

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 821**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2020** **PCT/EP2020/086194**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.06.2021** **WO21122579**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2020** **E 20824932 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024** **EP 4078181**

54 Título: **Un procedimiento de detección y/o cuantificación de un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos**

30 Prioridad:

16.12.2019 EP 19216592

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.10.2024

73 Titular/es:

**BLINK AG (100.0%)
Brüsseler Straße 20
07747 Jena, DE**

72 Inventor/es:

**ERMANTRAUT, EUGEN;
STEINMETZER, KATRIN;
HUBOLD, STEPHAN;
ELLINGER, THOMAS y
LEMUTH, OLIVER**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 980 821 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

Un procedimiento de detección y/o cuantificación de un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de detección y/o cuantificación de un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos.

Antecedentes de la invención

En el campo del diagnóstico, se han establecido estrategias de agrupación de muestras y de código de barras de muestras que se utilizan habitualmente en el procesamiento de un gran número de muestras biológicas.

10 Las estrategias de agrupación de muestras en el campo del diagnóstico se basan por lo general en el análisis de un grupo combinado de volúmenes definidos de muestras diferentes. Por lo general, las muestras se obtienen por duplicado, y un duplicado se guarda para su almacenamiento, mientras que el otro duplicado se agrega al grupo combinado. Si el grupo combinado da positivo, las muestras duplicadas almacenadas del mismo grupo se prueban individualmente para identificar finalmente las muestras positivas. El procedimiento de analizar muestras duplicadas individuales de un grupo combinado que proporcionó un resultado positivo a veces también se denomina "re-flexión". En particular, en muestras de las que generalmente se espera un resultado negativo para el respectivo analito probado, estas estrategias de agrupación proporcionan un enfoque de bajo coste. Sin embargo, el grado de agrupación tiene un efecto directo en la sensibilidad de la prueba, y la re-flexión requiere obtener al menos muestras duplicadas de una única fuente y un almacenamiento cuidadoso y controlado de tales muestras duplicadas, así como una logística compleja de la prueba.

20 El código de barras de muestras, también denominado a veces indexación de muestras, es un enfoque frecuentemente utilizado para etiquetar muestras para secuenciación multiplex y análisis multiplex. Todos los ácidos nucleicos de una muestra se etiquetan con la misma etiqueta de secuencia, y la biblioteca resultante se combina con otras bibliotecas y se secuencian en paralelo en un único ciclo. En lo sucesivo, los índices específicos de la muestra permiten al software separar los datos de secuencia multiplexados en conjuntos de datos específicos de la muestra.

El código de barras molecular difiere de la indexación de muestras en que cada molécula de una muestra se etiqueta con una secuencia diferente y única antes de la amplificación por PCR. Dado que cada ácido nucleico del material de partida (es decir, de la muestra) está marcado con una secuencia única, es decir, un "código de barras molecular" ("MBC"), el software de análisis de secuencias puede filtrar las lecturas duplicadas y los errores de PCR para obtener lecturas únicas. El código de barras de muestras y el código de barras molecular tienen en común que los ácidos nucleicos están marcados con etiquetas de secuencias moleculares específicas.

35 Un tipo diferente de técnica de código de barras es el código de barras celular fluorescente (FCB), una técnica de multiplexación celular para citometría de flujo de alto rendimiento. Las muestras con código de barras pueden teñirse y adquirirse colectivamente, lo que minimiza la variabilidad de la tinción y el consumo de anticuerpos, y disminuye los volúmenes de muestra necesarios (Krutzik et al., 2011 "Fluorescent cell barcoding for multiplex flowcytometry", Curr. Protoc. Cytom., Capítulo 6, Unidad 6.31).

40 En particular, en el contexto de las pruebas basadas en cartuchos, existen límites en términos de rendimiento, debido al tamaño y los costes del cartucho, especialmente en el contexto de un enfoque de un cartucho/una muestra. Ejemplos de este tipo de cartuchos son el GenExpert de Cepheid, el Idylla de Biocartis, el m-Pima de Abbott y otros. Por lo general se consigue un mayor rendimiento agregando recursos idénticos al instrumento y haciendo funcionar muchos cartuchos a la vez. También existen cartuchos que permiten procesar múltiples muestras en una única plataforma. Sin embargo, tales cartuchos se diseñan por lo general para realizar procedimientos de análisis separados para cada muestra individual, por ejemplo, para probar una muestra en busca de diferentes analitos, y por lo tanto, tales cartuchos son meramente composiciones de componentes que se asemejan a herramientas de análisis individuales para la muestra respectiva. Tales configuraciones también son útiles cuando es necesario procesar múltiples muestras en paralelo, por ejemplo, cuando se prueban múltiples muestras para el mismo analito, y ayudan a aumentar el rendimiento de los instrumentos respectivos o simplemente a reducir el tiempo de carga de las muestras en el cartucho de análisis. Un ejemplo de este tipo de herramienta es el sistema BDMax. Se ofrece una revisión completa de las herramientas de diagnóstico basadas en cartuchos existentes en Relich et al. 2018; "Syndromic and Point-of-Care Molecular Testing", Advances in Molecular Pathology 1(1):97-113.

55 Sigue existiendo la necesidad en la técnica de lograr un mayor rendimiento y utilización de los instrumentos, produciendo al mismo tiempo menos residuos y siendo menos costoso. También sigue existiendo la necesidad de procesar múltiples muestras dentro de un sistema en un único procedimiento que permita aprovechar al máximo los recursos de hardware y reactivos. Existe además la necesidad en la técnica de proporcionar un procedimiento que permita asignar a la muestra individual que se va a analizar una identidad individual que facilite la realización

de una única reacción de detección sobre una multiplicidad de tales muestras individualmente asignadas e identificables.

Sumario de la invención

5 La presente invención aborda estas necesidades y otras relacionadas. En un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección y/o cuantificación de un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos, dicho procedimiento comprende dos subprocesos, un subproceso específico de la muestra y un subproceso genérico.

10 El "subproceso específico de la muestra", en la presente memoria también denominado a veces "parte del procedimiento específica de la muestra", "parte del procedimiento específica" o "parte específica", es una parte en la que cada una de las muestras se somete por separado a un procedimiento o condiciones en las que se etiqueta específicamente (en la presente memoria también denominado a veces "codificado") de manera que pueda identificarse y distinguirse posteriormente de otras muestras.

15 El "subproceso genérico", o "parte genérica del procedimiento" o "parte genérica", es una parte en la que todas las muestras se someten a las mismas manipulaciones que permiten la detección de un analito. Tal parte genérica no comprende ningún procedimiento, manipulación o manejo específico de la muestra y por lo general se realiza con todas las muestras objeto de investigación, independientemente de la identidad de la muestra.

En una realización, la parte del procedimiento específica de la muestra comprende las siguientes etapas:

- 20 – proporcionar por separado, en cualquier orden, una pluralidad de diferentes muestras de líquidos biológicos sospechosas de contener un analito de interés, y una pluralidad de subconjuntos de micropartículas porosas etiquetadas de forma diferente, en los que, en dicha pluralidad de subconjuntos de micropartículas porosas, cada uno de dichos subconjuntos está separado de los demás subconjuntos;
- 25 – etiquetar específicamente cada una de dichas muestras biológicas diferentes exponiendo por separado cada uno de dichos subconjuntos separados de micropartículas a una muestra de líquidos biológicos cada uno, permitiendo así que cada muestra sea absorbida por un subconjunto específicamente etiquetado de micropartículas porosas en un medio acuoso;
- transferir por separado cada subconjunto de micropartículas porosas de dicho medio acuoso a un medio no acuoso;

En una realización, dicha parte de procedimiento genérico comprende las etapas:

- 30 – mezclar los subconjuntos de micropartículas porosas etiquetadas de forma diferente en dicho medio no acuoso y generar así una suspensión de una pluralidad de subconjuntos de micropartículas porosas etiquetadas de forma diferente;
- realizar una reacción de detección para detectar dicho analito de interés, en dicha suspensión de dicha pluralidad de subconjuntos de micropartículas porosas etiquetadas de forma diferente; y
- 35 – detectar y/o cuantificar dicho analito de interés, si está presente, en cualquiera de dichos subconjuntos de micropartículas en suspensión etiquetadas de forma diferente.

40 La frase "en dicha pluralidad de subconjuntos, cada uno de dichos subconjuntos de micropartículas porosas está separado de los otros subconjuntos", y el término "subconjunto separado", como se utilizan en la presente memoria, se refieren a un escenario en el que dicho subconjunto de micropartículas está físicamente separado de otros subconjuntos. En una realización, dos subconjuntos que están "separados" entre sí se encuentran en ubicaciones diferentes y/o pueden distinguirse macroscópicamente y/o están separados por una barrera física, preferentemente de forma que no pueda producirse mezcla o contaminación cruzada entre las muestras. Por consiguiente, es preferible que cada "subconjunto separado" se proporcione en una forma que permita el manejo separado de tal subconjunto. La separación física de los distintos subconjuntos puede lograrse, por ejemplo, mediante una barrera que rodee tal subconjunto. En una realización sencilla, dicho subconjunto separado puede estar situado en su propio recipiente o compartimento. Por lo general, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, antes de que se realice una reacción de detección y/o cuantificación (de un analito), los subconjuntos están separados entre sí. Durante el uso, por ejemplo durante una reacción de detección, más específicamente durante la parte genérica de tal reacción de detección, algunos o todos los subconjuntos de una biblioteca de micropartículas pueden eventualmente combinarse. Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que, de hecho, 45 no hay derrame o "comunicación cruzada" entre diferentes micropartículas cuando han sido combinadas/mezcladas, siempre que en tal mezcla hayan quedado aisladas unas de otras al haber sido transferidas a una fase no acuosa. Como resultado, tampoco habrá contaminación cruzada entre las muestras (que deben probarse para detectar la presencia de un analito), a pesar de que sus respectivas micropartículas se 50

hayan mezclado. El término "una pluralidad de subconjuntos de micropartículas porosas etiquetadas de forma diferente", como se utiliza en la presente memoria, también se denomina a veces "biblioteca de micropartículas".

El término "muestra de líquidos biológicos", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una muestra líquida obtenida del cuerpo de un organismo que puede o no haber sido procesada posteriormente, por ejemplo, para hacer que el analito o analitos de interés sean accesibles o susceptibles de análisis adicionales. Preferentemente, tal "muestra de líquidos biológicos" se selecciona entre sangre, plasma, suero, orina, sudor, lágrimas, esputo, linfa, semen, ascitis, líquido amniótico, bilis, leche materna, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido pericárdico, líquido cefalorraquídeo, quilo y orina, siendo más preferible que dicha muestra de líquidos biológicos sea plasma. Preferentemente, dicha muestra de líquidos biológicos se procesa adicionalmente, por ejemplo, puede lisarse o digerirse o tratarse de otro modo, antes de someterla al procedimiento según la presente invención. Por ejemplo, si la muestra biológica líquida es plasma, tal plasma puede haber sido lisado y/o digerido para eliminar componentes que podrían interferir con la reacción de detección posterior. Por ejemplo, si el analito de interés es un ácido nucleico particular, la muestra de líquidos biológicos, por ejemplo el plasma, puede digerirse primero con una proteasa y otras enzimas adecuadas para eliminar cualquier proteína o péptido no deseado, así como lípidos u otros componentes no deseados, antes de someterla al procedimiento según la presente invención. Una "muestra de líquidos biológicos", como se utiliza en la presente memoria, también puede referirse a un extracto obtenido a partir de cualquiera de los fluidos corporales antes mencionados; puede ser, por ejemplo, un extracto de ácido nucleico que se ha obtenido a partir de cualquiera de los fluidos corporales antes mencionados mediante una extracción adecuada, por ejemplo, utilizando la disrupción celular (si es necesario), la eliminación de lípidos, proteínas y ácido nucleico no deseado (si es necesario), y la purificación de ácidos nucleicos y/o el enriquecimiento de ácidos nucleicos particulares. En algunas realizaciones, un extracto de ácido nucleico puede haberse producido utilizando etanol u otro alcohol adecuado.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "biblioteca" (de micropartículas) se refiere a una pluralidad o colección de micropartículas, en la que, en dicha pluralidad o colección o biblioteca de micropartículas, hay al menos dos tipos diferentes de tales micropartículas, a las que también se hace referencia en la presente memoria como "subconjuntos". En una realización preferida, hay al menos dos subconjuntos de micropartículas precursoras prefabricadas, preferentemente tres o más subconjuntos de micropartículas precursoras prefabricadas, teniendo cada subconjunto su componente de etiqueta distinto fijado a, contenido dentro de o asociado de otro modo con dichas micropartículas dentro de dicho subconjunto, de tal manera que dichos al menos dos o más subconjuntos de micropartículas difieren por el componente de etiqueta respectivo fijado a, contenido dentro de o asociado de otro modo con cada subconjunto. En dicha biblioteca de subconjuntos diferentes, los subconjuntos respectivos se almacenan típica y preferentemente por separado unos de otros, por ejemplo, en recipientes diferentes. Esto significa que el término "subconjunto separado", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una colección o subconjunto de micropartículas que está físicamente separado de otros subconjuntos.

Descripción detallada de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección y/o cuantificación de un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos, dicho procedimiento comprende una parte de procedimiento específica de la muestra, seguida de una parte de procedimiento genérica; dicha parte de procedimiento específica de la muestra comprende las siguientes etapas:

- proporcionar por separado, en cualquier orden, una pluralidad de diferentes muestras de líquidos biológicos sospechosas de contener un analito de interés, y una pluralidad de subconjuntos de micropartículas porosas etiquetadas de forma diferente, en los que, en dicha pluralidad de subconjuntos, cada uno de dichos subconjuntos está separado de los demás subconjuntos;
- etiquetar específicamente cada una de dichas muestras biológicas diferentes exponiendo por separado cada uno de dichos subconjuntos separados de micropartículas a una muestra de líquidos biológicos cada uno, permitiendo así que cada muestra sea absorbida por un subconjunto específicamente etiquetado de micropartículas porosas en un medio acuoso;
- transferir por separado cada subconjunto de micropartículas porosas de dicho medio acuoso a un medio no acuoso;

dicha parte del procedimiento genérico que comprende las etapas:

- mezclar los subconjuntos de micropartículas porosas etiquetadas de forma diferente en dicho medio no acuoso y generar así una suspensión de una pluralidad de subconjuntos de micropartículas porosas etiquetadas de forma diferente;

- realizar una reacción de detección para detectar dicho analito de interés, en dicha suspensión de dicha pluralidad de subconjuntos de micropartículas porosas etiquetadas de forma diferente; y

detectar y/o cuantificar dicho analito de interés, si está presente, en cualquiera de dichos subconjuntos de micropartículas en suspensión etiquetadas de forma diferente.

5 Preferentemente, en dicha etapa de exponer por separado cada uno de dichos subconjuntos separados de micropartículas a una muestra biológica líquida cada uno, cada uno de dichos subconjuntos separados de micropartículas se expone, en cualquier orden, a una muestra biológica cada uno y a una composición de detección para realizar una reacción de detección química o bioquímica, de tal manera que cada subconjunto de micropartículas toma la muestra biológica respectiva y la composición de detección a la que ha sido expuesto.

10 En un aspecto, la presente invención también se refiere a un procedimiento de detección y/o cuantificación de un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos, en particular según el procedimiento descrito en los párrafos anteriores, en el que el procedimiento específico de la muestra implica

15 a. una etapa en la que se proporcionan por separado, en cualquier orden, una pluralidad de muestras de líquidos biológicos separadas sospechosas de contener un analito de interés, y una pluralidad de micropartículas porosas; cada una de dichas micropartículas porosas tiene una matriz porosa y está configurada para recibir un volumen de líquido en dicha matriz porosa y, preferentemente, para captar analito, si está presente; en la que, en dicha pluralidad de micropartículas porosas, se proporcionan diferentes subconjuntos de micropartículas, cada subconjunto de micropartículas caracterizado porque un componente de etiqueta específico está fijado a, contenido en o asociado de otro modo al subconjunto respectivo; en el que en dicha etapa de proporcionar el número de subconjuntos diferentes de micropartículas proporcionados es al menos tan grande como el número de muestras líquidas biológicas separadas proporcionadas, y en el que además en dicha etapa de proporcionar los diferentes subconjuntos de micropartículas se suministran separados entre sí; en el que, opcionalmente, dichos diferentes subconjuntos separados de micropartículas contienen en su respectiva matriz porosa una composición de detección que comprende reactivos para realizar una reacción de detección química o bioquímica de un analito;

20 b. una etapa de exposición de cada subconjunto separado de micropartículas a exactamente una muestra de líquidos biológicos separada, permitiendo así que cada subconjunto separado de micropartículas se incube con un volumen de exactamente una muestra de líquidos biológicos separada y tome tal muestra o una porción de la misma, y, opcionalmente, acumule analito, si está presente en dicha muestra, en o sobre la matriz de la(s) micropartícula(s); y, además, opcionalmente, en caso de que dichos subconjuntos separados de micropartículas, cuando se proporcionan en la etapa a), aún no comprendan reactivos para realizar una reacción de detección química o bioquímica de un analito, una etapa de exposición de cada subconjunto separado de micropartículas a una composición de detección que comprenda reactivos para realizar una reacción de detección química o bioquímica de un analito, permitiendo así que cada subconjunto separado de micropartículas reciba dichos reactivos;

25 c. transferir cada subconjunto de micropartículas por separado a una fase no acuosa y eliminar una parte o la totalidad de la fase acuosa que rodea a la micropartícula o micropartículas prefabricadas individuales de dicho subconjunto o subconjuntos, creando así una pluralidad de subconjuntos separados de espacios de reacción aislados para detectar dicho analito, cuyos espacios de reacción comprenden una fase acuosa que incluye la muestra y dichos reactivos para realizar una reacción de detección química o bioquímica de un analito, y cuyos espacios de reacción están confinados en dicho volumen o volúmenes vacíos de dichas micropartículas;

En una realización, el procedimiento genérico comprende

30 d. mezclar los diferentes subconjuntos separados de micropartículas en dicha fase no acuosa, de tal manera que todos los dichos diferentes subconjuntos de micropartículas formen una suspensión de diferentes micropartículas en dicha fase no acuosa; someter dichos diferentes subconjuntos mezclados de micropartículas a las condiciones requeridas para realizar una reacción de detección química o bioquímica de un analito; realizar tal reacción de detección de dicho analito de interés; y detectar y/o cuantificar dicho analito de interés, si está presente en cualquiera de dichos subconjuntos diferentes de micropartículas, mediante una señal generada en dicha reacción de detección en un subconjunto respectivo de micropartículas, si dicho analito de interés está presente en cualquier miembro de dicho subconjunto respectivo.

En una realización, dicho procedimiento comprende además la etapa

35 e) determinar qué muestra(s) de dicha pluralidad de muestras proporcionadas en la etapa a) contiene(n) dicho analito de interés determinando la identidad del (los) subconjunto(s) de micropartículas en las que se detecta dicho analito de interés en la etapa d).

En una realización, la identidad del subconjunto o subconjuntos de micropartículas en la etapa e) se determina mediante el componente de etiqueta específico que está fijado a, contenido en o asociado de otro modo al subconjunto respectivo de micropartículas.

5 En una realización, la etapa b) comprende además una subetapa de generación de un primer registro de correlación que indica qué subconjunto separado de micropartículas está o ha estado expuesto a qué muestra, y la etapa d) comprende una subetapa de generación de un segundo registro de correlación que indica en qué subconjunto de micropartículas se ha generado una señal en dicha reacción de detección.

10 En una realización, la etapa e) se realiza por referencia a dichos primer y segundo registros de correlación y vinculando dichos registros, permitiendo así determinar qué muestra(s) de dicha pluralidad de muestras proporcionadas en la etapa a) contiene(n) dicho analito de interés.

En una realización, cada una de dichas micropartículas porosas tiene una matriz porosa que permite acumular analito de interés por

- (i) un polímero o mezcla de polímeros que forma dicha matriz polimérica porosa o es dicha matriz polimérica; o
- 15 (ii) al menos un grupo ionizable, o una pluralidad de grupos ionizables, inmovilizados en dicha matriz polimérica porosa, siendo dicho(s) grupo(s) ionizable(s) capaz(es) de cambiar su(s) carga(s) en función de las condiciones ambientales que rodeen a dicha micropartícula precursora; o
- (iii) al menos un grupo cargado, o una pluralidad de grupos cargados inmovilizados en dicha matriz polimérica porosa; o
- 20 (iv) una combinación de cualquiera de i) a iii);

En una realización, cada una de dichas micropartículas porosas tiene una matriz porosa y comprende un reactivo específico de analito (ASR) que está fijado, preferentemente fijado de forma reversible, a dicha matriz porosa, permitiendo tal reactivo específico de analito un enriquecimiento de un analito de interés y/o permitiendo una señal específica o reacción de amplificación de diana que implique dicho analito; en la que dicho reactivo específico de analito es capaz de unirse específicamente a un analito de interés. En una realización preferida, el reactivo específico del analito permite una reacción de amplificación específica de la diana y, preferentemente, no una reacción de amplificación específica de la señal. En particular, en algunas realizaciones, el reactivo específico del analito no permite y/o no se utiliza en un ensayo de unión, tal como por ejemplo un ensayo de ADNb.

30 Como se utiliza en la presente memoria, el término "reactivo específico del analito" ("ASR") se refiere a un reactivo que es capaz de dirigirse o reconocer específicamente un analito de interés. Tal orientación específica o tal reconocimiento específico se manifiesta en la capacidad de dicho reactivo específico de analito de unirse específicamente a tal analito de interés o de reaccionar específicamente con él. En una realización, un reactivo específico de analito se selecciona entre ácidos nucleicos, incluidos aptámeros, espiegelmeros, oligómeros de ácido nucleico y cebadores de ácido nucleico; anticuerpos o fragmentos de anticuerpos; proteínas no anticuerpo capaces de unirse específicamente a un analito o complejo de analito, y proteínas de afinidad. En una realización preferida, el reactivo específico del analito se selecciona entre ácidos nucleicos, en particular oligómeros de ácido nucleico y cebadores de ácido nucleico. Los cebadores de ácidos nucleicos son especialmente adecuados para realizar una amplificación de ácidos nucleicos. En una realización, cuando el reactivo específico del analito es un cebador de ácido nucleico, tal reactivo específico del analito es, de hecho, un par de cebadores que flanquean la región dentro de un analito de interés que posteriormente se amplificará (y detectará). Opcionalmente, en dicha realización (de un par de cebadores que son un reactivo específico de analito), tal reactivo específico de analito puede comprender además una sonda detectable proporcionada junto con el cebador o cebadores y que permite la detección del cebador o cebadores respectivos y del producto o productos de amplificación resultantes.

45 En otra realización, cada una de dichas micropartículas porosas tiene una matriz porosa pero no comprende un reactivo específico de analito (ASR) como se define en el párrafo anterior. En esta realización, el enriquecimiento o la acumulación del analito en las micropartículas se consigue únicamente mediante la matriz porosa.

El término "reacción de amplificación de la señal o de la diana", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una reacción de detección química o bioquímica, en la que o bien se amplifica la señal utilizada para la detección del analito, o bien la diana (es decir, el analito) que debe detectarse y/o cuantificarse, se amplifica primero y se detecta después. Ejemplos típicos de una reacción de amplificación diana son las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, tales como la PCR. Ejemplos típicos de reacciones de amplificación de señal son las reacciones inmunoquímicas, tales como los inmunoensayos. En realizaciones preferidas de la presente invención, una reacción de detección química o bioquímica de acuerdo con la presente invención es una reacción de amplificación de diana y no una reacción de amplificación de señal. En particular, una reacción de detección química o bioquímica de acuerdo con la presente invención no es un ensayo de ADNb.

En una realización, el reactivo específico del analito se selecciona entre ácidos nucleicos, incluyendo aptámeros, espieglmeros; anticuerpos o fragmentos de anticuerpos; proteínas no-anticuerpo capaces de unirse específicamente a un analito o complejo analito, tales como receptores, fragmentos de receptores y proteínas de afinidad; en el que, preferentemente, dicho reactivo específico del analito se selecciona entre ácidos nucleicos, en particular oligómeros de ácidos nucleicos y cebadores de ácidos nucleicos.

En una realización, cada una de dichas micropartículas porosas tiene el mismo reactivo específico de analito fijado, preferentemente fijado de forma reversible, a su matriz porosa. En una de tales realizaciones, el mismo reactivo específico del analito es el único reactivo específico del analito fijado a las micropartículas.

El término "el mismo reactivo específico del analito", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un escenario en el que hay diversas moléculas de reactivos analito-específicos que tienen la misma especificidad para un único analito en particular. Por ejemplo, si el reactivo específico del analito es un anticuerpo que es específico para un analito en particular, todos los reactivos analito-específicos que son "iguales" con tal reactivo específico del analito, tienen la misma especificidad para tal analito. Por lo general, y en muchos casos, esto significa que tales "mismos" reactivos específicos para el analito son idénticos en cuanto a su estructura y/o secuencia, o difieren en estructura y secuencia sólo hasta tal punto que su especificidad para el mismo analito particular único no se ve afectada por estas variaciones.

En una realización, en dicha pluralidad (o biblioteca) de micropartículas porosas, hay diferentes subconjuntos de micropartículas,

con cada subconjunto

- que tenga su componente de etiqueta distintivo fijado a, contenido en o asociado de otro modo a dichas micropartículas de dicho subconjunto; y

todos esos subconjuntos diferentes que tienen

- el mismo reactivo específico del analito fijado a o contenido en dichas micropartículas de dichos subconjuntos, siendo dicho reactivo específico del analito específico para un analito de interés;

de tal manera que dichos subconjuntos diferentes de micropartículas sean idénticos en cuanto al reactivo específico del analito fijado a o contenido en, pero difieran por

- el componente de etiqueta respectivo fijado a, contenido en o asociado de otro modo a dichas micropartículas de cada subconjunto;

siendo cada subconjunto definido de forma inequívoca e identificable por dicho componente de etiqueta respectivo.

En una realización en la que todos dichos subconjuntos diferentes tienen el mismo reactivo específico de analito fijado a dichas micropartículas de dichos subconjuntos, y en la que dicho reactivo específico de analito es específico para un analito de interés, dicho procedimiento es un procedimiento de detección y/o cuantificación de un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos, en el que el número de subconjuntos diferentes de micropartículas proporcionados, preferentemente proporcionados en la etapa a), es igual al número de muestras de líquidos biológicos separadas proporcionadas.

En otra realización, en dicha pluralidad (o biblioteca) de micropartículas porosas, hay varios reactivos específicos de analito diferentes fijados a o contenidos en dichas micropartículas.

En tal realización (es decir, en la que, en dicha pluralidad de micropartículas porosas, hay varios reactivos específicos de analito diferentes fijados a o contenidos en dichas micropartículas), hay diferentes subconjuntos de micropartículas,

con cada subconjunto

- que tenga su componente de etiqueta distintivo fijado a, contenido en o asociado de otro modo a dichas micropartículas de dicho subconjunto; y

en la que además, en dicha pluralidad de micropartículas porosas, hay diferentes clases de subconjuntos de micropartículas con cada clase de subconjuntos

- que tienen un reactivo específico de analito diferente fijado a la matriz porosa de dichas micropartículas o contenido en dichas micropartículas; en el que, preferentemente, hay al menos dos clases diferentes de subconjuntos de micropartículas, más preferentemente al menos tres o más clases diferentes de subconjuntos de micropartículas;

de tal manera que los distintos subconjuntos de micropartículas se diferencien por el componente de etiqueta respectivo fijado a, contenido en o asociado de otro modo a las micropartículas de cada subconjunto; y cada subconjunto de micropartículas forme parte de una clase de subconjuntos de micropartículas; siendo cada subconjunto inequívocamente definido e identificable por el componente de etiqueta respectivo y el reactivo específico del analito respectivo; y

de tal manera que dichas clases diferentes de subconjuntos de micropartículas se diferencian por el respectivo reactivo específico del analito fijado a la matriz porosa de dichas micropartículas; y cada una de dichas clases diferentes comprende varios subconjuntos de micropartículas, todos los cuales tienen el mismo reactivo específico del analito fijado o contenido.

