

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 024**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2019 PCT/US2019/024975**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2019 WO19191666**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2019 E 19717657 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2023 EP 3775897**

54 Título: **Análisis de biomarcadores para datos multiplex de diagnóstico de alto rendimiento**

30 Prioridad:

29.03.2018 US 201862650162 P

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

25.06.2024

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (100.0%)**

**Office of Technology Transfer, National Institutes
of Health, 6011 Executive Boulevard Suite 325,
MSC 7660
Bethesda, MD 20892-7660, US**

72 Inventor/es:

**BERZOFSKY, JAY A.;
WELSH, JOSHUA ADEN y
JONES, JENNIFER C.**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 974 024 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análisis de biomarcadores para datos multiplex de diagnóstico de alto rendimiento

Campo de la divulgación

5 La divulgación se refiere a la identificación de grupos y subgrupos de vesículas extracelulares (VE) usando citometría de flujo multiplex.

Antecedentes

10 La caracterización de muestras de vesículas extracelulares (VE) puede realizarse mediante citometría de flujo. Según un estudio, se han identificado algunas subpoblaciones de VE en muestras utilizando una plataforma basada en microesferas en combinación con microscopía de agotamiento de emisión estimulada (STED). (Koliha et al., J. Extracellular Vesicles 2015, 5:29975.) Aunque los análisis basados en EV pueden proporcionar datos significativos en las mediciones basadas en microesferas, la extracción de información útil de los grandes conjuntos de datos asociados limita la utilidad de los análisis basados en EV. En consecuencia, es necesario mejorar los planteamientos.

15 El documento WO 2017/077105 A1 describe un procedimiento de caracterización de microvesículas derivadas del corazón (MV). En una primera etapa del procedimiento, se determinan las MV derivadas del corazón a partir de las MV circulantes basándose en la presencia del marcador CD172a. En una siguiente etapa, las MV así determinadas (CD172a positivas) se caracterizan determinando si están presentes los marcadores CD235a, CD61, CD144, CD14, CD45, CD73 y/o CD3. Esta caracterización da lugar a subgrupos de la MV derivada del corazón, como la MV derivada de eritroides, la MV derivada de plaquetas, etc. Comparando la cantidad de MV en los diferentes subgrupos con los respectivos valores de control, se puede monitorizar la eficacia de un tratamiento terapéutico, entre otros. La determinación de los subgrupos y la determinación de la cantidad respectiva pueden realizarse mediante la tecnología de citometría de flujo multicolor (FACS).

25 El documento WO 2014/082083 A1 describe biomarcadores que pueden evaluarse para procedimientos de diagnóstico, relacionados con la terapia o de pronóstico para identificar fenotipos, tales como una afección o enfermedad, o la etapa o progresión de una enfermedad, seleccionar regímenes de tratamiento candidatos para enfermedades, afecciones, etapas de la enfermedad y etapas de una afección, y para determinar la eficacia del tratamiento. También describe los biomarcadores circulantes, como las microvesículas de un fluido corporal, que pueden utilizarse en la elaboración de perfiles de estados fisiológicos o para determinar fenotipos, y los procedimientos correspondientes para evaluar las microvesículas

30

Sumario de la divulgación

35 La presente invención en el presente documento divulgada se define en la reivindicación 1, adjunta, y se refiere a un procedimiento que comprende: (i) identificar al menos dos grupos de muestras de vesículas extracelulares (VE) basándose en respuestas diferentes en recuentos de canales de citometría de flujo multicanal para una pluralidad de muestras para cada uno de una pluralidad de canales, estando cada canal definido por un agente de captura y un agente de detección, e incluyendo al menos 10 recuentos; (ii) seleccionar un conjunto de canales asociados con uno seleccionado de los grupos de muestras basándose en los al menos dos grupos de muestras de VE identificados; y (iii) obtener recuentos de canales de citometría de flujo multicanal para una muestra EV de prueba para cada canal del conjunto de canales para evaluar si la muestra de prueba está asociada con el grupo de muestras seleccionado, en el que la pluralidad de canales, estando cada canal definido por un agente de captura y un agente de detección, incluye canales identificables con longitudes de onda o bandas de longitudes de onda de luz dispersa seleccionadas además de las longitudes de onda de fluorescencia seleccionadas, así como canales identificables con espectros de luz dispersa además de los espectros de fluorescencia seleccionados, en los que se utilizan uno o más algoritmos de deconvolución para separar las señales ópticas correspondientes a diferentes canales. En algunos ejemplos, el conjunto de canales se obtiene a partir de una representación etiquetada de una incrustación estocástica de vecinos t-distribuida asociada con al menos algunos de la pluralidad de canales.

45 Además, se divulgan, pero no se reivindican, en el presente documento procedimientos y aparatos que permiten determinar agrupaciones de muestras EV y canales asociados definidos por combinaciones de agentes de captura y agentes de detección. En algunos casos, los canales asociados se utilizan para determinar si una muestra debe identificarse como perteneciente a una agrupación de muestras determinada. Los agentes de detección, los canales, los agentes de captura, así como las agrupaciones de muestras, pueden determinarse para permitir la selección de agrupaciones para objetivos concretos. En algunos casos, estas agrupaciones pueden utilizarse para definir conjuntos de entrenamiento que se utilizarán en el entrenamiento de redes neuronales para determinadas evaluaciones de muestras. Utilizando redes neuronales entrenadas de este modo, se pueden procesar datos adicionales o adquiridos previamente para afinar los conjuntos de entrenamiento, o para personalizar la selección de agentes de detección o de captura. Además, estas selecciones pueden identificar agrupaciones para las que se pueden realizar caracterizaciones adicionales, como el análisis RNA-Seq, que para grandes conjuntos de datos sería prohibitivo. Se pueden seleccionar marcadores, canales y agentes de detección para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, para una patología concreta de interés, se puede diseñar un conjunto de microesferas adecuado e implementar un análisis más

50

55

sencillo para esta patología. En algunos casos, los conjuntos de datos se combinan, normalizan y anotan, y la comunicación se realiza a través de una red de área amplia, como Internet, para que las operaciones intensivas de procesamiento puedan realizarse a distancia. A continuación, se proporcionan procedimientos y aparatos para determinar tales agrupaciones, utilizar las agrupaciones para establecer ensayos, construir conjuntos de entrenamiento para el desarrollo de redes neuronales y/o seleccionar marcadores, agentes de captura y agentes de detección. Se proporciona una interfaz gráfica de usuario (GUI) que permite a un investigador examinar rápidamente grandes conjuntos de datos y generar conjuntos de datos personalizados basados en el examen.

En algunos ejemplos, los procedimientos comprenden la obtención de recuentos de canales de citometría de flujo multicanal para una pluralidad de muestras de vesículas extracelulares (EV) para cada uno de una pluralidad de canales, estando cada canal definido por un agente de captura y un agente de detección. Con un procesador, se identifican al menos dos grupos de muestras que presentan respuestas diferentes basadas en los recuentos de canales de citometría de flujo multicanal. En algunos ejemplos, se muestra un mapa de calor basado en los recuentos de canales para cada uno de la pluralidad de canales. En otros ejemplos, los recuentos de canales para cada uno de la pluralidad de canales son representables como un mapa de calor almacenado, y un dendograma se deriva del mapa de calor almacenado basado en una agrupación jerárquica asociada con el mapa de calor almacenado. En otros ejemplos, se visualiza el dendograma derivado y se identifican los al menos dos grupos de muestras basándose en el dendograma derivado. En otros ejemplos, las puntuaciones de los componentes principales se obtienen a partir del mapa térmico almacenado y los al menos dos grupos de muestras se identifican a partir de las puntuaciones de los componentes principales. En algunos ejemplos, se muestran las puntuaciones de los componentes principales y se identifican los al menos dos grupos de muestras basándose en las puntuaciones de los componentes principales mostradas. En otras alternativas, la visualización de las puntuaciones de los componentes principales se presenta con respecto a tres componentes principales. Según otros ejemplos, los al menos dos grupos de muestras se identifican basándose en una incrustación estocástica de vecinos t-distribuida y, en algunos ejemplos, se muestra una representación etiquetada por canal de la incrustación estocástica de vecinos t-distribuida.

Los sistemas comprenden un citómetro de flujo configurado para producir recuentos de muestras para una pluralidad de muestras para cada uno de una pluralidad de canales definidos por una combinación de un anticuerpo de captura y un fluoróforo asociado con un anticuerpo de detección. Un procesador de visualización está acoplado para recibir los recuentos de muestras y mostrar un mapa de calor asociado y una interfaz gráfica de usuario que proporciona un conjunto de procedimientos de agrupación de muestras seleccionables en respuesta a la activación de un dispositivo de entrada. En algunos ejemplos, el dispositivo de entrada es un teclado o un dispositivo señalador, y el conjunto de procedimientos de agrupación de muestras incluye el análisis de componentes principales. En algunas realizaciones, el conjunto de procedimientos de agrupación de muestras incluye el análisis de componentes principales, una incrustación estocástica de vecinos distribuida en t y una agrupación jerárquica aglomerativa. En otros ejemplos, el procesador de visualización está acoplado a la pantalla para mostrar una o más de las puntuaciones de los componentes principales, un dendograma asociado con la agrupación jerárquica aglomerativa, y una representación de la incrustación estocástica de vecinos distribuida en t. Según algunos ejemplos, el procesador de visualización está acoplado a la pantalla para mostrar canales asociados con al menos un grupo de muestras establecido por uno del conjunto de procedimientos de agrupación de muestras.

Los procedimientos de pruebas de diagnóstico comprenden la aplicación de un conjunto seleccionado de reactivos y la ejecución de un procedimiento adecuado de análisis de datos, típicamente implementado como instrucciones almacenadas ejecutables por procesador, seguido de un ensayo posterior que identifica un estado específico de la enfermedad como la progresión tumoral; El ensayo posterior incluye uno o más de PCR y RNAseq u otros enfoques. También se pueden proporcionar kits de pruebas que incluyan el conjunto seleccionado de reactivos y las instrucciones almacenadas ejecutables por el procesador. En otros ejemplos, los procedimientos basados en conjuntos de reactivos y enfoques de análisis van seguidos de un ensayo posterior que se correlaciona o se asocia con la respuesta prevista a un tratamiento específico. El ensayo posterior puede incluir uno o más de PCR y RNAseq u otros ensayos,.

La descripción anterior y otras características y ventajas de la tecnología divulgada se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias realizaciones que procede con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

El expediente de patente o de solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. La Oficina facilitará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo(s) en color previa solicitud y pago de la tasa correspondiente.

La FIG. 1 ilustra un citómetro de flujo representativo.

La FIG. 2 ilustra un conjunto representativo de anticuerpos de captura.

La FIG. 3 ilustra un procedimiento representativo de identificación de grupos y subgrupos de VE.

La FIG. 4 ilustra un mapa de calor representativo asociado a los recuentos de microesferas para cada uno de una pluralidad de canales;

- La FIG. 5 ilustra una porción de un mapa de calor representativo que muestra los datos del canal para una población de muestra seleccionada.
- La FIG. 6 ilustra un procedimiento representativo de evaluación y agrupación de VE.
- 5 Las FIGS. 7A-7B ilustran un conjunto representativo de anticuerpos de captura y un gráfico que ilustra las agrupaciones de la respuesta fluorescente producida por una muestra.
- La FIG. 8 ilustra un mapa de calor representativo de los datos de citometría de flujo obtenidos con siete poblaciones de muestras y 333 canales/población.
- La FIG. 9 es un dendograma que ilustra una agrupación jerárquica representativa basada en los datos de citometría de flujo de la FIG. 8.
- 10 La FIG. 10 es un diagrama de caja basado en los datos de citometría de flujo de la FIG. 8.
- Las FIGS. 11A-11B ilustran un análisis de componentes principales (ACP) basado en datos de citometría de flujo multiplex.
- La FIG. 12 es una representación tridimensional de un ACP de un conjunto representativo de datos de citometría de flujo.
- 15 La FIG. 13 es un diagrama de Scree asociado a ACP.
- La FIG. 14 ilustra un gráfico basado en una incrustación de vecinos estocástica distribuida en t.
- La FIG. 15 corresponde a la FIG. 14, pero proporciona etiquetas para cada marcador.
- La FIG. 16 ilustra un mapa de calor basado en correlaciones.
- La FIG. 17 ilustra un conectograma.
- 20 La FIG. 18 ilustra un aparato representativo para identificar grupos y subgrupos de VE.
- La FIG. 19 ilustra una interfaz de usuario representativa.
- Las FIGS. 20A-20B ilustra la separación de grupos de EV para el análisis posterior del ARN de EV.
- La FIG. 21 ilustra un proceso representativo para muestras asociadas con cáncer de próstata oligometastásico PSMA+.
- 25 La FIG. 22 ilustra la adquisición y el procesamiento de datos en paralelo.
- La FIG. 23 ilustra la importación y el procesamiento de datos de microesferas multiplex como se muestra en la FIG. 22.
- La FIG. 24 ilustra análisis de salida de cuentas como se muestra en la FIG. 22.
- La FIG. 25 ilustra una interfaz gráfica de usuario para la importación, el tratamiento y la exportación de datos.
- 30 La FIG. 26 ilustra un campo de procesamiento/visualización de datos que muestra el análisis de componentes principales.
- La FIG. 27 ilustra un campo de visualización de procesamiento/datos que muestra el análisis tSNE.

