

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 980 694**

(51) Int. Cl.:

G06T 7/33 (2007.01)

G06T 7/11 (2007.01)

G06T 7/136 (2007.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2020 PCT/US2020/061066**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.05.2021 WO21102005**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2020 E 20821565 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2024 EP 4062372**

(54) Título: **Sistemas y métodos para el análisis espacial de analitos mediante alineación fiducial**

(30) Prioridad:

22.11.2019 US 201962938967 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.10.2024

(73) Titular/es:

**10X GENOMICS, INC. (100.0%)
6230 Stoneridge Mall Road
Pleasanton, CA 94588-3260, US**

(72) Inventor/es:

**WEISENFELD, NEIL, IRA;
DSHKHUNYAN, NAREK y
SHAH, PREYAS**

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 980 694 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

Sistemas y métodos para el análisis espacial de analitos mediante alineación fiducial

REFERENCIA CRUZADA A LA SOLICITUD RELACIONADA

La presente solicitud reivindica la prioridad sobre la solicitud de patente provisional US N.º 62/938.967, titulada "Sistemas y métodos para análisis espacial mediante alineación fiducial", presentada el 22 de noviembre de 2019.

CAMPO TÉCNICO

Esta especificación describe tecnologías relacionadas con el Procesamiento de datos de analitos observados en bases de datos grandes y complejas, tales como los datos de secuenciación de nueva generación dispuestos espacialmente.

ANTECEDENTES

10 La resolución espacial de los analitos en tejidos complejos proporciona nuevos conocimientos sobre los procesos que subyacen a la función y morfología biológicas, tales como el destino y el desarrollo celular, la progresión y la detección de enfermedades, y las redes de regulación a nivel celular y tisular. Ver, Satija et al., 2015, "Spatial reconstruction of single-cell gene expression data", *Nature Biotechnology*. 33, 495-502, doi: 10.1038/nbt.3192 y Achim et al., 2015, "High-throughput spatial mapping of single-cell RNA-seq data to tissue of origin," *Nature Biotechnology* 33: 503-509, doi:10.1038/nbt.3209

15 La comprensión de los patrones espaciales u otras formas de relación entre los analitos puede proporcionar información sobre el comportamiento diferencial de las células. Esto, a su vez, puede ayudar a dilucidar afecciones complejas tales como enfermedades complejas. Por ejemplo, la determinación de que la abundancia de un analito (por ejemplo, un gen) está asociada con una subpoblación tisular de una clase de tejido particular (por ejemplo, tejido enfermo, tejido sano, el límite entre tejido sano y enfermo, etc.) proporciona evidencia inferencial de la asociación del analito con una afección tal como una enfermedad compleja. Del mismo modo, la determinación de que la abundancia de un analito está asociada con una subpoblación particular de una población celular heterogénea en un tejido complejo bidimensional o tridimensional (por ejemplo, un cerebro, hígado, riñón, corazón de mamífero, un tumor o un embrión en desarrollo de un organismo modelo) proporciona evidencia inferencial de la asociación del analito con la subpoblación particular.

20 En consecuencia, el análisis espacial de analitos puede proporcionar información para la detección precoz de enfermedades mediante la identificación de regiones de riesgo en tejidos complejos y la caracterización de los perfiles de analitos presentes en estas regiones a través de la reconstrucción espacial (por ejemplo, de la expresión génica, la expresión de proteínas, la metilación del ADN y/o los polimorfismos de nucleótido único, entre otros). Un mapeo espacial de alta resolución de los analitos en su ubicación específica dentro de una región o subregión revela los patrones de expresión espacial de los analitos, proporciona datos relacionales y, además, implica interacciones de red de analitos relacionadas con enfermedades u otras morfologías o fenotipos de interés, lo que da como resultado una comprensión holística de las células en su contexto morfológico. Ver, 10X, 2019, "Spatially-Resolved Transcriptomics", 10X, 2019, "Inside Visium Spatial Technology" y 10X, 2019, "Visium Spatial Gene Expression Solution".

25 30 35 El análisis espacial de analitos se puede realizar mediante la captura de analitos y/o agentes de captura de analitos o dominios de unión de analitos y su mapeo en ubicaciones conocidas (por ejemplo, utilizando sondas de captura con código de barras unidas a un sustrato) utilizando una imagen de referencia que indique los tejidos o regiones de interés que corresponden a las ubicaciones conocidas. Por ejemplo, en algunas implementaciones del análisis espacial, se prepara una muestra (por ejemplo, se secciona tejido fresco congelado, se coloca en un portaobjetos, se fija y/o se tiñe para la obtención de imágenes). La imagen de la muestra proporciona la imagen de referencia que se utilizará para el análisis espacial. A continuación, se realiza la detección del analito utilizando, por ejemplo, la captura del analito o ligando del analito mediante sondas de captura con código de barras, la construcción de bibliotecas y/o la secuenciación. Los datos de analito con código de barras resultantes y la imagen de referencia se pueden combinar durante la visualización de datos para el análisis espacial. Ver, 10X, 2019, "Inside Visium Spatial Technology".

40 45 50 Una de las dificultades de este tipo de análisis es asegurar que una muestra o una imagen de una muestra (por ejemplo, una sección de tejido o una imagen de una sección de tejido) esté correctamente alineada con las sondas de captura con código de barras (por ejemplo, mediante alineación fiduciaria). Las limitaciones técnicas en este campo se agravan por la frecuente introducción de imperfecciones en la calidad de la muestra durante los métodos convencionales de laboratorio húmedo para la preparación y seccionamiento de muestras de tejido. Estos problemas surgen debido a la naturaleza de la propia muestra de tejido (que incluye, entre otras cosas, regiones intersticiales, vacuolas y/o granularidad general que a menudo es difícil de interpretar después de la obtención de imágenes) o debido a una manipulación inadecuada o a la degradación de la muestra que produce brechas u orificios en la muestra (por ejemplo, desgarro de muestras u obtención de solo una muestra parcial, tal como la proveniente de una biopsia).

Además, los métodos de laboratorio húmedo para la obtención de imágenes producen otras imperfecciones, que incluyen, pero sin limitación burbujas de aire, residuos, partículas cristalinas de tinción depositadas en el sustrato o el tejido, tinción incoherente o de contraste deficiente, y/o limitaciones de microscopía que producen imágenes borrosas, sobreexposición o subexposición, y/o resolución deficiente. Ver, Uchida, 2013, "Image Processing and recognition for biological images", Develop. Growth Differ. 55, 523-549, doi:10.1111/dgd.12054. Tales imperfecciones dificultan la alineación. Un ejemplo de alineación fiducial se divulga en el documento EP1336662

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de sistemas y métodos que proporcionen una alineación mejorada. Dichos sistemas y métodos pueden permitir la identificación y alineación reproducibles de muestras de tejido en imágenes sin necesidad de una capacitación y costos de mano de obra exhaustivos, y mejorar aún más la exactitud de la identificación mediante la eliminación del error humano debido a la alineación subjetiva. Dichos sistemas y métodos pueden proporcionar además una herramienta rentable y fácil de usar para que un profesional realice de forma fiable la reconstrucción espacial de analitos en secciones de tejido sin necesidad de que el usuario aporte información adicional durante la etapa de mapeo espacial más allá de proporcionar la imagen.

SUMARIO

15 En la presente descripción se proporcionan soluciones técnicas (por ejemplo, sistema, métodos informáticos y medios de almacenamiento legibles por computadora no transitorios) para abordar los problemas de alineación espacial identificados anteriormente.

20 A continuación se presenta un resumen de la presente descripción con el fin de proporcionar una comprensión básica de algunos de los aspectos de la presente descripción. Este resumen no es una descripción general exhaustiva de la presente descripción. No pretende identificar elementos clave/críticos de la presente descripción ni delinear el alcance de la misma. Su único propósito es presentar algunos de los conceptos de la presente descripción de forma simplificada como preludio a la descripción más detallada que se presenta más adelante.

25 Se divultan sistemas y métodos para el análisis espacial de analitos en los que se obtiene una estructura de datos en forma electrónica que comprende (i) una imagen de una muestra (por ejemplo, muestra de tejido seccionada) sobre un sustrato y (ii) un identificador de sustrato único para el sustrato (por ejemplo, chip). El sustrato incluye una pluralidad de marcadores fiduciales y un conjunto de puntos de captura. En algunas realizaciones, el conjunto de puntos de captura comprende al menos 1.000, 2.000, 5.000, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000, 55.000, 60.000, 65.000, 70.000, 75.000, 80.000, 85.000, 90.000, 95.000 o 100.000 puntos de captura. La imagen comprende una matriz de valores de píxel. En algunas realizaciones, la matriz de valores de píxel comprende al menos 100, 10.000, 100.000, 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 5×10^6 , 8×10^6 , 10×10^6 , o 15×10^6 valores de píxel. En algunas realizaciones, la imagen se adquiere mediante microscopía fluorescente o microscopía de luz de transmisión. En algunas realizaciones, los marcadores fiduciales no se unen a los analitos, ni directa ni indirectamente. Más bien, los marcadores fiduciales sirven para proporcionar una trama de referencia para un sustrato. En algunas realizaciones hay más de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 500 o 1000 marcadores fiduciales. En algunas realizaciones hay menos de 1000 marcadores fiduciales.

30 La matriz de valores de píxel se analiza para identificar una pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen.

35 El identificador del sustrato de la estructura de datos se utiliza para seleccionar una primera molde en una pluralidad de moldes. Cada molde de la pluralidad de moldes comprende posiciones de referencia para una pluralidad correspondiente de puntos fiduciales de referencia y un sistema de coordenadas correspondiente. La pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen se alinea con la pluralidad correspondiente de puntos fiduciales de referencia del primer molde utilizando un algoritmo de alineación para obtener una transformación entre la pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen y la pluralidad correspondiente de puntos fiduciales de referencia del primer molde.

40 La transformación y el sistema de coordenadas del primer molde se utilizan para registrar la imagen en el conjunto de puntos de captura. Entonces, la imagen se analiza conjuntamente con los datos espaciales del analito asociados a cada punto de la captura, de tal modo se realiza el análisis espacial de analitos.