En tal realización (es decir en la que, en dicha pluralidad de micropartículas porosas, hay varios reactivos específicos de analito diferentes fijados a o contenidos en dichas micropartículas), dicho procedimiento es un procedimiento de detección y/o cuantificación de más de un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos, en el que, el número de subconjuntos diferentes de micropartículas proporcionadas, en el que el número de subconjuntos diferentes de micropartículas proporcionados, preferentemente proporcionados en la etapa a), es igual al número de muestras de líquidos biológicos separadas proporcionadas, multiplicado por el número de analitos de interés que deben detectarse, y en el que hay tantas clases de subconjuntos de micropartículas proporcionados, preferentemente proporcionados en la etapa a), como el número de analitos de interés que deben detectarse.

Cabe señalar que existen numerosos tipos de micropartículas que pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención, siempre que tengan una matriz porosa, estén configuradas para recibir un volumen de líquido en dicha matriz porosa y tengan un componente de etiqueta específico fijado a la micropartícula, contenido en ella o asociado de otro modo a la misma, y cuyo componente de etiqueta permita clasificar dicha micropartícula para que pertenezca a un subconjunto particular de micropartículas. Las micropartículas adecuadas pueden tener o no reactivos específicos de analito (ASR). Ha resultado que las micropartículas, tales como las divulgadas en la solicitud EP paralela titulada "A library of prefabricated microparticles and precursors thereof" (attorney docket B33016EP) por el presente solicitante Blink AG, son particularmente adecuadas también en las realizaciones de la presente invención, en particular en aquellas realizaciones en las que debe detectarse más de un analito.

En una realización, dicha matriz porosa es una matriz polimérica porosa formada por un polímero o mezcla de polímeros, en la que, preferentemente, dicha matriz polimérica porosa está compuesta por un polímero (o polímeros) o mezcla de polímeros que no está reticulado, en la que, más preferentemente, dicho polímero o mezcla de polímeros que forma dicha matriz polimérica porosa, está compuesta por agarosa o una combinación de agarosa y gelatina, en la que, más preferentemente, en dicha combinación de agarosa y gelatina, dicha agarosa está presente en un intervalo desde 0,1 % (p/v) a 4 % (p/v), y dicha gelatina está presente en un intervalo desde 0,1 % (p/v) a 20 % (p/v), preferentemente desde 0,5 % (p/v) a 20 % (p/v). En una realización particular, la concentración de agarosa en dicha matriz polimérica porosa es de 0,5 % (p/v), y la concentración de gelatina está en el intervalo desde 1 % (p/v) a 2 % (p/v). Las realizaciones en las que el polímero o la mezcla de polímeros (o los polímeros) no están reticulados son particularmente buenas y versátiles para cambiar entre diferentes estados, por ejemplo, gel y sol.

En una realización, dicho componente de etiqueta es una mezcla de al menos dos colorantes diferentes, preferentemente al menos dos colorantes fluorescentes, en la que dichos al menos dos colorantes diferentes, preferentemente dichos al menos dos colorantes fluorescentes, están presentes en cada subconjunto de dichas micropartículas precursoras en una proporción definida respectiva y/o en cantidades definidas de dichos al menos dos colorantes diferentes, de tal manera que dichos subconjuntos diferentes de micropartículas precursoras difieran entre sí en cuanto a la proporción y/o cantidades respectivas de dichos al menos dos colorantes diferentes, permitiendo así distinguir entre dichos subconjuntos diferentes de micropartículas precursoras por las proporciones y/o cantidades respectivas de dichos al menos dos colorantes diferentes fijados a o contenidos en el subconjunto respectivo de micropartículas precursoras.

En una realización del procedimiento de detección y/o cuantificación de un analito, dicho analito de interés es un ácido nucleico, dicha reacción de detección es una amplificación de ácido nucleico, y dicha composición de detección es una composición para realizar una amplificación de ácido nucleico que comprende un tampón, mononucleósido-trifosfatos, una enzima de amplificación, tal como una polimerasa de ácido nucleico adecuada, por ejemplo, Taq polimerasa, y un colorante de ácido nucleico para la detección de un producto de amplificación, tal como un ácido nucleico amplificado, y, opcionalmente, uno o más pares de cebadores de amplificación y, además opcionalmente, sondas moleculares respectivas (por ejemplo, sondas TaqMan, balizas moleculares, etc.), si tales cebadores y/o sondas no se proporcionan ya como reactivo(s) específico(s) de analito (ASR) fijado(s) a dichas micropartículas o contenido(s) en las mismas.

En otra realización del procedimiento según la presente invención, dicho analito de interés es una proteína u otra molécula de ácido no nucleico, dicha reacción de detección es una reacción de detección inmunoquímica, y dicha composición de detección es una composición para realizar tal reacción de detección inmunoquímica y se proporciona en dicho procedimiento como dos componentes separados: en el que un primer componente de dicha

composición de detección comprende los reactivos necesarios para realizar una reacción de detección inmunoquímica, tales como un tampón, y un anticuerpo secundario o fragmento de anticuerpo secundario acoplado a una enzima indicadora adecuada y que sea específico para el mismo analito que un anticuerpo primario, fragmento de anticuerpo o proteína no anticuerpo, utilizado como reactivo específico del analito (ASR) en dicha reacción de detección inmunoquímica; y, opcionalmente, un anticuerpo primario, fragmento de anticuerpo, o una proteína no anticuerpo capaz de unirse específicamente a dicho analito proteico u otro analito de ácido no nucleico, si dicho anticuerpo primario, fragmento de anticuerpo, o proteína no anticuerpo no se proporciona ya como reactivo(s) específico(s) de analito (ASR) estando fijado a o contenido en dichas micropartículas; y en el que un segundo componente de dicha composición de detección comprende, como reactivo de detección, un sustrato adecuado para dicha enzima indicadora adecuada cuyo sustrato, tras haber reaccionado con dicha enzima indicadora, se hace detectable, preferentemente detectable ópticamente, más preferentemente detectable por fluorescencia.

En dicha realización, es decir, en la que la composición de detección se proporciona como dos componentes separados, a saber, como un primer componente y un segundo componente, se prefiere que los subconjuntos de micropartículas se expongan a dicho segundo componente después de haber sido expuestos al primer componente, de tal manera que las dos exposiciones se produzcan una después de la otra. Además, las dos exposiciones pueden separarse entre sí mediante una etapa de lavado adecuada, por ejemplo, una etapa en la que los subconjuntos de micropartículas se lavan con un tampón de lavado adecuado.

En otra realización del procedimiento según la presente invención, dicho analito de interés es una enzima u otro analito de química clínica, dicha reacción de detección es una reacción de detección química o bioquímica (por ejemplo, enzimática) y dicha composición de detección es una composición para realizar tal reacción de detección química o bioquímica: en la que la muestra se pone en contacto con los reactivos de detección y ambos se ponen en contacto con una micropartícula según la invención, y en la que dicha composición de detección comprende, como reactivo de detección, un sustrato adecuado para tal creación química o enzimática, cuyo sustrato al reaccionar con el analito respectivo se vuelve detectable, preferentemente detectable ópticamente, más preferentemente detectable por fluorescencia.

En una realización, en dicha etapa de detección y cuantificación dicho analito de interés, la cuantificación de dicho analito se realiza mediante un procedimiento seleccionado de:

a) amplificación digital de ácidos nucleicos, en particular reacción en cadena de la polimerasa (PCR) digital;

b) amplificación cuantitativa de ácidos nucleicos en tiempo real, en particular reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real;

c) procedimientos de detección inmunoquímica, en particular procedimientos de detección inmunoquímica digital, tales como inmunoensayos digitales, por ejemplo ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas digitales (ELISA);

d) procedimientos de detección inmunoquímica, en particular procedimientos de detección inmunoquímica digital, combinados con la amplificación de ácidos nucleicos, tales como la inmunorreacción en cadena de la polimerasa; en particular la inmunorreacción en cadena digital; y

e) una combinación de cualquiera de las letras a) a d);

en la que la cuantificación se realiza utilizando cualquiera de los procedimientos a) o b), o una combinación de a) y b), si el analito de interés es un ácido nucleico; y en la que la cuantificación se realiza utilizando cualquiera de los procedimientos c) o d), si el analito es una proteína, péptido u otro analito no ácido nucleico.

Como ya se ha indicado anteriormente, una "muestra de líquidos biológicos", como se utiliza en la presente memoria, puede ser una muestra líquida obtenida del cuerpo de un organismo que puede o no haber sido procesada posteriormente, por ejemplo, para hacer que el analito o analitos de interés sean accesibles o susceptibles de análisis adicionales. Preferentemente, tal "muestra de líquidos biológicos" se selecciona entre sangre, plasma, suero, orina, sudor, lágrimas, esputo, linfa, semen, ascitis, líquido amniótico, bilis, leche materna, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido pericárdico, líquido cefalorraquídeo, quilo y orina, siendo más preferible que dicha muestra de líquidos biológicos sea plasma. Preferentemente, dicha muestra de líquidos biológicos se procesa adicionalmente, por ejemplo, puede lisarse o digerirse o tratarse de otro modo, antes de someterla al procedimiento según la presente invención. Por ejemplo, si la muestra biológica líquida es plasma, tal plasma puede haber sido lisado y/o digerido para eliminar componentes que podrían interferir con la reacción de detección posterior. Por ejemplo, si el analito de interés es un ácido nucleico particular, la muestra de líquidos biológicos, por ejemplo el plasma, puede digerirse primero con una proteasa y otras enzimas adecuadas para eliminar cualquier proteína o péptido no deseado, así como lípidos u otros componentes no deseados, antes de someterla al procedimiento según la presente invención. Una "muestra de líquidos biológicos", como se utiliza en la presente memoria, también puede referirse a un extracto obtenido a partir de cualquiera de los fluidos corporales antes

mencionados; puede ser, por ejemplo, un extracto de ácido nucleico que se ha obtenido a partir de cualquiera de los fluidos corporales antes mencionados mediante una extracción adecuada, por ejemplo, utilizando la disrupción celular (si es necesario), la eliminación de lípidos, proteínas y ácido nucleico no deseado (si es necesario), y la purificación de ácidos nucleicos y/o el enriquecimiento de ácidos nucleicos particulares. En algunas realizaciones, un extracto de ácido nucleico puede haberse producido utilizando etanol u otro alcohol adecuado.

La disrupción o desintegración celular puede lograrse mediante procedimientos físicos y/o químicos, cuyo objetivo principal es disgregar la pared celular y/o las membranas celulares. Los procedimientos de disrupción se basan principalmente en las propiedades de la muestra y, para ello, se utiliza una amplia gama de herramientas y enfoques, solos o combinados, para lograr la disrupción de tejidos/células. Las enzimas líticas, los agentes caotrópicos y los distintos tipos de detergentes son los principales componentes de la lisis química, mientras que el procedimiento mecánico desorganiza las células mediante trituración, cizallamiento, batido y choque. Hay que tener en cuenta que si una técnica no da buenos resultados, otra puede tener éxito. Los procedimientos de choque osmótico han dado, en ciertos casos, mejores resultados que los protocolos habituales de purificación de ácidos nucleicos, tales como la extracción con fenol-cloroformo y el batido de microesferas. Otro enfoque para la disrupción celular es el uso combinado de diferentes procedimientos. Un buen ejemplo es el caso de la lisis enzimática, en la que muchos protocolos utilizan proteasas para liberar la NA de su andamiaje proteico protector. También es crucial la inactivación de las nucleasas celulares que pasan libres a la solución para proteger la nueva NA libre de proteínas [13]. Se puede utilizar una combinación de detergentes y sales caotrópicas en una única solución para solubilizar la pared celular y/o la membrana celular e inactivar las nucleasas intracelulares. En cambio, la disrupción mecánica utiliza la fuerza para extraer los componentes de la célula. Un ejemplo clásico de molienda es el uso del mortero, que hoy en día se optimiza con el uso de nitrógeno líquido (cuando la muestra lo permite). Las paredes celulares también pueden verse alteradas por las ondas de choque creadas por los rápidos cambios de presión provocados por la sonicación o la cavitación. Otras herramientas mecánicas disponibles para la disrupción celular son el cizallamiento, que utiliza una fuerza tangencial para hacer un agujero en la célula, y el batido de microesferas, que utiliza diferentes microesferas de vidrio o acero para romper las resistentes paredes celulares.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un kit para detectar y/o cuantificar un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos, en particular para realizar el procedimiento según la presente invención, dicho kit comprende:

- una pluralidad de recipientes que comprenden una pluralidad de micropartículas, cada recipiente que comprende un subconjunto de dicha pluralidad de micropartículas porosas, teniendo cada una de dichas micropartículas porosas dentro de cada subconjunto una matriz porosa y estando configurada para recibir un volumen de líquido en dicha matriz porosa; cada subconjunto de micropartículas caracterizado porque un componente de etiqueta específico está fijado a, contenido en o asociado de otro modo al subconjunto respectivo, en el que, preferentemente, dichas micropartículas son como se definen más arriba; opcionalmente, un recipiente que comprende un reactivo de lavado acuoso para lavar dichas micropartículas;
- un recipiente que contiene una composición de detección para detectar un analito de interés; dicha composición de detección contiene reactivos para realizar una reacción de detección química o bioquímica de un analito; en la que dicha composición de detección es una composición para realizar una amplificación de ácido nucleico, o es una composición para realizar una reacción de detección inmunológica;
- un recipiente que comprenda una fase no acuosa para transferir dichos subconjuntos diferentes de micropartículas a una fase no acuosa, una vez que cada subconjunto haya sido expuesto a una muestra de líquidos biológicos, y para generar suspensiones diferentes separadas de subconjuntos de micropartículas en una fase no acuosa;
- un recipiente mezclador para mezclar las diferentes suspensiones separadas de subconjuntos de micropartículas en dicha fase no acuosa, de tal manera que todas dichas suspensiones diferentes de subconjuntos de micropartículas formen una única suspensión de micropartículas diferentes en dicha fase no acuosa que se somete entonces a una reacción de detección;
- un recipiente para realizar una reacción de detección.

En una realización, cada una de dichas micropartículas porosas tiene un reactivo específico de analito (ASR) fijado, preferentemente fijado de manera reversible, a su matriz porosa o contiene un reactivo específico de analito (ASR), tal reactivo específico de analito permitiendo un enriquecimiento de un analito de interés y/o permitiendo una señal específica o reacción de amplificación de diana que implica dicho analito; en el que dicho reactivo específico de analito es capaz de unirse específicamente a un analito de interés. En las realizaciones preferidas de la presente invención, un reactivo específico de analito permite una reacción de amplificación de diana específica que implica dicho analito, y no una reacción de amplificación de señal. En particular, en algunas realizaciones, el reactivo específico del analito no permite y/o no se utiliza en un ensayo de unión, tal como por ejemplo un ensayo de ADN.

En una realización, dicho reactivo específico del analito se selecciona entre ácidos nucleicos, incluyendo aptámeros, espiegelmeros; anticuerpos o fragmentos de anticuerpos; proteínas no-anticuerpo capaces de unirse específicamente a un analito o complejo de analito, tales como receptores, fragmentos de receptores y proteínas de afinidad; en la que, preferentemente, dicho reactivo específico del analito se selecciona entre ácidos nucleicos, en particular oligómeros de ácidos nucleicos y cebadores de ácidos nucleicos.

En una realización, dicho analito de interés es un ácido nucleico, dicha reacción de detección es una amplificación de ácido nucleico, y dicha composición de detección es una composición para realizar una amplificación de ácido nucleico que comprende un tampón, mononucleósido-trifosfatos, una enzima de amplificación, tal como una polimerasa de ácido nucleico adecuada, por ejemplo, Taq polimerasa, y un colorante de ácido nucleico para la detección de un producto de amplificación, tal como un ácido nucleico amplificado, y opcionalmente, un par de cebadores, si tal par de cebadores no se proporciona ya como reactivo(s) específico(s) de analito (ASR) fijado(s) a o contenido(s) en dichas micropartículas.

En una realización, dicho analito de interés es una proteína u otra molécula de ácido no nucleico, dicha reacción de detección es una reacción de detección inmunoquímica, y dicha composición de detección es una composición para realizar tal reacción de detección inmunoquímica y se proporciona en dicho kit en dos compartimentos o recipientes separados; en la que dicha composición de detección comprende, en un primer compartimento o recipiente, los reactivos necesarios para realizar una reacción de detección inmunoquímica, tales como un tampón, y un anticuerpo secundario o fragmento de anticuerpo secundario acoplado a una enzima indicadora adecuada y que sea específico para el mismo analito que un anticuerpo primario, fragmento de anticuerpo o proteína no anticuerpo, utilizado como reactivo específico del analito (ASR) en dicha reacción inmunoquímica; y, opcionalmente, un anticuerpo primario, fragmento de anticuerpo, o una proteína no anticuerpo capaz de unirse específicamente a dicho analito proteico u otro analito de ácido no nucleico, si dicho anticuerpo primario, fragmento de anticuerpo, o proteína no anticuerpo no se proporciona ya como reactivo(s) específico(s) de analito (ASR) estando fijado a o contenido en dichas micropartículas; y en la que dicha composición de detección comprende, en un segundo compartimento o recipiente, como reactivo de detección, un sustrato adecuado para dicha enzima indicadora adecuada, sustrato que, al reaccionar con dicha enzima indicadora, se vuelve detectable, preferentemente detectable ópticamente, y más preferentemente detectable por fluorescencia.

En una realización, cada una de dichas micropartículas porosas tiene el mismo reactivo específico del analito fijado a su matriz porosa o contiene el mismo reactivo específico del analito.

En una realización, en dicha pluralidad de micropartículas porosas, hay diferentes subconjuntos de micropartículas, con cada subconjunto

- que tenga su componente de etiqueta distintivo fijado a, contenido en o asociado de otro modo a dichas micropartículas de dicho subconjunto; y

todos esos subconjuntos diferentes que tienen

- el mismo reactivo específico del analito fijado a o contenido en dichas micropartículas de dichos subconjuntos, siendo dicho reactivo específico del analito específico para un analito de interés;

de tal manera que dichos subconjuntos diferentes de micropartículas sean idénticos en cuanto al reactivo específico del analito fijado o contenido, pero difieran por

- el componente de etiqueta respectivo fijado a, contenido en o asociado de otro modo a dichas micropartículas de cada subconjunto;

estando cada subconjunto inequívocamente definido e identificable por dicho componente de etiqueta respectivo y proporcionándose en un envase separado.

En una realización, dicho kit es un kit para detectar y/o cuantificar un analito de interés (es decir, no más de uno) en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos, en el que el número de subconjuntos diferentes de micropartículas proporcionados en dicho kit es igual (preferentemente al menos igual) al número de muestras de líquidos biológicos separadas proporcionadas (o en algunas realizaciones el número de subconjuntos diferentes de micropartículas proporcionados en dicho kit es mayor que, y en cualquier caso no es menor que, el número de muestras de líquidos biológicos separadas proporcionadas).

En otra realización, en dicha pluralidad de micropartículas porosas, hay varios reactivos analito-específicos diferentes fijados a, contenidos en dichas micropartículas.

En dicha realización, existen diferentes subconjuntos de micropartículas, con cada subconjunto

- que tenga su componente de etiqueta distintivo fijado a, contenido en o asociado de otro modo a dichas micropartículas de dicho subconjunto; y

en la que además, en dicha pluralidad de micropartículas porosas, hay diferentes clases de subconjuntos de micropartículas con cada clase de subconjuntos

- 5 — que tienen un reactivo específico de analito diferente fijado a la matriz porosa de dichas micropartículas o contenido en dichas micropartículas; en el que, preferentemente, hay al menos dos clases diferentes de subconjuntos de micropartículas, más preferentemente al menos tres o más clases diferentes de subconjuntos de micropartículas;

10 de manera que los distintos subconjuntos de micropartículas se diferencien por el componente de etiqueta respectivo fijado a, contenido en o asociado de otro modo a dichas micropartículas de cada subconjunto; y cada subconjunto de micropartículas forme parte de una clase de subconjuntos de micropartículas; y cada subconjunto se defina e identifique inequívocamente por el componente de etiqueta respectivo y el reactivo específico del analito respectivo, y se proporcione en un recipiente separado; y

15 de tal manera que dichas clases diferentes de subconjuntos de micropartículas se diferencian por el respectivo reactivo específico del analito fijado a la matriz porosa de dichas micropartículas o contenido en dichas micropartículas; y cada una de dichas clases diferentes comprende varios subconjuntos de micropartículas, todos los cuales tienen el mismo reactivo específico del analito fijado o contenido.

20 En dicha realización, dicho kit es un kit para detectar más de un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos, en el que el número de subconjuntos diferentes de micropartículas proporcionados en dicho kit es igual (preferentemente al menos igual) al número de muestras de líquidos biológicos separadas proporcionadas, multiplicado por el número de analitos de interés que se va a detectar, y en el que, en dicho kit, hay tantas clases (preferentemente al menos tantas) de subconjuntos de micropartículas proporcionadas como el número de analitos de interés que deben detectarse; (o en algunas realizaciones el número de subconjuntos diferentes de micropartículas proporcionados en dicho kit puede, de hecho, ser incluso mayor que, y en cualquier caso no es menor que, el número de muestras de líquidos biológicos separadas proporcionadas, multiplicado por el número de analitos de interés que se va a detectar; y en el que, en dicha realización del kit, hay al menos tantas clases de subconjuntos de micropartículas proporcionadas como el número de analitos de interés que se va a detectar, y en cualquier caso el número de clases de subconjuntos de micropartículas proporcionadas en tal realización no es menor que el número de analitos de interés a detectar).

30 En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a un cartucho para realizar un procedimiento de detección y/o cuantificación de un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos, siendo dicho procedimiento como se define más arriba.

35 En una realización, el cartucho comprende una pluralidad de módulos específicos de muestra, una pluralidad de cámaras de almacenamiento, al menos una cámara de fase no acuosa para almacenar una fase no acuosa, y una única cámara combinada de mezcla y detección, o una combinación de una cámara de mezcla separada y una cámara de detección separada; en el que cada módulo específico de muestra comprende un compartimento de muestra que tiene su propia entrada de muestra separada, estando configurado cada módulo específico de muestra para recibir por separado exactamente una sola muestra biológica, en el compartimento de muestra respectivo; estando configurado además cada módulo específico de muestra para recibir micropartículas en dicho compartimento de muestra, siendo dichas micropartículas como se define más arriba; estando configurado además cada módulo específico de muestra para facilitar una transferencia de fase de dichas micropartículas de un medio acuoso a un medio no acuoso.

45 El término "módulo específico de muestra" se refiere a una sección dentro del cartucho que está específicamente designada para ser utilizada en conjunción con una muestra particular (específica). Como tal, por lo general comprende un compartimento de muestra y está configurado para recibir por separado exactamente una sola muestra biológica, en el respectivo compartimento de muestra. Un "módulo específico de muestra" tiene su propia entrada específica de muestra, lo que permite la adición de la muestra respectiva al módulo específico de muestra, puede comprender además otros compartimentos y/o canales de conexión. En una realización, dicha pluralidad de módulos específicos de muestra comprende una pluralidad de micropartículas porosas en los respectivos compartimentos de muestra; cada una de dichas micropartículas porosas tiene una matriz porosa y está configurada para recibir un volumen de líquido en dicha matriz porosa; en la que cada módulo específico de muestra en su compartimento de muestra comprende un subconjunto diferente de dicha pluralidad de micropartículas, caracterizándose cada subconjunto de micropartículas por un componente de etiqueta específico que está fijado a, contenido en o asociado de otro modo con el subconjunto respectivo; y/o en la que dicha al menos una cámara de fase no acuosa comprende una fase no acuosa, tal como un aceite.

En una realización, cada uno de dichos módulos específicos de muestra comprende además un medio para la separación mecánica de micropartículas de una fase líquida, preferentemente una fase acuosa líquida, tal como

un filtro; dicho medio está configurado para facilitar una transferencia de fase de dichas micropartículas de un entorno acuoso a un entorno no acuoso.

En una realización, en dicha pluralidad de cámaras de almacenamiento hay diferentes grupos de cámaras de almacenamiento, con un primer grupo de cámaras de almacenamiento que contienen reactivos para realizar una reacción de detección química o bioquímica de un analito y, por separado, con uno o varios grupos más de cámaras de almacenamiento que comprenden por separado uno o varios de: un tampón de lisis, un tampón para facilitar la unión de un analito a un reactivo específico del analito, y un tampón de lavado para lavar las micropartículas.

En una realización, el cartucho comprende un mecanismo de válvula, dicho mecanismo de válvula está configurado para fijarse a una bomba, dicho mecanismo de válvula permite poner en conexión de fluido, en serie o concomitantemente, cualquiera de las cámaras a) a c), con d); donde a) es una o varias de las cámaras de almacenamiento; b) es la única cámara combinada de mezcla y detección, o la combinación de una cámara de mezcla separada y una cámara de detección separada; c) es dicha al menos una cámara de fase no acuosa; y d) es cualquiera de los módulos específicos de la muestra.

Los presentes inventores han proporcionado un procedimiento de detección y/o cuantificación de un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos. Sin querer ceñirse a ninguna teoría, los presentes inventores creen que el nuevo procedimiento según la presente invención se basa en un nuevo ensayo en principio que comprende dos partes fundamentalmente diferentes, a saber, una parte específica de la muestra y una parte genérica (en la presente memoria también denominadas a veces "parte específica del procedimiento" o "parte específica", y "parte genérica del procedimiento", respectivamente).

En la parte específica de la muestra del procedimiento, las muestras individuales se codifican y el analito, si está presente en las muestras individuales, se enriquece, mientras que al mismo tiempo los materiales no deseados se eliminan de la muestra. En lo sucesivo, la muestra así codificada, que se ha hecho identificable por su código/etiqueta individual, se aísla como una especie de gotita acuosa definida por la micropartícula en un medio no acuoso. Tal gotita actúa como el espacio de reacción en el que se realiza la detección del analito, si está presente.

En términos generales, el objetivo antes mencionado se logra interrogando (y efectivamente "etiquetando" o "codificando") cada muestra individualmente con un tipo o subconjunto de micropartícula específica e individualmente etiquetada, respectivamente, una "micropartícula" en la presente memoria también se denomina a veces "microesfera", cuyo tipo o subconjunto de micropartícula específica e individualmente etiquetada lleva una etiqueta específica definida que está fijada a, contenida en o asociada de otro modo con la micropartícula respectiva. De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, puede haber una pluralidad de tipos diferentes de micropartículas (o "microesferas") (tales "tipos de micropartículas" en la presente memoria también se denominan a veces "subconjuntos de micropartículas"), que se caracterizan por la etiqueta específica fijada a las mismas, contenida en ellas o asociada de otro modo a las mismas. De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, las micropartículas son capaces de recibir un volumen de muestra líquida y, por tanto, captar el analito, si está presente en la muestra, y opcionalmente también unirlo y concentrarlo. La unión de un analito a micropartículas puede facilitarse mediante la exposición de micropartículas a una muestra sospechosa de contener un analito de interés en presencia de un tampón de unión. Tal tampón de unión sirve para establecer las condiciones que promueven la unión del analito a la matriz de las respectivas micropartículas y/o a cualquier reactivo específico del analito (ASR) fijado a las micropartículas o contenido en ellas.