Descripción detallada

- 35 Aunque la presente invención se refiere a un procedimiento como se define en la reivindicación 1, adjunta, la divulgación se refiere en general a procedimientos y aparatos que permiten la caracterización de la heterogeneidad de EVs y la cuantificación de EVs seleccionadas, así como la identificación de grupos y subgrupos de EVs basados en, por ejemplo, respuestas de pacientes a tratamientos particulares. En ejemplos típicos, los ensayos multiplex se combinan con procedimientos de citometría de flujo de alta resolución de EV individuales para establecer procedimientos de análisis de EV multiplex a individuales que permiten la caracterización de una amplia gama de subconjuntos de EV, al tiempo que miden la concentración de poblaciones específicas de EV. En un ejemplo, el repertorio de EV puede correlacionarse con la respuesta al tratamiento del cáncer. La detección de EVs asociadas a tumores y la detección de cambios en el repertorio de EVs durante el tratamiento pueden permitir terapias personalizadas y bioadaptativas en una amplia gama de tipos de tumores. Para facilitar la descripción, los grupos y subgrupos de EV asociados a una respuesta diferente de los pacientes se diferencian sin hacer referencia a un
- 40 tratamiento concreto. La división de las VE en subgrupos puede guiar mediciones adicionales de VE, por ejemplo,
- 45

guiando la selección de anticuerpos de captura o detección adicionales, u otras sensibilizaciones como elementos de dispersión o nanoetiquetas, como se explica más adelante.

5 Tal como se utilizan en la presente solicitud y en las reivindicaciones, las formas singulares "uno", "una" y "el y "la" incluyen las formas plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Además, el término "incluye" significa "comprende" Además, el término "acoplado" (incluido "acoplado ópticamente") no excluye la presencia de elementos intermedios entre los elementos acoplados.

10 Los sistemas, aparatos y procedimientos en el presente documento descritos no deben interpretarse como limitativos en modo alguno. Los sistemas, procedimientos y aparatos divulgados no se limitan a ningún aspecto o característica específicos o combinaciones de los mismos, ni requieren que se presenten una o más ventajas o se resuelvan problemas específicos. Cualquier teoría de operación es para facilitar la explicación, pero los sistemas, procedimientos y aparatos divulgados no se limitan a tales teorías de operación.

15 Aunque las operaciones de algunos de los procedimientos divulgados se describen en un orden particular, secuencial para la presentación conveniente, debe entenderse que esta manera de la descripción abarca el reordenamiento, a menos que un orden particular sea requerido por la expresión específica especificada a continuación. Por ejemplo, las operaciones descritas secuencialmente pueden, en algunos casos, reorganizarse o realizarse simultáneamente. Además, en aras de la simplicidad, las figuras adjuntas pueden no mostrar las diversas formas en que los sistemas, procedimientos y aparatos divulgados pueden utilizarse junto con otros sistemas, procedimientos y aparatos. Además, la descripción utiliza a veces términos como "producir" y "proporcionar" para describir los procedimientos divulgados. Estos términos son abstracciones de alto nivel de las operaciones reales que se realizan. Las operaciones reales que corresponden a estos términos variarán dependiendo de la implementación particular y son fácilmente discernibles por un experto en la materia.

20 En algunos ejemplos, los valores, procedimientos o aparatos' se denominan "peores", "mejores", "mínimos" o similares. Se apreciará que tales descripciones pretenden indicar que puede hacerse una selección entre muchas alternativas funcionales utilizadas, y tales selecciones no tienen por qué ser mejores, menores o preferibles de otro modo a otras selecciones.

25 En algunos ejemplos, se hace referencia a los datos adquiridos como correspondientes a filas y columnas de una matriz, pero pueden utilizarse otras representaciones, y puede cambiarse la asociación de series de datos con filas o columnas y hacerse cualquier selección particular para una ilustración conveniente. Tal como se utiliza en el presente documento, "mapa de calor" se refiere a un conjunto de datos bidimensional de datos de muestra, en el que cada una de una pluralidad de muestras se asocia con valores (típicamente recuentos) asociados con una pluralidad de canales. El mapa de calor también hace referencia a una presentación visual de dichos datos. En ejemplos típicos, valores como los recuentos se codifican en color o en escala de grises para su visualización.

30 En ejemplos típicos, los procedimientos y aparatos divulgados pueden utilizarse en ensayos de diagnóstico (determinación de la presencia o ausencia de enfermedad), ensayos predictivos (determinación de la probabilidad de respuesta) o ensayos de respuesta al tratamiento.

35 En algunos ejemplos, se utilizan representaciones en color y/o en escala de grises para la ilustración.

Citometría de flujo

40 El análisis por citometría de flujo puede utilizarse en análisis multiplex, típicamente basado en mediciones de VE capturadas por microesferas a las que se fija un conjunto de anticuerpos. Tras la incubación de las microesferas con las muestras de VE, las VE capturadas pueden teñirse utilizando anticuerpos secundarios (denominados en el presente documento anticuerpos de detección) que están asociados a los respectivos fluoróforos. La FIG. 1 muestra un ejemplo de un citómetro de flujo microfluídico 100 que incluye una fuente de iluminación de longitud de onda múltiple 102 que produce un haz de iluminación de longitud de onda múltiple 104 y dirige el haz de iluminación de longitud de onda múltiple 104 a un objetivo de citometría de flujo microfluídico 106. En ejemplos representativos, el objetivo de citometría de flujo 106 incluye una corriente de fluido 108, mostrada en sección transversal de tal manera que una corriente fluye dentro o fuera del plano de la FIG. 1, que incluye partículas 110 tales como vesículas extracelulares (EVs) que pueden hacerse detectables, incluyendo singularmente detectables, basándose en la captura de las EVs con uno o más anticuerpos de captura fijados a una microesfera siguiendo la unión a un anticuerpo de detección asociado con el fluoróforo respectivo. En otros ejemplos, la luz es dispersada elásticamente por etiquetas a nanoetiqueta ("nanotags") 112a, 112b que están adheridas a las partículas 110. Se apreciará que la corriente de fluido 108 puede ser inmóvil en algunos ejemplos. El haz de iluminación multi-longitud de onda 104 se dirige típicamente al objetivo de citometría de flujo 106 perpendicularmente a la dirección del flujo de la corriente del fluido 108 y se lleva a un foco en el objetivo de citometría de flujo 106. Un sistema de detección de dispersión frontal (FSC) 114 está situado frente al objetivo de citometría de flujo 106 desde el haz de iluminación de longitud de onda múltiple 104 tal como incide sobre el objetivo de citometría de flujo 106, de forma que recibe un haz de detección de dispersión frontal 116 desde el objetivo de citometría de flujo 106 que se propaga en la misma dirección general del haz de iluminación de longitud de onda múltiple 104.

Las nanoetiquetas moleculares son etiquetas citométricas de tamaño nanométrico que pueden detectarse individualmente o enumerarse cuantitativamente basándose en las correspondientes propiedades intrínsecas de dispersión de la luz. Los ejemplos de aparatos ópticos del presente documento son capaces de recopilar datos espectrales de luz dispersa de fuentes de luz de múltiples longitudes de onda con el fin de identificar diferentes nanoetiquetas moleculares que pueden ser modulares y pueden estar compuestas de diferentes nanomateriales, cada uno con propiedades espectrales de dispersión de luz identificables y distintivas a través de una amplia gama de longitudes de onda. En algunos ejemplos, pueden detectarse valores de intensidad o potencia óptica. Los ejemplos miden la dispersión de la luz en múltiples longitudes de onda específicas y se observan señales de dispersión mejoradas asociadas a los nanomateriales de oro en longitudes de onda que corresponden a las propiedades ópticas del oro. En ejemplos representativos, la resonancia plasmónica puede referirse a la absorción, y la dispersión puede corresponder a un fenómeno separado, y la suma de absorción y dispersión se detecta de modo que se utilizan índices de refracción complejos, incluido el índice de refracción clásico junto con la parte imaginaria que corresponde al coeficiente de extinción y da cuenta de la absorción. Dichas nanoetiquetas pueden utilizarse solas o junto con etiquetas fluorescentes, o pueden utilizarse fluoróforos y anticuerpos de detección sin nanoetiquetas.

En ejemplos adicionales, se demuestra que los patrones de potencia de dispersión de luz mejorada difieren entre materiales, según las propiedades ópticas, incluyendo el índice de refracción y el coeficiente de extinción. Tales diferencias pueden utilizarse con procedimientos de detección multiespectral en longitudes de onda seleccionadas para discriminar la luz láser y aumentar aún más la sensibilidad de la detección hasta el punto de detectar moléculas individuales, como nanoetiquetas moleculares, cada una con etiquetas distintas. Un sistema de detección de dispersión lateral (SSC) 118 está situado para recibir y detectar un haz de detección de múltiples longitudes de onda 120 que se propaga generalmente hacia el lado del objetivo de citometría de flujo 106 y el haz de iluminación de múltiples longitudes de onda 104, por ejemplo, perpendicular a la dirección de la corriente de fluido 108 y el haz de iluminación de múltiples longitudes de onda 104. En ejemplos representativos, el término dispersión lateral se refiere a la luz dispersada por una partícula suspendida en una corriente, como la corriente de fluido 108, que se recoge desde ángulos que varían típicamente entre 5 y 180 grados con respecto a una dirección de propagación de la luz recibida por la partícula desde una fuente de iluminación. El haz de detección de múltiples longitudes de onda 120 se produce por colisiones elásticas entre el haz de iluminación de múltiples longitudes de onda 104 y las partículas 110 y nanoetiquetas 112a, 112b del objetivo de citometría de flujo 106. En ejemplos representativos, las características de dispersión Mie de las nanoetiquetas para diferentes longitudes de onda o bandas de longitudes de onda pueden modelarse numéricamente de modo que pueda determinarse una correspondencia entre la dispersión detectada y la presencia de una o más nanoetiquetas en el objetivo 106 de citometría de flujo. Por ejemplo, la dispersión elástica detectada a 405 nm o cerca de ellos puede corresponder a nanoetiquetas de plata unidas a VE, y la dispersión elástica detectada a 532 nm o cerca de ellos puede corresponder a nanoetiquetas de oro unidas a VE. De este modo, el objetivo 106 de citometría de flujo puede ser interrogado con el haz de iluminación de longitud de onda múltiple 104, de modo que diferentes tipos de nanoetiquetas que producen diferentes características de dispersión respectivas a diferentes longitudes de onda, por ejemplo, las nanoetiquetas 112a, 112b, pueden ser detectadas con el sistema 118 de detección de dispersión lateral. En algunos ejemplos, la detección de dispersión lateral multiespectral con el sistema de detección SSC 118 puede combinarse con la detección de dispersión inelástica (Raman) o la detección de fluorescencia.

El sistema de detección de SSC 118 (y otros sistemas de detección) puede incluir o estar acoplado a un entorno de control de citometría de flujo 122 que puede incluir uno o más dispositivos informáticos que incluyen un procesador 124 y memoria 126 acoplada al procesador 124. El entorno de control 122 puede incluir una selección de umbral de detector 128 situada para ajustar un umbral de señal para la detección de luz dispersa para un canal de detector seleccionado del sistema de detección SSC 118, y una selección de canal de disparo de detector 130 situada para seleccionar uno o más canales de detector del sistema de detección SSC 118 que dispara un evento de detección basado en el umbral o umbrales de señal seleccionados con la selección de umbral de detector 128. Los datos FSC y SSC de cada evento de detección pueden compararse con perfiles predeterminados de dispersión SSC/FSC asociados con objetos seleccionados, tales como partículas 110 y/o nanoetiquetas 112a, 112b, y uno o más contadores de objetos 132a, 132b pueden incrementarse basándose en determinaciones positivas. También se puede detectar la fluorescencia.

En algunos ejemplos, se selecciona como disparador un canal detector que tenga el menor ruido añadido con la adición de la corriente de fluido 108 (pero sin ninguna partícula 110), y se selecciona un umbral detector para el canal seleccionado para que esté en o cerca del nivel de ruido asociado con la corriente de fluido 108. Tras la posterior interrogación de la corriente de fluido 108 que contiene las partículas 110 y las nanoetiquetas 112a, 112b con el haz de iluminación de múltiples longitudes de onda 104, los eventos asociados con el haz de detección de múltiples longitudes de onda 120 pueden incluir muestras de ruido que pueden compararse con el ruido de referencia libre de partículas para determinar la presencia o ausencia de objetos en el objetivo de citometría de flujo 106 que no se detectarían con los ajustes de ruido configurados para minimizar el ruido de fondo.

En realizaciones representativas, el entorno de control de citometría de flujo 122 incluye un control de enfoque SSC 138 que está acoplado al sistema de detección SSC 118 con el fin de ajustar las posiciones de enfoque para diferentes longitudes de onda del haz de detección de longitud de onda múltiple 120 en uno o más detectores ópticos respectivos o el haz de iluminación de longitud de onda múltiple 104 en el objetivo de citometría de flujo 106. Algunos ejemplos incluyen además perfiles de dispersión lateral de longitud de onda múltiple 140, tales como características de

dispersión lateral dependientes de la longitud de onda (por ejemplo, intensidad, potencia), para una o más nanopartículas, y en particular para una pluralidad de nanopartículas, de modo que las características detectadas del haz de detección de longitud de onda múltiple 120 puedan compararse con los perfiles de dispersión lateral de longitud de onda múltiple 140 para determinar la presencia de las nanopartículas. En ejemplos adicionales, se utilizan uno o más algoritmos de deconvolución 142 para separar las señales ópticas correspondientes a diferentes nanopartículas.

