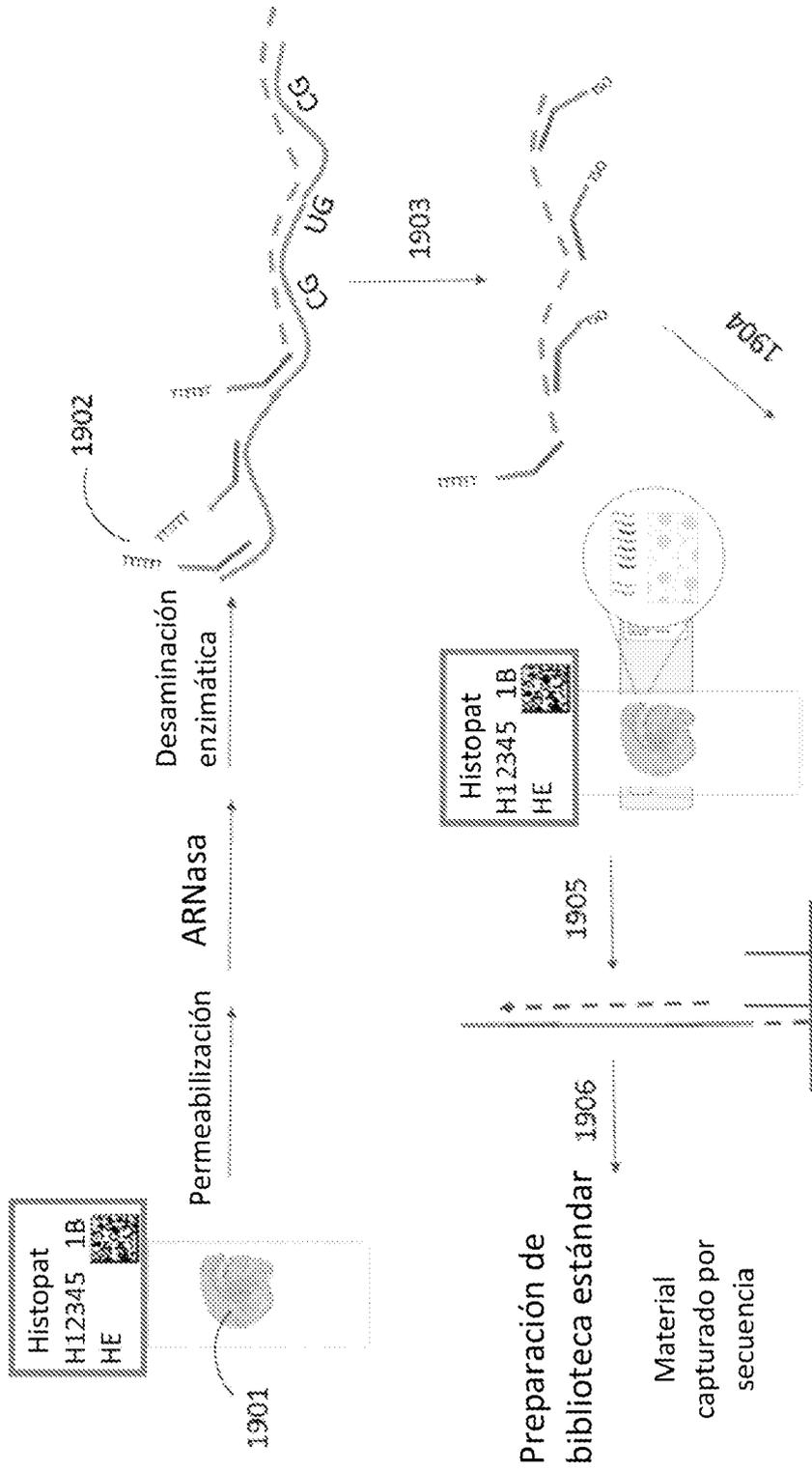
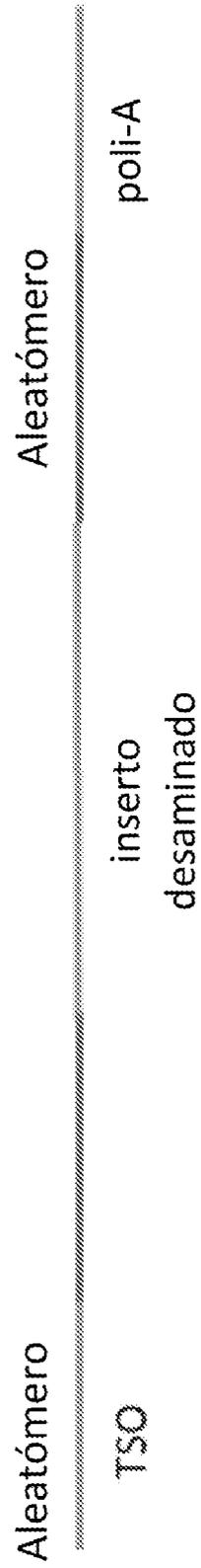