Además, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, las micropartículas individuales tienen un volumen interno que les permite tomar la muestra y los reactivos necesarios para detectar un analito de interés, si está presente. Una vez que el analito de la muestra ha sido captado (o "absorbido") y, posiblemente, unido o enriquecido (o "adsorbido") por la micropartícula, opcionalmente en presencia de un tampón de unión adecuado, y una vez que se han realizado las respectivas etapas de lavado, si es necesario, la micropartícula se expone posteriormente a una composición de detección adecuada que también será captada por la micropartícula. El término "composición de detección", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una composición que comprende reactivos para realizar una reacción de detección química o bioquímica de un analito. En realizaciones preferidas, la "reacción de detección química o bioquímica" es una amplificación de ácido nucleico o una reacción de detección inmunoquímica. Las "composiciones de detección" adecuadas para realizar tales reacciones se describen más arriba. Una vez que dicha composición de detección ha sido absorbida por la micropartícula, se obtiene una micropartícula que contiene una muestra biológica líquida (o una porción de dicha muestra) y una composición de detección adecuada. Posteriormente, se eliminará cualquier resto de líquido no contenido en el interior de la micropartícula, sino situado fuera de ella, por ejemplo mediante filtración, centrifugación, agitación u otra agitación mecánica, y combinaciones de las mismas, y a continuación se aislarán las respectivas micropartículas introduciéndolas en un líquido no acuoso que aisle las respectivas micropartículas e impida que interactúen entre sí. Este procedimiento se repite en múltiples muestras, y cada muestra es interrogada por un subconjunto específico diferente de micropartículas, específicamente etiquetadas por un componente de etiqueta específico. El resultado de este procedimiento son preparaciones separadas de micropartículas de subconjuntos, es decir, preparaciones separadas de subconjuntos con micropartículas individuales dentro de cada subconjunto

separadas entre sí, y con preparaciones individuales de micropartículas de subconjuntos que tienen asignado su respectivo componente de etiqueta individual, lo que permite asignar inequívocamente dicha preparación de micropartículas de subconjuntos a una muestra específica.

En esta fase, es decir, una vez aisladas las micropartículas, pueden mezclarse y agruparse diferentes tipos de preparaciones de micropartículas, es decir, diferentes subconjuntos, correspondientes a diferentes muestras. También en esta fase, dado que las micropartículas individuales se han aislado y ya no pueden interactuar entre sí, porque son gotitas acuosas individuales englobadas por una fase no acuosa, los diferentes tipos de preparaciones de micropartículas correspondientes a las diferentes muestras a las que han sido expuestas, pueden combinarse en un conjunto, y dicho conjunto puede someterse posteriormente a las condiciones necesarias para realizar una reacción de detección dentro de las micropartículas. Dicha reacción de detección puede ser, por ejemplo, una amplificación de ácido nucleico, o puede ser una reacción inmunoquímica. Dicha reacción de detección representa la parte genérica del procedimiento antes mencionada. Es "genérico", porque se realiza sobre cualquiera de las micropartículas, es decir, cualquier tipo de micropartículas, siempre que dicha micropartícula haya sido interrogada por una muestra sospechosa de un analito. En otras palabras, tal parte genérica se realiza en todas las micropartículas, preferentemente de forma simultánea como un único procedimiento, independientemente del tipo de muestra al que se hayan expuesto dichas micropartículas.

La señal generada dentro de cada micropartícula, como resultado de la reacción de detección, se detecta y se asigna al componente de etiqueta específico respectivo que está fijado a, contenido en o asociado de otro modo a la micropartícula respectiva. Dado que también se sabe qué componente de la etiqueta corresponde a qué muestra, la señal respectiva que se ha generado puede, efectivamente, correlacionarse con la muestra respectiva, como resultado de lo cual puede determinarse si el analito de interés está o estaba presente en la muestra que se va a analizar.

Efectivamente, las micropartículas representan espacios de reacción individuales o "reactores" en los que se han confinado cantidades diminutas de una muestra respectiva y que pueden analizarse individualmente. Por lo tanto, es efectivamente posible realizar realizaciones del procedimiento de acuerdo con la presente invención de tal manera que las moléculas individuales de analito puedan distribuirse en micropartículas individuales, proporcionando así una dilución limitada y permitiendo así que el procedimiento se realice en un formato digital; véase también Sykes et al., 1992, *Biotechniques* 13(3): pp. 444-449. Este formato permite una sensibilidad exquisita y una buena cuantificación del analito en la muestra respectiva.

Los reactivos típicos que se utilizan en las realizaciones de la presente invención son los siguientes: En primer lugar, están las micropartículas propiamente dichas, en la presente memoria también denominadas a veces "microesferas". Estos son altamente porosos y tienen una matriz porosa y están configurados para recibir un volumen de líquido en la matriz porosa. Por lo general, están compuestas por un polímero o una mezcla de polímeros que proporcionan estabilidad mecánica e integridad química a la micropartícula cuando la muestra líquida se toma y se aloja en la matriz porosa. Preferentemente, el polímero o polímeros de la matriz pueden presentar características de gel-sol que proporcionan partículas estables a temperatura ambiente y gotas a temperaturas elevadas. Por ejemplo, si las micropartículas se encuentran en estado gelatinoso, es decir, en una fase gelatinosa o casi sólida, formarán una suspensión en una fase líquida. Sin embargo, si posteriormente se convierten en estado sol, es decir, en estado soluble o casi líquido, formarán una emulsión en una fase líquida, y la suspensión se transformará en emulsión. Las realizaciones en las que el polímero o la mezcla de polímeros no están reticulados son especialmente buenas y versátiles a la hora de cambiar entre diferentes estados, por ejemplo, estados gel y sol.

El término "micropartícula", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una partícula cuyas dimensiones promedio están en el intervalo de los micrómetros. En una realización, las micropartículas de acuerdo con la presente invención tienen un tamaño promedio o dimensión promedio o diámetro promedio de aproximadamente 1 μm - 200 μm , preferentemente 5 μm - 150 μm , más preferentemente 10 μm - 100 μm . En una realización, las micropartículas de acuerdo con la presente invención son esféricas u ovaladas o elipsoidales, preferentemente esféricas, y las dimensiones mencionadas anteriormente se refieren al diámetro promedio de dicha micropartícula esférica, ovalada o elipsoidal. En una realización, las micropartículas tienen la forma de una gota (esférica). En otra realización, una micropartícula de acuerdo con la presente invención es un cuerpo esférico o un cuerpo casi esférico, es decir, que tiene la forma de una esfera (o se aproxima a ella), teniendo dicha esfera un diámetro promedio de las dimensiones mencionadas. Por lo general, las micropartículas de acuerdo con la presente invención son porosas y tienen una matriz polimérica porosa que tiene un volumen vacío para recibir una muestra acuosa y para proporcionar un espacio de reacción para la detección específica de un analito.

En realizaciones preferidas, las micropartículas según la presente invención no sólo son capaces de tomar una muestra líquida y alojarla, junto con cualquier analito que esté presente en tal muestra, dentro de la matriz porosa, sino que en realidad comprenden un miembro de unión (por ejemplo, una molécula de unión específica de analito fijada a dicha matriz polimérica porosa, por ejemplo un reactivo específico del analito (ASR); grupos ionizables, o una pluralidad de grupos ionizables, inmovilizados en dicha matriz polimérica porosa, siendo dicho(s) grupo(s) ionizable(s) capaz(es) de cambiar su(s) carga(s) en función de las condiciones ambientales que rodean a dicha

micropartícula precursora; un grupo cargado, o una pluralidad de grupos cargados inmovilizados en dicha matriz polimérica porosa; una combinación de cualquiera de ellos) que facilita(n) o proporciona(n) la funcionalidad requerida para unir o enriquecer un analito o clase de analito (por ejemplo, ácidos nucleicos) de interés, si están presentes en una muestra, y aumentar así la concentración local de dicho analito dentro de la micropartícula.

- 5 Además, en realizaciones preferidas de la presente invención, una micropartícula se caracteriza además por una etiqueta específica que está fijada a, contenida en o asociada de otro modo con la respectiva (tipo de) micropartícula.

10 Ha resultado que las micropartículas, tales como las divulgadas en la solicitud EP paralela titulada "A library of prefabricated microparticles and precursors thereof" (attorney docket B33016EP) por el presente solicitante Blink AG, son particularmente adecuadas también en las realizaciones de la presente invención, en particular en aquellas realizaciones en las que debe detectarse más de un analito en cada muestra.

15 En algunas realizaciones, puede ser necesario un tampón de lisis para liberar el analito de interés de la muestra o hacer que dicho analito de interés esté disponible dentro de la muestra. Dicho tampón de lisis puede contener un agente que puede causar una lisis de las células, en particular de las membranas celulares, o una lisis de los orgánulos celulares, como resultado de cuya lisis, un analito de interés sólo puede llegar a ser accesible. En algunas realizaciones, un tampón de lisis solo o en combinación con otro tampón puede facilitar el enriquecimiento o la unión de un analito de interés en una micropartícula. Si dicho "tampón de unión" se utiliza para adaptar las concentraciones del analito o de otros componentes, dicho "tampón de unión" también se denomina en la presente memoria "tampón de dilución".

- 20 El término "analito de interés" o "analito", como se utiliza en la presente memoria, también se denomina a veces "diana", en particular si se analizan ácidos nucleicos.

25 En algunas realizaciones, también puede ser necesario un tampón de lavado para eliminar cualquier componente no deseado de la(s) micropartícula(s) que, de otro modo, inhibiría una reacción de detección posterior o que, de otro modo, impediría que tal reacción de detección posterior funcionara correctamente. Si, por ejemplo, la reacción de detección es una reacción inmunoquímica, en algunas realizaciones, la(s) micropartícula(s) puede(n) comprender un reactivo específico para el analito, que es un anticuerpo primario específico para el analito de interés. En dicha realización de este tipo, la micropartícula o micropartículas que incluyen el anticuerpo primario como reactivo específico del analito, se exponen a una muestra que se sospecha que contiene un analito de interés, y dicha micropartícula se expone posteriormente a una primera composición de detección que comprende un anticuerpo secundario que es específico para el analito de interés unido al anticuerpo primario y que está, a su vez, acoplado a un indicador adecuado, por ejemplo, una enzima. Una vez que la micropartícula ha sido expuesta a la muestra y a la primera composición de detección, puede ser necesario realizar una etapa de lavado para eliminar cualquier anticuerpo secundario no unido que pudiera interferir con la reacción de detección posterior. Por consiguiente, las realizaciones de la presente invención prevén el uso de un etapa de lavado que implica un tampón de lavado para eliminar cualquier componente no deseado de las micropartículas que posteriormente pueda inhibir o impedir que se produzca una reacción de detección de reacción adecuada.

40 En un etapa adicional de una realización, la(s) micropartícula(s) se expone(n) a una segunda composición de detección que comprende, como reactivo de detección, un sustrato adecuado para la enzima indicadora que está fijada al anticuerpo secundario. Este sustrato, tras haber reaccionado con dicha enzima indicadora, se hace detectable, preferentemente detectable ópticamente, en particular detectable por fluorescencia.

45 En otras realizaciones de la invención, la reacción de detección puede ser una reacción de amplificación de ácido nucleico. En tales realizaciones, la(s) micropartícula(s) puede(n) comprender cebadores oligonucleotídicos y sondas para la amplificación y detección específicas de la diana. Estos reactivos específicos del analito pueden estar ya unidos de forma reversible a la(s) micropartícula(s) o pueden agregarse junto con otros componentes de una composición de detección genérica. Por lo general, tal composición de detección genérica comprende los reactivos necesarios para realizar una reacción de amplificación del analito de ácido nucleico de interés y puede, o no, contener también cebadores y, opcionalmente, sondas de detección adecuadas, dependiendo de si estos cebadores y/o sondas ya forman parte de la(s) micropartícula(s), o no. Si tales reactivos específicos del analito ya forman parte de la(s) micropartícula(s), no estarán incluidos en la composición genérica de detección. Sin embargo, tal composición de detección genérica comprende, por lo demás, los reactivos necesarios para realizar la reacción de amplificación del analito nucleico de interés, excepto los cebadores, en los que, en particular, la composición de detección genérica comprende un tampón adecuado, mononucleótidos, una enzima de amplificación, tal como una polimerasa de ácido nucleico adecuada, por ejemplo Taq polimerasa, y (opcionalmente) un colorante de ácido nucleico para la detección de un producto de amplificación, como un ácido nucleico amplificado.

55 Según la presente invención, el procedimiento también requiere una transferencia de la(s) micropartícula(s) a una fase no acuosa que se utiliza para aislar las micropartículas individuales, sellando y confinando así eficazmente su contenido al volumen de la(s) micropartícula(s). Dicha fase no acuosa suele ser un compuesto lipofílico, por ejemplo, un aceite lipofílico, tal como un aceite de fluorocarbono que, preferentemente, contiene uno o varios emulsionantes adecuados. Dicha fase no acuosa es necesaria cuando la micropartícula o micropartículas se

transfieren a ella, y dicha fase no acuosa ayuda a desplazar cualquier líquido acuoso que no sea absorbido por la micropartícula o micropartículas y a aislar dicha micropartícula o micropartículas entre sí, de forma que ya no sea posible el intercambio de líquidos entre diferentes micropartículas. Por consiguiente, una vez formada una suspensión estable de micropartículas, queda excluido cualquier arrastre de muestra de una micropartícula a otra, que podría dar lugar a una mezcla de dos muestras diferentes.

Además, las realizaciones del procedimiento según la presente invención permiten un enfoque elegante para la cuantificación de analitos al unir los enfoques de análisis cuantitativo digital y cuantitativo en tiempo real. Aunque esta afirmación es válida para cualquier tipo de ensayo de amplificación de señal o diana que se emplee en las micropartículas, la amplificación por PCR puede servir de ejemplo para ilustrar el enfoque de la cuantificación de dianas con este procedimiento. La cuantificación de las moléculas diana se realiza preferentemente mediante PCR digital (dPCR) porque este procedimiento permite una cuantificación más sensible y precisa que la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Una desventaja de la PCR digital es la limitación inherente del intervalo de medición que depende del número de micropartículas específicas para una muestra/analito. Para superar esta limitación, la invención complementa el análisis de la PCR digital con la PCR cuantitativa en tiempo real para concentraciones diana por encima del intervalo de medición de la PCR digital. La aplicación de este enfoque requiere la adquisición de imágenes de fluorescencia al final de la PCR y durante todos los ciclos de la PCR en tiempo real. Todas las imágenes adquiridas se analizan mediante un algoritmo de análisis de imágenes para cuantificar el nivel de fluorescencia de cada micropartícula en la cámara del reactor. Un algoritmo de segmentación separa los objetos micropartículas brillantes en forma de disco del fondo oscuro. Basándose en esta información de segmentación, finalmente se ajustan círculos a los contornos de los objetos de micropartículas, lo que permite estimar la fluorescencia media de las micropartículas y su volumen. El análisis de las imágenes de PCR en tiempo real incluye el seguimiento de las posiciones de las micropartículas en imágenes consecutivas para permitir el seguimiento de la fluorescencia durante el curso de la reacción en cada micropartícula respectiva.

La selección del enfoque de cuantificación aplicado se basa en el número/proporción de micropartículas que permanecen negativas tras la reacción de amplificación. Esta información procede de los datos de la PCR digital. Si se supera un límite inferior predefinido para el número/proporción de micropartículas negativas, puede aplicarse el análisis de Poisson de punto final. Por lo demás, el análisis en tiempo real se realiza utilizando los datos de PCR cuantitativa en tiempo real adquiridos durante todos los ciclos. Un límite inferior razonable para la proporción de micropartículas negativas que permite una cuantificación aún robusta con Poisson es el 0,5 %. El número medio correspondiente de objetivos por micropartícula es de 5,3. Para tener en cuenta posibles artefactos en las imágenes de fluorescencia, un requisito adicional puede ser un límite inferior para el número total de micropartículas negativas de, por ejemplo, 50.

El análisis de Poisson del punto final se realiza determinando la proporción de micropartículas negativas y aplicando una corrección de Poisson para tener en cuenta el hecho de que las micropartículas positivas pueden contener más de una molécula diana. El umbral, que distingue las micropartículas positivas de las negativas, se estima directamente a partir de las intensidades de la señal de fluorescencia de las micropartículas que se sabe que son negativas. Las posibles variaciones de volumen de las micropartículas se tienen en cuenta en la cuantificación mediante correcciones de Poisson específicas del volumen de las micropartículas. El algoritmo también corrige las posibles variaciones del volumen total de micropartículas entre mediciones.

Si la concentración diana excede el intervalo de medición de la PCR digital, el análisis en tiempo real ajusta una función no lineal al curso de la señal de fluorescencia de cada micropartícula individual. El modelo no lineal ajustado combina una función sigmoidea y otra lineal, donde el componente sigmoide revela la cinética de amplificación y el componente lineal representa el valor inicial de la señal. El valor umbral del ciclo (Ct) se calcula a partir de la intersección de la tangente en valor de definición de la función sigmoidea con la derivación máxima del segundo y el valor inicial. El número de dianas por micropartícula se calcula utilizando un conjunto de datos de calibración. El término de desplazamiento de la curva de calibración puede ser una función del volumen de micropartículas para tener en cuenta el efecto de las variaciones de volumen de las micropartículas.

Se puede aplicar una regla simple basada en el número de micropartículas que permanecen negativas (es decir, "oscuras") después de que se haya realizado una reacción de amplificación de señal o de diana en los espacios de reacción creados por las micropartículas, para establecer qué enfoque es el más adecuado para obtener resultados cuantitativos en un amplio intervalo de medida. La regla puede formularse así:

a. si, para una medida de detección/cuantificación dada utilizando una biblioteca según la presente invención, más del 0,5 % de las micropartículas específicas para un analito dado permanecen negativas (es decir, la probabilidad de que una micropartícula ("microesfera") permanezca oscura ("Pmicroesferaoscura" o "Pnegativa") es $>0,5\%$), puede aplicarse el análisis de Poisson para determinar la concentración de analitos diana en la muestra.

b. si, para una medida de detección/cuantificación dada utilizando una biblioteca según la presente invención, menos del 5 % de las micropartículas específicas para un analito dado permanecen negativas (es decir, la probabilidad de que una micropartícula (microesfera) permanezca oscura

("Pmicroesfera oscura" o "Pnegativa") es $<5\%$), pueden aplicarse algoritmos de análisis en tiempo real para determinar la concentración de analitos diana en la muestra

c. si, para una medida de detección/cuantificación dada utilizando una biblioteca según la presente invención, las micropartículas negativas; se encuentran dentro de un intervalo de $0,5\% < P_{\text{negativa}} < 5\%$, ambos enfoques pueden aplicarse indistintamente

Este principio de cuantificación también se ilustra en las figuras 14 y 15, así como en el ejemplo 2.

Además, se hace referencia a las figuras que se dan para ilustrar, no para limitar la presente invención. Más concretamente,

la figura 1A muestra una realización de un esquema básico de un ensayo/procedimiento de acuerdo con realizaciones de la presente invención que muestra que el flujo de trabajo de dicho procedimiento comprende una parte específica de la muestra (denominada en la figura "parte específica del procedimiento") que se realiza preferentemente tantas veces como muestras diferentes haya que probar, y una parte genérica del procedimiento que es común a todas las micropartículas, independientemente de a qué muestra(s) se hayan expuesto. El recuadro superior representa una realización de un procedimiento básico y los posibles componentes de una parte del procedimiento específica para una muestra. Una muestra se lisa utilizando un tampón de lisis, como resultado de lo cual se liberará el analito o analitos de interés, en la presente memoria también denominados a veces "diana(s)". Opcionalmente, se puede utilizar un tampón de dilución adecuado (en la presente memoria también denominado a veces "tampón de unión") para ajustar las concentraciones de determinados reactivos en el tampón de lisis a un intervalo aceptable, tras lo cual la muestra, incluido el presunto analito de interés, se somete a condiciones en las que la muestra, incluido el analito o analitos de interés, puede ser absorbida o adsorbida por micropartículas que llevan una determinada etiqueta que ahora se asigna a la muestra respectiva, tales micropartículas etiquetadas en la presente memoria también denominadas a veces "micropartículas codificadas" o "microesferas codificadas". Tales "micropartículas codificadas" que han sido expuestas a una muestra, también se denominan en la presente memoria "subconjunto de micropartículas". Cada uno de estos "subconjuntos" se caracteriza por un componente de etiqueta específico que está fijado a, contenido en o asociado de otro modo al subconjunto respectivo. En algunas realizaciones, el analito respectivo también puede unirse a la(s) micropartícula(s) mediante la unión por afinidad a la matriz que forma la partícula o a un reactivo específico para el analito (ASR) que se haya fijado a las partículas o esté contenido en ellas con este fin. Una vez que el analito o analitos de interés se han incorporado/acomodado dentro de la micropartícula o micropartículas, el subconjunto respectivo de micropartículas se expone a una composición de detección adecuada cuya naturaleza y contenido dependen de la reacción de detección que se vaya a realizar con el analito de interés (reacción de detección que, a su vez, depende del tipo de analito que se vaya a detectar). Tal reacción de detección comprende los reactivos necesarios para realizar una reacción de detección del analito de interés. Los ejemplos preferidos de dicha composición de detección se definen más arriba. Posteriormente, una vez que la composición de detección respectiva ha sido absorbida por las micropartículas, puede seguir una etapa de eliminación de cualquier fase acuosa que esté rodeando a la(s) micropartícula(s) respectiva(s). Tal etapa puede implicar filtración, centrifugación, agitación u otra agitación mecánica, y combinaciones de las mismas, que se realiza con las respectivas micropartículas. En lo sucesivo, preferentemente tras la eliminación de cualquier fase acuosa que rodee a la micropartícula o micropartículas respectivas, éstas se transfieren a una fase no acuosa, tal como un aceite, que opcionalmente incluye un emulsionante. En realizaciones preferidas, el emulsionante ayuda a aislar la micropartícula individual. Como resultado de tal transferencia a una fase no acuosa, habrá una suspensión de micropartículas aisladas con, posiblemente, analito(s) de interés de esta muestra en particular. El mismo procedimiento se repite con un tipo diferente ("subconjunto") de micropartículas, codificadas de forma diferente, es decir, con un componente de etiqueta diferente unido a ellas, contenido en ellas o asociado a ellas de otro modo, y estas micropartículas codificadas de forma diferente se exponen a una muestra diferente. Una vez se ha realizado este procedimiento para tantas muestras diferentes como sea necesario o se desee, puede generarse un primer registro de correlación que indique qué subconjunto separado de micropartículas ha sido expuesto a qué muestra. Este primer registro de correlación también se denomina en ocasiones "lista de códigos de muestras/microesferas". Una vez que se ha realizado el procedimiento de exposición de diferentes subconjuntos de micropartículas a diferentes muestras para tantas muestras diferentes como se desee o sea necesario, los respectivos subconjuntos diferentes aislados de micropartículas pueden mezclarse y someterse en la parte genérica del procedimiento a una reacción de detección que puede ser una amplificación de ácidos nucleicos, o la realización de una reacción inmunoquímica, o cualquier otra reacción bioquímica adecuada para la detección de un analito de interés. Dependiendo de la presencia o ausencia de analito en la muestra respectiva (y subconjunto de micropartículas), puede haber una señal generada en tal reacción de detección para un subconjunto particular de micropartículas. De este modo, puede generarse una lista de las microesferas en las que se ha detectado una señal ("lista de microesferas/código de señal" o "segundo registro de correlación"), indicando en qué subconjunto de micropartículas se ha generado una señal en la reacción de detección. Posteriormente, la(s) señal(es) respectiva(s) generada(s) en dicha reacción de detección puede(n) descodificarse (por ejemplo, alineando o comparando el segundo registro de correlación (o la "lista de códigos de microesferas/señales") con el primer registro de correlación (o la "lista de códigos de muestras/microesferas"), dando lugar a la conclusión de que el(los) analito(s) de interés ha(n) estado presente(s) (o ausente(s)) en una o varias de las muestras que se habían utilizado

originalmente para llenar/cargar la(s) micropartícula(s) respectiva(s). Preferentemente, la determinación de qué muestra contiene el analito de interés, es decir, la asignación real de señal detectada a se realiza vinculando el primer registro de correlación (es decir, la lista que indica qué subconjunto ha sido expuesto a qué muestra) con el segundo registro de correlación (es decir, la lista que indica en qué subconjunto se ha generado una señal).

5 Cabe señalar que una ventaja importante del procedimiento según la presente invención es la siguiente: Si las muestras se analizaran individualmente, habría que realizar una reacción de detección individual y separada para cada muestra. La presente invención permite que una parte del procedimiento (la "parte genérica") que es idéntica y común a todas las reacciones de detección que, de otro modo, se realizarían individualmente y por separado para cada muestra, se realice una vez para todas las muestras que se analizan.

10 **La figura 1B** muestra una realización de un esquema básico de un ensayo/procedimiento de acuerdo con realizaciones de la presente invención que muestra que el flujo de trabajo de dicho procedimiento también puede aplicarse favorablemente para procesar una sola muestra. Las microesferas empleadas proporcionan un procedimiento sencillo que utiliza el material poroso para el enriquecimiento de la diana, la limpieza y para realizar una reacción de generación de señal tal como la PCR en nanoreactores individuales, que proporcionan una
15 cuantificación exquisita de la diana presente en la muestra a través de un amplio intervalo de medición.

La figura 2 muestra una realización de una micropartícula ejemplar de acuerdo con la presente invención que tiene una matriz porosa y está constituida por un polímero que, en este caso particular, también es capaz de experimentar una transición de fase ante un desencadenante externo. Por ejemplo, en una realización preferida, la micropartícula que tiene una matriz porosa se compone de una matriz polimérica porosa cuyo polímero que
20 compone dicha matriz polimérica porosa es capaz de someterse a una transición sol-gel, por ejemplo al aumentar la temperatura. Una vez que las respectivas micropartículas se han aislado en una fase no acuosa, la temperatura puede elevarse hasta un nivel en el que la micropartícula experimente dicha transición de fase, dando lugar efectivamente a la formación de una gotita acuosa en la que puede tener lugar una reacción de detección. De acuerdo con esta realización mostrada en la figura 2, la(s) micropartícula(s) también tiene(n) una mayor afinidad
25 de unión para un analito de interés particular. Esto puede ser una característica de la propia matriz polimérica o, por ejemplo, lograrse mediante una molécula de unión específica del analito (reactivo aglutinante) fijada a la matriz. En algunos casos, dicho aglutinante puede ser, por ejemplo, un reactivo específico del analito (ASR), tal como se ha definido anteriormente. Los ligantes específicos de un analito pueden seleccionarse entre ácidos nucleicos, incluidos pares de ácidos nucleicos, en particular pares de cebadores; aptámeros, espiegelmeros; anticuerpos o fragmentos de anticuerpos; proteínas no anticuerpos capaces de ligar específicamente un analito o un complejo de analitos, tales como receptores, fragmentos de receptores y proteínas de afinidad. En una realización preferida, el reactivo específico del analito se selecciona entre ácido nucleico, en particular oligómeros de ácido nucleico y cebadores de ácido nucleico. Además, la(s) micropartícula(s) tiene(n) un componente de etiqueta fijado a,
30 contenido en o asociado de otro modo con la(s) misma(s). Además, dicha micropartícula puede (opcionalmente) comprender reactivos fijados de manera reversible para una reacción de detección generadora de señales que se realizará dentro del espacio proporcionado por la micropartícula. Debe tenerse en cuenta que, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, un par de cebadores que es adecuado para amplificar una secuencia de ácido nucleico particular (que es el "analito" o "diana"), puede en la presente memoria calificarse y considerarse como un único reactivo específico de analito (ASR) a pesar de que dicho par de cebadores comprenda dos
35 cebadores diferentes. Sin embargo, son específicos para una única secuencia de ácido nucleico en el sentido de que flanquean la misma región de dicha secuencia de ácido nucleico y, por tanto, son específicos para el mismo analito de ácido nucleico

En realizaciones preferidas, el componente de la etiqueta es un colorante fluorescente, más preferentemente una mezcla de dos colorantes fluorescentes diferentes.