45 La pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen se determina identificando primero una pluralidad de puntos fiduciales derivados candidatos. Los puntos fiduciales derivados candidatos se determinan mediante el establecimiento del umbral de la matriz de valores de píxeles en una pluralidad de imágenes umbral e identificando, dentro de la pluralidad de imágenes umbral, grupos de píxeles que tienen valores blancos. La pluralidad de puntos fiduciales derivados candidatos se agrupan sobre la base de tamaño de las puntos, de este modo se distribuye la pluralidad de puntos fiduciales derivados candidatos en una pluralidad de subconjuntos de puntos fiduciales derivados candidatos, cada subconjunto respectivo de puntos fiduciales derivados candidatos en la pluralidad de subconjuntos de puntos fiduciales derivados candidatos tienen un tamaño característico. El subconjunto de puntos fiduciales derivados candidatos en la pluralidad de subconjuntos de puntos fiduciales derivados candidatos que tienen el mayor tamaño característico se selecciona entonces como la pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen. En

algunas de estas realizaciones, los respectivos pares de puntos fiduciales derivados candidatos están dentro de una distancia umbral entre sí antes de la agrupación. En algunas realizaciones, los puntos fiduciales derivados candidatos respectivos que no satisfacen un criterio de tamaño máximo o mínimo se filtran antes de la agrupación. En algunas realizaciones, los puntos fiduciales derivados candidatos respectivos que no satisfacen un criterio de circularidad se filtran, donde la circularidad de un punto fiducial derivado respectivo se define por:

$$\frac{4\pi \text{ Área}}{\text{perímetro}^2}$$

donde "Área" es el área del punto fiducial derivado respectivo, y "perímetro" es el perímetro del punto fiducial derivado respectivo. En algunas realizaciones, se filtran los puntos fiduciales derivados candidatos respectivos que no satisfacen un criterio de convexidad o un criterio de relación de inercia.

En algunas realizaciones, la transformación es una transformación de similitud que comprende rotación, traslación y escalado isotrópico de la pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen para minimizar un error residual entre la pluralidad de puntos fiduciales derivados y la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia.

En algunas realizaciones, la transformación es una transformada no rígida (por ejemplo, una transformación afín) que comprende escalado anisotrópico y sesgado de la pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen para minimizar un error residual entre la pluralidad de puntos fiduciales derivados y la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia.

En algunas realizaciones, el algoritmo de alineación es un algoritmo de deriva de punto coherente o un algoritmo de punto más cercano iterativo. En algunas realizaciones, el algoritmo de alineación es un algoritmo de coincidencia de puntos robusto o un algoritmo Thin- Plate-Spline Robust Point Matching.

En algunas realizaciones, la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia del primer molde consiste en entre 100 puntos y 1000 puntos.

En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tejido seccionada, y cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura es (i) en una posición diferente en una matriz bidimensional y (ii) se asocia con uno o más analitos de la muestra de tejido seccionada, y cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura se caracteriza por al menos un código de barras espacial único en una pluralidad de códigos de barras espaciales.

En algunas realizaciones, un sustrato puede tener dos o más puntos de captura que tienen los mismos códigos de barras espaciales. Es decir, entre los dos puntos de captura, ninguno tiene un código de barras espacial único. En algunas de estas realizaciones, estos puntos de captura con códigos de barras espaciales duplicados se consideran como un punto de captura único. En otras realizaciones, los puntos de captura que no tienen un código de barras espacial único no se consideran parte conjunto de puntos de captura que se utiliza para localizar las respectivas lecturas de secuencias en los puntos de captura de un conjunto de puntos de captura particular.

En algunas realizaciones al menos uno por ciento, al menos cinco por ciento, al menos 10 por ciento, al menos 20 por ciento, al menos 30 por ciento, o al menos 40 por ciento de los puntos de captura en un sustrato puede no tener un código de barras espacial único en todos los puntos de captura del sustrato. Es decir, para cada código de barras espacial respectivo de cada punto de captura, existe al menos otro punto de captura en el sustrato que tiene el código de barras espacial respectivo. En algunas de estas realizaciones, estos puntos de captura sin un código de barras espacial único no se consideran parte del conjunto de puntos de captura que se utiliza para localizar las respectivas lecturas de secuencias en puntos de captura de un conjunto de puntos de captura particular.

En algunas realizaciones al menos diez, al menos 100, al menos 1000, al menos 10.000, al menos 100.000, o al menos 1.000.000 de los puntos de captura de un sustrato puede no tener un código de barras espacial único en todos los puntos de captura del sustrato. Es decir, para cada código de barras espacial respectivo de tal punto de captura, existe al menos otro punto de captura en el sustrato que tiene el código de barras espacial respectivo. En algunas de estas realizaciones, estos puntos de captura sin un código de barras espacial único no se consideran parte del conjunto de puntos de captura que se utiliza para localizar las respectivas lecturas de secuencias en puntos de captura de un conjunto de puntos de captura particular.

En algunas realizaciones, un punto de captura en el conjunto de puntos de captura comprende un dominio de captura. En algunas realizaciones, un punto de captura en el conjunto de puntos de captura comprende un dominio de escisión. En algunas realizaciones, cada punto de captura en el conjunto de puntos de captura se une directamente o se une indirectamente al sustrato. En algunas realizaciones, el uno o más analitos comprende cinco o más analitos, diez o

más analitos, cincuenta o más analitos, cien o más analitos, quinientos o más analitos, 1000 o más analitos, 2000 o más analitos, o entre 2000 y 10.000 analitos.

En algunas realizaciones, el código de barras espacial único codifica un valor único predeterminado seleccionado del conjunto {1, ..., 1024}, {1, ..., 4096}, {1, ..., 16384}, {1, ..., 65536}, {1, ..., 262144}, {1, ..., 1048576}, {1, ..., 4194304}, {1, ..., 16777216}, {1, ..., 67108864}, o {1, ..., 1 x 10¹²}.

En algunas realizaciones, cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura incluye 1000 o más sondas de captura, 2000 o más sondas de captura, 10.000 o más sondas de captura, 100.000 o más sondas de captura, 1 x 10⁶ o más sondas de captura, 2 x 10⁶ o más sondas de captura, o 5 x 10⁶ o más sondas de captura. En algunas realizaciones, cada sonda de captura en el punto de captura respectivo incluye una secuencia poli-A o una secuencia poli-T y un código de barras espacial único que caracteriza el punto de captura respectivo. En algunas realizaciones, cada sonda de captura en el punto de captura respectivo incluye el mismo código de barras espacial de la pluralidad de códigos de barras espaciales. En algunas realizaciones, cada sonda de captura en el punto de captura respectivo incluye un código de barras espacial diferente de la pluralidad de códigos de barras espaciales.

En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tejido seccionada que tiene una profundidad de 100 micrones o menos.

En algunas realizaciones, el uno o más analitos es una pluralidad de analitos, y un punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura incluye una pluralidad de sondas de captura. En algunas de estas realizaciones, cada sonda de captura en la pluralidad de sondas de captura incluye un dominio de captura que se caracteriza mediante un tipo de dominio de captura en una pluralidad de tipos de dominio de captura, y cada respectivo tipo de dominio de captura en la pluralidad de tipos de dominio de captura está configurado para unirse a un analito diferente en la pluralidad de analitos.

En algunas realizaciones, la pluralidad de tipos de dominio de captura comprende entre 5 y 15.000 tipos de dominio de captura y el punto de captura respectivo incluye al menos cinco, al menos 10, al menos 100, o al menos 1000 sondas de captura para cada tipo de dominio de captura en la pluralidad de tipos de dominio de captura.

En algunas realizaciones, el uno o más analitos es una pluralidad de analitos, y un punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura incluye una pluralidad de sondas de captura. Además, cada sonda de captura en la pluralidad de sondas de captura que incluye un dominio de captura que se caracteriza por un tipo de dominio de captura único configurado para unirse a cada analito en la pluralidad de analitos de manera no sesgada.

En algunas realizaciones, cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura está contenido en un cuadrado de 100 micrones por 100 micrones del sustrato. En algunas realizaciones, cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura está contenido en un cuadrado de 50 micrones por 50 micrones del sustrato. En algunas realizaciones, cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura está contenido en un cuadrado de 10 micrones por 10 micrones del sustrato. En algunas realizaciones, cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura está contenido en un cuadrado de 1 micrón por 1 micrón del sustrato. En algunas realizaciones, cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura está contenido en un cuadrado de 0,5 micrones por 0,5 micrones del sustrato. En algunas realizaciones, cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura está contenido en un cuadrado de 0,3 micrones por 0,3 micrones del sustrato. En algunas realizaciones, cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura está contenido en un cuadrado de 0,2 micrones por 0,2 micrones del sustrato.

En algunas realizaciones, una distancia entre un centro de cada punto respectivo a un punto de captura vecino en el conjunto de puntos de captura en el sustrato está entre 300 nanómetros y 300 micrones. En algunas realizaciones, una distancia entre un centro de cada punto respectivo a un punto de captura vecino en el conjunto de puntos de captura en el sustrato está entre 700 nanómetros y 10 micrones. En algunas realizaciones, una distancia entre un centro de cada punto respectivo a un punto de captura vecino en el conjunto de puntos de captura en el sustrato está entre 800 nanómetros y 3 micrones.

En algunas realizaciones, una forma de cada punto de captura en el conjunto de puntos de captura del sustrato es una configuración de forma cerrada. En algunas realizaciones, la configuración de forma cerrada es circular, elíptica, o un N-gon, donde N es un valor entre 1 y 20. En algunas realizaciones, la configuración de forma cerrada es hexagonal. En algunas realizaciones, la configuración de forma cerrada es circular y cada punto de captura en el conjunto de puntos de captura tiene un diámetro de 80 micrones o menos. En algunas realizaciones, la configuración de forma cerrada es circular y cada punto de captura en el conjunto de puntos de captura tiene un diámetro de entre 0,3 micrones y 65 micrones.