En diferentes realizaciones, se pueden utilizar varios tipos de fuente de iluminación de longitud de onda múltiple 102, incluyendo una pluralidad de láseres monocromáticos y fuentes láser de banda ancha o supercontinuo. En algunos ejemplos, puede utilizarse un control del haz de iluminación 136 para controlar la temporización y/o la generación del haz de iluminación de longitud de onda múltiple 104, basándose en la selección de la longitud de onda, la disposición del detector, etc. En algunos ejemplos, puede acoplarse un sistema de detección de SSC adicional 144 al objetivo de citometría de flujo 106 opuesto al haz de detección de longitud de onda múltiple 120 y al sistema de detección de SSC 118 para recibir y detectar un haz de detección de longitud de onda múltiple separado 140 que comprende luz dispersada por el objetivo de citometría de flujo 106. En algunos aparatos de ejemplo, uno o más de los sistemas de detección SSC 118, 144 pueden situarse para detectar luz distinta de las longitudes de onda de dispersión lateral, como fluorescencia, Raman u otras longitudes de onda ópticas y/o efectos ópticos de interés.

El entorno de control de citometría de flujo 122 puede incluir instrucciones de software o firmware llevadas a cabo por un ordenador digital. Por ejemplo, cualquiera de las técnicas de detección de citometría de flujo divulgadas puede ser realizada en parte por un ordenador u otro hardware informático (por ejemplo, uno o más de un ASIC, FPGA, PLC, CPLD, GPU, etc.) que forma parte de un sistema de control de citómetro de flujo. El entorno de control de citometría de flujo 122 puede estar conectado o de otro modo en comunicación con la fuente de iluminación de longitud de onda múltiple 102, el sistema de detección de FSC 114, el sistema de detección de SSC 118 y el sistema de detección de SSC adicional 144, programado o configurado para controlar el haz de iluminación de longitud de onda múltiple 104, la detección de FSC, SSC y/o fluorescencia y para comparar u ordenar los datos del haz de detección para determinar la presencia o ausencia de partículas, perlas y/o nanoetiquetas de citometría de flujo. El ordenador puede ser un sistema informático que comprenda uno o más de los procesadores 124 (dispositivos de procesamiento) y la memoria 126, incluyendo medios tangibles, no transitorios legibles por ordenador (por ejemplo, uno o más discos de medios ópticos, dispositivos de memoria volátil (como DRAM o SRAM), o memoria no volátil o dispositivos de almacenamiento (como discos duros, NVRAM, y unidades de estado sólido (por ejemplo, unidades flash)). El uno o más procesadores 124 pueden ejecutar instrucciones ejecutables por ordenador almacenadas en uno o más de los medios legibles por ordenador tangibles, no transitorios, y realizar así cualquiera de las técnicas divulgadas. Por ejemplo, el software para realizar cualquiera de las realizaciones divulgadas puede almacenarse en uno o más medios volátiles no transitorios legibles por ordenador como instrucciones ejecutables por ordenador, que cuando se ejecutan por el uno o más procesadores, hacen que el uno o más procesadores realicen cualquiera de las técnicas de iluminación/detección divulgadas. Los resultados de los cálculos y las características ópticas detectadas del objetivo de citometría de flujo 106 pueden almacenarse (por ejemplo, en una estructura de datos adecuada) en uno o más medios de almacenamiento legibles por ordenador no transitorios tangibles y/o también pueden mostrarse a un usuario, por ejemplo, mostrando en un dispositivo de visualización 134 el número de objetos contados, los datos de intensidad o potencia de FSC/SSC, los datos de fluorescencia, los datos de SSC convolucionados o deconvolucionados, la selección de canal, los niveles de ruido/disparo, etc., como una interfaz gráfica de usuario.

Preparación y procesamiento de muestras EV

En ejemplos típicos, los anticuerpos de captura se unen a perlas de poliestireno o de otro tipo, como perlas de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) o de sílice. Las muestras de VE se incuban con las microesferas para promover la unión selectiva de las VE a las microesferas. Las VE no unidas se eliminan mediante lavado. Si se desea, las perlas pueden teñirse antes de la incubación para ayudar a estimar las concentraciones de colorante. Pueden utilizarse varios conjuntos de anticuerpos de captura, como los que se muestran en las FIGS. 2 y 7A, y como se expone más adelante, pueden definirse conjuntos de anticuerpos de captura adicionales con menos o más anticuerpos de captura y basados en el procesamiento de muestras EV. Tras la incubación y el lavado, las microesferas con las VE unidas se exponen a uno, dos o más anticuerpos de detección que se asocian a los respectivos fluoróforos. Por comodidad, cada combinación de un fluoróforo y un anticuerpo de captura se denomina definición de un canal.

Visión general del análisis multiplex

En ejemplos típicos, se utilizan 40-100 (o más o menos) anticuerpos de captura, y 4-10 anticuerpos de detección con fluoróforos asociados, de modo que el número de canales varía entre 160 y 500; en otro ejemplo, se definen menos o más canales. Por lo tanto, la evaluación citométrica de flujo de las poblaciones de EV tiende a producir grandes conjuntos de datos. En un ejemplo concreto, se utilizan 39 anticuerpos de captura y 3 anticuerpos de detección para cada población de muestras EV, de modo que los datos adquiridos se asocian a unos 120 valores de respuesta de fluorescencia diferentes. Si se desea, pueden utilizarse datos de dispersión, como la dispersión lateral (SSC) y la dispersión frontal (FSC), con o sin nanoetiquetas. Si se va a evaluar una población muestral, cada muestra se asociará con los valores de respuesta correspondientes, y un conjunto total de datos para el conjunto de muestras incluirá un gran número de valores de respuesta incrustados. Se necesitan procedimientos para extraer resultados prácticos y para agrupar muestras a partir de estos complejos conjuntos de datos. Las FIGS. 2 y 7A muestran conjuntos representativos de anticuerpos de captura, pero pueden seleccionarse otros conjuntos (arbitrarios). En algunos casos,

uno o más conjuntos posteriores se eligen en función de los análisis realizados según las evaluaciones con un conjunto inicial.

Visión general de la agrupación EV

5 La FIG. 3 es un diagrama de bloques de un procedimiento representativo 300 de procesamiento y agrupación de poblaciones de muestras EV. En 302, se adquieren datos de la muestra, tales como si la muestra está asociada con la respuesta al tratamiento, la no respuesta al tratamiento o la falta de tratamiento. En 304, se adquieren datos de citometría de flujo de microesferas (u otras etiquetas), como anticuerpos de captura y anticuerpos de detección utilizados, junto con histogramas de números de recuentos por canal definidos por microesferas o nanoetiquetas. Los parámetros representativos de la adquisición de datos incluyen las características de la microesfera sensibilizada, el número y la identificación de los anticuerpos de captura, el número y la identificación de los anticuerpos de detección, y los valores y procesos de normalización o control utilizados para ajustar los datos, por ejemplo para corregir el solapamiento de los espectros de fluorescencia (generalmente denominado compensación). En 308, los datos de medición de citometría de flujo obtenidos tras el preprocesamiento en 306 para, por ejemplo, normalizar o reordenar, se someten a uno o más análisis para permitir la identificación de grupos y subgrupos de EV. Por ejemplo, pueden elaborarse mapas térmicos o aplicarse análisis de componentes principales (ACP) a algunas o todas las partes de los datos adquiridos. En algunos casos, se descartan las porciones de datos asociadas a recuentos bajos. En algunos ejemplos, se realizan múltiples análisis diferentes que permiten la identificación de grupos o subgrupos. Mientras que las agrupaciones o subagrupaciones se pueden producir en 308, algunos o todos los análisis se muestran en 310, ya sea para su uso en la selección de grupos tras la inspección visual por parte de un usuario o para confirmar la selección de grupos. También se puede mostrar una interfaz gráfica de usuario para que el usuario pueda confirmar, modificar, rechazar, reiniciar o finalizar el análisis. En algunos ejemplos, la preparación de los análisis en 308 se basa en la obtención de instrucciones ejecutables por ordenador almacenadas en un medio legible por ordenador no transitorio que definen una biblioteca 311. Si se desea, se pueden almacenar las agrupaciones y descartar los datos FC.

25 Las FIGS. 4-5 ilustran datos representativos de citometría de flujo. Con referencia a la FIG. 4, un número de cuentas detectadas asociadas a cada canal (denominado "recuento") se codifica en color para su visualización. Para facilitar la reproducción, la asignación de colores puede mostrarse en escala de grises, y en 402 se muestra una asignación de recuentos en color/escala de grises. Como se muestra en la FIG. 4, un número de recuentos varía entre cero y aproximadamente 500. Cada fila de la FIG. 4 muestra así los recuentos de cada canal para cada población de muestra. La presentación de datos de la FIG. 4 se denomina mapa de calor. La FIG. 4 ilustra catorce muestras (mostradas en catorce filas), y cada fila está asociada a 200 canales (es decir, 40 anticuerpos de captura y 5 anticuerpos de detección). En la mayoría de los ejemplos, los números pequeños de recuentos, como menos de 10, 7 o 5, no suelen proporcionar indicadores fiables de las características de la muestra, y los canales con recuentos tan bajos no se utilizan en los análisis posteriores.

35 La FIG. 5 muestra una única fila de un mapa térmico representativo de una muestra K^n , como el mapa térmico de la FIG. 4. En este ejemplo, se utilizan N anticuerpos de captura CAB1 ... CABN junto con tres anticuerpos de detección (DAB1, DAB2, DAB3), definiendo canales 3N. Se pueden utilizar canales adicionales asociados con la dispersión u otras etiquetas, pero no se muestran en la FIG. 5. El sombreado de cada canal se utiliza para ilustrar el recuento/canal.

Procesamiento de microesferas multiplex

40 La FIG. 6 ilustra un procedimiento 600 de obtención de datos de FC y procesamiento de los datos de FC adquiridos para la identificación de grupos y subgrupos. En 602, se adquieren y procesan los datos de FC. Los datos adquiridos (recuentos) se asignan a canales en función de los anticuerpos de captura y detección (y los fluoróforos asociados) que se utilicen. También pueden obtenerse datos de FC asociados a microesferas de control y utilizarse para corregir la unión no específica. Los datos se pueden normalizar, los canales se pueden reordenar y los recuentos se pueden registrar basándose en el logaritmo de los recuentos reales. Se puede aplicar la sincronización de poblaciones junto con la compensación para reducir los efectos del solapamiento espectral de los fluoróforos. En algunos casos, se producen histogramas de recuento. En 604, los conjuntos de datos FC para una pluralidad de muestras se combinan para producir una matriz de datos, tal como una matriz en la que cada fila está asociada con una muestra, y cada columna contiene un valor numérico asociado con un número de recuentos en un canal particular. Si se desea, los datos combinados pueden normalizarse o reordenarse adecuadamente para agrupar poblaciones de muestras similares.

55 Las características de las microesferas y las muestras pueden almacenarse para su uso en la adquisición de datos de FC, el análisis y la notificación de resultados como grupos o subgrupos. Por ejemplo, los parámetros del haz se almacenan en 606 e incluyen anticuerpos de captura y anticuerpos de detección y sus fluoróforos asociados. En algunos casos, se incluyen identificadores de conjuntos (paneles) de anticuerpos de captura. Los datos de la muestra, como agrupaciones de muestras, respuestas exhibidas por uno o más especímenes en una muestra o agrupación de muestras, y punto de tiempo asociado con un tratamiento de muestra se almacenan en 608.

En 610, pueden aplicarse uno o más procedimientos para encontrar agrupaciones y subagrupaciones EV. Normalmente, la selección de dichos procedimientos la realiza un usuario con una interfaz gráfica de usuario, y se muestran los resultados de dichos análisis. Sin embargo, en algunos ejemplos, los resultados se envían a un clínico u

otro destino a través de una red, y los resultados del análisis no se muestran localmente. Por ejemplo, se puede generar un mapa de calor o aplicar un procedimiento jerárquico o de agrupación para identificar muestras relacionadas. En otros ejemplos, se producen mapas de correlación, gráficos de caja, análisis de componentes principales (ACP), análisis de incrustación de vecinos estocásticos distribuidos en t (tSNE) o mapas de calor, y en 612 se muestran los datos tabulares asociados, gráficos u otras características de un análisis particular que pueden ser útiles para un usuario. A continuación, se exponen ejemplos de estas evaluaciones. Basándose en esta evaluación, se pueden adquirir datos adicionales de FC en 602 utilizando el mismo panel de anticuerpos o paneles diferentes, o evaluar una respuesta.

Las FIGS. 7A-7B ilustran un conjunto de anticuerpos de captura y datos de FC asociados, respectivamente, ilustrando agrupaciones de respuesta asociadas con cada uno de los anticuerpos de captura del conjunto. Las respuestas individuales son evidentes.

Análisis de muestras

Con referencia a la FIG. 8, un mapa de calor 800 incluye siete filas y muestra recuentos para siete muestras asociadas con 333 canales definidos por 37 anticuerpos de captura y 9 anticuerpos secundarios (detección) (es decir, 9 fenotipos). En este ejemplo, los anticuerpos de detección son una mezcla de CD9, CD63, CD81, HLA-ABC, HLA-E, CD117, CD11b, CD33, CD40, CD3 y CD16. Se muestran muestras asociadas a tres tratamientos diferentes, una asociada a un primer tratamiento (Respuesta 1), dos asociadas a un segundo tratamiento (Respuesta 2) y cuatro asociadas a un tercer tratamiento (Respuesta 3). En el ejemplo de la FIG. 8, los canales que aparecen en la parte central del mapa de calor 800 están asociados a recuentos bajos o muy bajos, y los datos de recuento asociados pueden no utilizarse. La inspección del mapa de calor 800 permite identificar las diferencias de respuesta del canal entre los tres tratamientos, y la Respuesta 2 parece ser la más diferente de la Respuesta 3, y la Respuesta 2 parece más similar a la Respuesta 1 que a la Respuesta 3.