45 La(s) micropartícula(s) de acuerdo con las realizaciones de la presente invención poseen una capacidad para alojar, preferentemente unir o enriquecer, el analito de interés en su matriz porosa, y pueden identificarse y distinguirse de otras micropartículas por medio del componente de etiqueta respectivo que está fijado a, contenido en o asociado de otro modo con la(s) micropartícula(s) respectiva(s). Dado que las micropartículas de acuerdo con la presente invención son de naturaleza porosa, proporcionan un volumen interior accesible suficiente para recoger
50 (o "absorber") la muestra, incluido cualquier analito de interés, si está presente, o para unir ("adsorber") el analito a la matriz de la micropartícula mediante, por ejemplo una molécula de unión específica del analito fijada a dicha matriz polimérica porosa; grupos ionizables, o una pluralidad de grupos ionizables, inmovilizados en dicha matriz polimérica porosa, siendo dicho(s) grupo(s) ionizable(s) capaz(es) de cambiar su(s) carga(s) en función de las condiciones ambientales que rodean a dicho precursor-micropartícula; un grupo cargado, o una pluralidad de grupos cargados inmovilizados en dicha matriz polimérica porosa; o una combinación de cualquiera de ellos.
55

Preferentemente, dichas micropartículas son además capaces de experimentar una transición de fase tras la aplicación de un desencadenante externo, de forma que pueden, por ejemplo al elevar la temperatura por encima de un cierto umbral, transformarse de un estado de gel a temperatura ambiente a un estado soluble a temperatura elevada. Cuando las partículas se encuentran al mismo tiempo en un líquido, su suspensión a temperatura
60 ambiente se transformará, por tanto, en una emulsión a temperaturas elevadas.

Los polímeros preferidos que funcionan de esta manera son los polímeros de agarosa, solos o en combinación con gelatina.

La figura 3 muestra la funcionalidad básica de las micropartículas ("microesferas de reactor") de acuerdo con las realizaciones de la presente invención. La figura muestra tres tipos diferentes de micropartículas, cada una de las cuales se distingue de las demás en virtud del componente de etiqueta asociado a dicho tipo respectivo. En la presente representación de la figura 3, los diferentes componentes de la etiqueta están simbólicamente representados por áreas sombreadas de forma diferente dentro de las representaciones circulares de las micropartículas/microesferas; tales áreas sombreadas de forma diferente pueden representar cualquier componente de etiqueta adecuado siempre que permitan distinguir las diferentes micropartículas. Por ejemplo, pueden representar diferentes concentraciones de un único colorante, diferentes proporciones de dos colorantes diferentes, diferentes etiquetas físicas detectables, etc. En una primera parte del procedimiento, que es la "parte específica de la muestra" del procedimiento, los tres tipos diferentes de micropartículas se exponen por separado a tres muestras diferentes 1 - 3, de manera que, efectivamente, cada muestra está codificada por el componente de la etiqueta del tipo respectivo ("subconjunto") de micropartícula que se expone a tal muestra. En una realización preferida, dicha correlación entre el componente de la etiqueta y la respectiva muestra asociada con el mismo, se consigue generando una lista de componentes de la etiqueta (de subconjuntos correspondientes de micropartículas) con las correspondientes muestras asociadas, en la presente memoria también denominado a veces "un primer registro de correlación". Dicha lista también puede denominarse en ocasiones "lista de códigos muestra/micropartícula" o "lista de códigos muestra/microesfera", que indica qué subconjunto de micropartículas ha sido expuesto a qué muestra. En esta realización, tras una serie de etapas del procedimiento, las micropartículas se cargan con reactivos de detección y se recogen en un entorno no acuoso que proporciona un aislamiento de las micropartículas y evita cualquier comunicación cruzada entre las micropartículas. En una segunda parte del procedimiento, que es la "parte genérica" del procedimiento, las diferentes suspensiones de micropartículas que codifican y corresponden a diferentes muestras en una fase no acuosa se mezclan y se someten simultáneamente ("de una sola vez", es decir, ya no por separado unas de otras) a las condiciones necesarias para realizar la reacción de detección requerida, por ejemplo una amplificación de ácidos nucleicos, tal como la PCR que implica un ciclado de temperatura. Dado que esta "parte genérica" permite procesar un gran número de muestras, se facilita la realización de un único procedimiento de detección con muestras de cohortes enteras de pacientes de gran tamaño, por ejemplo en un ensayo clínico. Se registra(n) la(s) señal(es) producida(s) en dicha reacción de detección, y se determinan/leen los respectivos componentes de la etiqueta de las (subconjuntos de) micropartículas. Se genera un segundo registro de correlación que indica en qué subconjunto de micropartículas se ha generado una señal. Este segundo registro de correlación también se denomina en la presente memoria "Lista de códigos de microesferas/señales". Las combinaciones señal de detección/micropartícula resultantes en la "lista de códigos microesfera/señal" (es decir, el segundo registro de correlación) se comparan con la "lista de códigos muestra/micropartícula" ("es decir, el primer registro de correlación), como resultado de lo cual puede determinarse qué muestra (de la pluralidad de muestras analizadas) contenía o no el respectivo analito de interés.

Las micropartículas que son particularmente adecuadas para las realizaciones, según la presente invención son las micropartículas contenidas en una biblioteca de micropartículas prefabricadas para realizar una detección específica de un analito de interés en una muestra, como se describe en la Solicitud de Patente Europea copendiente titulada biblioteca de micropartículas prefabricadas (Attorney docket B33016EP), presentada simultáneamente con la presente.

La figura 4 muestra un diagrama esquemático de una disposición ejemplar de un cartucho fluido novedoso que puede ser adecuado para realizar realizaciones del procedimiento según la presente invención. Las características únicas del cartucho son las múltiples entradas separadas para las muestras individuales que se van a analizar. Cada entrada está conectada por separado con su propia cámara de muestras o módulo específico de muestras, y en el cartucho hay varias cámaras de muestras o módulos específicos de muestras diferentes, cada uno de los cuales está previsto y configurado para utilizarse con una muestra distinta. Los términos "cámara de muestras", "módulo de cámara de muestras" y "módulo específico de muestras" se utilizan indistintamente en la presente memoria y se refieren a una cámara que está específicamente destinada y configurada para recibir una muestra específica. El espacio real dentro del módulo específico de la muestra respectiva que está configurado para contener la muestra (y para contener el subconjunto específico de micropartículas para esta muestra en particular) también se denomina en la presente memoria a veces "compartimento de la muestra". Estos módulos de cámara específicos se proporcionan para garantizar un procedimiento de codificación seguro, es decir, un procedimiento en el que cada muestra se codifica/etiqueta mediante la exposición de un tipo separado específico ("subconjunto") de micropartículas a dicha muestra, lo que da lugar a que cada uno de dichos subconjuntos diferentes de micropartículas se "cargue" con una muestra diferente, respectivamente. Los distintos módulos de cámara específicos para cada muestra evitan cualquier contaminación cruzada entre los distintos módulos y, por tanto, entre las distintas muestras. Las respectivas entradas separadas se muestran en la figura mediante hendiduras triangulares en las cámaras de muestras (o módulos específicos de muestras) que se representan mediante cajas rectangulares apoyadas sobre su(s) lado(s) más pequeño(s).

La disposición ejemplar del cartucho en esta figura comprende un mecanismo ejemplar de válvula y bomba. En la disposición de los cartuchos hay tres grupos distintos de cámaras (o módulos):

1. módulos que facilitan el procedimiento específico de la muestra y que, entre otras partes, contienen las micropartículas codificadoras de la muestra
- 5 2. cámaras para almacenar los reagentes necesarios para realizar los procedimientos específicos (si no están incluidos en los módulos específicos de la muestra) y genéricos; también se muestra una cámara de almacenamiento específicamente designada para contener una fase no acuosa ("cámara de fase no acuosa")
- 10 3. cámaras o módulos que facilitan el procedimiento genérico (por ejemplo, una cámara de mezcla (opcional) y una cámara de detección (obligatoria), o una cámara combinada de mezcla y detección, es decir, una cámara en la que se combinan ambas funciones (no mostrada))

15 Todos los reactivos se suministran a los módulos respectivos de forma unidireccional antes de que se haya completado el procedimiento de codificación, y antes de que las micropartículas se aislen, es decir, se aseguren en la fase no acuosa. Finalmente, se recoge una suspensión de micropartículas de cada módulo de muestra, y las diferentes suspensiones se mezclan para formar una única suspensión. A continuación, estas micropartículas mezcladas se transfieren a una cámara de detección y se someten a las condiciones necesarias para realizar una reacción de detección. Un cartucho que puede adaptarse y, previa modificación, utilizarse de acuerdo con las realizaciones de la presente invención es un cartucho como el descrito en la Solicitud de Patente Europea EP No. 19 187 064.1, presentada el 18 de julio de 2019, que necesita ser adaptado sin embargo, en la medida en que requiere modificación en el sentido de que el cartucho según la presente invención tiene una pluralidad de cámaras de muestras, y cada una de tales cámaras de muestras tiene su propia entrada de muestras. Esto permite la manipulación por separado de una pluralidad de muestras, cada una de las cuales se etiqueta por separado de acuerdo con la presente invención.

25 **La figura 5** muestra una realización de un procedimiento según la presente invención. Más concretamente, diferentes subconjuntos de micropartículas (denominadas en la figura "microesfera 1", "microesfera 2", "microesfera 3" y "microesfera 4", respectivamente) tienen un componente de etiqueta diferente fijado, pero o bien no contienen ningún reactivo específico para el analito, o bien comprenden, exactamente, un tipo de reactivo específico para el analito que es específico para un analito concreto de interés. Los diferentes subconjuntos de micropartículas son identificables por sus diferentes componentes de etiqueta y se suministran por separado, por ejemplo, en diferentes recipientes, tales como diferentes cámaras de muestras o módulos específicos de muestras dentro de un cartucho, como se ha descrito más arriba, y cada uno de ellos se expone por separado a una muestra diferente. En efecto, se utilizarán tantos subconjuntos de micropartículas como muestras haya que analizar. En lo sucesivo, se agrega a cada subconjunto la composición necesaria (genérica) de reactivo/reactivo de detección (opcionalmente, tal composición de detección también incluye un reactivo específico del analito, como se ha definido anteriormente, si tal reactivo específico del analito no estaba contenido en las micropartículas desde el principio). A continuación, los subconjuntos respectivos de micropartículas se transfieren, todavía por separado, a una fase no acuosa (que puede ser un aceite, que opcionalmente contiene emulsionante), quedando así aislados unos de otros, como resultado de lo cual ya no habrá "comunicación cruzada", es decir, mezcla de muestras entre los espacios proporcionados por las micropartículas respectivas, y a partir de entonces se lleva a cabo una reacción de detección (genérica) ("reacción de detección en un solo recipiente"). Los resultados de tal reacción de detección (genérica) permiten llegar a una conclusión con respecto a qué muestra ha estado presente el analito de interés. Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que, de hecho, no hay derrame o "comunicación cruzada" entre diferentes micropartículas una vez que se han aislado unas de otras al haber sido transferidas a una fase no acuosa. Como resultado, tampoco habrá contaminación cruzada entre las muestras (que deben probarse para detectar la presencia de un analito), a pesar de que sus respectivas micropartículas se hayan mezclado.

35 **La figura 6** muestra una realización de un procedimiento según la presente invención en el que se prueban múltiples muestras para múltiples analitos. En principio, el esquema es similar al de la figura 5, con la salvedad de que se utilizarán tantos subconjuntos de micropartículas como muestras haya que analizar, multiplicados por el número de analitos diferentes que se quieran detectar. A modo de ejemplo, la primera muestra de la figura 6 se prueba/analiza utilizando dos subconjuntos diferentes de micropartículas que no sólo difieren en cuanto al componente de etiqueta asociado a las mismas, sino también en cuanto al reactivo específico del analito fijado a dicho tipo. Se hace lo mismo con la segunda muestra ("muestra 2"). Por consiguiente, en este ejemplo hay en total 4 subconjuntos diferentes de micropartículas, y cada uno de ellos tiene su combinación única de componente de etiqueta y reactivo específico del analito. En lo sucesivo, se agrega el reactivo de detección/la composición de detección (genéricos) necesarios, pero siempre por muestra, para evitar la contaminación cruzada entre muestras diferentes. En lo sucesivo, las micropartículas respectivas se transfieren, de nuevo, por muestra a la fase no acuosa, y sólo después de que estas micropartículas respectivas se hayan aislado de tal manera y ya no puedan interferir ni contaminarse mutuamente, se realiza la reacción de detección necesaria. El resultado final será la constatación de si cada muestra analizada no contenía ninguno, uno o dos de los analitos a detectar. De nuevo,

como se ha señalado anteriormente, sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que, de hecho, no hay derrame o "comunicación cruzada" entre diferentes micropartículas una vez que se han aislado unas de otras al haber sido transferidas a una fase no acuosa. Como resultado, tampoco habrá contaminación cruzada entre las muestras (que deben analizarse para detectar la presencia de un analito o varios analitos), a pesar de que sus respectivas micropartículas (cada una de las cuales comprende un pequeño volumen de la muestra respectiva que debe analizarse) se hayan mezclado.

La figura 7 muestra una micrografía de la unión transversal microfluídica del montaje utilizado para generar micropartículas según la invención. Las microgotas se forman en aceite y forman una solución acuosa de hidrogel (a la izquierda). Posteriormente, las gotitas se enfrían y se forman micropartículas.

La figura 8 muestra una micrografía de fluorescencia adquirida con un Juego de Filtros Cy3 en un Zeiss Axioscope equipado con una cámara digital. Se pueden observar tres niveles de fluorescencia diferentes (brillante, medio, bajo) que representan tres concentraciones del componente de la etiqueta (colorante Cy3), lo que corresponde efectivamente a tres componentes de etiqueta diferentes.

La figura 9 muestra una imagen combinada de la cámara de detección que representa el canal de fluorescencia que codifica la etiqueta de las microesferas. En la imagen ampliada de la parte inferior derecha pueden reconocerse claramente tres tipos diferentes de micropartículas (o "microesferas"), distinguibles (y, por tanto, codificadas) por sus respectivos componentes de etiqueta (señal brillante, media y baja). Debido a sus diferentes componentes de etiqueta, estas microesferas pueden utilizarse para etiquetar o "codificar" diferentes muestras (por lo que a veces también se denominan en la presente memoria "microesferas codificadoras de muestras"). Las microesferas se distribuyen espacialmente en empaquetamiento compacto hexagonal. El número total de todas las microesferas codificadoras de muestras (diámetro medio $d=105\text{ }\mu\text{m}$) reconocidas por el algoritmo de software empleado dentro de esta cámara PCR se ha determinado con $N=17,698$.

La figura 10 A muestra imágenes de fluorescencia de micropartículas híbridas de agarosa-gelatina etiquetadas con color después de la amplificación PCR. Se pueden reconocer tres etiquetas por su intensidad de fluorescencia en el canal 1. El canal 2 representa las señales de fluorescencia para el control interno del procedimiento (fago MS2) y el canal 3 representa la fluorescencia específica para la amplificación por PCR de la diana del HCV. Cada etiqueta corresponde a una muestra diferente que ha sido procesada y analizada. **La figura 10B** (gráfico superior) muestra los histogramas de la intensidad de fluorescencia determinada para las diferentes microesferas del canal 1 (imagen superior de la figura 10A). Se encuentran tres especies de etiquetas distintas. En los gráficos central e inferior se muestran los diagramas de violín que representan la distribución de la señal encontrada en las respectivas especies de microesferas para el canal 2 (MS2) y los canales (3). Aplicando el análisis de Poisson, los números encontrados se traducen en un número de copias específico por muestra de volumen aplicada a las microesferas.

La figura 11 resume los datos del ejemplo 3 sobre la eficacia de unión de diferentes formulaciones de micropartículas para el ARN. Los datos muestran que los ajustes en la composición de las micropartículas permiten optimizar las características de unión.

La figura 12 muestra imágenes de fluorescencia de curso temporal que muestran la unión de ARN a las micropartículas preparadas en el ejemplo 3.

La figura 13 ilustra el efecto de enriquecimiento conseguido mediante el uso de las micropartículas. El gráfico muestra los datos de dos composiciones diferentes de micropartículas. Los puntos negros indican la concentración diana en la muestra antes de la incubación con las micropartículas determinada por RT-PCR digital. Las columnas blancas representan la concentración diana detectada tras la incubación en el sobrenadante, las columnas grises la concentración diana en las micropartículas. El efecto de enriquecimiento es claramente visible, mostrando un agotamiento del sobrenadante o sobrenadantes respectivos.

La figura 14 muestra la precisión del enfoque combinado de análisis PCR cuantitativo digital y en tiempo real para la cuantificación de dianas en micropartículas. Se muestran los intervalos de confianza para ambos procedimientos. La línea vertical en $\lambda=5$ cp/micropartícula (cp=copias) indica el valor aproximado en el que los procedimientos pueden utilizarse indistintamente ("CI"= intervalo de confianza).

La figura 15 muestra datos de fluorescencia en tiempo real obtenidos a partir de una serie de imágenes recogidas en micropartículas en aceite durante la amplificación PCR. A la izquierda se muestra una imagen combinada de una cámara de detección con la señal de fluorescencia del punto final detectada en un canal de fluorescencia específico para la amplificación. El gráfico del centro muestra de forma ejemplar la intensidad de fluorescencia de 12 micropartículas individuales representativas seleccionadas de la imagen de fluorescencia de la izquierda a lo largo del tiempo. En el histograma de la derecha se muestra una distribución de los valores ct calculados para cada micropartícula detectada en la imagen de fluorescencia.

Además, se hace referencia a los siguientes ejemplos que se dan para ilustrar, no para limitar la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de "microesferas de codificación de muestras" para un ensayo de detección de ARN

Se han generado micropartículas etiquetadas diferentemente con una matriz compuesta de gelatina y agarosa, en la que la fracción de gelatina de la composición servía como parte portadora del colorante de la matriz y debido a su composición permitía la unión y el enriquecimiento de la diana.

El etiquetado de la gelatina con colorantes fluorescentes para crear un código de partículas se llevó a cabo del siguiente modo:

La fracción insoluble en acetona de la gelatina de piel bovina de tipo A se etiqueta con un colorante fluorescente aprovechando la química de acoplamiento NHS. Cy³ Mono NHS Éster (GE Healthcare) se disolvieron en DMF hasta obtener una solución final del 10 % (p/v). El componente 1 se disuelve en tampón fosfato de sodio 70mM (pH 8,0-8,3, filtrado estéril) para obtener una concentración final del 0,25 % (p/v). Se utiliza una cantidad molecular 10 veces menor del colorante respectivo sobre los grupos amino de gelatina libre para etiquetar 25 ml de cualquiera de los dos tipos de gelatina. Las soluciones de etiquetado se incuban a 4 °C, durante la noche utilizando el Multi-Rotator PTR-60 (Grant-bio) en modo vertical. La purificación de la gelatina etiquetada con fluorescencia y su concentración se realiza mediante precipitación repetida con sulfato de amonio utilizando una solución saturada de (NH₄)₂SO₄. Alternativamente, la gelatina puede estar en un formato del tamaño de partículas gelificadas para el acoplamiento y puede purificarse sin precipitación de sulfato de amonio simplemente lavando y centrifugando a temperatura ambiente. Además, para purificar la gelatina se puede realizar la ultrafiltración, la extracción con disolventes como el isopropanol, la acetona o el metanol, la filtración en gel mediante columnas de sefarsa o la diálisis.

En cualquier caso, la purificación se repite hasta que el efluente aparezca claro y no muestre fluorescencia. Las muestras de gelatina purificadas y etiquetadas fluorescentemente se secan finalmente al vacío después de lavar las pellas cuatro veces con dH₂O, lo que da como resultado el componente 3.

Preparación de la solución híbrida gelatina/agarosa:

Se prepara una solución de hidrogel híbrido que consta de tres componentes para fabricar nanorreactores.

Componente 1: Gelatina insoluble en acetona de piel bovina tipo A G1890 (Sigma)

Componente 2: Agarosa 2-hidroxietil de baja gelificación (A4018, Sigma)

Componente 2: Gelatina etiquetada con Cy3 (tipo A)

Para generar una solución homogénea al 4 % (p/v) del componente 1, se disuelven 40 mg del componente 1 en 1 ml de agua libre de nucleasas (Carl Roth) y se incuba a 50 °C bajo agitación suave (750 rpm). Asimismo, se disuelven y funden 20 mg del componente 2 en 1 ml de agua libre de nucleasas y se incuba a 80 °C bajo agitación suave para preparar una solución homogénea de agarosa al 2 % (p/v). Para preparar una solución al 4 % (p/v) de gelatina etiquetada, se toman pellas secas del componente 3 en un volumen respectivo de agua libre de nucleasas y se incuba a 55 °C hasta que la gelatina esté fundida. Los tres componentes se mezclan y se rellenan con agua libre de nucleasas para generar una solución de hidrogel híbrido con concentraciones finales del 1,5 % (p/v) para la gelatina y del 0,5 % (p/v) para la agarosa A4018, respectivamente. Se mezclan diversos volúmenes del componente 3 y del componente 1 para obtener n conjuntos de micropartículas de colores distintos. En esta realización, el componente 3 resuspendido y el componente 1 se mezclan en proporciones 1:1000, 1:500, 1:250 para obtener tres componentes de etiqueta individuales que permitan la identificación y el análisis de tres muestras diferentes. Todas las soluciones se conservaron a 55 °C hasta su uso posterior.

Generación de micropartículas de gelatina/agarosa no reticuladas

Se fabricaron micropartículas híbridas monodispersas de agarosa-gelatina codificadas por colores utilizando un sistema microfluídico generador de partículas (Dolomite, Reino Unido). Se fabrican micropartículas híbridas monodispersas en un procedimiento de una sola etapa de formación de emulsiones utilizando un sencillo dispositivo de flujo-foco. En detalle, se utiliza un chip de unión de gotas estándar (100 µm) de naturaleza fluorofílica con un conector lineal de 4 vías y una interfaz de chip H para interconectar la conexión fluidica entre el tubo y el chip. Dos bombas P Mito suministran la solución de hidrogel y el aceite portador. El sistema se modifica con la integración de un dispositivo de calentamiento que se coloca encima de una placa caliente y permite mantener la solución híbrida de gelatina/agarosa en estado líquido y calentar el fluido impulsor garantizando una temperatura constante cuando el aceite y la solución híbrida de gelatina/agarosa entran en contacto en la unión del chip. El Picosurf 2 (Spherafluidics, Reino Unido) y la solución de hidrogel híbrido se filtran previamente con un filtro de 0,22 µm antes de colocarlos en la bomba P (Mito) y en el depósito de hidrogel dentro del dispositivo de calentamiento del sistema de goteo, respectivamente. La temperatura del equipo de calefacción se fija en 55 °C. Las líneas de fluido se ceban a 2000 mbar durante 1 minuto utilizando el software de control de flujo. Se ajusta un caudal de 15-

20 µl/min para una formación estable de gotas. Los parámetros se supervisan con el software Dolomite Flow Control Advanced.

La figura 7 muestra una micrografía de la unión transversal microfluídica con microgotas formándose a la izquierda en la fase oleosa. Posteriormente, las gotitas de hidrogel se solidifican y se convierten en micropartículas.

- 5 En ambos casos, las micropartículas híbridas de agarosa-gelatina coloreadas se recogen en hielo en tubos de microcentrifuga de 2 ml o en tubos falcon de 15 ml para iniciar la solidificación del hidrogel híbrido. Para evitar la pérdida de fase acuosa de las micropartículas en el límite aceite-aire, se superponen 500 µl del aceite de emulsión que contiene las micropartículas con 500 µl de agua libre de nucleasas. Posteriormente, las micropartículas se enfrían a 4 °C, durante al menos 24 horas (preferentemente 48 h) para formar andamios híbridos estables.

10 Recuperación de micropartículas híbridas de la fase continua

Las microesferas híbridas solidificadas se acumulan sobre el aceite de la emulsión. El aceite de la emulsión se retira cuidadosamente con una pipeta teniendo cuidado de no desprender las partículas. Después, se agregan 500 µl de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctanol (PFO; Sigma) al tubo para romper la emulsión. Para transferir las partículas de hidrogel híbrido a la fase oleosa, se agita el tubo en vórtex durante 5 s y se centrifuga a 2.500 x g durante 5 s.

- 15 Las micropartículas de hidrogel híbrido se transfieren a un tubo de microcentrifuga nuevo de 1,5 ml.

Opcional: Este procedimiento puede repetirse para eliminar el aceite de fluorocarbono residual y el tensioactivo. Tras el lavado con PFO, las micropartículas recuperadas se lavan dos veces con 1 ml de agua libre de nucleasas. La calidad y el tamaño de las micropartículas se examinan visualmente con un microscopio. El resultado final del procedimiento descrito produce conjuntos de micropartículas nanorreactantes (diámetro d=100 µm) con una matriz polimérica porosa y una capacidad de codificación de muestras.

- 20

La figura 8 muestra una micrografía de fluorescencia adquirida con un Juego de Filtros Cy3 en un Zeiss Axioscope equipado con una cámara digital. Se pueden observar tres niveles de fluorescencia diferentes (brillante, medio, bajo) que representan tres concentraciones del colorante (colorante Cy3) y, por tanto, tres componentes de etiqueta diferentes que permiten distinguir entre las respectivas micropartículas etiquetadas con él.

25 Liofilización de conjuntos de micropartículas

Opcionalmente, los conjuntos de microesferas pueden liofilizarse para obtener gránulos de micropartículas para su almacenamiento a largo plazo. Por lo tanto, los conjuntos de microesferas deseados y las concentraciones se complementan con un volumen igual de una solución de trehalosa de 600 mg/ml para generar una suspensión de biblioteca de micropartículas con un 30 % (p/v) de trehalosa. Posteriormente, se preparan alícuotas de biblioteca de 100 µl en tubos de tiras de PCR sin RNasa/DNasa listos para la liofilización. El tipo de excipiente (por ejemplo, trehalosa) y su concentración en la formulación de liofilización afectan al grado de hinchamiento de las microesferas liofilizadas cuando se exponen a un eluido más adelante en el procedimiento. Los conjuntos de microesferas se liofilizaron al vacío (-25 °C y 0,1 mbar) utilizando el liofilizador Alpha 2-4 LSCplus (Christ) tras congelarlos en hielo seco durante 2 h. Las muestras se dejaron en el liofilizador durante un tiempo total de 200 min. La fase principal de secado se mantuvo a 0,01 mbar durante 3 h con un aumento escalonado de la temperatura, de -25 °C a 25 °C. La etapa final de secado se realizó a 25 °C y 0,05 mbar durante 20 min.