En algunas realizaciones, una distancia entre un centro de cada punto de captura respectivo a un punto de captura vecino en el conjunto de puntos de captura en el sustrato está entre 0,5 micrones y 2 micrones. En algunas

realizaciones, una distancia entre un centro de cada punto de captura respectivo a un punto de captura vecino en el conjunto de puntos de captura en el sustrato está entre 2 micrones y 7 micrones. En algunas realizaciones, una distancia entre un centro de cada punto de captura respectivo a un punto de captura vecino en el conjunto de puntos de captura en el sustrato está entre 5 micrones y 50 micrones.

- 5 En algunas realizaciones, la primera molde se obtiene de un sistema informático remoto, de entre la pluralidad de moldes, responsivo al envío del identificador del sustrato al sistema informático remoto.

Otro aspecto de la presente descripción proporciona un Sistema informático que comprende uno procesadores, memoria, y uno o más programas. El uno o más programas se almacenan en la memoria y se configuran para ser ejecutado por el uno o más procesadores. El uno o más programas están destinados al análisis espacials de analitos.

- 10 El uno o más programas incluye instrucciones para obtener una estructura de datos en forma electrónica que comprende (i) una imagen de una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido seccionada) de un sustrato (por ejemplo, de un sujeto), y (ii) un identificador de sustrato único para el substrato.

El sustrato incluye una pluralidad de marcadores fiduciales y un conjunto de puntos de captura.

- 15 En algunas realizaciones el conjunto de puntos de captura comprende al menos 1000, 2000, 5000, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000, 55.000, 60.000, 65.000, 70.000, 75.000, 80.000, 85.000, 90.000, 95.000 o 100.000 puntos de captura.

- 20 Los marcadores fiduciales ni se unen a los analitos, sea directa o indirectamente. Más bien, los marcadores fiduciales sirven para proporcionar una trama de referencia para un sustrato. En algunas realizaciones, la pluralidad de marcadores fiduciales comprende 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 500, o 1000 marcadores fiduciales. En algunas realizaciones existen menos de 1000 marcadores fiduciales en la pluralidad de marcadores fiduciales.

La imagen comprende una matriz de valores de píxel. En algunas realizaciones la matriz de valores de píxel comprende al menos un mínimo 100, 10.000, 100.000, 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 5×10^6 , 8×10^6 , 10×10^6 , o 15×10^6 valores de píxel.

- 25 La matriz de valores de píxel se analiza para identificar una pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen. El identificador de sustrato de la estructura de datos se utiliza para seleccionar una primera molde de una pluralidad de moldes, donde cada molde de la pluralidad de moldes comprende posiciones de referencia a la pluralidad correspondiente de puntos fiduciales de referencia y un sistema de coordenadas correspondiente. La pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen se alinea con la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia del primer molde utilizando un algoritmo de alineación para obtener una transformación entre la pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen y la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia del primer molde. La transformación y el sistema de coordenadas del primer molde se utilizan para registrar la imagen en el conjunto de puntos de captura. A continuación, la imagen se analiza junto con los datos de análisis espacial asociados a cada punto de captura, de este modo se realiza el análisis de los analitos.

- 35 Otro aspecto de la presente descripción proporciona un medio de almacenamiento legible por computadora que almacena uno o más programas. El uno o más programas comprenden instrucciones, que cuando son ejecutadas por un dispositivo electrónico con uno o más procesadores y una memoria, hacen que el dispositivo electrónico realice el análisis espacial de analitos. El análisis espacial de analitos comprende la obtención de una estructura de datos en formato electrónico que comprende (i) una imagen de una muestra de tejido biológico (por ejemplo, una muestra de tejido seccionada) sobre un sustrato (por ejemplo, de un sujeto), y (ii) un identificador de sustrato único para el sustrato.

40 El sustrato incluye una pluralidad de marcadores fiduciales y un conjunto de puntos de captura.

En algunas realizaciones el conjunto de puntos de captura comprende al menos 1000, 2000, 5000, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000, 55.000, 60.000, 65.000, 70.000, 75.000, 80.000, 85.000, 90.000, 95.000 o 100.000 puntos de captura.

- 45 Los marcadores fiduciales no se unen a los analitos, en forma directa ni indirecta. Más bien, los marcadores fiduciales sirven para proporcionar una trama de referencia para un sustrato. En algunas realizaciones, la pluralidad de marcadores fiduciales comprende 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 500, o 1000 marcadores fiduciales. En algunas realizaciones existen menos de 1000 marcadores fiduciales en la pluralidad de marcadores fiduciales.

- 50 La imagen comprende una matriz de valores de píxel. En algunas realizaciones la matriz de valores de píxel comprende al menos 100, 10.000, 100.000, 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 5×10^6 , 8×10^6 , 10×10^6 , o 15×10^6 valores de píxel.

La matriz de valores de píxel se analiza para identificar una pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen. El identificador de sustrato de la estructura de datos se utiliza para seleccionar una primera molde de una pluralidad de moldes. Cada molde de la pluralidad de moldes comprende posiciones de referencia a la pluralidad correspondiente de puntos fiduciales de referencia y un sistema de coordenadas correspondiente. La pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen se alinea con la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia del primer molde utilizando un algoritmo de alineación para obtener una transformación entre la pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen y la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia del primer molde. La transformación y el sistema de coordenadas del primer molde se utilizan para registrar la imagen en el conjunto de puntos de captura. A continuación, la imagen se analiza junto con los datos de análisis espacial asociados a cada punto de captura, de este modo se realiza el análisis de los analitos

Otro aspecto de la presente descripción proporciona un sistema informático que incluye uno o más procesadores y una memoria que almacena uno o más programas para el análisis nucleico espacial. Se apreciará que esta memoria puede estar en una computadora única, una red de computadoras, una o más máquinas virtuales, o en una arquitectura de computación en nube. El uno o más programas están configurados para ser ejecutados por el uno o más procesadores. El uno o más programas incluyen instrucciones para realizar cualquiera de los métodos descriptos en la presente.

Otro aspecto de la presente descripción proporciona un medio de almacenamiento legible por computadora que almacena uno o más programas para ser ejecutados por un dispositivo electrónico. El uno o más programas incluyen instrucciones para que el dispositivo electrónico realice el análisis espacial de analitos por cualquiera de los métodos divulgados en la presente. Se apreciará que el medio de almacenamiento legible por computadora puede existir como un único medio de almacenamiento legible por computadora como cualquier número de medios de almacenamiento legibles por computadora que estén físicamente separados entre sí.

Otras realizaciones están dirigidas a sistemas, dispositivos de consumo portátiles y medios legibles por computadora asociados con los métodos descriptos en la presente.

Como se describe en la presente, cualquier realización descripta en la presente se puede aplicar a cualquier aspecto.

Varias realizaciones de sistemas, métodos y dispositivos dentro del alcance de las reivindicaciones anexas tienen varios aspectos, ninguno de los cuales es el único responsable de los atributos deseables descriptos en la presente. Sin limitar el alcance de las reivindicaciones anexas, se describen en la presente algunas características destacadas. Despues de considerar esta discusión, y en particular despues de leer la sección titulada "Descripción Detallada" se entenderá cómo se utilizan las características de varias realizaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos ilustran determinadas realizaciones de las características y ventajas de la presente descripción.

Estas realizaciones no pretenden limitar en modo alguno el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los símbolos de referencia similares en los dibujos indican elementos similares

La FIG. 1 muestra un ejemplo de flujo de trabajo de análisis espacial de acuerdo con una realización de la presente descripción.

La FIG. 2 muestra un ejemplo de flujo de trabajo de análisis espacial en el que se indican las etapas opcionales con recuadros discontinuos de acuerdo con una realización de la presente descripción.

Las FIGS. 3A y 3B muestran ejemplos de flujos de trabajo de análisis espacial en los que, en la FIG. 3A, las etapas opcionales se indican con recuadros discontinuos de acuerdo con una realización de la presente descripción.

La FIG. 4 muestra un ejemplo de flujo de trabajo de análisis espacial en el que se indican las etapas opcionales con recuadros discontinuos de acuerdo con una realización de la presente descripción.

La FIG. 5 muestra un ejemplo de flujo de trabajo de análisis espacial en el que se indican las etapas opcionales con recuadros discontinuos de acuerdo con una realización de la presente descripción.

La FIG. 6 es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de una sonda de captura con código de barras, como se describe en la presente de acuerdo con una realización de la presente descripción.

La FIG. 7 es un diagrama esquemático que ilustra una sonda de captura escindible de acuerdo con una realización de la presente descripción.

La FIG. 8 es un diagrama esquemático de un ejemplo de punto de captura marcado espacialmente multiplexado de acuerdo con una realización de la presente descripción.