Mientras que la presentación de un mapa de calor permite la estimación de agrupaciones adecuadas, las agrupaciones se pueden determinar sin la inspección del usuario (o se puede ayudar a la inspección del usuario) basándose en la agrupación jerárquica aglomerativa como se ilustra en un dendograma 900 mostrado en la FIG. 9. Los datos seleccionados asociados a cada muestra se utilizan para representar una ubicación en un espacio multidimensional, y se determinan las distancias entre dichos puntos. En un ejemplo típico, se utilizan las distancias euclidianas, pero pueden utilizarse otras métricas de distancia, como las distancias euclidianas al cuadrado o Manhattan. También se pueden mostrar agrupaciones intermedias. En la FIG. 9, las Respuestas 1 y 2 están asociadas a un único conglomerado, mientras que la Respuesta 3 está asociada a un conglomerado inferior 902 y a un conglomerado intermedio 904, lo que indica variabilidad dentro de la Respuesta 3. El ejemplo de FIG. 9 muestra los resultados de la agrupación jerárquica aglomerativa en un conjunto de muestras, pero también se puede aplicar una agrupación similar basada en anticuerpos de detección.

La FIG. 10 ilustra un diagrama de caja que muestra las diferencias en la intensidad de tinción del anticuerpo secundario para cada microesfera en función de los grupos asignados por un usuario. En el ejemplo de la FIG. 10, las agrupaciones corresponden a no respondedores (Respuestas 1 y 3) y respondedores (Respuesta 2).

En algunos ejemplos, se utiliza el ACP para determinar las agrupaciones. La FIG. 11A ilustra gráficos unidimensionales de ACP para los tres primeros componentes principales de un ACP representativo de datos de CF. Las poblaciones muestrales se denominan R1, R2 y R3. La FIG. 11B es un gráfico ACP bidimensional que muestra combinaciones de los 3 primeros componentes principales. La FIG. 12 es un gráfico ACP tridimensional que puede visualizarse como un gráfico giratorio. Los coeficientes de las variables se muestran como puntos relativos y los componentes principales se muestran con etiquetas de muestra. Los coeficientes variables relativos a los conglomerados de muestras únicas en esta visualización pueden utilizarse para identificar canales únicos de subconjuntos. La extensión de las etiquetas desde el origen indica los componentes principales asociados, y las agrupaciones muestran cómo la variabilidad de los datos es proporcionada por los tres componentes principales utilizados en la FIG. 12. Las direcciones de los ejes principales pueden girarse para obtener vistas adicionales. Por comodidad, este tipo de gráfico puede denominarse "ACP etiquetado", debido a la utilización de etiquetas de canal. La FIG. 13 es un diagrama de Scree que muestra el porcentaje de variabilidad de los resultados correspondiente a cada componente principal.

En otro ejemplo ilustrado con referencia a la FIG. 14, se utiliza Incrustación de vecino estocástico distribuido en t (tSNE) para identificar agrupaciones. Cada punto de datos de la FIG. 14 corresponde a una combinación de un anticuerpo de captura (de un conjunto de 37) y un anticuerpo de detección (de un conjunto de 9). En la FIG. 14, la FC multiplexada multidimensional se mapea en dos dimensiones. En un mapeo de este tipo, los marcadores de mayor tamaño indican una mayor variación de la expresión del fenotipo en el conjunto de datos. Típicamente, a cada anticuerpo de detección se le asigna un color respectivo para que la determinación de la variabilidad asociada a un anticuerpo sea revelada por el gráfico de la FIG. 14. La FIG. 15 es un duplicado del gráfico tSNE de la FIG. 14 con etiquetas para cada marcador. Las etiquetas de la FIG. 15 utilizan la misma coloración que en la FIG. 14. La agrupación de marcadores indica los que están relacionados, probablemente aumentando y disminuyendo de forma sincrónica, lo que permite la identificación de marcadores para su posterior análisis/investigación. La representación de la FIG. 15 puede denominarse "etiquetada" en vista del uso directo de etiquetas de canal.

La FIG. 16 ilustra un mapa de calor que indica la correlación de los marcadores entre sí, normalmente utilizando colores. En un ejemplo de escala de grises, la FIG. 16, las regiones más oscuras se asocian a correlaciones mayores. Un conectograma ilustrado esquemáticamente en la FIG. 17 puede utilizarse para vincular marcadores (canales) que muestren correlaciones significativas entre sí para la identificación de objetivos para su posterior análisis e investigación.

Sistema Multiplex representativo

Con referencia a la FIG. 18, un sistema 1800 incluye un citómetro de flujo 1802 que está acoplado a un controlador de citómetro 1804 que regula los flujos de fluidos, la adquisición de datos, el análisis y la salida de los datos adquiridos. El citómetro de flujo 1802 está típicamente acoplado a un medio de almacenamiento legible por ordenador no transitorio 1806 que almacena información de microesferas (como características de anticuerpos de captura y detección), datos multiplexados como datos de histograma, ajustes del instrumento e instrucciones ejecutables por el procesador, y datos procesados (típicamente compactados como resultado del procesamiento) en porciones de memoria respectivas. En algunos casos, algunos o todos de los datos o instrucciones se obtienen o almacenan a través de una conexión de red a una red de área local o de área amplia. En la mayoría de los casos, un controlador de pantalla 1820 está acoplado a una pantalla 1822 para que los datos procesados o sin procesar, los ajustes e instrucciones del instrumento u otra información puedan ser proporcionados a un usuario.

Interfaz de usuario representativa

La FIG. 19 muestra una captura de pantalla 1900 de una interfaz de usuario ejemplar para la adquisición, control y procesamiento de datos de FC para identificar grupos y subgrupos. En el ejemplo, la importación de nuevos datos se selecciona con una casilla de verificación 1920 y la selección de un procedimiento de análisis se señala seleccionando una casilla de verificación 1930. Un cuadro de menú 1931 enumera los procedimientos disponibles que se pueden seleccionar, por ejemplo, resaltando con un dispositivo señalador como un ratón. Como alternativa, puede proporcionarse un menú desplegable. En algunos casos, la selección de un proceso en particular inicia al usuario a establecer el control del proceso. Se proporciona un botón 1932 para indicar que se van a mostrar los resultados del análisis; normalmente se proporciona un menú adicional para seleccionar los resultados de visualización preferentes. Una casilla de verificación 1936 es seleccionable para la salida de resultados analíticos tales como representaciones gráficas (por ejemplo, mapas de calor, diagramas de Scree, conectogramas) o datos asociados con tales representaciones. Los botones 1940A y 1940B proporcionan las funciones OK y Cancelar.

Análisis de la carga de VE en subconjuntos seleccionados

En los ejemplos anteriores, la selección de grupos y subgrupos específicos de muestras permite que estos grupos y subgrupos se clasifiquen y analicen por separado en ensayos posteriores, como la secuenciación de ARN o ADN, el análisis de mutaciones o los estudios de colocalización molecular. Las FIGS. 20A-20B muestran un diagrama esquemático (A) y una captura de pantalla de un ejemplo de datos de miARN (B), en el que se clasificaron grupos de VE aisladas en función de un marcador asociado a tumor, el antígeno de membrana específico de la próstata, y se analizó su contenido de miARN. Los perfiles de miARN de los diferentes grupos de VE (véase la FIG. 20B) muestran una firma de 11 miARN, incluidos 10 miARN previamente asociados con células de cáncer de próstata agresivo, mientras que la firma de miARN de interés no está claramente representada en la población de EV no seleccionadas (total). La FIG. 21 ilustra más detalladamente un proceso para obtener dichos grupos y subgrupos.

Con referencia a la FIG. 22, la adquisición y procesamiento paralelo de datos 2200 se muestra mediante flujos de datos representativos 2202, 2204, 2206 que producen salidas que pueden dirigirse a la nube o a otra red para su procesamiento remoto. En el flujo de datos 2202, la importación de datos se lleva a cabo como se indica en 2210 e incluye la adquisición de la información de la muestra, la importación de los datos de la muestra y la normalización de los datos multiplex, los datos clínicos y los datos ómicos. En 2212, los datos importados de 2210 son procesados en base a las asignaciones de color de los anticuerpos y los datos son normalizados y concatenados. A continuación, los datos procesados se someten a un análisis de salida de cuentas y se acoplan a un procesador remoto. Se pueden ejecutar varios flujos de datos en paralelo, y se muestran tres para una mejor ilustración.

La importación y procesamiento de datos de microesferas multiplex 2300 se ilustra en la FIG. 23. Se puede utilizar una GUI 2306 para controlar la recepción de los parámetros de la microesfera 2302, la información de la muestra 2304 y los datos de citometría de flujo 2306. En 2308, los datos se importan según lo seleccionado con la GUI 2306 y luego se procesan en 2310. En 2312, se comparan los datos de las microesferas medidas y de control, y luego se normalizan en 2314 y/o se utilizan para generar histogramas en 2316. Los datos normalizados y/o histogramas son entonces acoplados para el procesamiento previo a la salida como se muestra en la FIG. 22. En algunos casos, las muestras se reordenan en 2318 para el procesamiento adicional de datos en 2310 y la comparación de microesferas en 2312.

La FIG. 24 ilustra una disposición representativa para el análisis de perlas como el mostrado en la FIG. 22. Los datos del procesamiento previo a la salida (como en 2212 en la FIG. 22) se acopla para proporcionar análisis de correlación en 2402, histogramas en 2404 y dendogramas en 2406. Los colores de los grupos de enlace se proporcionan en 2408 y los grupos de colores de usuario pueden definirse en 2414. Los colores pueden asociarse a marcadores secundarios en 2412 y a muestras o grupos de muestras en 2410. En 2416, los datos se procesan selectivamente generando un

diagrama de caja, realizando un análisis tSNE o ACP, y/o generando mapas de calor y/o conectogramas. También pueden utilizarse otros tipos de análisis. Tras el análisis, los datos pueden exportarse para su posterior análisis o para solicitar la adquisición de datos adicionales, como datos ómicos.

5 La FIG. 25 ilustra una GUI 2500 que puede utilizarse para procesar, importar, exportar y analizar datos. Una serie de regiones activables por el usuario 2502 (que responden típicamente a un dispositivo señalador del ordenador, como un ratón o un panel táctil) ordena a un procesador que muestre mapas térmicos de varios tipos o un diagrama de caja. Una región activable por el usuario 2504 es seleccionable para la normalización basada en los parámetros de normalización mostrados en una región de visualización/entrada 2506. Una serie 2508 de regiones activables por el usuario (convenientemente implementadas como pestañas) permite el control de varios procesamientos de análisis, adquisición y visualización. Se muestra una región de salida o actividad 2510 con visualización de un histograma y parámetros de control asociados. Una región de visualización adicional 2512 puede mostrar una lista de comandos ejecutados u otra información sobre el procesamiento previo y los procedimientos de importación o exportación de datos. La región de actividad 2510 puede listar archivos de datos que han sido procesados, importados o exportados, y una visualización particular se define generalmente en relación a una selección entre la serie 2508 de pestañas. Por ejemplo, la FIG. 26 muestra la región de actividad 2510 con la selección de una pestaña asociada al procesamiento ACP. Se ilustran un gráfico ACP, un gráfico Scree y los controles de color de la pantalla ACP. Para cada pestaña, la región de actividad 2510 está generalmente dispuesta para mostrar los datos asociados, los resultados del procesamiento de datos y proporcionar la entrada y visualización de cualquier parámetro utilizado en el análisis. En otro ejemplo, la FIG. 27 muestra la región de actividad 2510 con la selección de una pestaña asociada al procesamiento tSNE.

Selección de canales

En los ejemplos descritos anteriormente, los grupos y subgrupos de muestras se identifican basándose en análisis de recuentos de canales. Estas identificaciones de grupos permiten seleccionar los conjuntos de canales preferentes para la detección de muestras en un subgrupo concreto. Por ejemplo, la presencia de muestras asociadas con grupos particulares puede identificarse utilizando canales asociados con estas agrupaciones, y no es necesario adquirir datos de canales para otros canales. Además, la identificación de canales útiles puede servir para orientar la selección de canales adicionales.

En vista de las muchas realizaciones posibles a las que pueden aplicarse los principios de la divulgación, debe reconocerse que las realizaciones ilustradas son sólo ejemplos y no deben considerarse una limitación del alcance de la divulgación. Por lo tanto, reivindicamos todo lo que esté dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento, que comprende:

5 Identificación de al menos dos grupos de muestras de vesículas extracelulares (VE) basándose en respuestas diferentes en recuentos de canales de citometría de flujo multicanal para una pluralidad de muestras para cada uno de una pluralidad de canales, estando cada canal definido por un agente de captura y un agente de detección, y que incluya al menos 10 recuentos; selección de un conjunto de canales asociados a uno de los grupos de muestras seleccionado en función de los al menos dos grupos de muestras EV identificados; y

10 obtención de recuentos de canales de citometría de flujo multicanal para una muestra EV de prueba para cada canal del conjunto de canales para evaluar si la muestra de prueba está asociada con el grupo de muestras seleccionado, en el que la pluralidad de canales, estando cada canal definido por un agente de captura y un agente de detección, incluye canales identificables con longitudes de onda o bandas de longitudes de onda de luz dispersa seleccionadas además de las longitudes de onda de fluorescencia seleccionadas, así como canales

15 identificables con espectros de luz dispersa además de los espectros de fluorescencia seleccionados, en el que se utilizan uno o varios algoritmos de deconvolución para separar las señales ópticas correspondientes a canales diferentes.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el conjunto de canales se obtiene a partir de los recuentos de canales de citometría de flujo multicanal basándose en una representación etiquetada de una incrustación de vecinos estocástica distribuida en t asociada con al menos algunos de la pluralidad de canales.