- 30
- 35

Ejemplo 2: Codificación de muestras con "microesferas de codificación de muestras"

Preparación de muestras con microesferas híbridas

Preparación de la resina de filtración en gel

- 40 Se deja hidratar P-2 Bio-Gel Media Extra fino <45 µm (BIO-RAD 150-4118) en H₂O desionizada libre de nucleasas. A continuación, el gel se introduce en una columna de centrifugación vacía (es decir, columnas de centrifugación SigmaPrep™, Sigma-Aldrich SC1000-KT) para obtener un volumen de lecho final de 400 µl. La columna se somete a un breve etapa de centrifugación de 1 min a 1000 ref para eliminar la fase móvil. La columna se lava dos veces con 400 µl de tampón Tris HCl 50 mM pH 8,4 agregando el tampón y, posteriormente, se centrifugan las columnas como se ha descrito anteriormente.

- 45

Lisis de muestras

Tres muestras de 30 µl de sangre total obtenida de un donante sano (Institute of Transfusion Medicine, University Hospital Jena) han sido enriquecidas con 300 cp/µl de virus MS2 (Muestra 1, 2 y 3) y una de las tres muestras (Muestra 1) ha sido enriquecida con el virus AccuPlex HCV Recombinant Sindbis (SeraCare 0505-0036) diluido en diluyente Basematrix Negative (SeraCare 1805-0075), resultando en un título nominal de 5500 cp/µl de muestra.

- 50

Todas las muestras han sido mezcladas por separado con 195 µl de tampón de lisis cada una, conteniendo 4.5 M Guanidinium HCl, 9 % Triton X100, 18 mM de EDTA y 100 mM de Tris HCl pH 8.0. Cada mezcla de lisis se ha incubado a 65 °C, durante 5 minutos.

Filtración en gel para eliminar el HCl de Guanidinio

Inmediatamente después de la lisis, cada mezcla se ha aplicado a la columna P-2. El flujo/filtrado se ha recuperado tras 1 minuto de centrifugación a 1.000 ref en un tubo de reacción nuevo que contenía 200 U de inhibidor de RNasa (biotechrabbit, DE).

5 Unión del analito a las microesferas codificadoras de muestras

Las muestras se asignan a las micropartículas marcadas fluorescentemente como se muestra en la siguiente tabla.

Asignación de muestras a microesferas de codificación de muestras

	Subtipo de codificación de la muestra	HCV	MS2
Muestra 1	0	+	+
Muestra 2	1	-	+
Muestra 3	2	-	+
+ = positivo; - = negativo			

- 10 Las pellas de micropartículas liofilizadas se vuelven a suspender en 70 µl de tampón de unión que contiene ARN (componente 4), y cada conjunto consta de aproximadamente 10.000 nanoreactores disponibles para el análisis de PCR digital. Se deja que absorban el tampón y que se hinchen instantáneamente, proporcionando una matriz funcional porosa 3D de gelatina-agarosa desarrollada para la unión eficaz e inespecífica de ácidos nucleicos y la compatibilidad con la PCR digital. Las muestras individuales se incuban con sus correspondientes microesferas a 15 °C, durante 5 min a 1000 rpm en tubos separados para capturar completamente el HCV y el ARN MS2, lo que resulta en un enriquecimiento de ácidos nucleicos en los nanoreactores.

Lavado de las micropartículas

Se agregaron 200 µl de tampón de lavado (50 mM Tris HCl pH 8,4, 1 U/µl de inhibidor de RNasa) a cada muestra. Tras una breve etapa de vórtex a 12.000 a 16.000 rpm durante 1 segundo, las micropartículas se sedimentan por centrifugación a 300 rcf durante 30 segundos y se elimina el sobrenadante. La fase de lavado se repite 3 veces.

- 20 1. Detección y cuantificación de una diana molecular en diferentes muestras con "Microesferas de codificación de muestras"

Carga de los reactivos en las micropartículas

- 25 Los reactivos para la detección de un analito dentro de los nanorreactores se suministran como pellas liofilizadas que se vuelven a suspender con 100 µl de tampón PCR 1x (componente 7) formando una mezcla de reactivos 2x (componente 8). Los reactivos se vuelven a suspender cuidadosamente mediante una breve etapa de vórtex. Se distribuye un volumen igual de la mezcla de reactivos con respecto a la lechada de microesferas en los recipientes individuales con conjuntos de microesferas de codificación de muestras individuales que han capturado los ARN. Se permite que los reactivos de amplificación y detección se difundan en (y se unan a) la matriz de hidrogel mediante una breve incubación de 5 min a 15 °C mientras se agita a 1000 rpm.

- 30 Componente 7: Tampón PCR (Tris HCl 20 mM, KCl 22 mM, NH₄Cl 22 mM, MgCl₂ 3 mM, pH 8,5)

Componente 2: Mezcla de reactivos (2x)

- 2x Transcriptasa inversa termoestable con inhibidor de ribonucleasas (biotechrabbit GmbH)
- 0,4 U/µl de Hot Start Taq ADN polimerasa (biotechrabbit GmbH)
- 0,8 mM de dNTPs (biotechrabbit GmbH)
- 35 – 0.2 % (p/v) baja carga biológica, libre de proteasas, para biología molecular BSA (Sigma)

Reactivos específicos del analito(HCV)

- 0.8 µM de cebador sentido HCV-Brun (5'-GTGGTCTGCGGAACCGGTGA-3') SEQ ID NO:1

- 0.8 μ M de cebador antisentido *HCV-Brun*(5'-CGCAAGCACCCCTATCAGGCAGT-3') SEQ ID NO:2
- 0.8 μ M de sonda *HCV-Brun* TaqMan (5'-Atto647-CCGAGTAGYGTGGGTYGCGAAAGG-BHQ-2-3') SEQ ID NO:3

Reactivos específicos para el control interno de procedimientos(*MS2*)

- 5
- 0.8 μ M de cebador antisentido *MS2-Nino* (5'-CTCTGAGAGCGGCTCTATTGGT-3') SEQ ID NO:4
 - 0.8 μ M de cebador antisentido *MS2-Nino* (5'-GGTCCCTACAACGAGCCTAAATTC-3') SEQ ID NO:5
 - 0.8 μ M de sonda *MS2-Nino* TaqMan (5'-FAM-TCAGACACGCGGTCCGCTAACGA-BHQ-1-3') SEQ ID NO:6

Emulsificación de micropartículas

- 10 Los conjuntos de nanorreactores individuales se transfieren por separado a una fase no acuosa dispersando las micropartículas en el componente 9 para evitar las interferencias entre las microesferas codificadas por la muestra. Las microesferas se centrifugan a 500 rcf durante 30 s y se desecha el sobrenadante. El lecho de microesferas se pone en contacto con un exceso del componente 9 (200 μ l) utilizando un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. Es necesario aplicar altas fuerzas de cizallamiento para desaglomerar y emulsionar las micropartículas acuosas en el aceite de fluorocarbono en nanorreactores individuales. Las mezclas se agitan mediante la aplicación de ultrasonidos utilizando el Sonifier™ S-450 y el Ultrasonics Sonifier™ Cup Horn (Branson) o simplemente deslizando el tubo sobre los orificios de una gradilla para tubos de microcentrifuga 20 veces a una frecuencia de aproximadamente 20/s mientras se presiona el tubo contra la superficie de la gradilla. Esto aplica tensión mecánica y rompe las fuerzas de atracción entre las micropartículas acuosas y crea tensión superficial formando una suspensión/emulsión. Tanto las micropartículas de hidrogel como el exceso de fase acuosa se emulsionan en la fase oleosa. Las gotitas de tamaño submicrónico que se producen como subproducto se eliminan lavando la emulsión tres veces mediante centrifugación suave (soorcf). El lavado repetido con el mismo aceite (componente 12) elimina esencialmente todas las gotas de líquido indeseables. El componente 12 también proporciona una termoeestabilidad eficaz de la emulsión para la posterior PCR digital en emulsión. Los tres conjuntos de microesferas de codificación de muestras emulsionadas pueden ahora combinarse simplemente en un recipiente (tubo) preparado para la amplificación digital paralela de la señal y la detección de las muestras codificadas.
- 15
- 20
- 25

Componente 9: transferencia de fase & aceite de amplificación de señales

- Aceite de fluorocarbono HFE-7500 (3M Deutschland GmbH) enriquecido con
- 2-5 % (v/v) PicoSurf (Dolomite Microfluidics) O 2-5 % (v/v) FluoSurf (Emulseo) O 2-5 % (v/v) 008-FluoroSurfactant (RAN Biotechnologies)

Reacciones de amplificación PCR digital en paralelo en microesferas de codificación de muestras

- La emulsión monodispersa con la muestra 1, la muestra 2 y la muestra 3 encapsuladas se transfiere a una cámara de detección con un área de aproximadamente 2,5 cm² y un espesor de capa de 100 μ m. La ventana de detección de la cámara está hecha de policarbonato (Makrolon 6555; Covestro AG) de 0,8 mm, mientras que el lado opuesto de la cámara está compuesto por una película de policarbonato (Lexan 8010) transparente de 125 micras, pulida y sin modificar (Koenig Kunststoffe GmbH), que facilita la transferencia eficaz del calor necesario para las reacciones individuales en nanolitros. Los nanorreactores suspendidos en el aceite de fluorocarbono se ven obligados a formar una monocapa debido a las dimensiones de la cámara de reacción. Por tanto, las microesferas proporcionan una matriz espaciada uniformemente de aproximadamente 20.000-30.000 nanorreactores ($\approx$ 7.000-10.000/muestra) para las subsiguientes reacciones paralelas de amplificación de la señal.
- 35
- 40 Las micropartículas se someten a ciclos de temperatura ultrarrápidos utilizando un elemento PELTIER modificado de 30x30x4,7 mm, 19,3 W (Quick-Ohm, Küpper & Co. GmbH, #QC-71-1,4-3,7M) y un modo de control de PCR específico de la cámara establecido. Las condiciones térmicas de RT-PCR aplicadas son Transcripción inversa a 50 °C, durante 10min, desnaturalización inicial a 95 °C, durante 30 s seguida de 30-45 ciclos de una PCR de dos etapas consistente en desnaturalización a 95 °C, durante 2 s e hibridación/alargamiento a 65 °C, durante 5 s.
- 45 Debido a su capacidad de cambio sol-gel, la suspensión se convierte en una emulsión con gotitas individuales de nanolitro líquido. Las amplificaciones dúplex múltiples de HCV y MS2 (control) de diferentes muestras tienen lugar en los compartimentos de nano reacción etiquetados.

- La adquisición automatizada de imágenes se activa con el software BLINK toolbox y se realiza con un microscopio de Revisar todo el documento. fluorescencia (Zeiss AxioObserver) equipado con un objetivo 5x (campo de visión 4,416mm x 2,774mm) y una fuente de luz pE-4000 (CoolLED Ltd.). El microscopio se equipó además con tres juegos de filtros de fluorescencia (Cy5 ET, Cy3 ET, FITC/FAM HC, AHF Analysentechnik) y una plataforma x-y automatizada en la que se montó el termociclador con la cámara de reacción.
- 50

Los ajustes de adquisición de imágenes son los siguientes: 100-1000 ms y ganancia de 1-10x. Se requiere una imagen para la identificación de la etiqueta ($\lambda_{exc} 1 = 580 \text{ nm}$), una imagen para las señales PCR de control interno ($\lambda_{exc} 2 = 470 \text{ nm}$) y una imagen para las señales PCR específicas ($\lambda_{exc} 3 = 635 \text{ nm}$). Para el análisis opcional en tiempo real específico del nanorreactor, se pueden tomar tres imágenes correspondientes a tres canales de fluorescencia en cada ciclo en una posición adecuada de la cámara.

Una vez finalizado el protocolo térmico, se escanea todo el campo de la cámara de detección utilizando el mismo equipo con los ajustes mencionados anteriormente. En total se necesitan 48-56 imágenes para cubrir la dimensión de la cámara de amplificación/detección.

En la **figura 9** se muestra una imagen combinada de la cámara de detección que representa el canal de fluorescencia que codifica la etiqueta de las microesferas. En la imagen ampliada de la parte inferior derecha pueden reconocerse claramente tres microesferas de codificación de muestras diferentes (señal brillante, media y baja). Las microesferas se distribuyen espacialmente en empaquetamiento compacto hexagonal. El número total de todas las microesferas codificadoras de muestras (diámetro medio $d=105 \mu\text{m}$) reconocidas por el algoritmo de software empleado dentro de esta cámara PCR se ha determinado con $N=17,698$.

Descodificación de muestras y análisis de puntos finales

Todas las imágenes adquiridas se someten a un algoritmo de procesamiento de imágenes multifacético automatizado. El procedimiento emplea la segmentación de imágenes que aprovecha las regiones extremas máximamente estables (MSER) para detectar gotas vecinas a partir del resultado de la segmentación de imágenes basada en MSER. En detalle, las imágenes se someten primero a un procesamiento previo que implica un filtro de mediana. En segundo lugar, se aplica el algoritmo MSER al fondo de la imagen para determinar los puntos de inflexión convexos de los contornos del fondo y su triangulación de Delaunay para identificar los cortes adecuados entre las gotas/micropartículas. Además, las gotas/micropartículas se segmentan mediante el algoritmo MSER. Por último, se realiza una comprobación de plausibilidad de los contornos de las gotas/micropartículas (contraste, forma, convexidad). Posteriormente, se recogen las características, incluidas las señales de fluorescencia en cada canal, la posición, el diámetro/volumen, etc. de todas las gotas/micropartículas segmentadas. Los datos del experimento se aplican a un script Jupyter que identifica etiquetas individuales (graduación del colorante Cy3 acoplado) y su respectiva amplificación específica.

La PCR se amplifica hasta un punto final y por tanto se determina el número total de gotas fluorescentes positivas y negativas para cada etiqueta individual. Las gotitas positivas contienen al menos 1 copia de la diana específica y, por tanto, muestran un aumento de la señal de fluorescencia por encima de un umbral de intensidad definido. El valor umbral se deriva de reacciones de amplificación realizadas previamente sin plantilla o se determina en cada experimento mediante estadísticas. Las fracciones negativas y positivas de cada tipo de nanorreactor se agrupan y la fracción de gotitas positivas se ajusta a un algoritmo de Poisson para determinar la concentración inicial de las moléculas de ARN diana en unidades de copias/ μl (copias/ml) de entrada. Dado que el ensayo descrito anteriormente proporciona una detección simultánea del HCV en 3 muestras diferentes, los reactores se agrupan en 6 grupos:

Grupo de datos de puntos finales de PCR digital.

Grupo	Muestra	Tipo de microesfera de codificación de muestra (etiqueta)	ARN de HCV	ARN del fago MS2
1	Muestra 1	0	Positivo	Pase
2			Negativo	
3	Muestra 2	1	Positivo	Pase
4			Negativo	
5	Muestra 3	2	Positivo	Pase
6			Negativo	

En la **figura 10A** se muestran imágenes de fluorescencia de micropartículas híbridas de agarosa-gelatina etiquetadas con color después de la amplificación por PCR. Se pueden reconocer tres etiquetas por la intensidad de su fluorescencia en el canal 1. El canal 2 representa las señales de fluorescencia para el control interno del procedimiento (fago MS2) y el canal 3 representa la fluorescencia específica para la amplificación por PCR de la

diana del HCV. Cada etiqueta corresponde a una muestra diferente que ha sido procesada y analizada. La figura 10B (gráfico superior) muestra los histogramas de la intensidad de fluorescencia determinada para las diferentes microesferas. Se encuentran tres especies de etiquetas distintas. En los gráficos central e inferior se muestran los diagramas de violín que representan la distribución de la señal encontrada en las respectivas especies de microesferas para el canal 2 (MS2) y los canales (3). Aplicando el análisis de Poisson, los números encontrados se traducen en un número de copias específico por volumen de muestra (cp/μl) aplicado a las microesferas.

Ejemplo 3: Capacidad de unión del ARN de las microesferas híbridas de agarosa-gelatina

La unión del ARN se examina para diversas microesferas híbridas que consisten en diversas concentraciones de diferentes gelatinas y agarosa A4018. El ARN unido a las micropartículas se midió cualitativamente utilizando un ensayo de tinción de ARN o cuantitativamente utilizando el formato de PCR digital descrito anteriormente.

Preparación de las microesferas

Las micropartículas se generaron como se ha descrito anteriormente con las siguientes desviaciones:

- Se omitió la fracción etiquetada de gelatina, con lo que se obtuvieron micropartículas no etiquetadas
- Las soluciones de hidrogel híbrido para la generación de micropartículas consistían en diferentes concentraciones de agarosa y gelatina, a saber:
 - a) 1,3 % de gelatina, 1,0 % de agarosa
 - b) 0,5 % de gelatina, 0,5 % de agarosa
 - c) 1,3 % de gelatina, 0,5 % de agarosa
 - d) 2,0 % de gelatina, 0,5 % de agarosa
 - e) 4,0 % de gelatina, 0,5 % de agarosa
- Para la fabricación de micropartículas se utilizaron dos tipos diferentes de gelatina de dos productores cada uno, a saber:
 - GELITA Imagen AP (tipo A)
 - GELITA Imagen SI (tipo B)
 - fracción insoluble en acetona de G1890 (Sigma, tipo A)
 - fracción insoluble en acetona de G9391 (Sigma tipo B)

Ensayo de unión a ARN RiboGreen

Los pocillos de las placas de microtitulación UV-Star (Greiner) se llenan con 3 μl de una mezcla de microesferas al 50 % en un tampón de unión 1X (componente 4). Concentraciones finales de 1 ng/μl de ARN de diferentes preparaciones, a saber, un ARN-espaciador (Metabion), un ARNt de levadura de cerveza (Roche Diagnostic) y un ARN total extraído de sangre se incuban a 15 °C, durante 5-10 min permitiendo que el ARN penetre en/sobre la matriz porosa de hidrogel y se una. Dado que la unión se produce rápidamente, es crucial mezclar directamente después de agregar el ARN a las microesferas para conseguir una distribución homogénea del ARN en las microesferas.

Para visualizar el ARN unido a las micropartículas híbridas, se pipetea 0,5 μl de una alícuota de reactivo de ARN Quant-iT™ RiboGreen® diluido 1:2 en los pocillos de microtitulación y se mezclan. Las microesferas se lavaron dos veces con 200 μl de tampón TE y su señal de fluorescencia se midió posteriormente utilizando un microscopio de fluorescencia (Zeiss AxioObserver) y una fuente de luz pE-4000 (CoolLED Ltd.).

La figura 11 ilustra que los ajustes en la composición de las micropartículas permiten optimizar las características de unión. La gelatina GELITA Imagen A en combinación con A4018 produce señales RiboGreen relativamente bajas en las microesferas en comparación con la fracción insoluble en acetona de la gelatina G1890 tipo A de Sigma. El ARN total, el ARNt y el fragmento corto de ARN pueden unirse en mayor medida con microesferas híbridas hechas de >1,3 % de gelatina en combinación con 0,5 % de agarosa. En combinación con agarosa al 1 %, también se obtienen mejores señales para los ARN analizados (faltan los resultados de las muestras de ARN total). La gelatina de tipo B se comporta de forma diferente a la de tipo A en lo que respecta al enriquecimiento del ARN en las microesferas. Mientras que casi no hay señales visibles para ninguna de las microesferas de gelatina GELITA SI para ninguno de los ARN (lo que significa sólo difusión en la partícula pero sin enriquecimiento), las microesferas hechas de la fracción insoluble en acetona de la gelatina G9391 tipo B muestran señales RiboGreen aunque éstas

son débiles para el espaciador 1 del ARN y el ARNt. El ARN total global, el ARNt y el fragmento corto de ARN pueden unirse en mayor medida con microesferas híbridas hechas de >1,3 % de gelatina en combinación con 0,5 % de agarosa.

- 5 **La figura 12** muestra la unión del ARN total de levadura a lo largo del tiempo a micropartículas visualizadas con el reactivo de ARN Quant-iT™ RiboGreen®. El formato del ensayo también permite el seguimiento directo de la unión del ARN a las micropartículas. Se han adquirido imágenes cada 6 s y se puede medir directamente el aumento de la señal RiboGreen.

Cuantificación de la unión del ARN mediante PCR digital

- 10 Para la evaluación cuantitativa de la capacidad de unión de ARN de las micropartículas según la invención se realizó PCR digital dentro de los nanoreactores como se ha descrito anteriormente. La capacidad de las micropartículas para pasar de una partícula solidificada a una gotita líquida permite proporcionar tanto la matriz de unión como la de detección de PCR digital. De este modo, las moléculas de ARN del HCV unidas pueden medirse directamente en las microesferas. Alternativamente, el sobrenadante puede medirse en formato digital utilizando el cartucho DG8 (Bio-Rad) para la generación de gotas.

- 15 Se agregaron 40 µl de tampón de unión (componente 4) conteniendo ARN de HCV Accuplex purificado (QIAamp Viral RNA Mini Kit) (Seracare Life Sciences Inc.) a 40 µl de un lecho de microesferas y se incubaron a 15 °C, durante 5 min a 1000 rpm para unir el ARN. A continuación, las microesferas se centrifugaron a 300xg durante 30 s y el sobrenadante se conservó en hielo para su posterior análisis. se agregan 40 µL de la mezcla de reactivos 2x (componente X) al lecho de microesferas (40 µl) y los reactivos de amplificación y detección se difunden en la matriz de hidrogel mediante una breve incubación de 5 min a 15 °C mientras se agita a 1000 rpm.

Componente X: Mezcla de reactivos (2x)

- 2x Transcriptasa inversa termoestable con inhibidor de ribonucleasas (biotechrabbit GmbH)
- 0,4 U/µl de Hot Start Taq ADN Polimerasa (biotechrabbit GmbH)
- 0,8 mM de dNTPs (biotechrabbit GmbH)
- 25 – 0.2 % (p/v) de baja carga biológica, sin proteasas, para biología molecular BSA (Sigma) Reactivos específicos para el analito (HCV)
- 0.8 µM de cebador sentido HCV-Brun (5'-GTGGTCTGCGGAACCGGTGA-3') SEQ ID NO:1
- 0.8 µM de cebador antisentido HCV-Brun (5'-CGCAAGCACCTATCAGGCAGT-3') SEQ ID NO:2
- 30 – 0.8 µM de Sonda HCV-Brun TaqMan (5'-Atto647-CCGAGTAGYGTTGGGTGCGAAAGG-BHQ-2-3') SEQ ID NO:3

- 35 La transferencia de la fase de microesferas, la reacción de amplificación y el análisis se realizan como se ha descrito anteriormente. El sobrenadante (40 µl) se complementa con reactivos PCR (40 µl de mezcla de reactivos 2x) y posteriormente se emulsiona utilizando el cartucho DG8 (Bio-Rad). se aplican 100 µl del reactivo de emulsión HFE-7500 que contiene 2-5 % de Picosurf 2 (Sphere Fluidics) y 40 µl en los pocillos inferiores del cartucho. Se aplica vacío en el pocillo de recogida tirando suavemente de una jeringa conectada al pocillo. Las gotitas se recogen y se transfieren a una cámara de detección separada para su análisis digital. Los ajustes para la reacción de amplificación y el análisis de las gotitas son idénticos a los ajustes para las microesferas. Asimismo, se emulsiona y analiza una muestra de referencia compuesta por volúmenes iguales de mezcla de reactivos 2x y de tampón PCR.

- 40 **La figura 13** muestra datos resumidos sobre estos experimentos que fueron diseñados para evaluar la capacidad de enriquecimiento de dos composiciones diferentes de micropartículas. Los puntos negros indican la concentración diana en la muestra antes de la incubación con las micropartículas. Las columnas blancas representan la concentración diana detectada tras la incubación en el sobrenadante, las columnas grises la concentración diana en las micropartículas. El efecto de enriquecimiento es claramente visible.

- 45 **La figura 14** muestra la precisión del enfoque combinado de análisis PCR cuantitativo digital y en tiempo real, descrito más arriba, para la cuantificación de dianas en micropartículas. Se muestran los intervalos de confianza para ambos procedimientos. La línea vertical en $\lambda=5$ cp/micropartícula (cp=copias) indica el valor aproximado en el que los procedimientos pueden utilizarse indistintamente ("CI"= intervalo de confianza).

- 50 **La figura 15** muestra datos de fluorescencia en tiempo real obtenidos a partir de una serie de imágenes recogidas en micropartículas en aceite durante la amplificación PCR. A la izquierda se muestra una imagen combinada de una cámara de detección con la señal de fluorescencia del punto final detectada en un canal de fluorescencia

específico para la amplificación. El gráfico del centro muestra de forma ejemplar la intensidad de fluorescencia de 12 micropartículas individuales representativas seleccionadas de la imagen de fluorescencia de la izquierda a lo largo del tiempo. En el histograma de la derecha se muestra una distribución de los valores ct calculados para cada micropartícula detectada en la imagen de fluorescencia.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección y/o cuantificación de un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos, dicho procedimiento comprende una parte de proceso específica de la muestra, seguida de una parte de proceso genérica; dicha parte de procedimiento específica de la muestra comprende las siguientes etapas:

- proporcionar por separado, en cualquier orden, una pluralidad de muestras líquidas biológicas diferentes que se han tomado y se sospecha que contienen un analito de interés, y una pluralidad de subconjuntos de micropartículas porosas etiquetadas de forma diferente, en los que, en dicha pluralidad de subconjuntos, cada uno de dichos subconjuntos está separado de los demás subconjuntos;

- etiquetar específicamente cada una de dichas muestras biológicas diferentes exponiendo por separado cada uno de dichos subconjuntos separados de micropartículas a una muestra de líquidos biológicos cada uno, permitiendo así que cada muestra sea absorbida por un subconjunto específicamente etiquetado de micropartículas porosas en un medio acuoso;

- transferir por separado cada subconjunto de micropartículas porosas de dicho medio acuoso a un medio no acuoso;

dicha parte del procedimiento genérico que comprende las etapas:

- mezclar los subconjuntos de micropartículas porosas etiquetadas de forma diferente en dicho medio no acuoso y generar así una suspensión de una pluralidad de subconjuntos de micropartículas porosas etiquetadas de forma diferente;

- realizar una reacción de detección para detectar dicho analito de interés, en dicha suspensión de dicha pluralidad de subconjuntos de micropartículas porosas etiquetadas de forma diferente; y

- detectar y/o cuantificar dicho analito de interés, si está presente, en cualquiera de dichos subconjuntos de micropartículas en suspensión etiquetadas de forma diferente;

en el que cada una de dichas micropartículas porosas tiene una matriz porosa que permite acumular el analito de interés uniéndose al analito mediante:

(i) un polímero o mezcla de polímeros que forma o es dicha matriz porosa; o

(ii) al menos un grupo ionizable, o una pluralidad de grupos ionizables, inmovilizados en dicha matriz porosa, siendo dicho(s) grupo(s) ionizable(s) capaz(s) de cambiar su(s) carga(s) en función de las condiciones ambientales que rodeen a dicha(s) micropartícula(s); o bien

(iii) al menos un grupo cargado, o una pluralidad de grupos cargados inmovilizados en dicha matriz porosa; o

(iv) una combinación de cualquiera de i) a iii).