- La FIG. 9 muestra un ejemplo de flujo de trabajo de análisis espacial en el que se indican las etapas opcionales con recuadros discontinuos de acuerdo con una realización de la presente descripción.
- Las FIG. 10A, 10B, 10C, 10D, y 10E ilustran métodos no limitantes para el análisis espacial de analitos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción, en los que las etapas opcionales se ilustran con recuadros de líneas discontinuas.
- La FIG. 11 es un ejemplo de diagrama de bloques que ilustra un dispositivo informático de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.
- La FIG. 12 es un esquema que muestra la disposición de los puntos de captura con código de barras dentro de una matriz de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.
- 10 La FIG. 13 es un esquema que ilustra una vista lateral de un medio resistente a difusión *por ejemplo*, una tapa de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.
- La FIG. 14 ilustra un sustrato con una imagen de una muestra (*por ejemplo*, muestra de tejido) en el sustrato, de acuerdo con una realización de la presente descripción.
- 15 La FIG. 15 ilustra un sustrato que tiene un número de áreas de captura y un identificador de sustrato, de acuerdo con una realización de la presente descripción.
- La FIG. 16 ilustra un sustrato que tiene una pluralidad de marcadores fiduciales y un conjunto de puntos de captura, de acuerdo con una realización de la presente descripción.
- 20 La FIG. 17 ilustra una imagen de una muestra (*por ejemplo*, muestra de tejido) de un sustrato, donde la muestra se ubica dentro de una pluralidad de marcadores fiduciales, de acuerdo con una realización de la presente descripción.
- 25 La FIG. 18 ilustra un molde que comprende posiciones de referencia para una correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia y un sistema de coordenadas correspondiente de acuerdo con una realización de la presente descripción.
- La FIG. 19 ilustra cómo el molde especifica las ubicaciones del conjunto de puntos de captura de un sustrato en relación con los puntos fiduciales de referencia del sustrato usando un sistema de coordenadas correspondiente de acuerdo con una realización de la presente descripción.
- 30 La FIG. 20 ilustra el diseño del sustrato, que incluye una pluralidad de marcadores fiduciales y una conjunto de puntos de captura, para la imagen que incluye los correspondientes puntos fiduciales derivados, de acuerdo con una realización de la presente descripción.
- 35 La FIG. 21 ilustra el registro de la imagen con el sustrato utilizando una transformación y el sistema de coordenadas de la molde para registrar la imagen en el conjunto de puntos de captura del sustrato, de acuerdo con una realización de la presente descripción.
- La FIG. 22 ilustra el análisis de la imagen después del registro de la imagen con el sustrato, utilizando una transformación y el sistema de coordenadas de la molde para registrar la imagen en el conjunto de puntos de captura del sustrato, de este modo se identifican los puntos de captura en el sustrato que han sido superpuestos con el tejido de acuerdo con una realización de la presente descripción.
- 40 La FIG. 23 ilustra los puntos de captura de un sustrato que han sido superpuestos con el tejido de acuerdo con una realización de la presente descripción.
- La FIG. 24 ilustra la extracción de códigos de barras y UMIs de cada lectura de secuencia en datos de secuenciación de ácidos nucleicos asociados a un sustrato de acuerdo con una realización de la presente descripción.
- 45 La FIG. 25 ilustra la alineación de las lecturas de secuencias con un genoma de referencia de acuerdo con una realización de la presente descripción.
- La FIG. 26 ilustra cómo las lecturas de secuencias no se asignan todas exactamente al mismo lugar, aunque comparten un código de barras y un UMI, debido a la fragmentación aleatoria que se produce durante las etapas del flujo de trabajo de acuerdo con una realización de la presente descripción.
- La FIG. 27 ilustra cómo el código de barras de cada lectura de secuencia se valida frente a una lista blanca de códigos de barras reales (*por ejemplo*, en algunas realizaciones, la lista blanca corresponde a las perlas de gel químico Chromium Single Cell 3' v3 que tienen aproximadamente 3,6 millones de códigos de barras distintos y, por lo tanto, una lista blanca de 3,6 millones de códigos de barras) de acuerdo con una realización de la presente descripción.

La FIG. 28 ilustra cómo los identificadores moleculares únicos (UMIs) de las lecturas de secuencia que son 1 desajuste de un UMI de recuento superior se corrigen a ese UMI si comparten un código de barras celular y un gen de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

5 La FIG. 29 ilustra cómo usar solo las lecturas mapeadas con confianza con códigos de barras válidos y UMIs se usan para formar recuentos UMI para una matriz de código de barras de características en bruto de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

10 La FIG. 30 ilustra cómo se realiza un análisis secundario en códigos de barras denominados celdas (matriz de código de barras de características filtradas), en el que se utiliza el análisis de componentes principales en la matriz de celdas de genes filtrada normalizada para reducir los genes G a los 10 metagenes principales, se ejecuta t-SNE en el espacio PCA para generar una proyección bidimensional, se realiza una agrupación basada en gráficos (Louvain) y medias k ($k=2 \dots 10$) en el espacio PCA. . . 10) para identificar grupos de células, y el algoritmo Seq (prueba binomial negativa) se utiliza para encontrar los genes que definen de forma más exclusiva cada grupo, de acuerdo con una realización de la presente descripción.

15 FIG. 31 ilustra una línea para analizar una imagen (por ejemplo, imagen de tejido) en conjunción con datos de secuenciación de ácido nucleico asociados con cada punto de captura en una pluralidad de puntos de captura, de este modo se realiza un análisis espacial de ácido nucleico de acuerdo con la presente descripción.

20 La FIG. 32 ilustra cómo el análisis de la imagen de tejido en conjunción con los datos de secuenciación de ácido nucleico se puede utilizar para ver grupos de puntos de captura en el contexto de la imagen de acuerdo con la presente descripción.

25 La FIG. 33 ilustra cómo el análisis de la imagen del tejido junto con los datos de secuenciación de ácidos nucleicos puede incluir el zoom en la superposición de grupos de puntos de captura en el contexto de la imagen para ver más detalles de acuerdo con algunas de las realizaciones de la presente descripción.

30 La FIG. 34 ilustra cómo se puede utilizar el análisis de la imagen del tejido junto con los datos de secuenciación de ácidos nucleicos para crear categorías y grupos personalizados para el análisis de expresión diferencial de acuerdo con algunas de las realizaciones de la presente descripción

35 La FIG. 35 ilustra cómo se puede utilizar el análisis de la imagen del tejido junto con los datos de secuenciación de ácidos nucleicos para ver los genes expresados en el contexto de la imagen de tejido de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

40 La FIG. 36 ilustra un esquema de reacción para la preparación de lecturas de secuencias para el análisis espacial de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción

La FIG. 37 es un diagrama esquemático de un ejemplo de agente de captura de analito de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

45 La FIG. 38A es un diagrama esquemático que representa un ejemplo de interacción entre una sonda de captura inmovilizada por características y un agente de captura de analito de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción

La FIG. 38B es un ejemplo de esquema que muestra un resto de unión a un analito que comprende un oligonucleótido que tiene un dominio de unión de captura (indicado por una secuencia poli(A)) que se hibrida con un dominio de bloqueo (indicado por una secuencia poli(T)).

50 La FIG. 38C es un ejemplo de esquema que muestra un resto de unión a un analito que incluye un oligonucleótido que comprende una secuencia de horquilla dispuesta entre un dominio de bloqueo (indicado por una secuencia poli(U)) y un dominio de unión de captura (indicado por una secuencia poli(A)). Como se muestra, el dominio de bloqueo se hibrida con el dominio de unión de captura.

La FIG. 38D es un ejemplo de esquema que muestra un dominio de bloqueo liberado por ARNasa H.

55 La FIG. 38E es un ejemplo de esquema que muestra un resto de unión a un analito que incluye un oligonucleótido que comprende un dominio de unión a captura que se bloquea utilizando nucleótidos enjaulados (indicados por pentágonos).

La FIG. 39 es un ejemplo de esquema que ilustra un agente de captura de analito marcado espacialmente en el que la secuencia de captura de analito está bloqueada mediante una sonda de bloqueo, y en el que la sonda de bloqueo se puede eliminar, por ejemplo con un tratamiento de ARNasa, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Introducción

Esta divulgación describe aparatos, sistemas, métodos y composiciones para el análisis espacial de muestras. Esta sección en particular describe cierta terminología general, analitos, tipos de muestras, y etapas preparativas a las que se hace referencia en secciones posteriores de la divulgación.

(a) Análisis espacial

Los tejidos y las células se pueden obtener de cualquier fuente. Por ejemplo, los tejidos y/o células se pueden obtener de organismos unicelulares o multicelulares (por ejemplo, un mamífero). Los tejidos y células obtenidos de un mamífero (por ejemplo, un ser humano) a menudo tienen niveles de analitos variados (por ejemplo, expresión de genes y/o proteínas) que pueden producir diferencias en la morfología y/o función celular. La posición de una célula o subconjunto de células (por ejemplo, células vecinas y/o no vecinas) dentro de un tejido puede afectar, por ejemplo, al destino, comportamiento, morfología, señalización e intercomunicación celular con otras células del tejido. La información relativa a las diferencias en los niveles de analitos (por ejemplo, expresión de genes y/o proteínas) en diferentes células de un tejido de un mamífero también puede ayudar a los médicos a administrar un tratamiento que sea eficaz y puede permitir a los investigadores identificar y dilucidar diferencias en la morfología y/o función celular en organismos unicelulares o multicelulares (por ejemplo, un mamífero) sobre la base de las diferencias detectadas en los niveles de analitos en diferentes células del tejido. Las diferencias en los niveles de analitos dentro de diferentes células en un tejido de un mamífero también pueden proporcionar información sobre cómo funcionan y/o se desarrollan los tejidos (por ejemplo, tejidos sanos y enfermos). Las diferencias en los niveles de analitos dentro de células diferentes en un tejido de un mamífero también pueden proporcionar información sobre diferentes mecanismos de patogénesis de enfermedades en un tejido, y mecanismo de acción de un tratamiento terapéutico dentro de un tejido. Las diferencias en los niveles de analitos dentro de diferentes células en un tejido de un mamífero también pueden proporcionar información sobre los mecanismos de resistencia a los fármacos y el desarrollo de los mismos en los tejidos de mamíferos. Las diferencias en la presencia o ausencia de analitos dentro de células diferentes en un tejido de un organismo multicelular (por ejemplo, un mamífero) pueden proporcionar información sobre mecanismos de resistencia a fármacos y el desarrollo de los mismos en un tejido de un organismo multicelular.

Las metodologías de análisis espacial descriptas en la presente permiten la detección de diferencias en el nivel de un analito (por ejemplo, expresión de genes y/o proteínas) dentro de diferentes células en un tejido de un mamífero o dentro de una célula individual de un mamífero. Por ejemplo, las metodologías de análisis espacial se pueden usar para detectar las diferencias en los niveles de analitos (por ejemplo, expresión de genes y/o proteínas) dentro de diferentes células en muestras de portaobjetos histológicos, cuyos datos se pueden reensamblar para generar un mapa tridimensional de los niveles de analitos (por ejemplo, expresión de genes y/o proteínas) de una muestra (por ejemplo, muestra de tejido) obtenida de un mamífero, con un grado de resolución espacial tal como la resolución de una célula única.