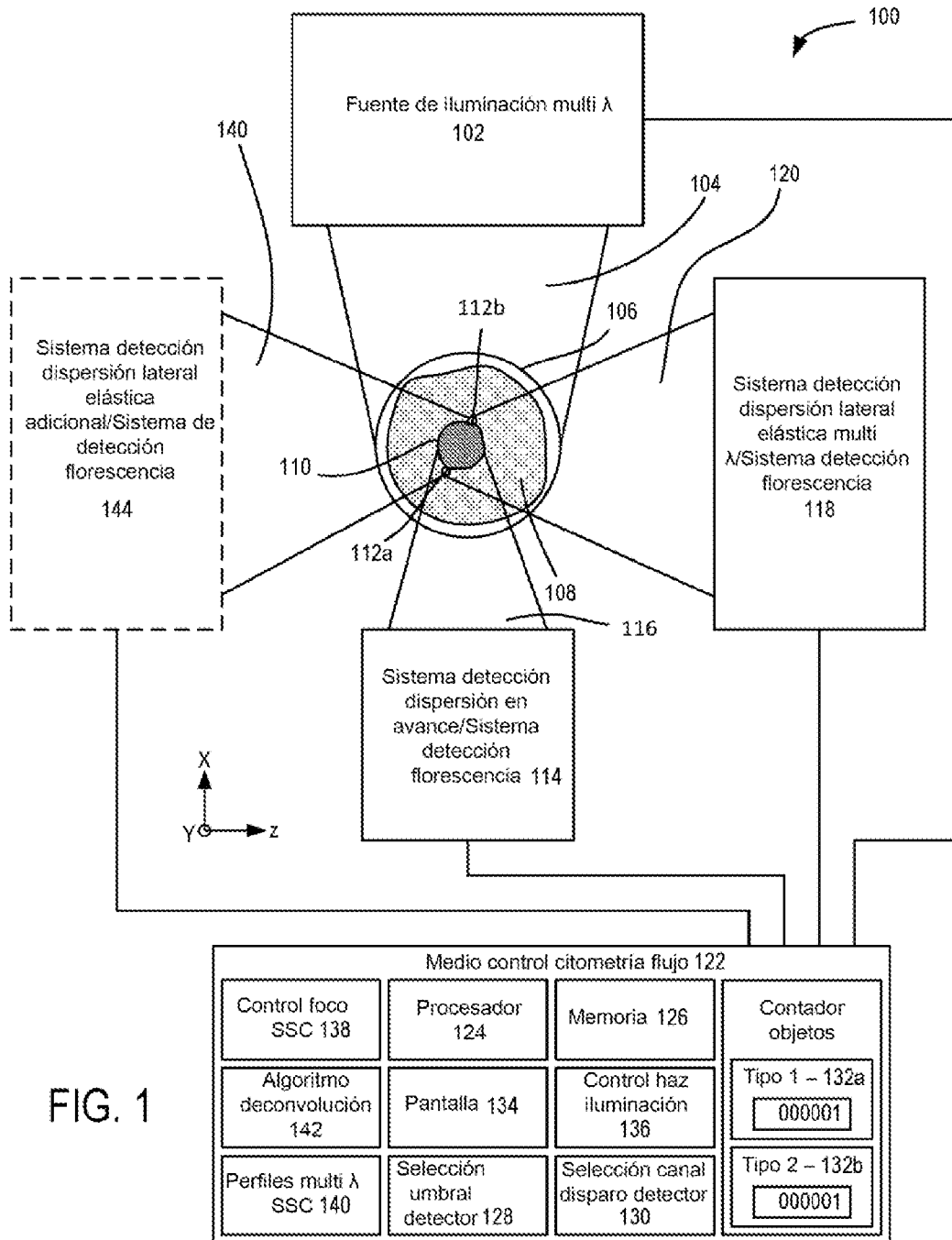
20

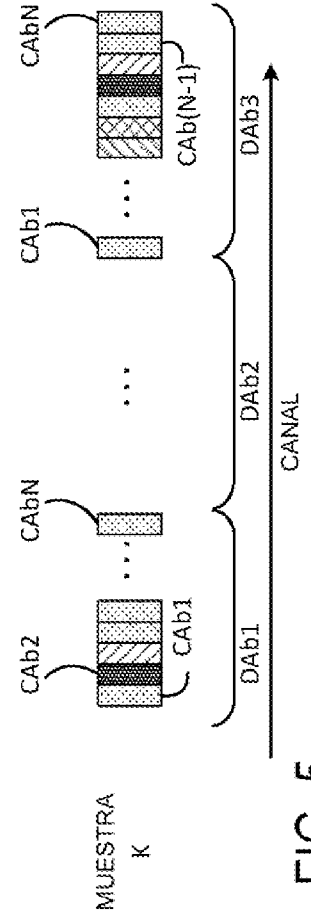
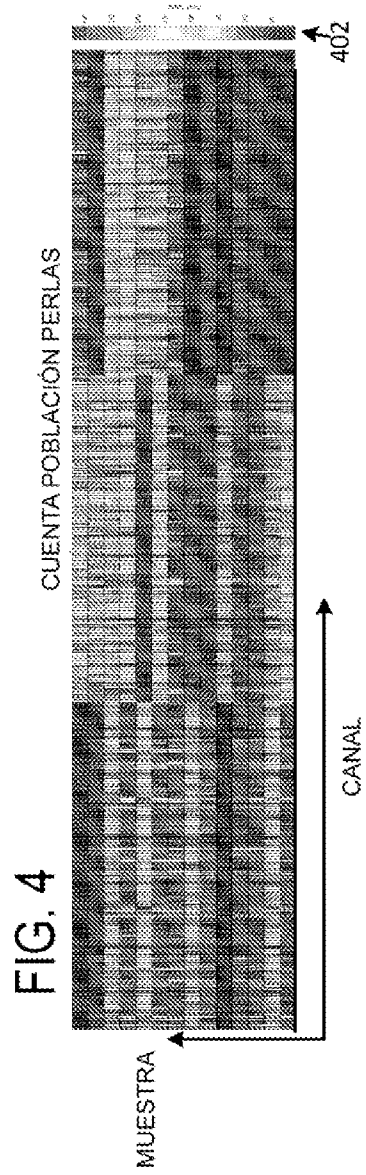
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el conjunto de canales se obtiene a partir de los recuentos de canales de citometría de flujo multicanal basándose en una agrupación jerárquica aglomerativa o un análisis de componentes principales.

4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los conjuntos diferentes de agentes de captura varían de 40 a 100, y los más de dos conjuntos diferentes de agentes de detección varían de 4 a 10.

25

5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el número de canales varía entre 160 y 500.