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que, en dicha etapa de exponer por separado cada uno de dichos subconjuntos separados de micropartículas a una muestra biológica líquida cada uno, cada uno de dichos subconjuntos separados de micropartículas se expone, en cualquier orden, a una muestra biológica cada uno y a una composición de detección para realizar una reacción de detección química o bioquímica, de tal manera que cada subconjunto de micropartículas toma la muestra biológica respectiva y la composición de detección a la que ha sido expuesto.

3. El procedimiento de detección y/o cuantificación de un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

a. una etapa en la que se proporcionan por separado, en cualquier orden, una pluralidad de muestras separadas de líquido biológico sospechosas de contener un analito de interés, y una pluralidad de micropartículas porosas; cada una de dichas micropartículas porosas tiene una matriz porosa y está configurada para recibir un volumen de líquido en dicha matriz porosa; en la que, en dicha pluralidad de micropartículas porosas, se proporcionan diferentes subconjuntos de micropartículas, cada subconjunto de micropartículas **caracterizado por** un componente de etiqueta específico está fijado a, contenido en o asociado de otro modo al subconjunto respectivo; en el que en dicha etapa de proporcionar, el número de subconjuntos diferentes de micropartículas proporcionados es al menos tan grande como el número de muestras de líquidos biológicos separadas proporcionadas, y en el que además en dicha etapa de proporcionar, los diferentes subconjuntos de micropartículas se suministran separados entre sí; en el que,

opcionalmente, dichos diferentes subconjuntos separados de micropartículas contienen en su respectiva matriz porosa una composición de detección que comprende reactivos para realizar una reacción de detección química o bioquímica de un analito;

b. una etapa de exposición de cada subconjunto separado de micropartículas a exactamente una muestra de líquidos biológicos separada, permitiendo así que cada subconjunto separado de micropartículas se incube con un volumen de exactamente una muestra de líquidos biológicos separada y tome tal muestra o una porción de la misma, y, opcionalmente, acumule analito, si está presente en dicha muestra, en o sobre la matriz de la(s) micropartícula(s); y, además, opcionalmente, en caso de que dichos subconjuntos separados de micropartículas, cuando se proporcionan en la etapa a), aún no comprendan reactivos para realizar una reacción de detección química o bioquímica de un analito, una etapa de exposición de cada subconjunto separado de micropartículas a una composición de detección que comprenda reactivos para realizar una reacción de detección química o bioquímica de un analito, permitiendo así que cada subconjunto separado de micropartículas reciba dichos reactivos;

c. transferir cada subconjunto de micropartículas por separado a una fase no acuosa y eliminar una parte o la totalidad de la fase acuosa que rodea a la micropartícula o micropartículas prefabricadas individuales de dicho subconjunto o subconjuntos, creando así una pluralidad de subconjuntos separados de espacios de reacción aislados para detectar dicho analito, cuyos espacios de reacción comprenden una fase acuosa que incluye la muestra y dichos reactivos para realizar una reacción de detección química o bioquímica de un analito, y cuyos espacios de reacción están confinados en dicho volumen o volúmenes vacíos de dichas micropartículas;

d. mezclar los diferentes subconjuntos de micropartículas separados en dicha fase no acuosa, de manera que todos dichos subconjuntos diferentes de micropartículas formen una suspensión de micropartículas diferentes en dicha fase no acuosa; someter dichos subconjuntos diferentes de micropartículas mezclados a las condiciones requeridas para realizar una reacción de detección química o bioquímica de un analito; realizar tal reacción de detección de dicho analito de interés; y detectar y/o cuantificar dicho analito de interés, si está presente, en cualquiera de dichos subconjuntos diferentes de micropartículas, mediante una señal generada en dicha reacción de detección en un subconjunto respectivo de micropartículas, si dicho analito de interés está presente en dicho subconjunto respectivo.

4. El procedimiento según la reivindicación 3, dicho procedimiento comprende además la etapa

e) determinar qué muestra(s) de dicha pluralidad de muestras proporcionadas en la etapa a) contiene(n) dicho(s) analito(s) de interés mediante la determinación de la identidad del subconjunto(s) de micropartículas en las que se detecta dicho analito de interés en la etapa d), en el que, preferentemente, la identidad del subconjunto(s) de micropartículas en la etapa e) se determina mediante el componente de etiqueta específico que está fijado a, contenido en o asociado de otro modo con el subconjunto respectivo de micropartícula(s).

5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, en el que la etapa b) comprende además una subetapa de generación de un primer registro de correlación que indica qué subconjunto separado de micropartículas está o ha estado expuesto a qué muestra, y la etapa d) comprende una subetapa de generación de un segundo registro de correlación que indica en qué subconjunto de micropartículas se ha generado una señal en dicha reacción de detección.

6. El procedimiento según las reivindicaciones 4-5, en el que la etapa e) se realiza por referencia a dichos primer y segundo registros de correlación y vinculando dichos registros, permitiendo así determinar qué muestra(s) de dicha pluralidad de muestras proporcionadas en la etapa a) contiene(n) dicho analito de interés.

7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que cada una de dichas micropartículas porosas tiene una matriz porosa y comprende un reactivo específico de analito (ASR) que está fijado a dicha matriz porosa o contenido por dicha micropartícula, permitiendo dicho reactivo específico de analito una señal específica o reacción de amplificación de diana que implica dicho analito; en el que dicho reactivo específico del analito es capaz de unirse específicamente a un analito de interés, en el que, preferentemente, el reactivo específico del analito se selecciona entre ácidos nucleicos, incluidos aptámeros, espejelmeros, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos; proteínas no anticuerpo capaces de unirse específicamente a un analito o complejo de analito, tales como receptores, fragmentos de receptores y proteínas de afinidad; en el que, preferentemente, dicho reactivo específico del analito se selecciona entre ácidos nucleicos, en particular oligómeros de ácido nucleico y cebadores de ácido nucleico.

8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que cada una de dichas micropartículas porosas contiene o tiene el mismo reactivo específico del analito fijado a su matriz porosa.

9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que, en dicha pluralidad de micropartículas porosas, hay diferentes subconjuntos de micropartículas,

con cada subconjunto

- que tenga su componente de etiqueta distintivo fijado a, contenido en o asociado de otro modo a dichas micropartículas de dicho subconjunto; y

todos esos subconjuntos diferentes que tienen

- 5 - el mismo reactivo específico del analito fijado a o contenido en dichas micropartículas de dichos subconjuntos, siendo dicho reactivo específico del analito, específico para un analito de interés;

de tal manera que dichos subconjuntos diferentes de micropartículas sean idénticos en cuanto al reactivo específico del analito fijado o contenido, pero difieran por

- 10 - el componente de etiqueta respectivo fijado a, contenido en o asociado de otro modo a dichas micropartículas de cada subconjunto;

siendo cada subconjunto definido de forma inequívoca e identificable por dicho componente de etiqueta respectivo.

- 15 10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, o según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que dicho procedimiento es un procedimiento de detección y/o cuantificación de un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos, en el que el número de subconjuntos diferentes de micropartículas proporcionados, preferentemente proporcionados en la etapa a), es igual al número de muestras de líquidos biológicos separadas proporcionadas.

11. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que, en dicha pluralidad de micropartículas porosas, hay varios reactivos específicos de analito diferentes fijados o contenidos en dichas micropartículas.

- 20 12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que hay diferentes subconjuntos de micropartículas,

con cada subconjunto

- que tenga su componente de etiqueta distintivo fijado a, contenido en o asociado de otro modo a dichas micropartículas de dicho subconjunto; y

- 25 en la que además, en dicha pluralidad de micropartículas porosas, hay diferentes clases de subconjuntos de micropartículas con cada clase de subconjuntos

- que tienen un reactivo específico de analito diferente fijado a la matriz porosa de dichas micropartículas o contenido en dichas micropartículas; en el que, preferentemente, hay al menos dos clases diferentes de subconjuntos de micropartículas, más preferentemente al menos tres o más clases diferentes de subconjuntos de micropartículas;

- 30 de tal manera que los distintos subconjuntos de micropartículas se diferencien por el componente de etiqueta respectivo fijado a, contenido en o asociado de otro modo a las micropartículas de cada subconjunto; y cada subconjunto de micropartículas forme parte de una clase de subconjuntos de micropartículas; siendo cada subconjunto inequívocamente definido e identificable por el componente de etiqueta respectivo y el reactivo específico del analito respectivo; y

- 35 de tal manera que dichas clases diferentes de subconjuntos de micropartículas se diferencian por el respectivo reactivo específico del analito fijado o contenido; y cada una de dichas clases diferentes comprende varios subconjuntos de micropartículas, todos los cuales tienen el mismo reactivo específico del analito fijado o contenido.

- 40 13. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11- 12, en el que dicho procedimiento es un procedimiento de detección y/o cuantificación de más de un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos, en el que, el número de subconjuntos diferentes de micropartículas proporcionados, preferentemente proporcionados en la etapa a), es igual al número de muestras de líquidos biológicos separadas proporcionadas, multiplicado por el número de analitos de interés que deben detectarse, y en el que hay tantas clases de subconjuntos de micropartículas proporcionados, preferentemente proporcionados en la etapa a), como
- 45 el número de analitos de interés que deben detectarse.

- 50 14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 - 13, en el que dicha matriz porosa es una matriz polimérica porosa formada por un polímero o mezcla de polímeros, en el que, preferentemente, dicha matriz polimérica porosa está compuesta por un polímero (o polímeros) que no está(n) reticulado(s), en el que, más preferentemente, dicho polímero o mezcla de polímeros que forma dicha matriz polimérica porosa, está compuesta por agarosa o una combinación de agarosa y gelatina, en el que, más preferentemente, en dicha combinación de

agarosa y gelatina, dicha agarosa está presente en un intervalo desde 0,1 % (p/v) a 4% (p/v), y dicha gelatina está presente en un intervalo desde 0,1 % (p/v) a 20 % (p/v), preferentemente desde 0,5 % (p/v) a 20 % (p/v).

15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 - 14, en el que dicho analito de interés es un ácido nucleico, dicha reacción de detección es una amplificación de ácido nucleico, y dicha composición de detección es una composición para realizar una amplificación de ácido nucleico que comprende un tampón, mononucleósido-trifosfatos, una enzima de amplificación, tal como una polimerasa de ácido nucleico adecuada, por ejemplo, Taq polimerasa, y un colorante de ácido nucleico para la detección de un producto de amplificación, tal como un ácido nucleico amplificado, y, opcionalmente, uno o más pares de cebadores de amplificación y, además opcionalmente, sondas moleculares respectivas (por ejemplo, Sondas TaqMan, balizas moleculares, etc.), si tales cebadores y/o sondas no se proporcionan ya como reactivo(s) específico(s) de analito (ASR) que se fijan a dichas micropartículas o están contenidos en las mismas; Y/O

en el que dicho analito de interés es una proteína u otra molécula de ácido no nucleico, dicha reacción de detección es una reacción de detección inmunoquímica, y tal composición de detección es una composición para realizar dicha reacción de detección inmunoquímica y se proporciona en dicho procedimiento como dos componentes separados: en el que un primer componente de dicha composición de detección comprende los reactivos necesarios para realizar una reacción de detección inmunoquímica, tales como un tampón, y un anticuerpo secundario o fragmento de anticuerpo secundario acoplado a una enzima indicadora adecuada y que sea específico para el mismo analito que un anticuerpo primario, fragmento de anticuerpo o proteína no anticuerpo, utilizado como reactivo específico del analito (ASR) en dicha reacción de detección inmunoquímica; y, opcionalmente, un anticuerpo primario, fragmento de anticuerpo, o una proteína no anticuerpo capaz de unirse específicamente a dicho analito proteico u otro analito de ácido no nucleico, si dicho anticuerpo primario, fragmento de anticuerpo, o proteína no anticuerpo no se proporciona ya como reactivo(s) específico(s) de analito (ASR) estando fijado a o contenido en dichas micropartículas; y en el que un segundo componente de dicha composición de detección comprende, como reactivo de detección, un sustrato adecuado para dicha enzima indicadora adecuada cuyo sustrato, tras haber reaccionado con dicha enzima indicadora, se hace detectable, preferentemente detectable ópticamente, más preferentemente detectable por fluorescencia.

16. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, en dicha etapa de detección y cuantificación de dicho analito de interés, la cuantificación de dicho analito se realiza mediante un procedimiento seleccionado entre:

- a) amplificación digital de ácidos nucleicos, en particular reacción en cadena de la polimerasa (PCR) digital;
- b) amplificación cuantitativa de ácidos nucleicos en tiempo real, en particular reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real;
- c) procedimientos de detección inmunoquímica, en particular procedimientos de detección inmunoquímica digital, tales como inmunoensayos digitales, por ejemplo ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas digitales (ELISA);
- d) procedimientos de detección inmunoquímica, en particular procedimientos de detección inmunoquímica digital, combinados con la amplificación de ácidos nucleicos, tales como la inmunorreacción en cadena de la polimerasa; en particular la inmuno-PCR digital; y
- e) una combinación de cualquiera de las letras a) a d);

en la que la cuantificación se realiza utilizando cualquiera de los procedimientos a) o b), o una combinación de a) y b), si el analito de interés es un ácido nucleico; y en la que la cuantificación se realiza utilizando cualquiera de los procedimientos c) o d), si el analito es una proteína, péptido u otro analito no ácido nucleico.

17. Un kit para detectar un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos, en particular para realizar el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 16, dicho kit comprende:

- una pluralidad de recipientes que comprenden una pluralidad de micropartículas, cada recipiente que comprende un subconjunto de dicha pluralidad de micropartículas porosas, teniendo cada una de dichas micropartículas porosas dentro de cada subconjunto una matriz porosa y estando configurada para recibir un volumen de líquido en dicha matriz porosa; cada subconjunto de micropartículas **caracterizado por** un componente de etiqueta específico está fijado a, contenido en o asociado de otro modo al subconjunto respectivo, en el que, preferentemente, dichas micropartículas son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 16; opcionalmente, un recipiente que comprende un reactivo de lavado acuoso para lavar dichas micropartículas;
- un recipiente que comprende una composición de detección para detectar un analito de interés; dicha composición de detección contiene reactivos para realizar una reacción de detección química o

bioquímica de un analito; en la que dicha composición de detección es una composición para realizar una amplificación de ácido nucleico, o es una composición para realizar una reacción de detección inmunoquímica;

5 - un recipiente que comprenda una fase no acuosa para transferir dichos subconjuntos diferentes de micropartículas a una fase no acuosa, una vez que cada subconjunto haya sido expuesto a una muestra de líquidos biológicos, y para generar suspensiones diferentes separadas de subconjuntos de micropartículas en una fase no acuosa;

10 - un recipiente mezclador para mezclar las diferentes suspensiones separadas de subconjuntos de micropartículas en dicha fase no acuosa, de tal manera que todas dichas suspensiones diferentes de subconjuntos de micropartículas formen una única suspensión de micropartículas diferentes en dicha fase no acuosa que se somete entonces a una reacción de detección;

- un recipiente para realizar una reacción de detección.

18. El kit según la reivindicación 17, en el que cada una de dichas micropartículas porosas tiene un reactivo específico de analito (ASR) fijado a su matriz porosa o contiene un reactivo específico de analito (ASR), tal reactivo específico de analito que permite una señal específica o reacción de amplificación que implica dicho analito; en el que dicho reactivo específico de analito es capaz de unirse específicamente a un analito de interés, en el que, preferentemente, dicho reactivo específico de analito se selecciona de ácidos nucleicos, incluyendo aptámeros, espieglmeros; anticuerpos o fragmentos de anticuerpos; proteínas no anticuerpo capaces de unirse específicamente a un analito o complejo de analito, tal como receptores, fragmentos de receptores y proteínas de afinidad; en los que, preferentemente, dicho reactivo específico de analito se selecciona entre ácidos nucleicos, en particular oligómeros de ácido nucleico y cebadores de ácido nucleico.

19. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 - 18, en el que dicho analito de interés es un ácido nucleico, dicha reacción de detección es una amplificación de ácido nucleico, y dicha composición de detección es una composición para realizar una amplificación de ácido nucleico que comprende un tampón, mononucleósido-trifosfatos, una enzima de amplificación, tal como una polimerasa de ácido nucleico adecuada, por ejemplo, Taq polimerasa, y un colorante de ácido nucleico para la detección de un producto de amplificación, tal como un ácido nucleico amplificado, y, opcionalmente, un par de cebadores, si dicho par de cebadores no se proporciona ya como reactivo(s) específico(s) de analito (ASR) que se une(n) a dichas micropartículas o está(n) contenido(s) en las mismas; O en el que dicho analito de interés es una proteína u otra molécula de ácido no nucleico, dicha reacción de detección es una reacción de detección inmunoquímica, y dicha composición de detección es una composición para realizar tal reacción de detección inmunoquímica y se proporciona en dicho kit en dos compartimentos o recipientes separados; en la que dicha composición de detección comprende, en un primer compartimento o recipiente, los reactivos necesarios para realizar una reacción de detección inmunoquímica, tales como un tampón, y un anticuerpo secundario o fragmento de anticuerpo secundario acoplado a una enzima indicadora adecuada y que sea específico para el mismo analito que un anticuerpo primario, fragmento de anticuerpo o proteína no anticuerpo, utilizado como reactivo específico del analito (ASR) en dicha reacción inmunoquímica; y, opcionalmente, un anticuerpo primario, fragmento de anticuerpo, o una proteína no anticuerpo capaz de unirse específicamente a dicho analito proteico u otro analito de ácido no nucleico, si dicho anticuerpo primario, fragmento de anticuerpo, o proteína no anticuerpo no se proporciona ya como reactivo(s) específico(s) de analito (ASR) estando fijado a o contenido en dichas micropartículas; y en la que dicha composición de detección comprende, en un segundo compartimento o recipiente, como reactivo de detección, un sustrato adecuado para dicha enzima indicadora adecuada, sustrato que, al reaccionar con dicha enzima indicadora, se vuelve detectable, preferentemente detectable ópticamente, y más preferentemente detectable por fluorescencia.

20. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 - 19, en el que cada una de dichas micropartículas porosas tiene el mismo reactivo específico del analito fijado a su matriz porosa o contiene el mismo reactivo específico del analito.

21. El kit según la reivindicación 20, en el que, en dicha pluralidad de micropartículas porosas, hay diferentes subconjuntos de micropartículas,

con cada subconjunto

50 - que tenga su componente de etiqueta distintivo fijado a, contenido en o asociado de otro modo a dichas micropartículas de dicho subconjunto; y

todos esos subconjuntos diferentes que tienen

- el mismo reactivo específico del analito fijado a o contenido en dichas micropartículas de dichos subconjuntos, siendo dicho reactivo específico del analito, específico para un analito de interés;

de tal manera que dichos subconjuntos diferentes de micropartículas sean idénticos en cuanto al reactivo específico del analito fijado o contenido, pero difieran por

- el componente de etiqueta respectivo fijado a, contenido en o asociado de otro modo a dichas micropartículas de cada subconjunto;

5 estando cada subconjunto inequívocamente definido e identificable por dicho componente de etiqueta respectivo y proporcionándose en un envase separado.

22. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 20 - 21, en el que dicho kit es un kit para detectar un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos, en el que el número de subconjuntos diferentes de micropartículas proporcionados en dicho kit es igual al número de muestras de líquidos biológicos separadas
10 proporcionadas.

23. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 - 19, en el que, en dicha pluralidad de micropartículas porosas, hay varios reactivos específicos de analito diferentes fijados o contenidos en dichas micropartículas.

24. El kit según la reivindicación 23, en el que hay diferentes subconjuntos de micropartículas,

con cada subconjunto

15 - que tenga su componente de etiqueta distintivo fijado a, contenido en o asociado de otro modo a dichas micropartículas de dicho subconjunto; y

en la que además, en dicha pluralidad de micropartículas porosas, hay diferentes clases de subconjuntos de micropartículas con cada clase de subconjuntos

20 - que tienen un reactivo específico de analito diferente unido a la matriz porosa de dichas micropartículas o contenido en dichas micropartículas; en el que, preferentemente, hay al menos dos clases diferentes de subconjuntos de micropartículas, más preferentemente al menos tres o más clases diferentes de subconjuntos de micropartículas;

25 de manera que los distintos subconjuntos de micropartículas se diferencien por el componente de etiqueta respectivo fijado a, contenido en o asociado de otro modo a dichas micropartículas de cada subconjunto; y cada subconjunto de micropartículas forme parte de una clase de subconjuntos de micropartículas; y cada subconjunto se defina e identifique inequívocamente por el componente de etiqueta respectivo y el reactivo específico del analito respectivo, y se proporcione en un recipiente separado; y

30 de tal manera que dichas clases diferentes de subconjuntos de micropartículas se diferencian por el respectivo reactivo específico del analito fijado a la matriz porosa de dichas micropartículas o contenido en dichas micropartículas; y cada una de dichas clases diferentes comprende varios subconjuntos de micropartículas, todos los cuales tienen el mismo reactivo específico del analito fijado o contenido.

25. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 23 - 24, en el que dicho kit es un kit para detectar más de un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos, en el que, el número de subconjuntos diferentes de micropartículas proporcionados en dicho kit es igual al número de muestras de líquidos biológicos separadas proporcionadas, multiplicado por el número de analitos de interés que deben detectarse, y en el que, en dicho kit, hay tantas clases de subconjuntos de micropartículas proporcionadas como el número de analitos de
35 interés que deben detectarse.

26. Un cartucho para realizar un procedimiento de detección y/o cuantificación de un analito de interés en una pluralidad de muestras de líquidos biológicos según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 16, en el que dicho cartucho comprende una pluralidad de módulos específicos de muestra, una pluralidad de cámaras de almacenamiento, al menos una cámara de fase no acuosa para almacenar una fase no acuosa, y una única cámara combinada de mezcla y detección, o una combinación de una cámara de mezcla separada y una cámara de detección separada; en el que cada módulo específico de muestra comprende un compartimento de muestra que tiene su propia entrada de muestra separada, estando configurado cada módulo específico de muestra para recibir
40 por separado exactamente una sola muestra biológica, en el respectivo compartimento de muestra; estando configurado además cada módulo específico de muestra para recibir micropartículas en dicho compartimento de muestra, siendo dichas micropartículas como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 16; estando configurado además cada módulo específico de muestra para facilitar una transferencia de fase de dichas micropartículas desde un medio acuoso a un medio no acuoso.