La heterogeneidad espacial en los sistemas en desarrollo se ha estudiado normalmente mediante hibridación de ARN, inmunohistoquímica, indicadores fluorescentes o purificación o inducción de subpoblaciones predefinidas y posterior elaboración de perfiles genómicos (por ejemplo, ARN-seq). Sin embargo, estos enfoques se basan en un conjunto relativamente pequeño de marcadores predefinidos, por lo que introducen un sesgo de selección que limita el descubrimiento. Estos enfoques previos también se basan en conocimientos a priori. Los ensayos espaciales de ARN se basaban tradicionalmente en la tinción de un número limitado de especies de ARN. Por el contrario, la secuenciación de ARN de célula única permite elaborar perfiles detallados de la expresión génica celular (que incluye ARN no codificador, pero los métodos establecidos separan las células de su contexto espacial nativo).

Las metodologías de análisis espacial descriptas en la presente proporcionan una gran cantidad de datos sobre el nivel de analitos y/o datos de expresión para una variedad de analitos múltiples dentro de una muestra con alta resolución espacial, por ejemplo, mientras se conserva el contexto espacial nativo. Los métodos de análisis espacial incluyen, por ejemplo, el uso de una sonda de captura que incluye un código de barras espacial (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico) que proporciona información sobre la posición de la sonda de captura dentro de una célula o una muestra de tejido (por ejemplo, una célula de mamífero o una muestra de tejido de mamífero) y un dominio de captura que es capaz de unirse a un analito (por ejemplo, una proteína y/o ácido nucleico) producido por y/o presente en una célula. Como se describe en la presente, el código de barras espacial puede ser un ácido nucleico que tenga una secuencia única, un fluoróforo único, una combinación única de fluoróforos, una secuencia de aminoácidos única, un metal pesado único o una combinación única de metales pesados, o cualquier otro agente detectable único. El dominio de captura puede ser cualquier agente capaz de unirse a un analito producido por y/o presente en una célula (por ejemplo, un ácido nucleico capaz de hibridarse con un ácido nucleico de una célula (por ejemplo, un ARNm, ADN genómico, ADN mitocondrial o ARNmi), un sustrato que incluya un analito, un compañero de unión de un analito o un anticuerpo que se une específicamente a un analito). Una sonda de captura también puede

incluir una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia de un cebador directo y/o inverso universal. Una sonda de captura también puede incluir un sitio de escisión (por ejemplo, un sitio de reconocimiento de escisión de una endonucleasa de restricción), o una unión fotolábil o termosensible.

La unión de un analito a una sonda de captura se puede detectar utilizando una serie de métodos diferentes, por ejemplo, secuenciación de ácidos nucleicos, detección de fluoróforos, amplificación de ácidos nucleicos, detección de ligación de ácidos nucleicos y/o detección de productos de escisión de ácidos nucleicos. En algunos ejemplos, la detección se utiliza para asociar un código de barras espacial específico con un analito específico producido por y/o presente en una célula (por ejemplo, una célula de mamífero).

Las sondas de captura pueden estar, por ejemplo, unidas a una superficie, por ejemplo, un matriz sólida, una perla o un cubreobjetos. En algunos ejemplos, las sondas de captura no están unidas a una superficie. En algunos ejemplos, las sondas de captura están encapsuladas, incrustadas o colocadas en capas en una superficie de una composición permeable (por ejemplo, cualquiera de los sustratos descriptos en la presente). Por ejemplo, las sondas de captura se pueden encapsular o disponer dentro de una perla permeable (por ejemplo, una perla de gel). En algunos ejemplos, las sondas de captura se encapsulan, se incrustan o se colocan en capas sobre una superficie de un sustrato (por ejemplo, cualquiera de los sustratos ejemplares descriptos en la presente, como un hidrogel o una membrana porosa).

En algunos ejemplos, una célula o una muestra de tejido que incluye una célula se pone en contacto con sondas de captura unidas a un sustrato (por ejemplo, una superficie de un sustrato), y la célula o muestra de tejido se permeabiliza para permitir que los analitos se liberan de la célula y se unan a las sondas de captura unidas al sustrato. En algunos ejemplos, los analitos liberados de una célula se pueden dirigir activamente a las sondas de captura unidas a un sustrato mediante diversos métodos, por ejemplo, electroforesis, gradiente químico, gradiente de presión, flujo de fluido o campo magnético.

En otros ejemplos, una sonda de captura se dirige para interactuar con una célula o una muestra de tejido utilizando una variedad de métodos, por ejemplo, la inclusión de un agente de anclaje de lípidos en la sonda de captura, la inclusión de un agente que se une específicamente a, o forma un enlace covalente con, una proteína de membrana en la sonda de captura, flujo de fluido, gradiente de presión, gradiente químico, o campo magnético.

Aspectos no limitantes de las metodologías de análisis espacial se describen en los documentos WO 2011/127099, WO 2014/210233, WO 2014/210225, WO 2016/162309, WO 2018/091676, WO 2012/140224, WO 2014/060483, Patente U.S. Nº 10.002.316, Patente U.S. Nº 9,727,810, Publicación de la solicitud de patente U.S. Nº 2017/0016053, Rodrigues *et al.*, *Science* 363(6434):1463-1467, 2019; WO 2018/045186, Lee *et al.*, *Nat. Protoc.* 10(3):442-458, 2015; 30 WO 2016/007839, WO 2018/045181, WO 2014/163886, Trejo *et al.*, *PLoS ONE* 14(2):e0212031.2019, Publicación de la solicitud de patente U.S. Nº 2018/0245142, Chen *et al.*, *Science* 348(6233):aaa6090, 2015, Gao *et al.*, *BMC Biol.* 15:50, 2017, WO 2017/144338, WO 2018/107054, WO 2017/222453, WO 2019/068880, WO 2011/094669, Patente U.S. Nº 7.709.198, Patente U.S. Nº 8.604.182, Patente U.S. Nº 8.951.726, Patente U.S. Nº 9.783.841, Patente U.S. Nº 10.041.949, WO 2016/057552, WO 2017/147483, WO 2018/022809, WO 2016/166128, WO 2017/027367, WO 35 2017/027368, WO 2018/136856, WO 2019/075091, Patente U.S. Nº 10.059.990, WO 2018/057999, WO 2015/161173, Gupta *et al.*, *Nature Biotechnol.* 36:1197-1202, 2018, y solicitud de patente de Estados Unidos Nº 16/992.569 titulada "Systems and Methods for Using Spatial Distribution of Haplotypes to Determine a Biological Condition, presentada el 13 de agosto de 2020, y se puede utilizar en la presente en cualquier combinación. En la presente se describen otros aspectos no limitativos de las metodologías de análisis espacial.

40 (b) Terminología general

A lo largo de esta divulgación se utiliza terminología específica para explicar diversos aspectos de los aparatos, sistemas, métodos y composiciones que se describen. Esta subsección incluye explicaciones de ciertos términos que aparecen en secciones posteriores de la divulgación. En la medida en que las descripciones de esta sección estén en conflicto evidente con el uso en otras secciones de esta divulgación, prevalecerán las definiciones de esta sección.

45 (i) Sujeto

Un "sujeto" es un animal, tal como un mamífero (por ejemplo, un ser humano o un simio no humano), o un ave (por ejemplo, un pájaro), u otro organismo, tal como una planta. Los ejemplos de sujetos incluyen, pero no se limitan a, un mamífero tal como un roedor, ratón, rata, conejo, cobayo, ungulado, caballo, oveja, cerdo, cabra, vaca, gato, perro, primate (por ejemplo ser humano o primate no humano); una planta tal como *Arabidopsis thaliana*, maíz, sorgo, avena, trigo, arroz, colza o soja; un alga tal como *Chlamydomonas reinhardtii*; un nematodo tal como *Caenorhabditis elegans*; un insecto tal como *Drosophila melanogaster*, mosquito, mosca de la fruta, abeja de la miel o araña; un pez tal como pez cebra; un reptil; un anfibio tal como rana o *Xenopus laevis*; un *Dictyostelium discoideum*; un hongo tal como *Pneumocystis carinii*, *Takifugu rubripes*, levadura, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*, o un *Plasmodium falciparum*.

(ii) Ácido nucleico y nucleótido

Los términos "ácido nucleico" y "nucleótido" son coherentes con su uso en la técnica e incluyen especies naturales o análogos funcionales de las mismas. Los análogos funcionales de ácidos nucleicos particularmente útiles son capaces de hibridarse con un ácido nucleico de una manera específica de secuencia (por ejemplo, capaz de hibridarse a dos ácidos nucleicos de tal manera que la ligación puede ocurrir entre los dos ácidos nucleicos hibridados) o son capaces de ser utilizados como una molde para la replicación de una secuencia particular de nucleótidos. Los ácidos nucleicos naturales generalmente tienen una estructura que contiene enlaces fosfodiéster. Una estructura análoga puede tener un enlace al esqueleto alternativo que incluya cualquiera de una variedad de los conocidos en la técnica. Los ácidos nucleicos naturales generalmente tienen un azúcar desoxirribosa (por ejemplo, en el ácido desoxirribonucleico [ADN]) o un azúcar ribosa (por ejemplo, en el ácido ribonucleico [ARN]).

Un ácido nucleico puede contener nucleótidos que tengan cualquiera de una variedad de análogos de estos restos de azúcares conocidos en la técnica. Un ácido nucleico puede incluir nucleótidos nativos o no nativos. A este respecto, un ácido desoxirribonucleico nativo puede tener una o más bases seleccionadas del grupo que consiste en adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G), y un ácido ribonucleico puede tener una o más bases seleccionadas del grupo que consiste en uracilo (U), adenina (A), citosina (C) o guanina (G). Las bases no nativas útiles que se pueden incluir en un ácido nucleico o nucleótido son conocidas en la técnica.

(iii) Sonda y diana

Una "sonda" o una "diana", cuando se utiliza en referencia a un ácido nucleico o secuencia de ácidos nucleicos, se considera como un identificador semántico del ácido nucleico o secuencia en el contexto de un método o composición, y no limita la estructura o función del ácido nucleico o secuencia más allá de lo que se indica expresamente.