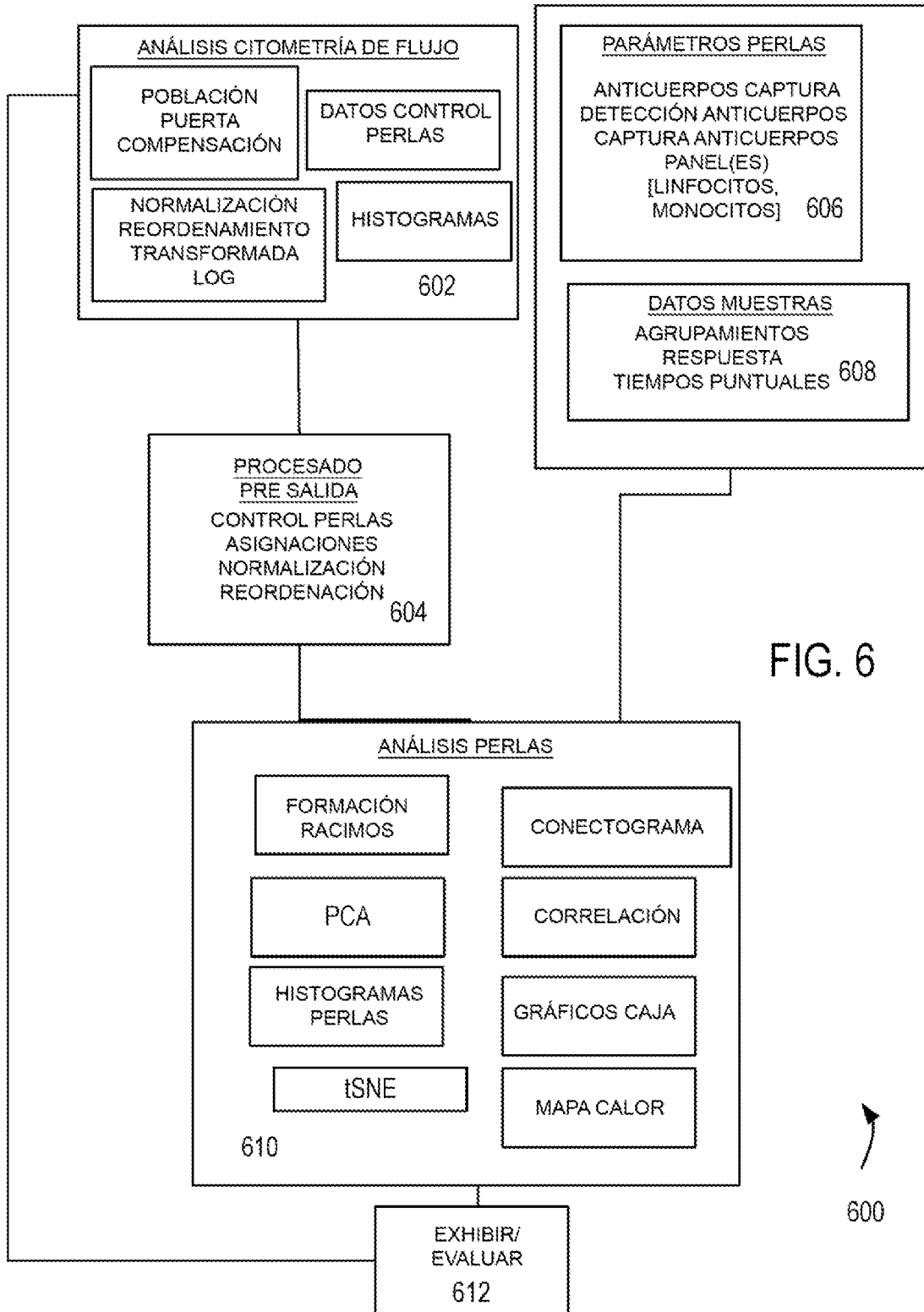


FIG. 6

Anticuerpos captura conjunto perlas

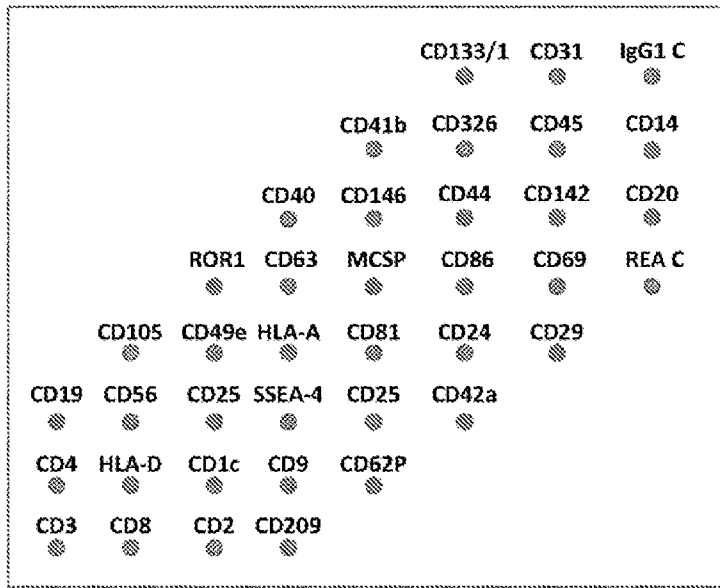


FIG. 7A

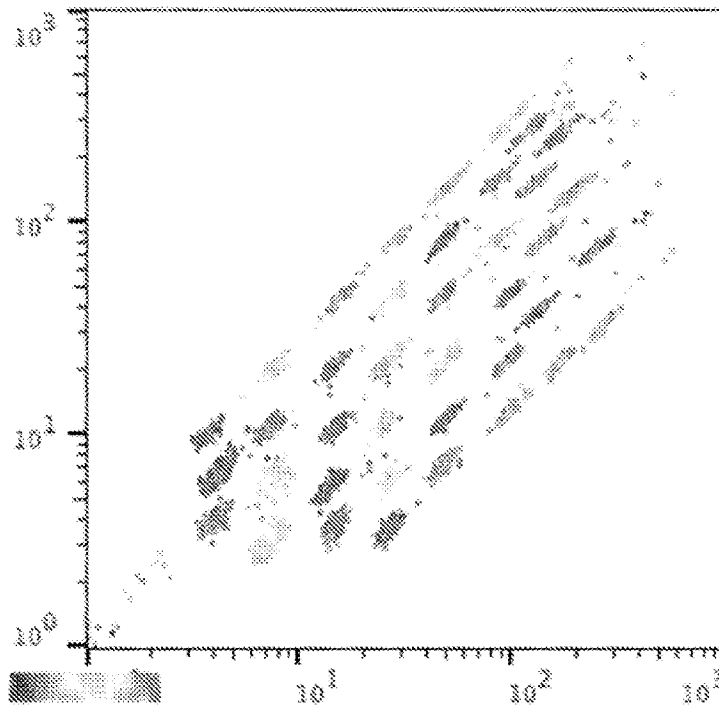


FIG. 7B

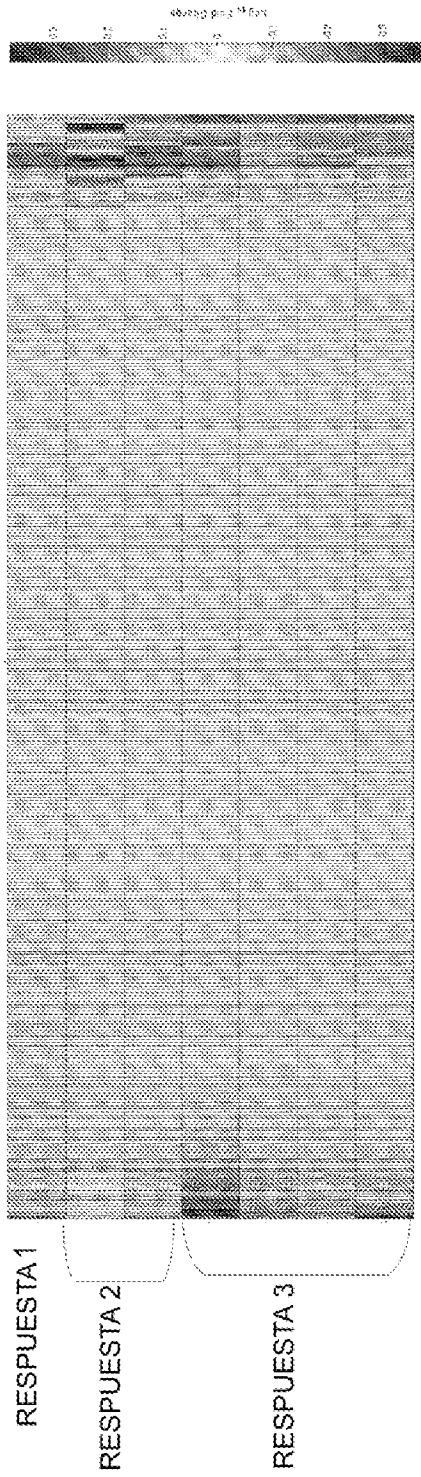


FIG. 8

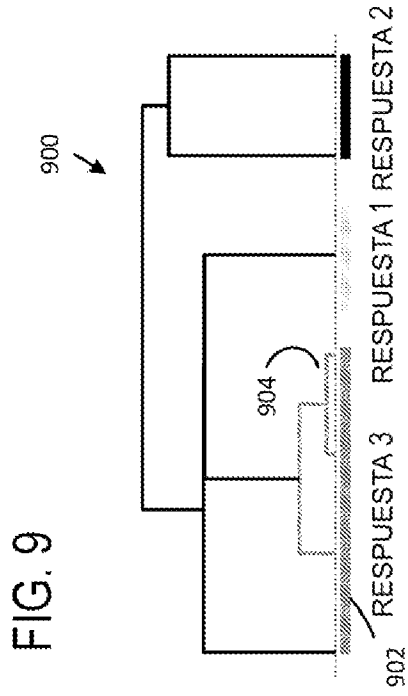


FIG. 9

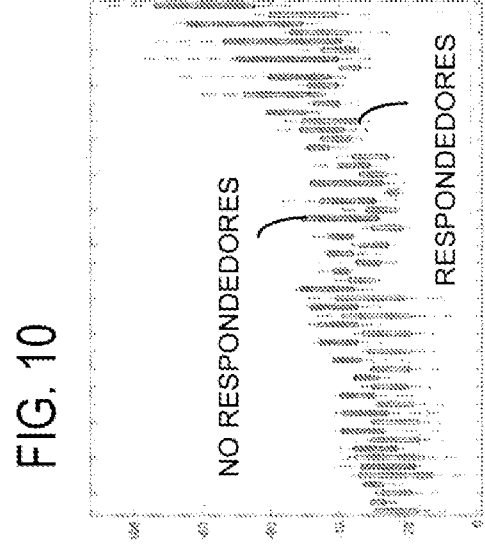


FIG. 10

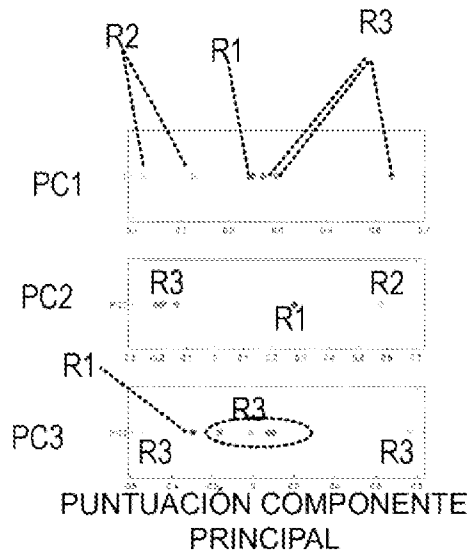


FIG. 11A

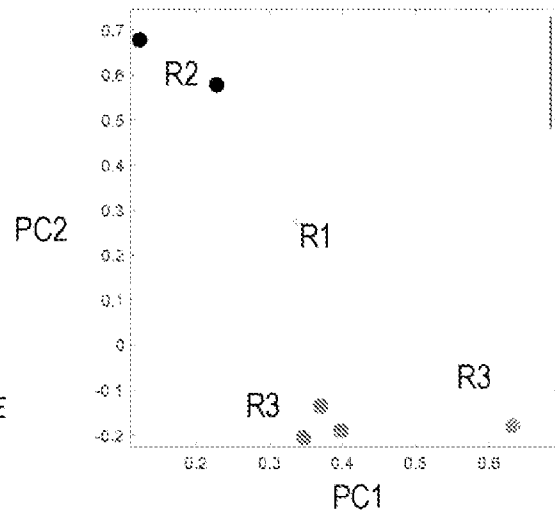


FIG. 11B

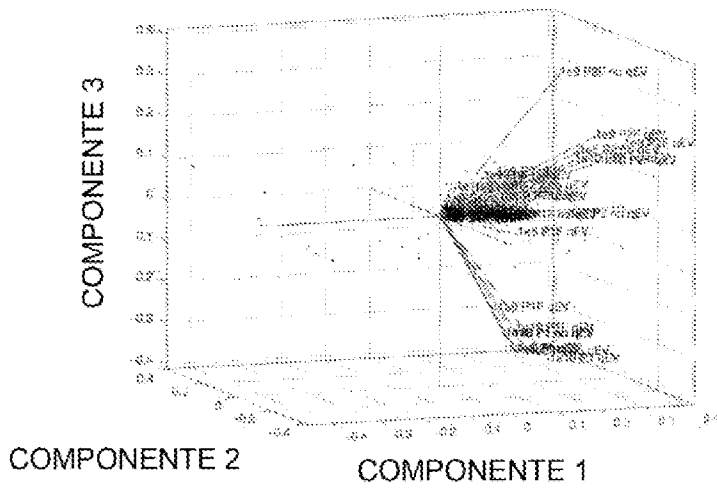


FIG. 12

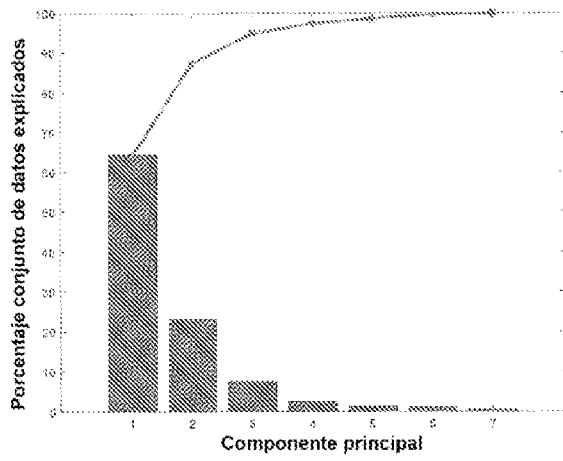


FIG. 13

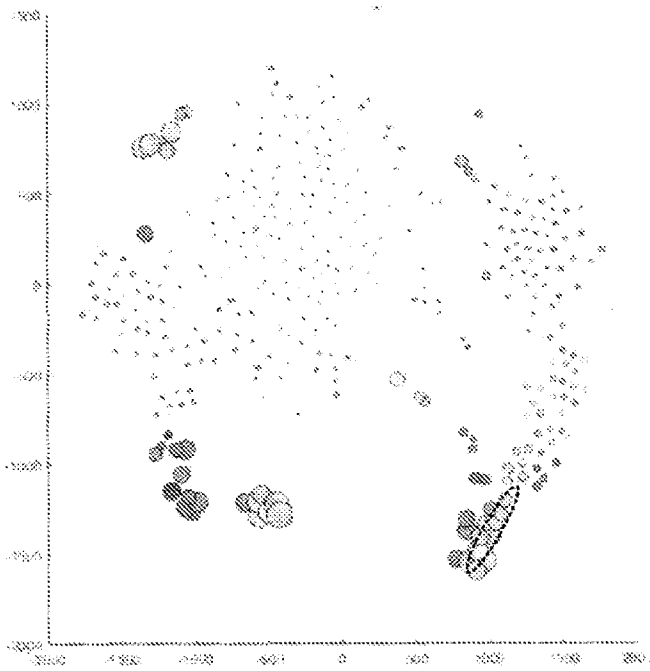


FIG. 14