50

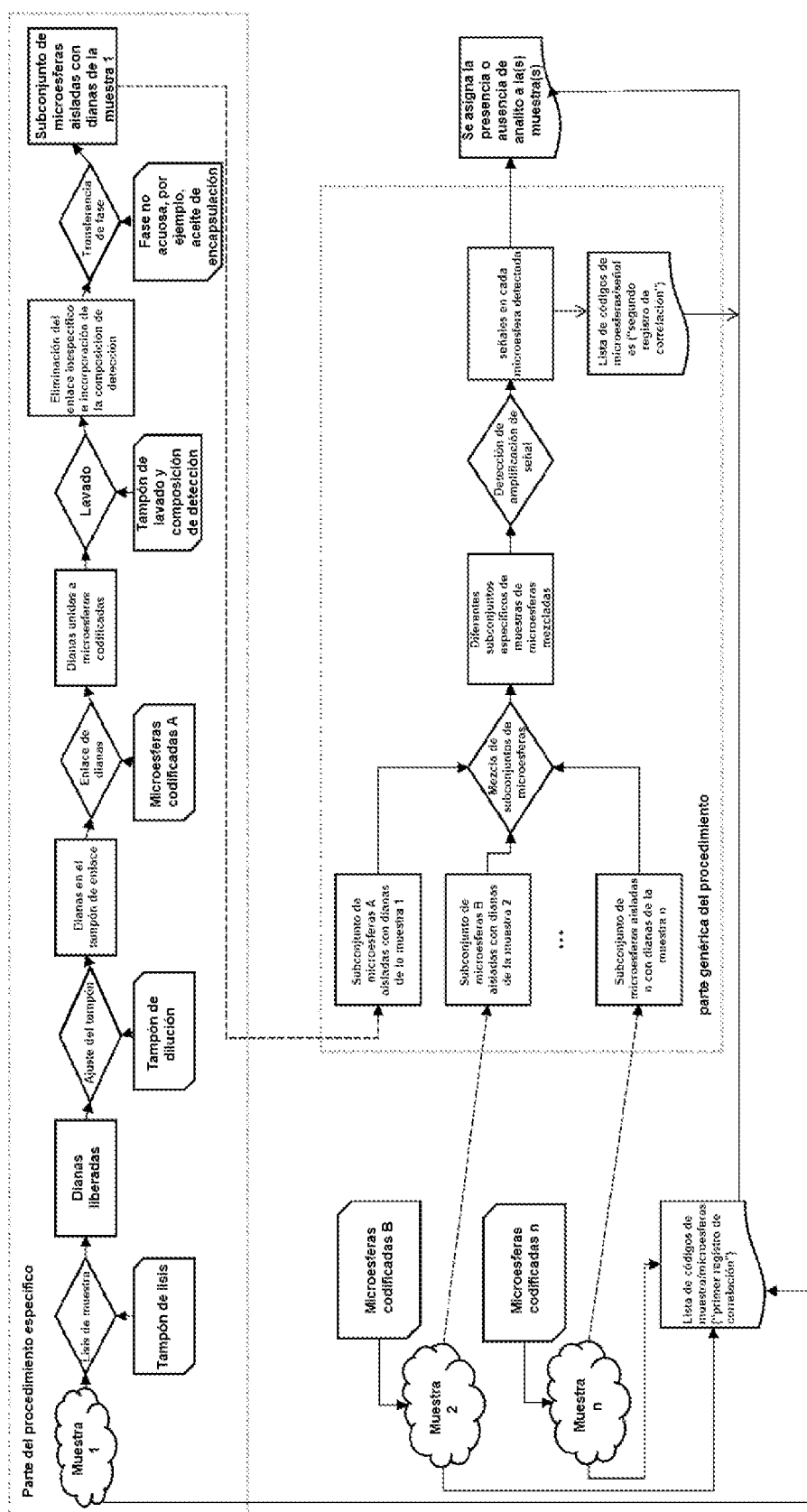


Figura 1A

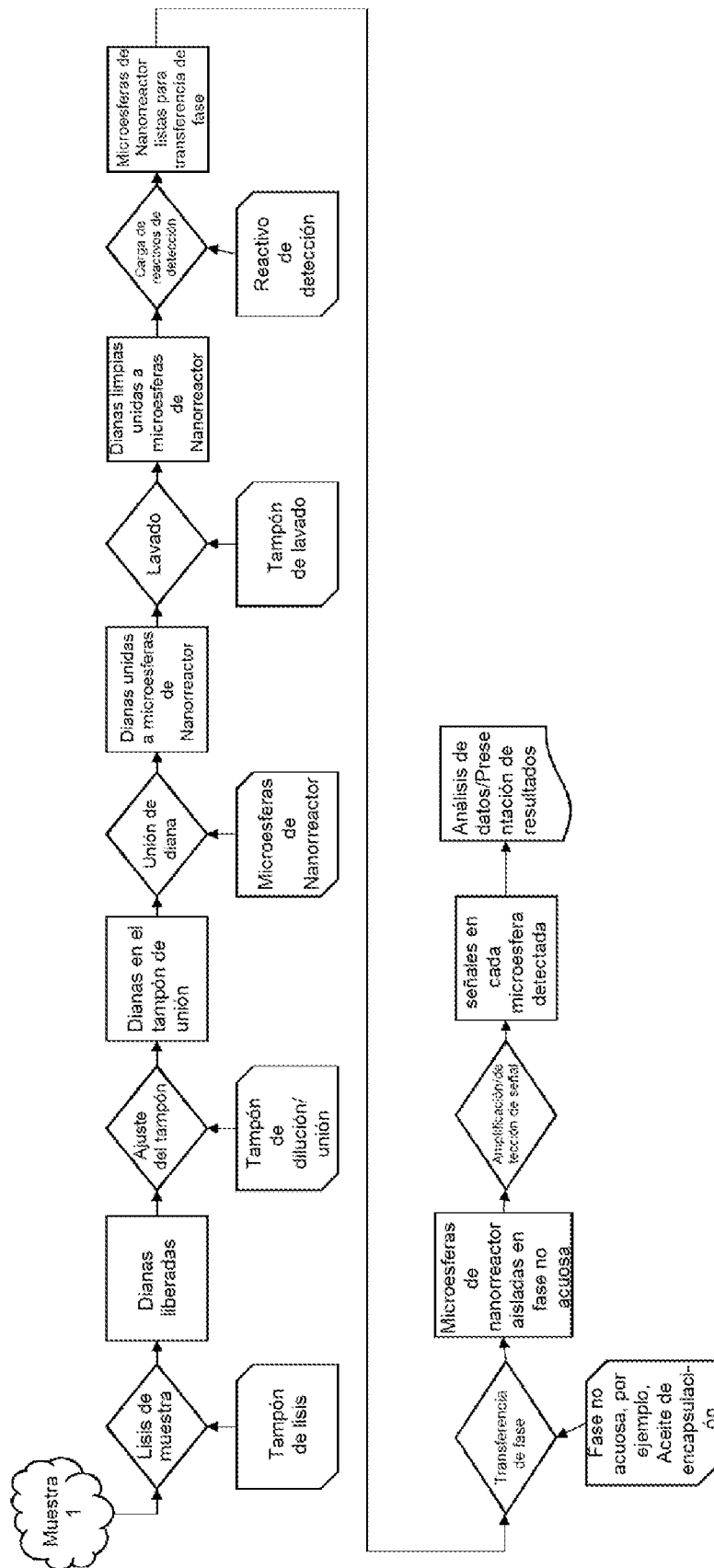


Figura 1B

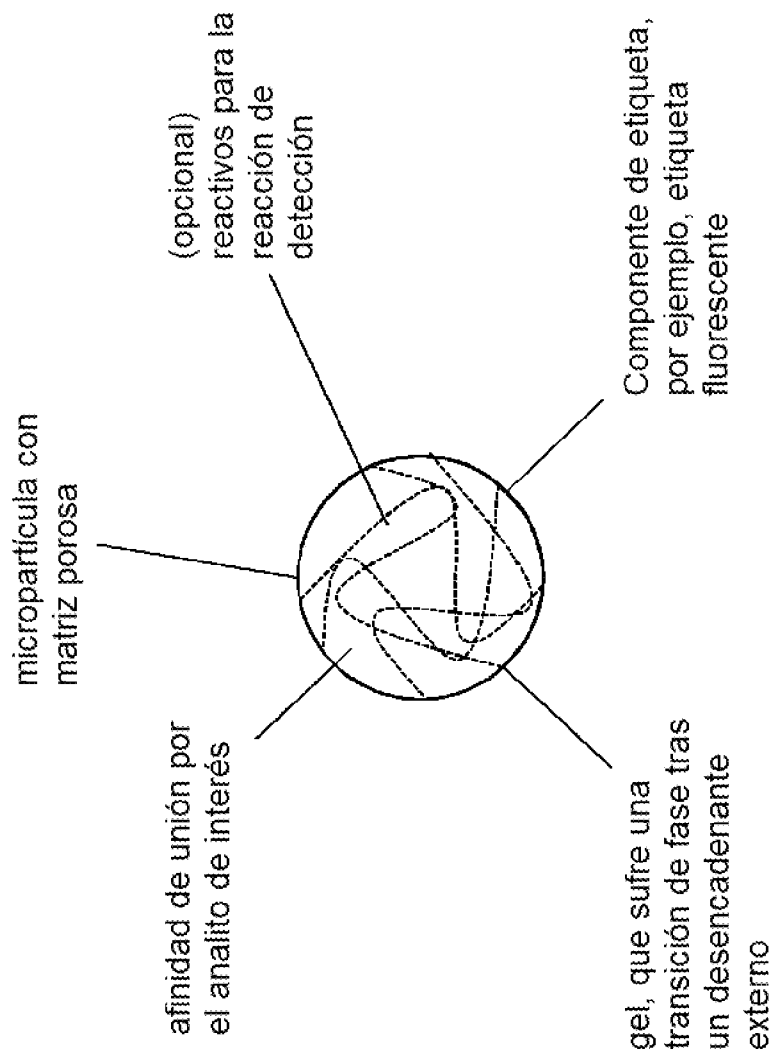


Figura 2

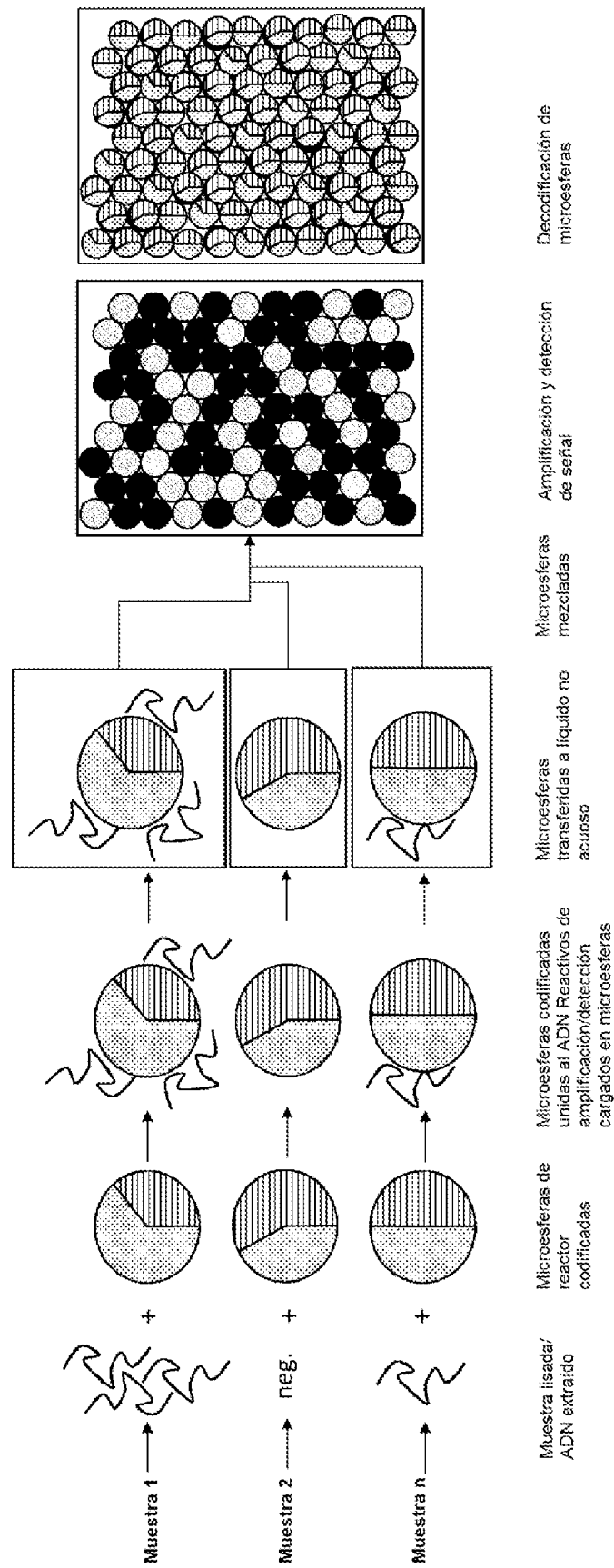


Figura 3

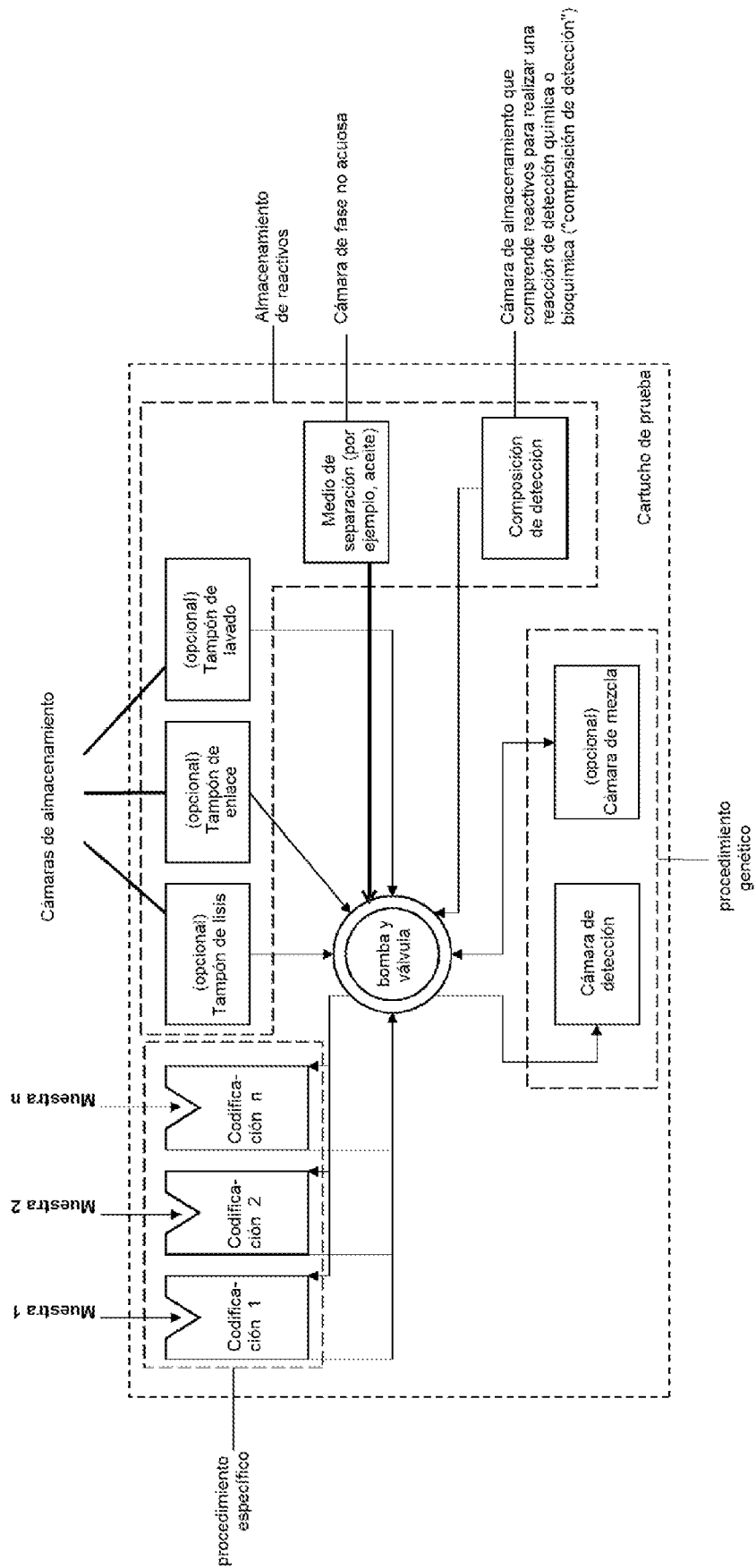


Figura 4

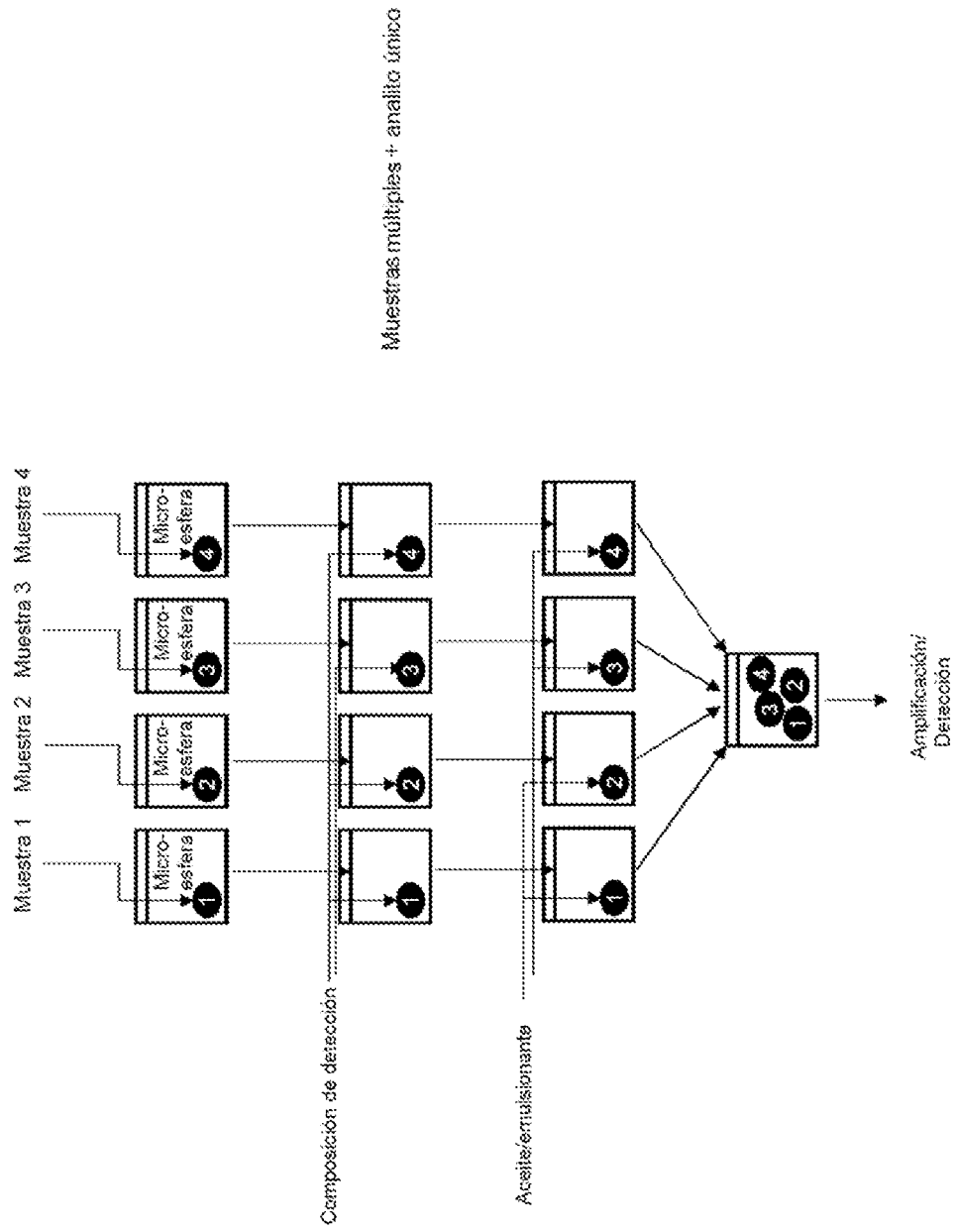


Figura 5

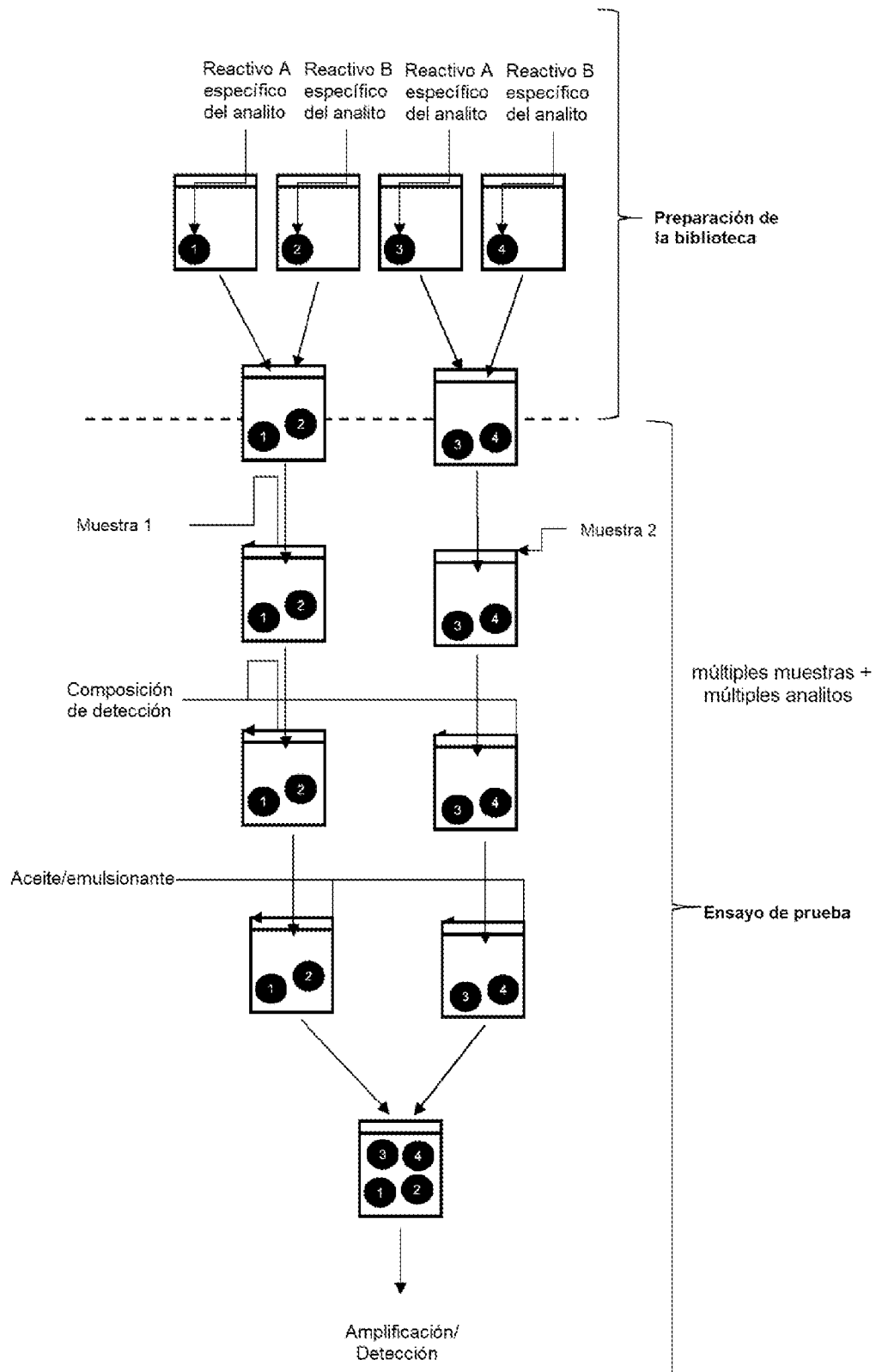


Figura 6

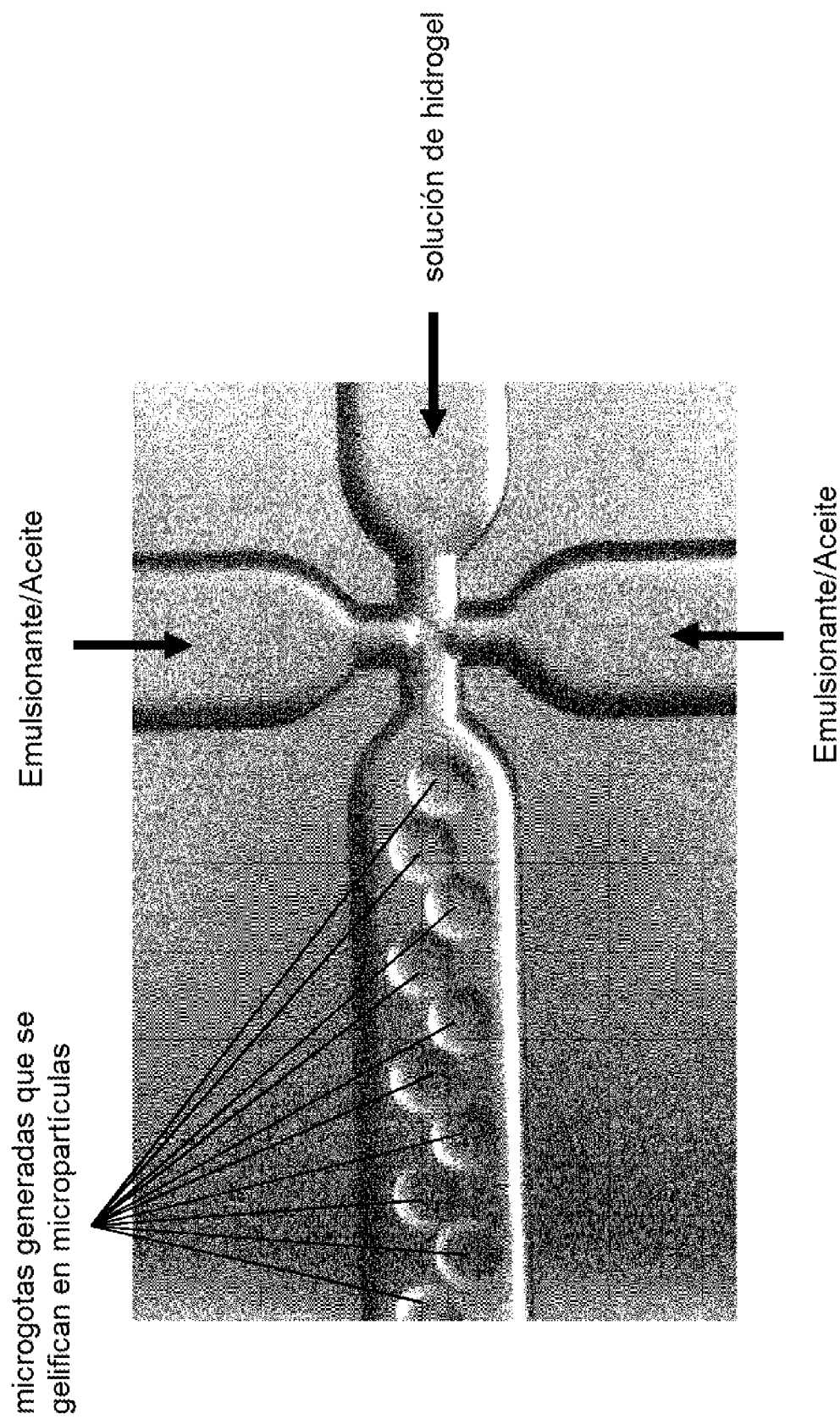


Figura 7

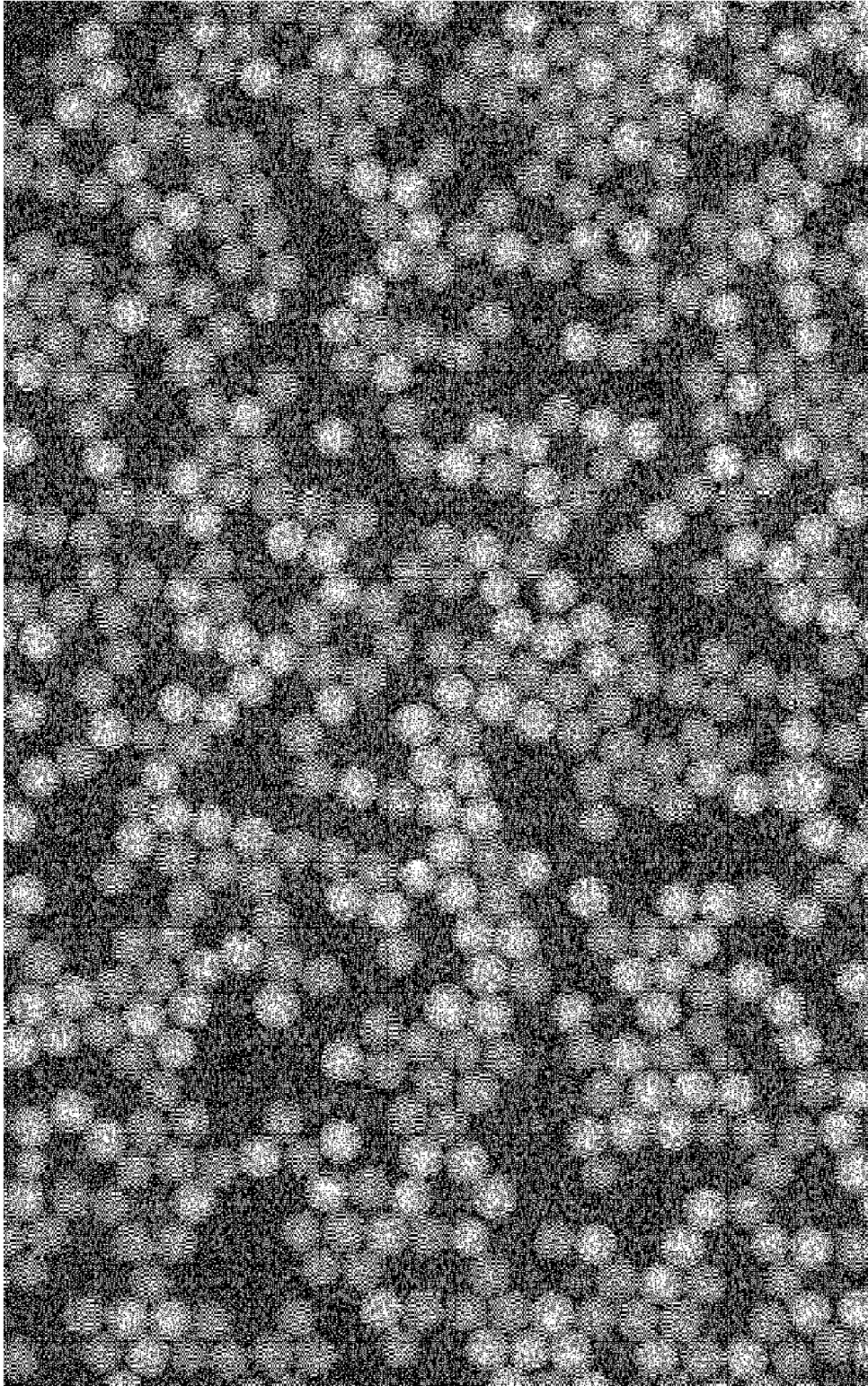