(iv) Códigos de barra

Un "código de barras" es una etiqueta, o identificador, que transmite o es capaz de transmitir información (por ejemplo, información sobre un analito en una muestra, una perla y/o una sonda de captura). Un código de barras puede formar parte de un analito o ser independiente de un analito. Un código de barras puede estar unido a un analito. Un código de barras particular puede ser único en relación con otros códigos de barras.

Los códigos de barras pueden tener una variedad de formatos diferentes. Por ejemplo, los códigos de barras pueden incluir secuencias de ácidos nucleicos y/o aminoácidos no aleatorias, semialeatorias y/o aleatorias, y secuencias de ácidos nucleicos y/o aminoácidos sintéticas.

Los códigos de barras pueden tener una variedad de formatos diferentes. Por ejemplo, los códigos de barras pueden incluir códigos de barras de polinucleótidos, secuencias aleatorias de ácidos nucleicos y/o aminoácidos, y secuencias sintéticas de ácidos nucleicos y/o aminoácidos. Un código de barras se puede unir a un analito o a otro resto o estructura de forma reversible o irreversible. Un código de barras se puede añadir, por ejemplo, a un fragmento de una muestra de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) antes o durante la secuenciación de la muestra. Los códigos de barras pueden permitir la identificación y/o cuantificación de lecturas de secuenciación individuales (por ejemplo, un código de barras puede ser o puede incluir un identificador molecular único o "UMI").

Los códigos de barras pueden resolver espacialmente componentes moleculares encontrados en muestras, por ejemplo, a resolución de célula única (por ejemplo, un código de barras puede ser o puede incluir un "código de barras espacial"). En algunas realizaciones, un código de barras incluye tanto un UMI como un código de barras espacial. En algunas realizaciones, un código de barras incluye dos o más subcódigos de barras que juntos funcionan como un único código de barras. En algunas realizaciones, un código de barras incluye tanto un UMI como un código de barras espacial. En algunas realizaciones, un código de barras incluye dos o más subcódigos de barras que juntos funcionan como un único código de barras (por ejemplo, un código de barras de polinucleótido). Por ejemplo, un código de barras de polinucleótido puede incluir dos o más secuencias polinucleotídicas (por ejemplo, subcódigos de barras) separadas por una o más secuencias no codificadas.

(v) Punto de captura

Un "punto de captura" (alternativamente, "característica" o "pluralidad de sondas de captura") se utiliza en la presente para describir una entidad que actúa como soporte o depósito de diversas entidades moleculares utilizadas en el análisis de muestras. Los ejemplos de puntos de captura incluyen, pero no se limitan a, una perla, un punto de cualquier geometría bidimensional o tridimensional (por ejemplo, un punto de chorro de tinta, un punto enmascarado, un cuadrado en una cuadrícula), un pocillo y una almohadilla de hidrogel. En algunas realizaciones, un punto de captura es un área de un sustrato en la que se agrupan sondas de captura etiquetadas con códigos de barras espaciales. En la presente descripción se describen con más detalle realizaciones específicas no limitantes de puntos de captura y sustratos.

Se pueden encontrar definiciones adicionales relacionadas en general con el análisis espacial de analitos en la solicitud de patente de los Estados Unidos Número 16/992,569 titulada "Systems and Methods for Using the Spatial Distribution of Haplotypes to Determine a Biological Condition," presentada el 13 de agosto de 2020, que se incorpora en la presente por referencia.

5 **(vi) Sustrato**

Como se usa en la presente, un "sustrato" es cualquier superficie sobre la que se pueden fijar sondas de captura (por ejemplo, un chip, una matriz sólida, una perla, un portaobjetos, un sustrato, un cubreobjetos, etc.).

(vii) Anticuerpo

Un "anticuerpo" es una molécula polipeptídica que reconoce y se une a un antígeno diana complementario. Los anticuerpos normalmente tienen una forma de estructura molecular que se asemeja a una forma de Y, o polímeros de la misma. Los anticuerpos naturales, denominados inmunoglobulinas, pertenecen a una de las clases de inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Los anticuerpos también se pueden producir sintéticamente. Por ejemplo, los anticuerpos recombinantes, que son anticuerpos monoclonales, se pueden sintetizar utilizando genes sintéticos mediante la recuperación de los genes del anticuerpo a partir de células fuente, amplificación en un vector apropiado, e introducción del vector en un huésped para hacer que el huésped exprese el anticuerpo recombinante. En general, los anticuerpos recombinantes se pueden clonar a partir de cualquier especie animal productora de anticuerpos utilizando cebadores de oligonucleótidos y/o sondas de hibridación adecuados. Las técnicas recombinantes se pueden utilizar para generar anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, incluyendo especies no endógenas.

Los anticuerpos sintéticos se pueden derivar de fuentes no inmunoglobulínicas. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden generar a partir de ácidos nucleicos (por ejemplo, aptámeros) y de armazones proteicos no inmunoglobulínicos (tales como aptámeros peptídicos) en los que se insertan bucles hipervariables para formar sitios de unión a antígenos. Los anticuerpos sintéticos basados en ácidos nucleicos o estructuras peptídicas pueden ser más pequeños que los anticuerpos derivados de inmunoglobulinas, lo que permite una mayor penetración en los tejidos.

Los anticuerpos también pueden incluir, que son reactivos de afinidad que normalmente tienen un peso molecular de aproximadamente 12-14 kDa. Las proteínas afímero generalmente se unen a una diana (por ejemplo, una proteína diana) con alta afinidad y especificidad. Los ejemplos de tales dianas incluyen, pero sin limitación, cadenas de ubiquitina, inmunoglobulinas y proteína C reactiva. En algunas realizaciones, las proteínas afímero se derivan de inhibidores de cisteína proteasa, e incluyen bucles peptídicos y una secuencia N-terminal variable que proporciona el sitio de unión. Los anticuerpos también pueden incluir anticuerpos de dominio único (dominios VHH y dominios VNAR), scFvs y fragmentos Fab.

(c) Analitos

Los aparatos, sistemas, métodos y composiciones descriptos en la presente descripción se pueden utilizar para detectar y analizar una amplia variedad de analitos diferentes. A los efectos de la presente descripción, un "analito" puede incluir cualquier sustancia, estructura, resto o componente biológico que deba analizarse. El término "diana" se puede utilizar de forma similar para referirse a un analito de interés.

Los analitos se pueden clasificar ampliamente en uno de dos grupos: analitos de ácido nucleico y analitos de ácido no nucleico. Los ejemplos de analitos de ácido no nucleico incluyen, pero no se limitan a, lípidos, carbohidratos, péptidos, proteínas, glicoproteínas (N-ligadas u O-ligadas), lipoproteínas, fosfoproteínas, variantes fosforiladas o acetiladas de proteínas específicas, variantes de amidación de proteínas, variantes de hidroxilación de proteínas, variantes de metilación de proteínas, variantes de ubiquitilación de proteínas, variantes de sulfatación de proteínas, proteínas de cubierta viral, proteínas extracelulares e intracelulares, anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos. En algunos casos, el analito es una organela (por ejemplo, núcleos o mitocondrias).

Las características de la superficie celular correspondientes a los analitos pueden incluir, pero sin limitación, un receptor, un antígeno, una proteína de superficie, una proteína transmembrana, un grupo de proteína de diferenciación, un canal proteico, una bomba de proteína, una proteína portadora, un fosfolípido, una glicoproteína, un glicolípido, un complejo proteico de interacción célula-célula, un complejo de presentación de antígenos, un complejo de histocompatibilidad mayor, un receptor de células T manipulado genéticamente, un receptor de células T, un receptor de células B, un receptor de antígenos quimérico, una proteína de matriz extracelular, una modificación postraduccional (por ejemplo, una modificación de la proteína de la matriz extracelular), una modificación postraduccional (por ejemplo, fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, nitrosilación, metilación, acetilación o lipidación) de una proteína de la superficie celular, una unión de brecha y una unión adherente.

Los analitos se pueden derivar de un tipo específico de célula y/o una región subcelular específica. Por ejemplo, los analitos se pueden derivar del citosol, de los núcleos celulares, de las mitocondrias, de los microsomas y, más

generalmente, de cualquier otro compartimento, organela o porción de una célula. Los agentes permeabilizantes que se dirigen específicamente a determinados compartimentos y orgánulos celulares se pueden utilizar para liberar selectivamente analitos de las células para su análisis.

Los ejemplos de analitos de ácidos nucleicos incluyen analitos de ADN tales como ADN genómico, ADN metilado, secuencias específicas de ADN metilado, ADN fragmentado, ADN mitocondrial, productos de PCR sintetizados *in situ* e híbridos de ARN/ADN.

Los ejemplos de analitos de ácido nucleico también incluyen analitos de ARN tales como varios tipos de ARN codificador y no codificador. Los ejemplos de los diferentes tipos de analitos de ARN incluyen ARN mensajero (ARNm), ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), microARN (ARNmi) y ARN viral. El ARN puede ser un transcripto (por ejemplo, presente en una sección de tejido). El ARN puede ser pequeño (por ejemplo, menos de 200 bases de ácido nucleico de longitud) o grande (por ejemplo, ARN de más de 200 bases de ácido nucleico de longitud). Los ARN pequeños incluyen principalmente el ARN ribosómico 5,8S (ARNr), ARNr 5S, ARN de transferencia (ARNt), microARN (ARNmi), ARN de interferencia pequeño (ARNsi), ARN nucleolar pequeño (ARNsno), ARN que interactúa con Piwi (ARNpi), ARN pequeño derivado del ARNt (ARNts) y el ARN pequeño derivado del ARNr (ARNsr). El ARN puede ser ARN de cadena doble o cadena simple. El ARN puede ser ARN circular. El ARN puede ser un ARNr bacteriano (por ejemplo, ARNr 16s o ARNr 23s).