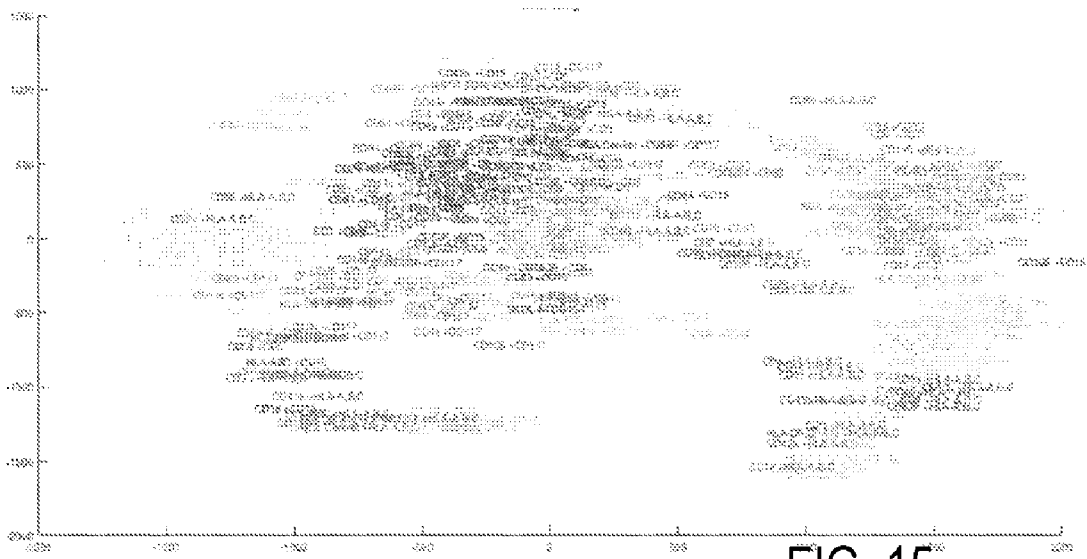


FIG. 15

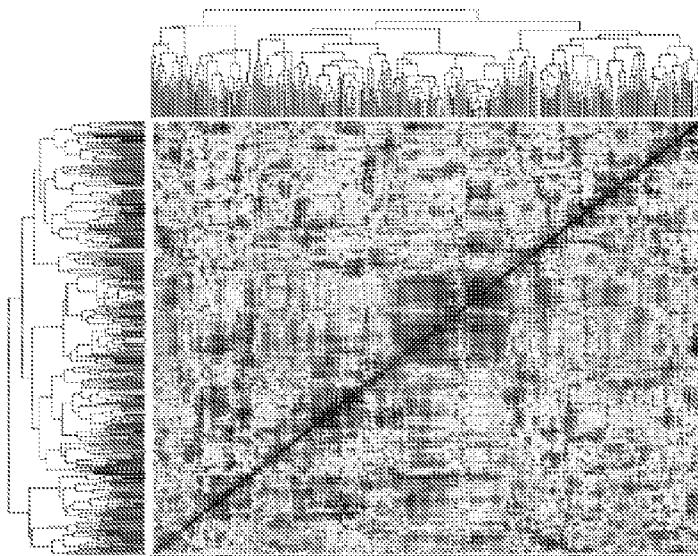


FIG. 16

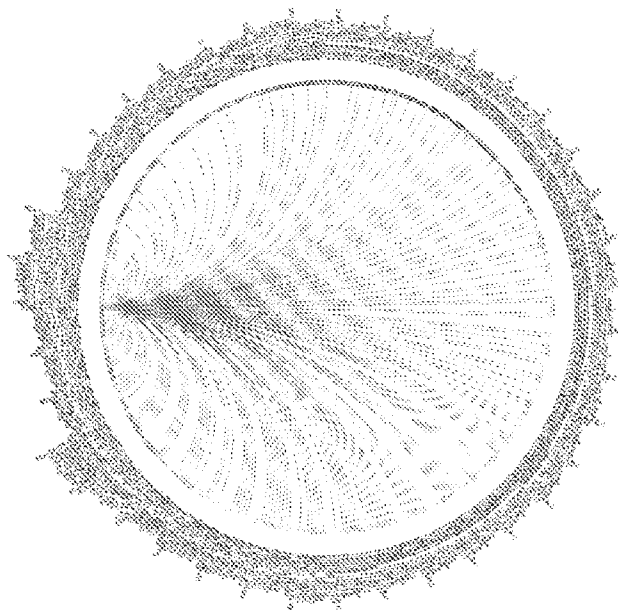


FIG. 17

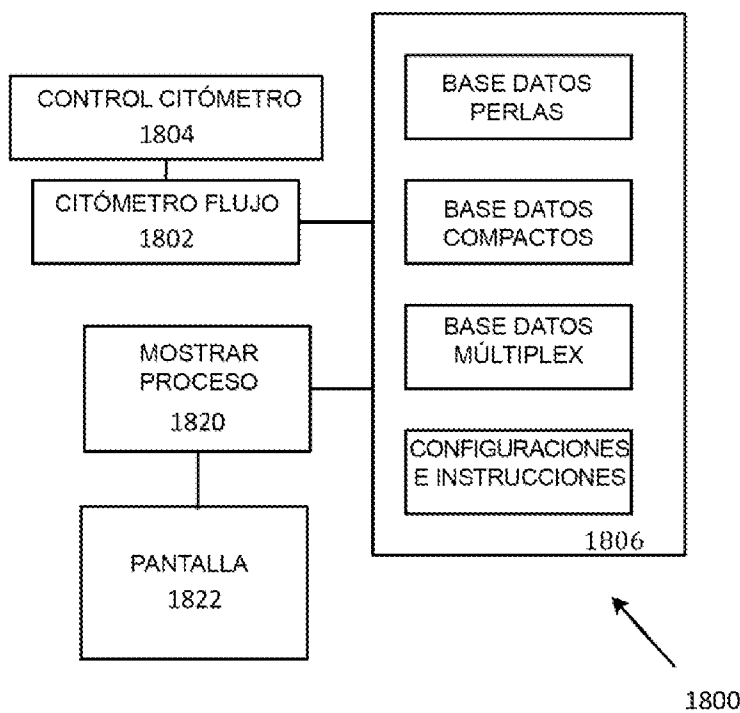


FIG. 18

FIG. 19

PROCESADO PRUEBAS MULTIPLEX

1920
 NUEVOS DATOS CITOMETRÍA FLUJO IMPORTACIÓN

1930
 PROCESADO SELECCIÓN

SOLAMENTE MAPA CALOR 1931
PCA
ANÁLISIS RACIMOS
CORRELACIÓN MAPA COLOR
INCORPORAR VECINOS DIST STO

MOSTRAR
RESULTADOS
1932

1936
 EXPORTAR ANÁLISIS

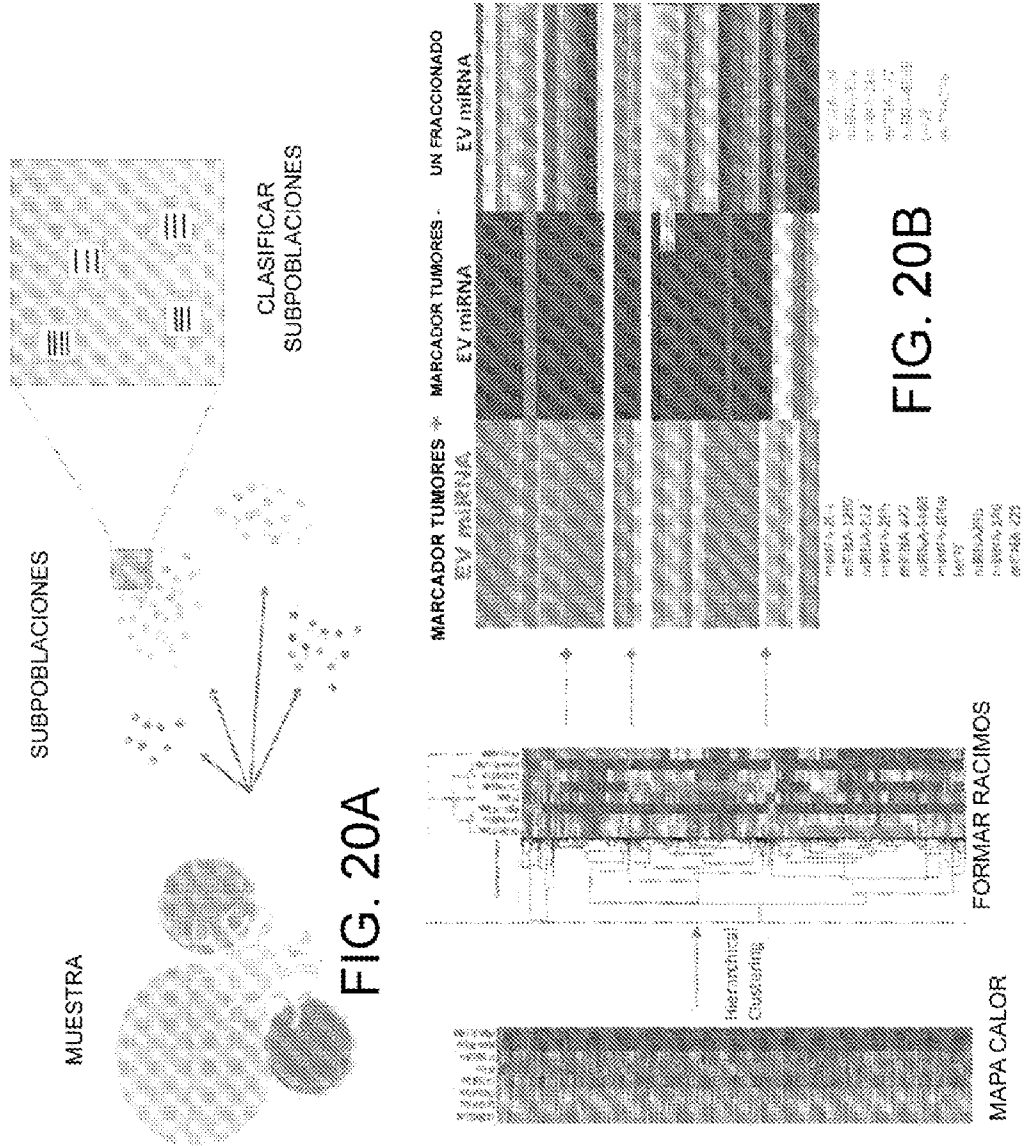
OK
1940A

CANCELAR
1940B

3610



1900



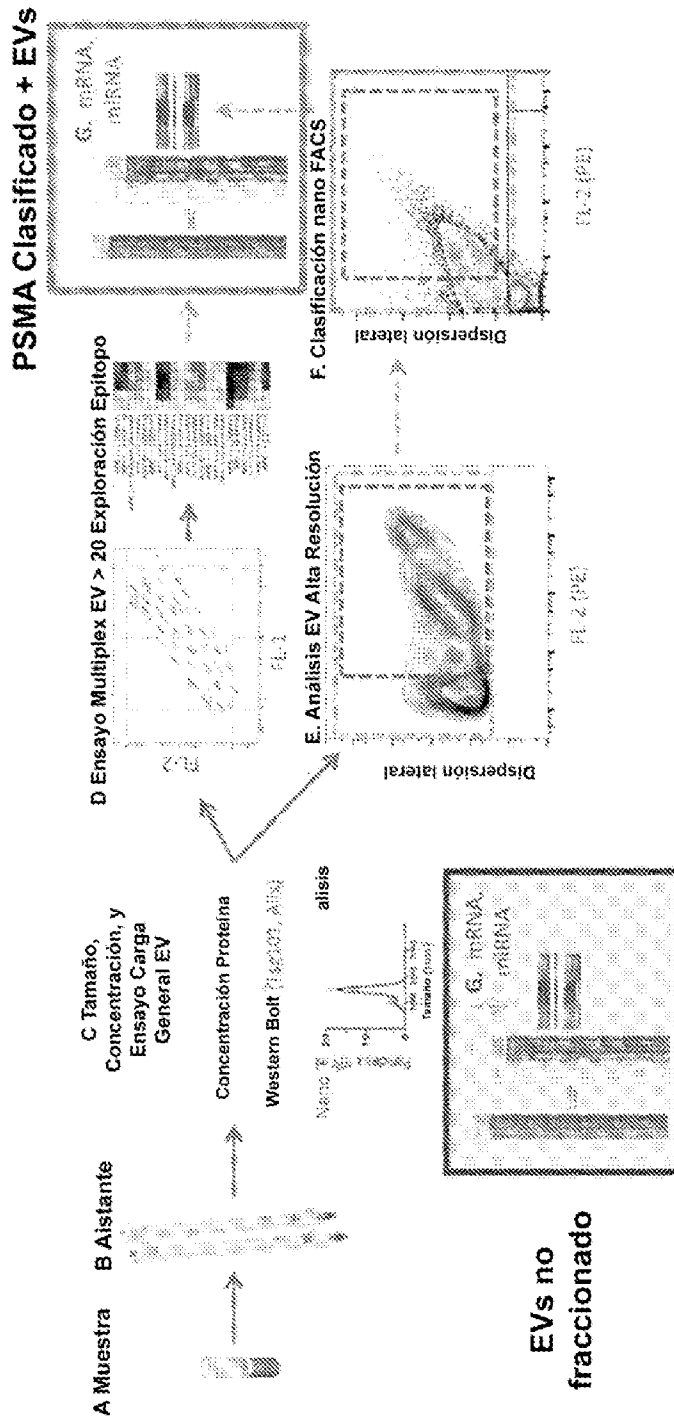
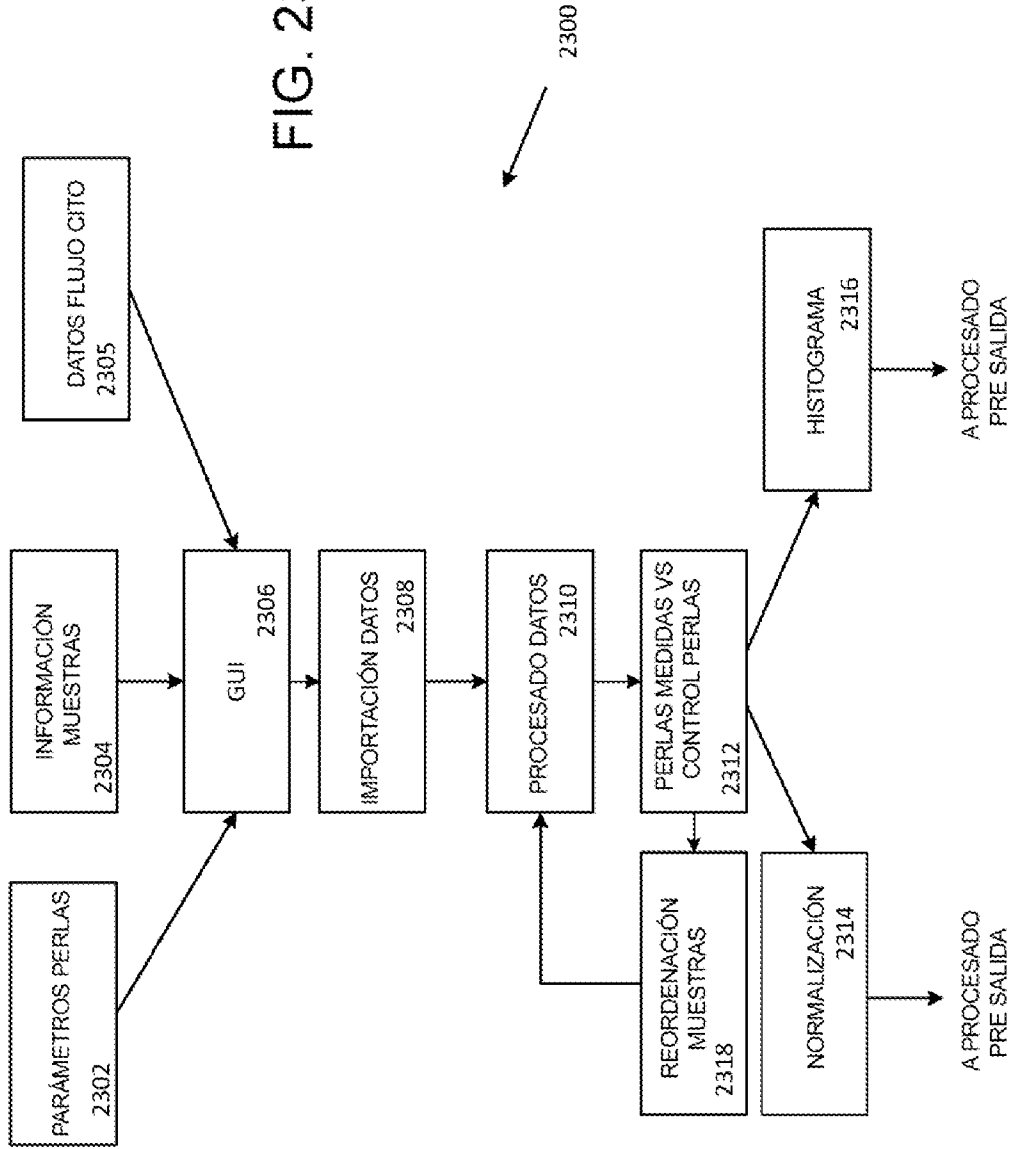