Figura 8

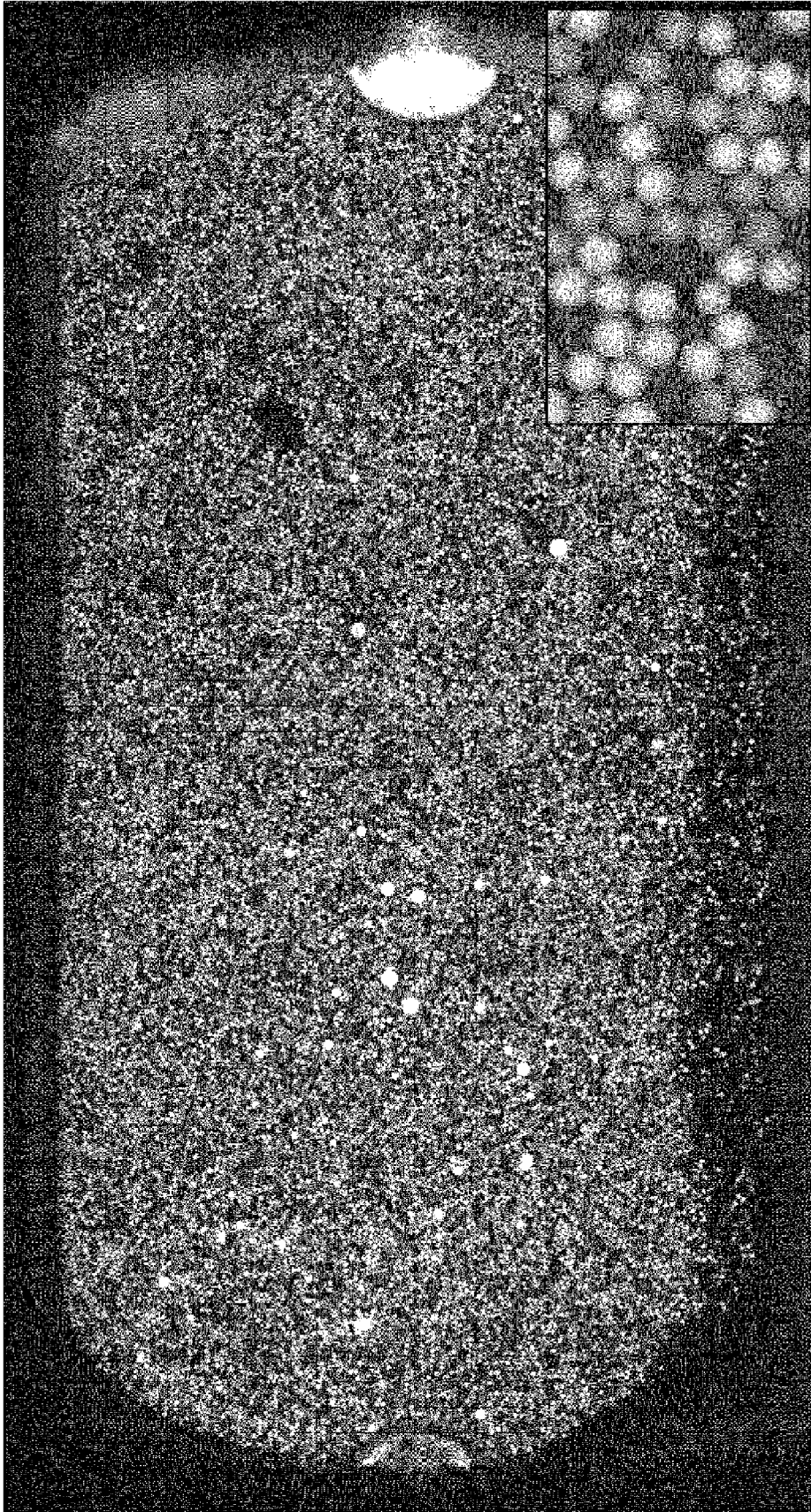


Figura 9

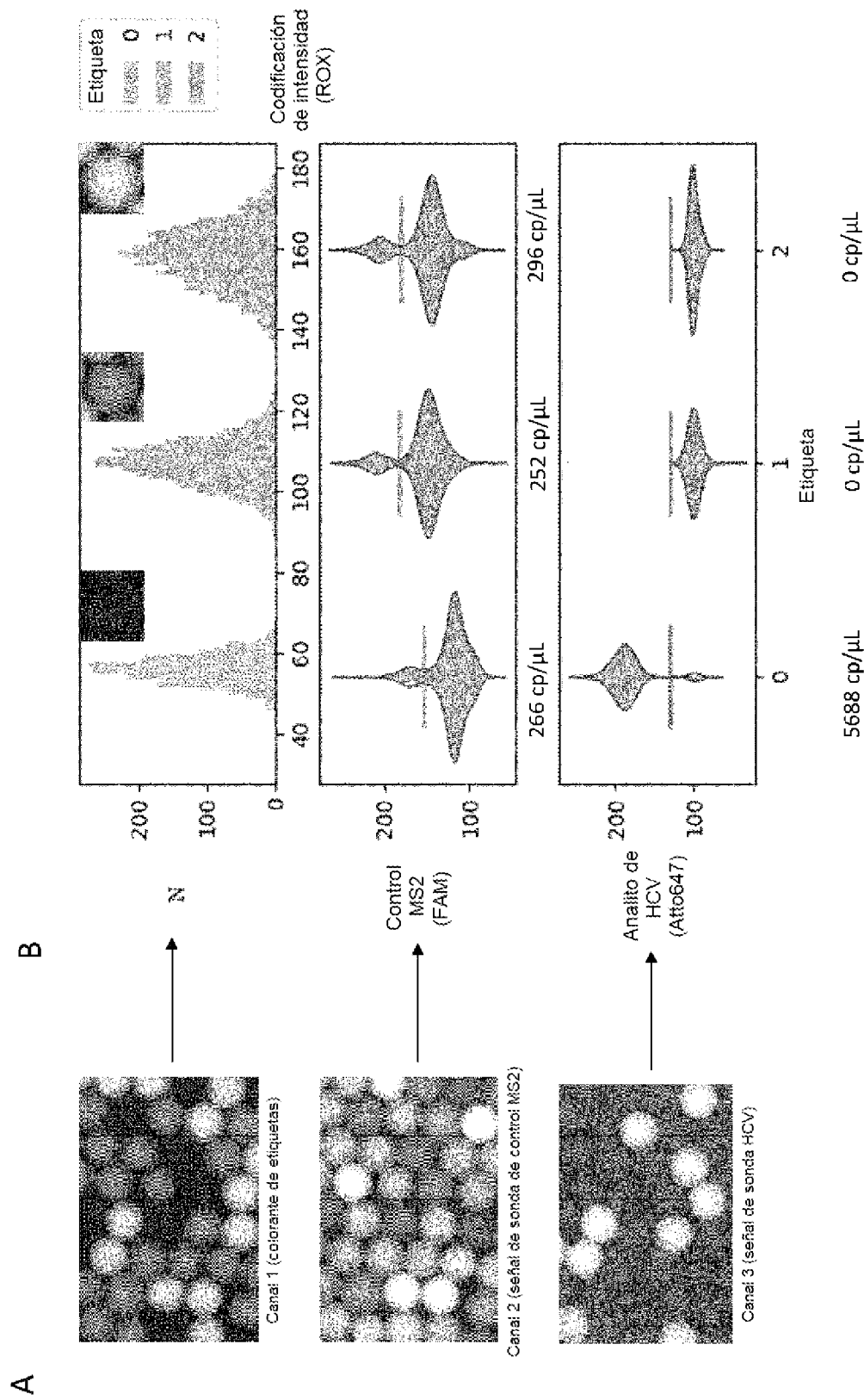
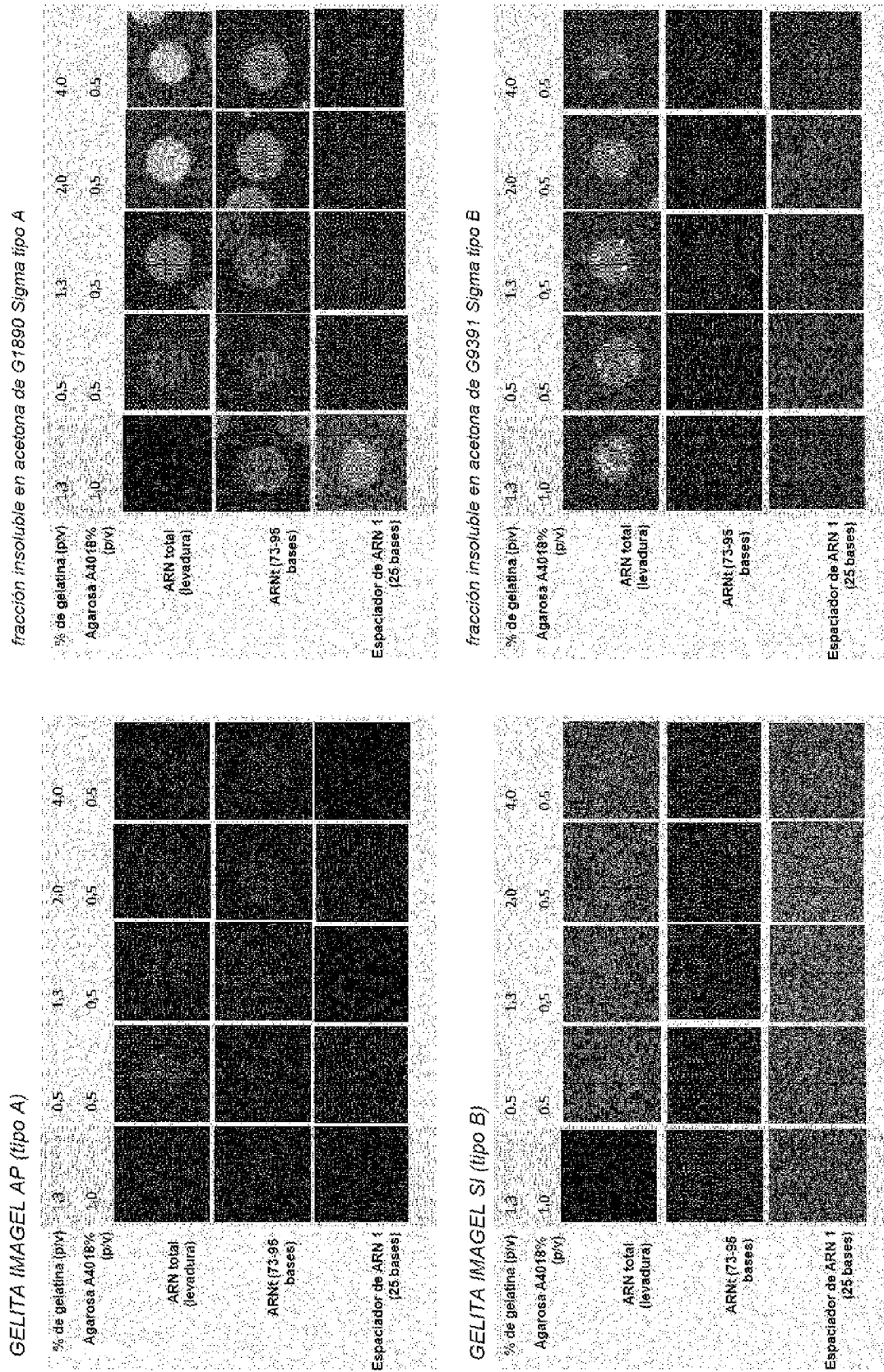


Figura 10



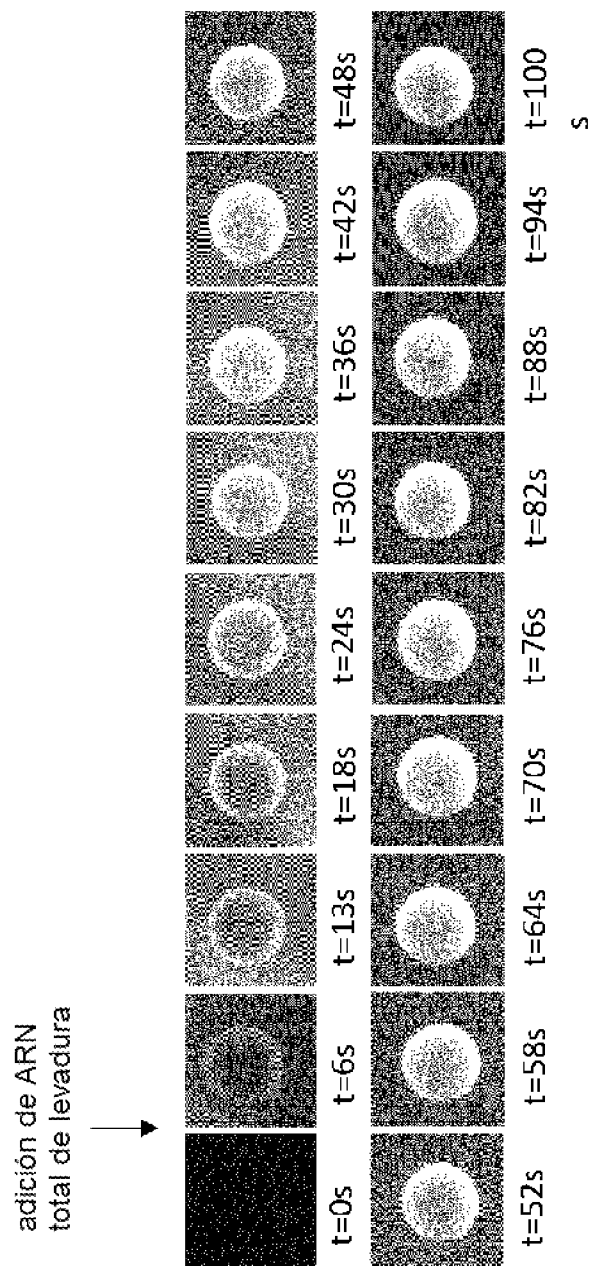


Figura 12

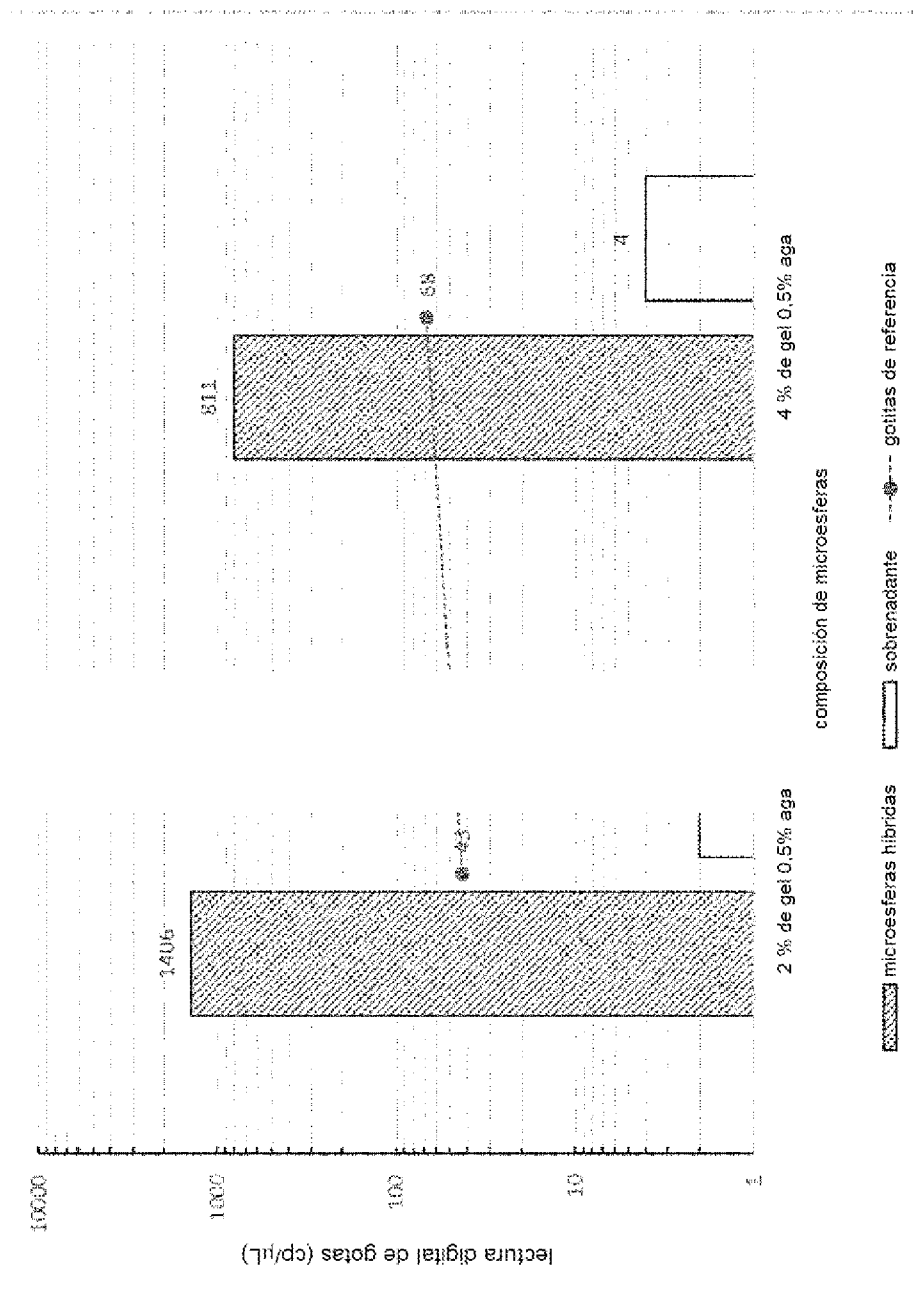


Figura 13

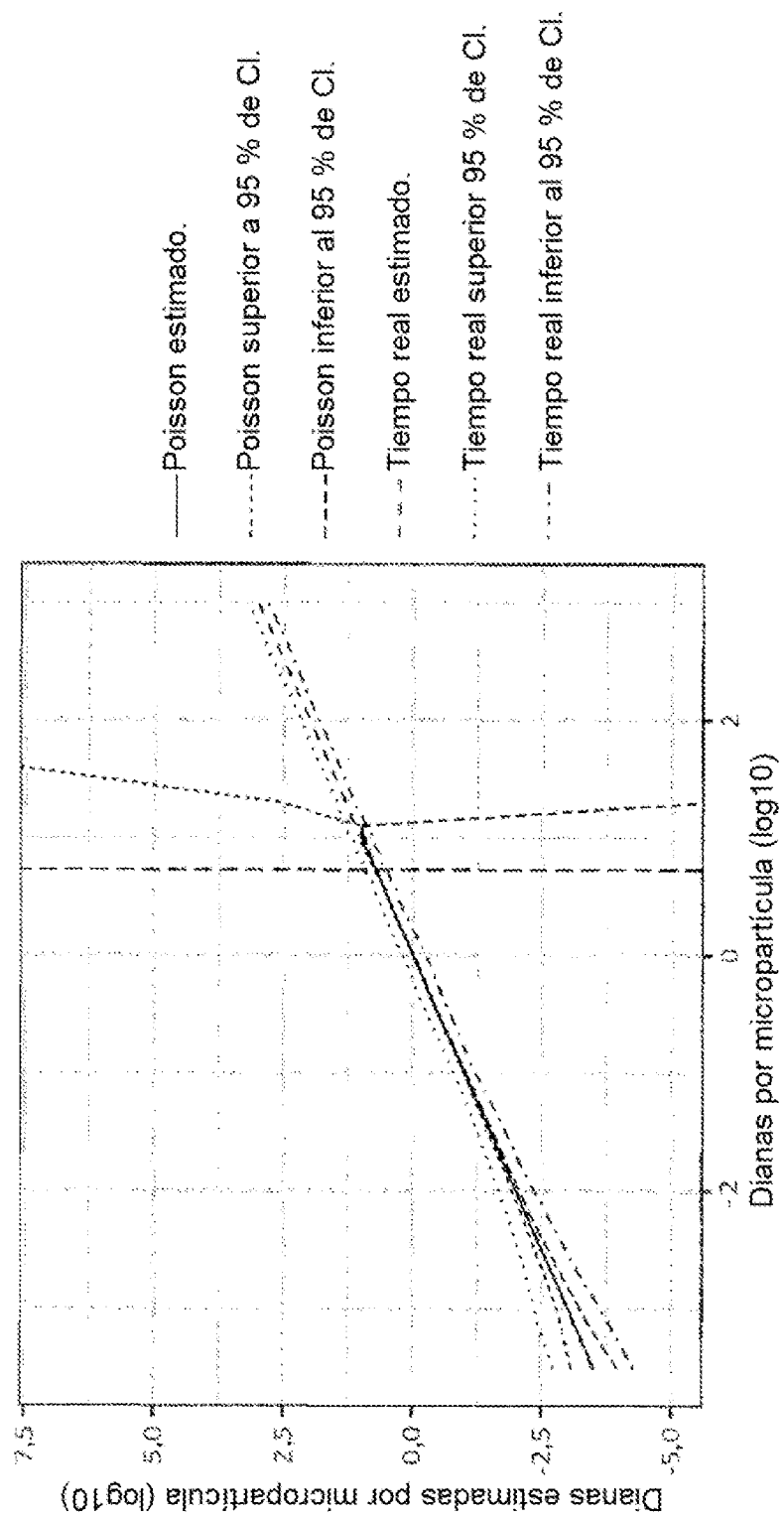


Figura 14

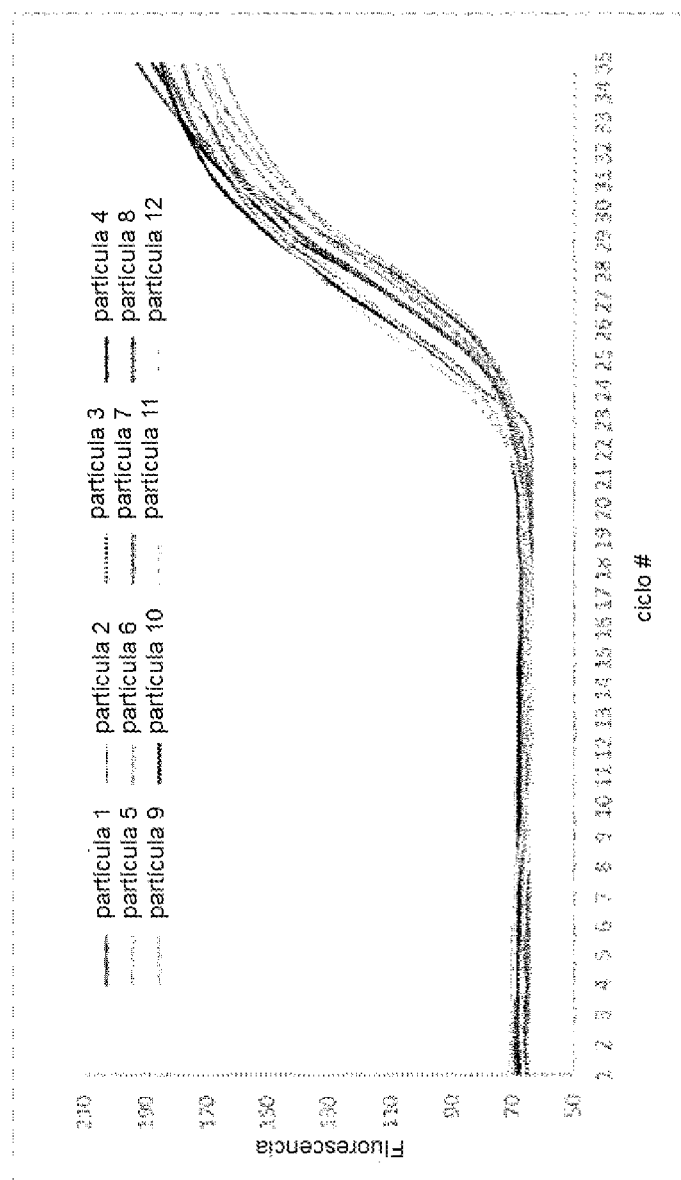
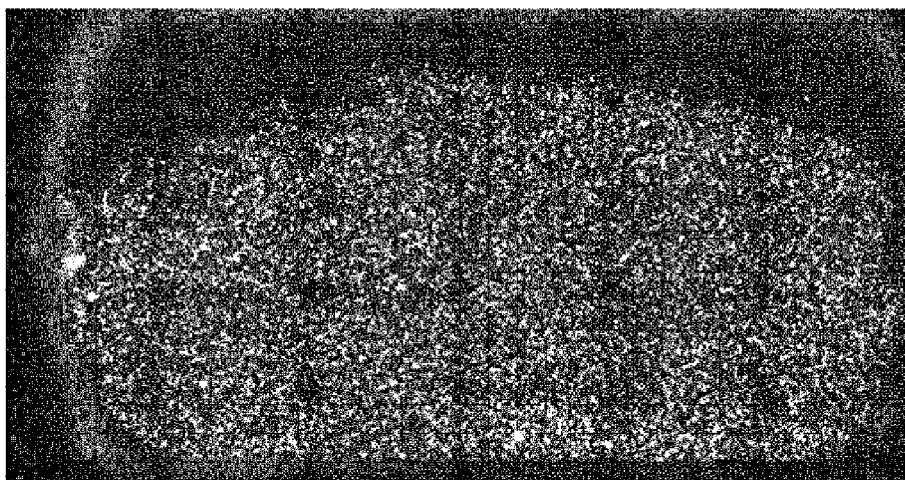


Figura 15A

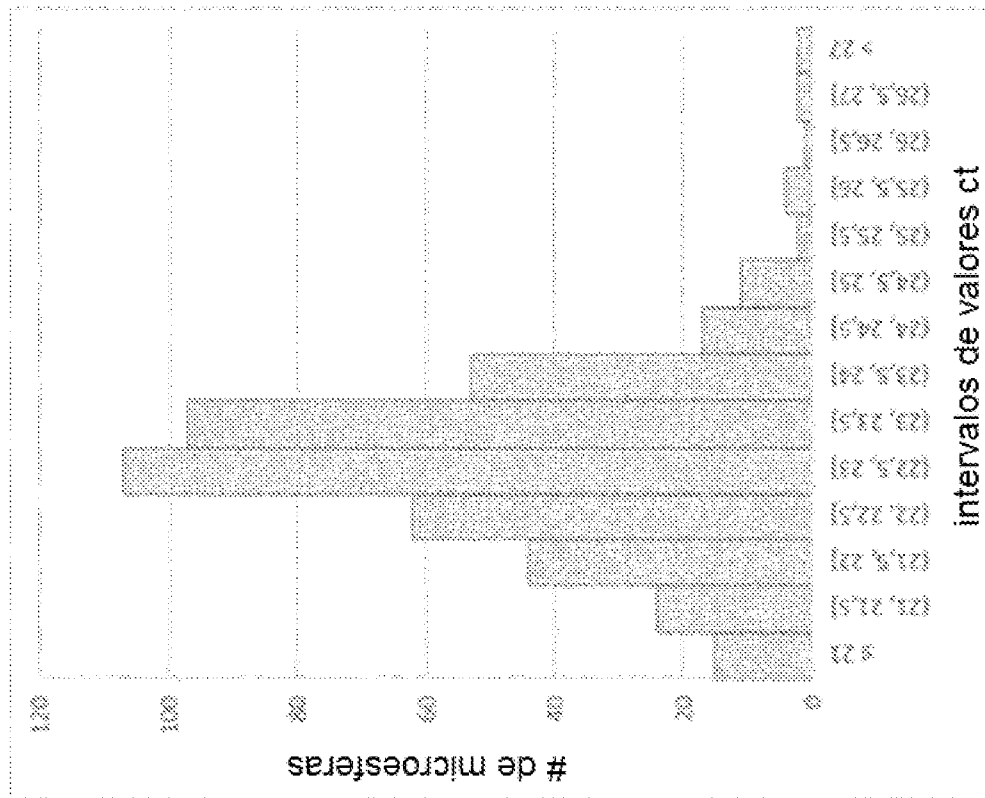


Figura 15B