Los ejemplos adicionales de analitos incluyen ARNm y características de la superficie celular (por ejemplo, utilizando los agentes de etiquetado descriptos en la presente), ARNm y proteínas intracelulares (por ejemplo, factores de transcripción), ARNm y estado de metilación celular, ARNm y cromatina accesible (por ejemplo, ATAC-seq, ADNase-seq, y/o MNase-seq), ARNm y metabolitos (por ejemplo, utilizando los agentes de etiquetado descriptos en la presente), un agente de etiquetado con código de barras (por ejemplo, los anticuerpos marcados con oligonucleótidos descriptos en la presente) y una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias (por ejemplo, receptor de células T), ARNm y un agente de perturbación (por ejemplo, un ARNcr/ARNsg CRISPR, TALEN, nucleasa de dedos de zinc y/u oligonucleótido antisentido como se describe en la presente). En algunas realizaciones, un agente de perturbación es una molécula pequeña, un anticuerpo, un fármaco, un aptámero, un ARNmi, un ambiente físico (por ejemplo, un cambio de temperatura) o cualquier otro agente de perturbación conocido.

Los analitos pueden incluir una molécula de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una porción de una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias (por ejemplo, un TCR o BCR). En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico es un ADNc generado primero a partir de la transcripción inversa del ARNm correspondiente, utilizando un cebador que contiene poli(T). A continuación, el ADNc generado puede tener un código de barras mediante una sonda de captura, que presenta una secuencia de código de barras (y, opcionalmente, una secuencia de UMI) que se hibrida con al menos una parte del ADNc generado. En algunas realizaciones, un oligonucleótido de cambio de molde se hibrida con una cola de poli(C) añadida al extremo 3' del ADNc por una enzima transcriptasa inversa. El molde de ARNm original y el oligonucleótido de cambio de molde luego se pueden desnaturalizar del ADNc y la sonda de captura con código de barras entonces se puede hibridar con el ADNc y generar un complemento del ADNc.

Se describen métodos y composiciones adicionales adecuados para el ADNc con código de barras generado a partir de transcritos de ARNm, incluidos los que codifican regiones V(D)J de un receptor de células inmunitarias y/o métodos de código de barras y composición que incluyen un oligonucleótido de cambio de molde se describen en la solicitud de patente PCT PCT/US2017/057269, presentada el 18 de octubre de 2017, y en la solicitud de patente de Estados Unidos Serie Nº 15/825.740, presentada el 29 de noviembre de 2017, ambas incorporadas en la presente por referencia en su totalidad. El análisis V(D)J también se puede completarse con el uso de uno o más agentes de marcación que se unen a características particulares de la superficie de las células inmunitarias y asociados con las secuencias con código de barras. El uno o más agentes de marcación pueden incluir un MHC o multímero de MHC.

Como se describió anteriormente, el analito puede incluir un ácido nucleico capaz de funcionar como componente de una reacción de edición génica, tal como, por ejemplo, la edición génica basada en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR). En consecuencia, la sonda de captura puede incluir una secuencia de ácido nucleico que es complementaria al analito (por ejemplo, una secuencia que puede hibridar con el ARN CRISPR (ARNcr), ARN guía único (ARNsg), o una secuencia adaptadora manipulada genéticamente en un ARNcr o ARNsg).

En ciertas realizaciones, se extrae un analito de una célula viva. Las condiciones de procesamiento se pueden ajustar para asegurar que una muestra permanece viva durante el análisis, y los analitos se extraen de (o se liberan de) células vivas de la muestra. Los analitos derivados de células vivas se pueden obtener una sola vez a partir de la muestra, o se pueden obtener a intervalos a partir de una muestra que continúa permaneciendo en condiciones viables.

En general, los sistemas, aparatos, métodos y composiciones se pueden usar para analizar cualquier número de analitos. Por ejemplo, el número de analitos que se analizan pueden ser al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 11, al menos aproximadamente 12, al menos aproximadamente 13, al menos aproximadamente 14, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 1.000, al menos aproximadamente 10.000, al menos aproximadamente 100.000 o más diferentes analitos presentes en una región de la muestra o dentro de un punto de captura individual del sustrato. Los métodos para realizar ensayos multiplexados para analizar dos o más analitos diferentes se discutirán en una sección posterior de esta divulgación

(d) Muestras

(i) Tipos de muestras

La presente descripción permite el análisis de muestras tanto biológicas como no biológicas. Una "muestra biológica" se obtiene del sujeto para su análisis utilizando cualquiera de una variedad de técnicas que incluyen, pero sin limitación, biopsia, cirugía y microscopía de captura láser (LCM), y generalmente incluye células y/u otro material biológico del sujeto. Además de los sujetos descriptos anteriormente, una muestra biológica también se puede obtener de organismos no mamíferos (por ejemplo, plantas, insectos, arácnidos, nematodos, hongos, anfibios y peces). Una muestra biológica también se puede obtener de un procariota tal como bacteria, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Mycoplasma pneumoniae*; una arquea; un virus tal como virus de la hepatitis C o virus de inmunodeficiencia humana; o un viroid. También se puede obtener una muestra biológica de un eucariota, tal como un organoide derivado de paciente (PDO) o un xenoinjerto derivado de paciente (PDX). La muestra biológica puede incluir organoides, una versión miniaturizada y simplificada de un órgano producido in vitro en tres dimensiones que muestra una microanatomía realista. Los organoides se pueden generar a partir de una o más células de un tejido, células madre embrionarias y/o células madre pluripotentes inducidas, que se pueden autoorganizar en cultivo tridimensional debido a sus capacidades de autorrenovación y diferenciación. En algunas realizaciones, un organoide es un organoide cerebral, un organoide intestinal, un organoide estomacal, un organoide lingual, un organoide tiroideo, un organoide tímico, un organoide testicular, un organoide hepático, un organoide pancreático, un organoide epitelial, un organoide pulmonar, un organoide renal, un gastruloide, un organoide cardíaco o un organoide retiniano. Los sujetos de los que pueden obtenerse muestras biológicas pueden ser individuos sanos o asintomáticos, individuos que tienen o se sospecha que tienen una enfermedad (por ejemplo, cáncer) o una predisposición a una enfermedad, y/o individuos que necesitan terapia o se sospecha que necesitan terapia.

La muestra biológica puede incluir cualquier número de macromoléculas, por ejemplo, macromoléculas celulares y organelas (por ejemplo, mitocondrias y núcleos). La muestra biológica puede ser una muestra de ácido nucleico y/o una muestra de proteína. La muestra biológica puede ser una muestra de carbohidratos o una muestra de lípidos. La muestra biológica se puede obtener como una muestra de tejido, tal como una sección de tejido, una biopsia, una biopsia de núcleo, un aspirado con aguja o un aspirado con aguja fina. La muestra puede ser una muestra de líquido, tal como una muestra de sangre, muestras de orina o muestra de saliva. La muestra puede ser una muestra de piel, una muestra de colon, un hisopado de mejilla, una muestra histológica, una muestra histopatológica, una muestra de plasma o suero, una muestra de tumor, células vivas, células cultivadas, una muestra clínica tal como, por ejemplo, sangre entera o productos derivados de la sangre, células sanguíneas o tejidos o células cultivadas, incluidas suspensiones celulares.

Las muestras biológicas libres de células pueden incluir polinucleótidos extracelulares. Los polinucleótidos extracelulares se pueden aislar de una muestra corporal, por ejemplo, sangre, plasma, suero, orina, saliva, excreciones mucosas, esputo, heces y lágrimas.

Las muestras biológicas se pueden derivar de un cultivo o población homogénea de los sujetos u organismos mencionados en la presente o, alternativamente, de una colección de varios organismos diferentes, por ejemplo, en una comunidad o ecosistema.

Las muestras biológicas pueden incluir una o más células enfermas. Una célula enferma puede tener propiedades metabólicas, expresión génica, expresión de proteínas y/o características morfológicas alteradas. Ejemplos de enfermedades incluyen trastornos inflamatorios, trastornos metabólicos, trastornos del sistema nervioso y cáncer. Las células cancerosas pueden derivar de tumores sólidos, neoplasias hematológicas, líneas celulares u obtenerse como células tumorales circulantes.

Las muestras biológicas también pueden incluir células fetales. Por ejemplo, se puede realizar un procedimiento tal como la amniocentesis para obtener una muestra de células fetales de la circulación materna. La secuenciación de

células fetales se puede utilizar para identificar cualquiera de una serie de trastornos genéticos, que incluyen, por ejemplo, aneuploidías tales como síndrome de Down, síndrome de Edwards y síndrome de Patau. Además, las características de la superficie celular de las células fetales se pueden utilizar para identificar cualquiera de una serie de trastornos o enfermedades.

- 5 Las muestras biológicas también pueden incluir células inmunitarias. El análisis de secuencias del repertorio inmunitario de dichas células, que incluye las características genómicas, proteómicas y de superficie celular, puede proporcionar una gran cantidad de información para facilitar la comprensión del estado y la función del sistema inmunitario. A modo de ejemplo, la determinación del estado (por ejemplo, negativo o positivo) de la enfermedad mínima residual (MRD) en un paciente con mieloma múltiple (MM) después de un trasplante autólogo de células madre 10 se considera un predictor de la MRD en el paciente con MM (ver, por ejemplo, la publicación de patente U.S. N°2018/0156784, cuyo contenido íntegro se incorpora al presente documento por referencia).

Los ejemplos de células inmunitarias en una muestra biológica incluyen, pero no se limitan a, células B, células T (por ejemplo, células T citotóxicas, células T citolíticas naturales, células T reguladoras y células T auxiliares), células citolíticas naturales, células citolíticas inducidas por citoquinas (CIK), células mieloídes, tales como granulocitos (granulocitos basófilos, granulocitos eosinófilos, granulocitos neutrófilos/neutrófilos hipersegmentados), monocitos/macrófagos, mastocitos, trombocitos/megacariocitos y células dendríticas.

Como se analizó anteriormente, una muestra biológica puede incluir un analito de interés único, o más de un analito de interés. Los métodos para realizar ensayos multiplexados para analizar dos o más analitos diferentes en una muestra biológica única se analizarán en una sección posterior de esta divulgación.

20 ***(ii) Preparación de muestras***

Para preparar una muestra para su análisis, se pueden llevar a cabo diversos pasos. Excepto que se indique lo contrario, las etapas de preparación descriptas a continuación se pueden combinar generalmente de cualquier manera para preparar adecuadamente una muestra específica para su análisis.