FIG. 21

FIG. 23



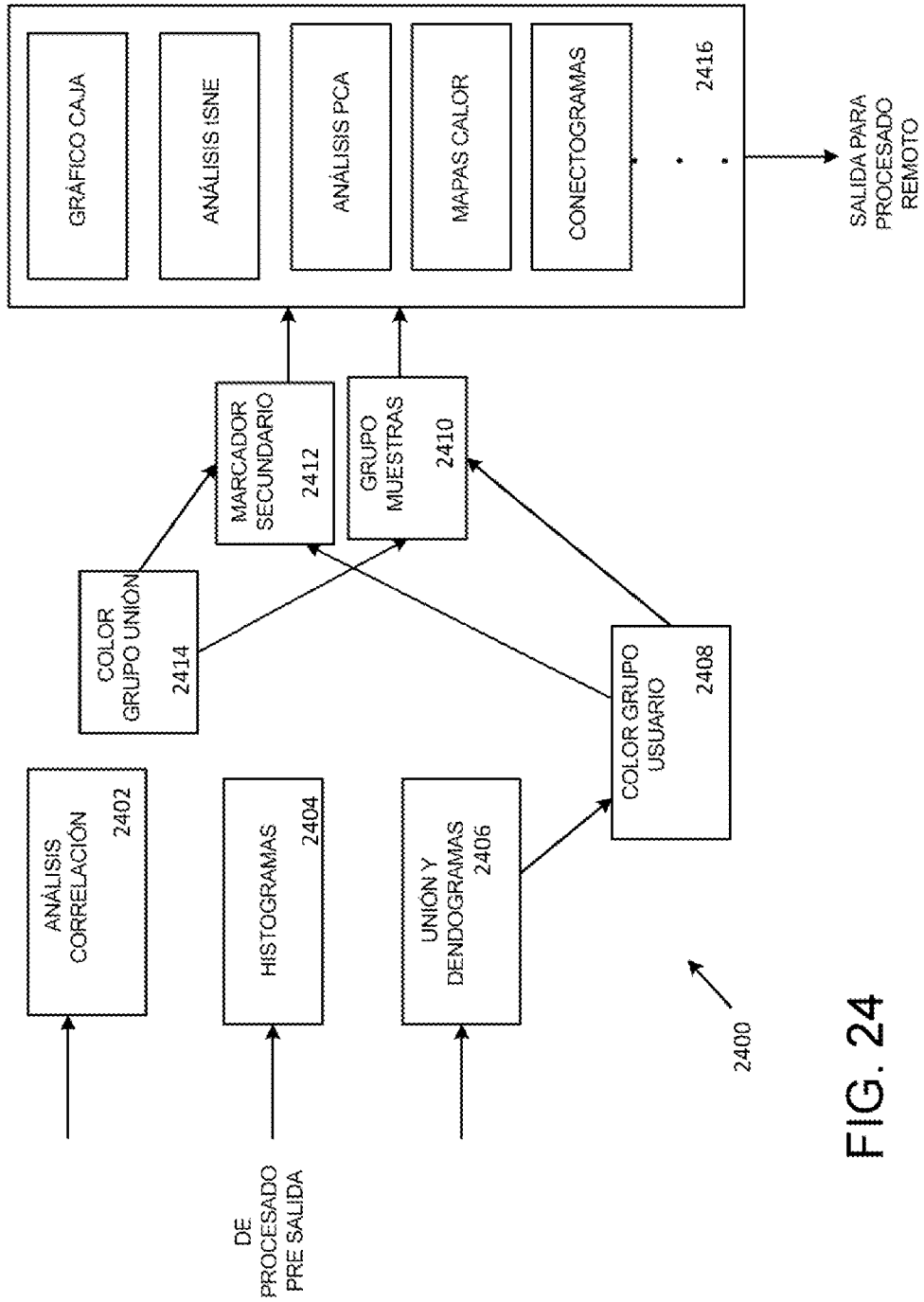


FIG. 24

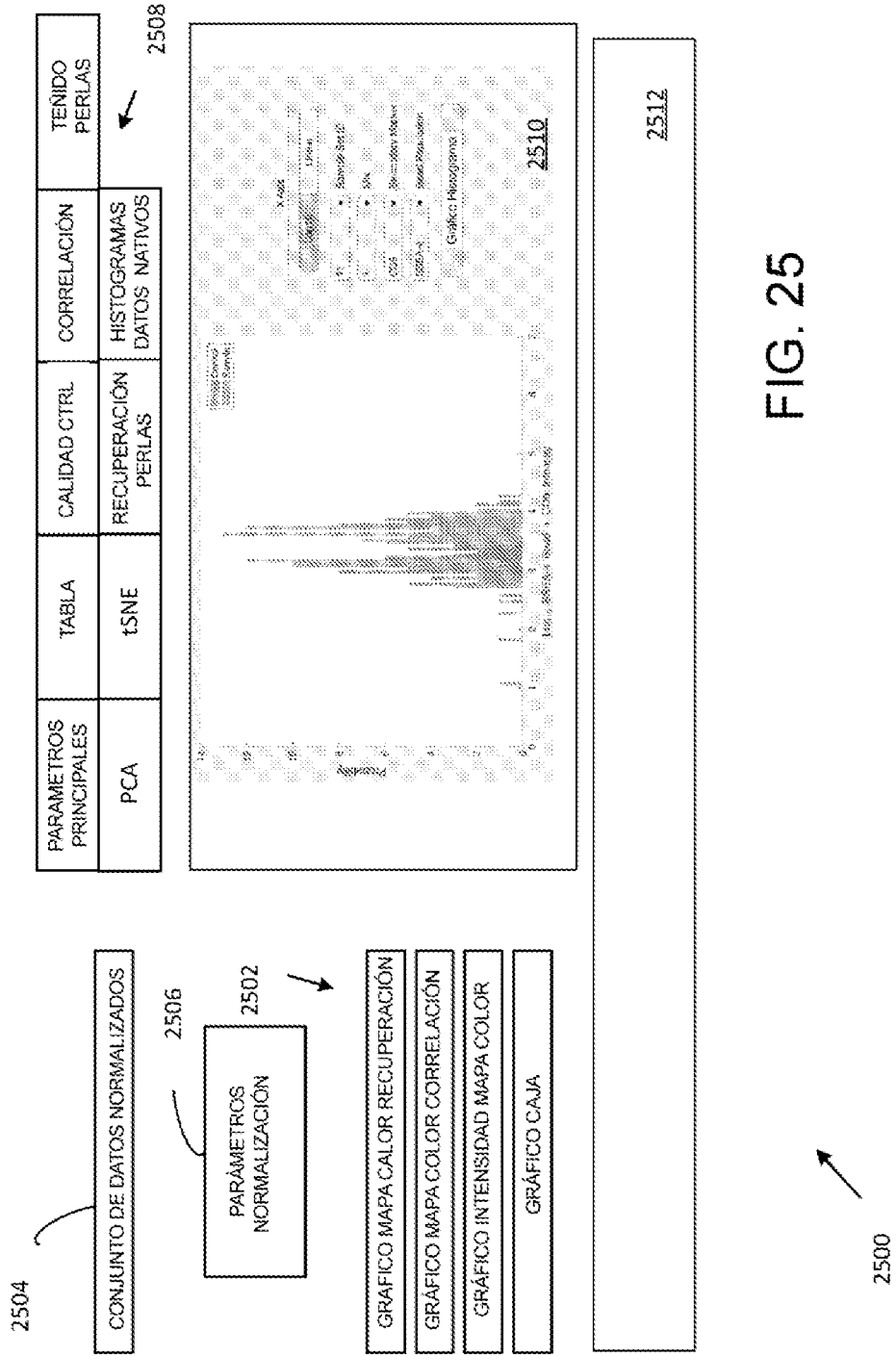


FIG. 25

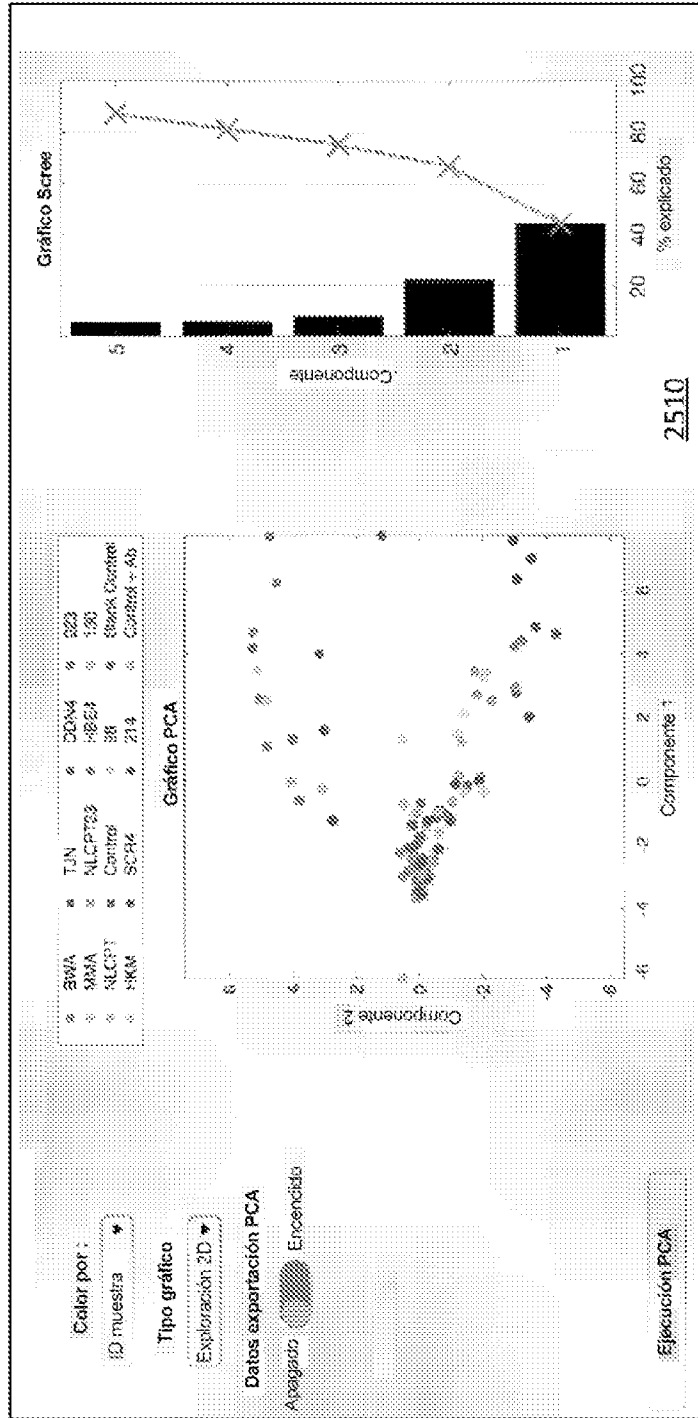


FIG. 26

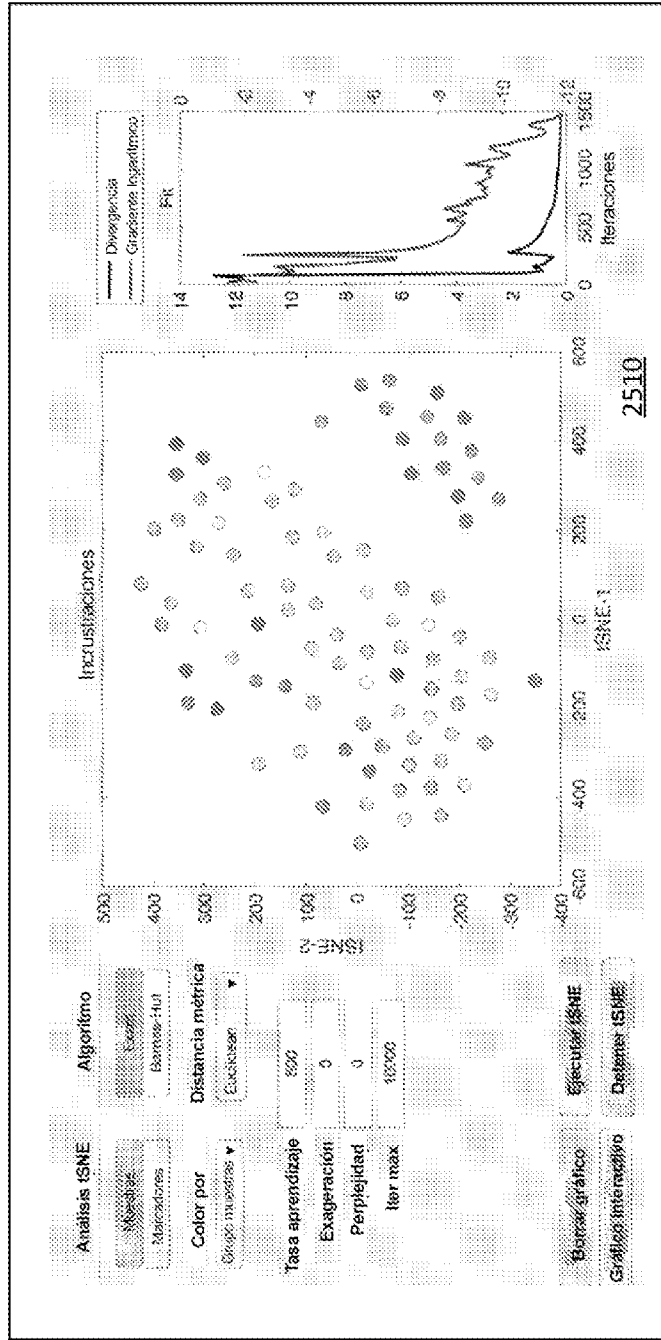


FIG. 27