FIGURA 19A



**FIGURA 19B**



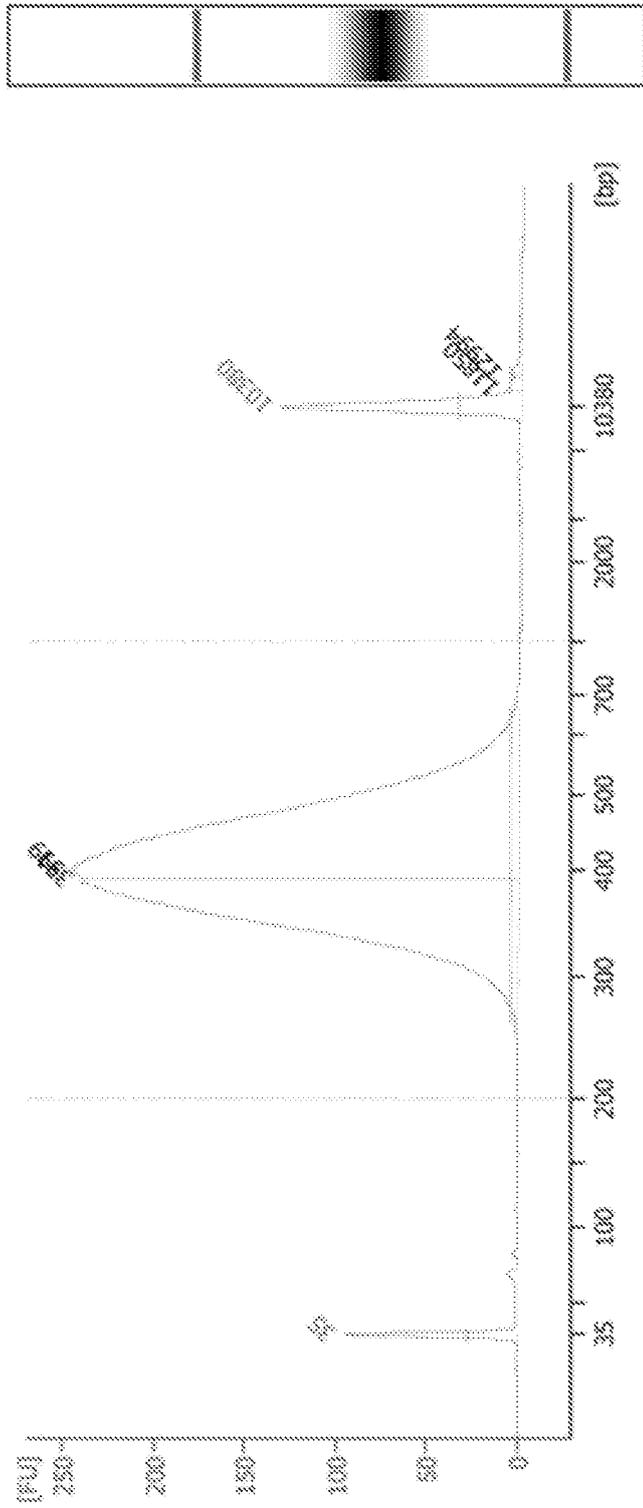
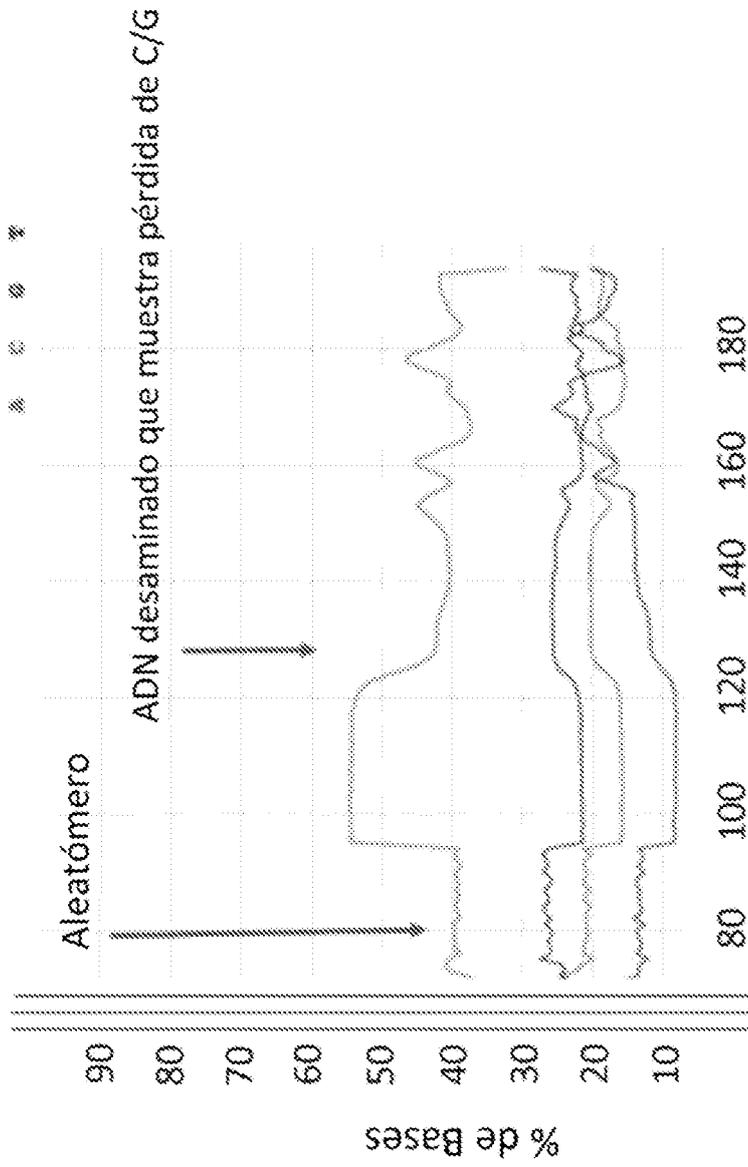


FIGURA 21



Ciclo

FIGURA 22