(1) Seccionamiento del tejido

- 25 Una muestra se puede recolectar de un sujeto (por ejemplo, mediante biopsia quirúrgica, seccionamiento del sujeto entero) o cultivar in vitro en un sustrato de crecimiento o placa de cultivo como una población de células, o preparar para el análisis como un escisión de tejido o sección de tejido. Las muestras cultivadas pueden ser lo suficientemente finas como para ser analizadas sin necesidad de otras etapas de procesamiento. Alternativamente, las muestras cultivadas, y las muestras obtenidas mediante biopsia o seccionamiento, se pueden preparar como secciones finas de tejido utilizando un aparato de escisión mecánico tal como un micrótomo de cuchilla vibratoria. Como otra alternativa, en algunas realizaciones, una sección fina de tejido se puede preparar mediante la aplicación de una impresión táctil de una muestra a un material de sustrato adecuado.

30 El grosor de la sección de tejido puede ser una fracción (por ejemplo, menor de 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1) de la dimensión máxima de la sección transversal de una célula. Sin embargo, también se puede un grosor que sea mayor que la dimensión transversal máxima de la célula. Por ejemplo, se pueden utilizar secciones de criostato, que pueden tener, por ejemplo, 10-20 micrómetros de grosor.

35 Más generalmente, el grosor de una sección de tejido depende típicamente del método utilizado para preparar la sección y las características físicas del tejido, y por lo tanto se puede preparar y utilizar secciones que tengan una amplia variedad de grosores diferentes. Por ejemplo, el grosor de la sección de tejido puede ser de al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7, 1,0, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 30, 40, o 50 micrómetros. También se pueden usar secciones más gruesas, si se desea o es conveniente, *por ejemplo*, al menos 70, 80, 90, o 100 micrómetros o más. Normalmente, el grosor de una sección de tejido está entre 1-100 micrómetros, 1-50 micrómetros, 1-30 micrómetros, 1-25 micrómetros, 1-20 micrómetros, 1-15 micrómetros, 1-10 micrómetros, 2-8 micrómetros, 3-7 micrómetros, o 4-6 micrómetros, pero como se mencionó anteriormente, también se pueden analizar las secciones con grosores mayores o menores que estos rangos.

40 También se pueden obtener múltiples secciones a partir de una única muestra. Por ejemplo, se pueden obtener múltiples secciones de tejido a partir de una muestra de biopsia quirúrgica mediante el seccionamiento en serie de la muestra de biopsia con una cuchilla seccionadora. De este modo, se puede conservar la información espacial entre las secciones seriadas, y las secciones se pueden analizar sucesivamente para obtener información tridimensional sobre la muestra.

(2) Congelación

En algunas realizaciones, la muestra (por ejemplo, una sección de tejido como se describió anteriormente) se puede preparar por congelación a una temperatura adecuada para mantener o preservar la integridad (por ejemplo, las características físicas) de la estructura del tejido. Dicha temperatura puede ser, por ejemplo, menor de -20 °C, o menor de -25 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C, -80 °C, -90 °C, -100 °C, -110 °C, -120 °C, -130 °C, -140 °C, -150 °C, -

- 5 -160 °C, -170 °C, -180 °C, -190 °C, o -200 °C. La muestra de tejido congelada se puede seccionar, por ejemplo, en cortes finos, sobre una superficie de sustrato utilizando cualquier número de métodos adecuados. Por ejemplo, una muestra de tejido se puede preparar usando un micrótomo enfriado (por ejemplo, un criostato) ajustado a una temperatura adecuada para mantener tanto la integridad estructural de la muestra de tejido como las propiedades químicas de los ácidos nucleicos de la muestra. Dicha temperatura puede ser, por ejemplo, menor de -15 °C, menor de 10 -20 °C o menor de -25 °C. Una muestra se puede congelar rápidamente en isopentano y nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se pueden almacenar en un recipiente sellado antes de la incrustación.

(3) Fijación con formol e inclusión en parafina

En algunas realizaciones, la muestra se puede preparar mediante fijación en formol e inclusión en parafina (FFPE), que son métodos establecidos. En algunas realizaciones, las suspensiones celulares y otras muestras no tisulares se 15 pueden preparar mediante fijación con formalina e inclusión en parafina. Después de la fijación de la muestra y su inclusión en un bloque de parafina o resina, la muestra se puede seccionar como se describió anteriormente. Antes del análisis, el material incluido en parafina se puede eliminar de la sección de tejido (por ejemplo, desparafinización) mediante la incubación de la sección de tejido en un solvente apropiado (por ejemplo, xileno) seguido de un enjuague (por ejemplo, etanol 99,5% durante 2 minutos, etanol 96% durante 2 minutos y etanol 70% durante 2 minutos).

(4) Fijación

Como alternativa a la fijación con formol descripta anteriormente, una muestra se puede fijar en cualquiera de una variedad de otros fijadores para conservar la estructura biológica de la muestra antes del análisis. Por ejemplo, una muestra se puede fijar mediante inmersión en etanol, metanol, acetona, formaldehído (por ejemplo, formaldehído 2%) paraformaldehído-Triton, glutaraldehído, o combinaciones de los mismos.

- 25 En algunas realizaciones, la fijación con acetona se utiliza con muestras frescas congeladas, que pueden incluir, pero sin limitación, muestras de tejido de corteza, bulbo olfatorio de ratón, tumor cerebral humano, cerebro humano post-mortem y cáncer de mama. En algunas realizaciones, se elige y/u optimiza un método de fijación compatible basado en un flujo de trabajo deseado. Por ejemplo, se puede elegir la fijación con formaldehído como compatible para flujos de trabajo que utilicen protocolos IHC/IF para la visualización de proteínas. A modo de otro ejemplo, se puede elegir la fijación con metanol para flujos de trabajo que enfaticen la calidad de las bibliotecas de ARN/ADN. La fijación con acetona se puede elegir en algunas aplicaciones para permeabilizar el tejido. Cuando se realiza la fijación con acetona, se pueden evitar las etapas de pre-permeabilización (descriptos a continuación). Alternativamente, la fijación con acetona se puede realizar junto con las etapas de permeabilización

(5) Inclusión

- 35 Como alternativa a la inclusión en parafina descripta anteriormente, una muestra se puede incluir en cualquiera de una variedad de otros materiales de inclusión para proporcionar un sustrato estructural a la muestra antes del seccionamiento y otras etapas de manipulación. En general, el material de inclusión se retira antes del análisis de las secciones de tejido obtenidas de la muestra. Los materiales de inclusión adecuados incluyen, pero sin limitación, ceras, resinas (por ejemplo, resinas de metacrilato), epoxis y agar.

(6) Tinción

40 Para facilitar la visualización, las muestras se pueden teñir usando una amplia variedad de tinciones y técnicas de tinción. En algunas realizaciones, por ejemplo, una muestra se puede teñir utilizando cualquier número de tinciones, que incluyen pero sin limitación, naranja de acridina, marrón de Bismarck, carmín, azul de coomassie, violeta de cresilo, DAPI, eosina, bromuro de etidio, fucsina ácida, hematoxilina, tinciones Hoechst, yodo, verde de metilo, azul de metileno, rojo neutro, azul de Nilo, rojo de Nilo, tetróxido de osmio, yoduro de propidio, rodamina o safranina.

45 La muestra se puede teñir usando técnicas de tinción conocidas, que incluyen técnicas de tinción Can-Grunwald, Giemsa, hematoxilina y eosina (H&E), Jenner's, Leishman, tricrómico de Masson, Papanicolaou, Romanowsky, plata, Sudán, Wright's, y/o ácido periódico de Schiff (PAS). La tinción PAS normalmente se realiza después de la fijación con formol o acetona.

- 50 En algunas realizaciones, la muestra se tiñe utilizando una marca detectable (por ejemplo, radioisótopos, fluoróforos, compuestos quimioluminiscentes, compuestos bioluminiscentes y colorantes) como se describe en otra parte en la presente. En algunas realizaciones, una muestra se tiñe utilizando solo un tipo de tinción o una técnica. En algunas realizaciones, la tinción incluye técnicas de tinción biológica tales como la tinción de H&E. En algunas realizaciones,

la tinción incluye la identificación de analitos utilizando anticuerpos conjugados fluorescentemente. En algunas realizaciones, una muestra se tiñe utilizando dos o más tipos diferentes de tinciones, o dos o más técnicas de tinción diferentes. Por ejemplo, una muestra se puede preparar mediante tinción e imagen utilizando una técnica (por ejemplo, tinción H&E e imagen de campo claro), seguida de tinción e imagen utilizando otra técnica (por ejemplo, tinción IHC/IF y microscopía de fluorescencia) para la misma muestra.

En algunas realizaciones, las muestras se pueden destearñir. Los métodos para destearñir o decolorar una muestra son conocidos en la técnica y generalmente dependen de la naturaleza de la tinción aplicada a la muestra. Por ejemplo, la tinción de H&E se puede decolorar mediante el lavado de la muestra en HCl o en cualquier otro ácido de pH bajo (por ejemplo, ácido selénico, ácido sulfúrico, ácido yodhídrico, ácido benzoico, ácido carbónico, ácido málico, ácido fosfórico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido salicílico, ácido tartárico, ácido sulfuroso, ácido tricloroacético, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido ortofosfórico, ácido arsénico, ácido selenoso, ácido crómico, ácido cítrico, ácido fluorhídrico, ácido nitroso, ácido isociánico, ácido fórmico, seleniuro de hidrógeno, ácido molibdico, ácido láctico, ácido acético, ácido carbónico, sulfuro de hidrógeno o combinaciones de los mismos). En algunas realizaciones, la decoloración puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, o más lavados en un ácido de pH bajo (por ejemplo, HCl). En algunas realizaciones, la decoloración puede incluir la adición de HCl a una solución corriente abajo (por ejemplo, una solución de permeabilización). En algunas realizaciones, la decoloración puede incluir la disolución de una enzima utilizada en los métodos divulgados (por ejemplo, pepsina) en una solución ácida de pH bajo (por ejemplo, HCl). En algunas realizaciones, después de decolorar la hematoxilina con un ácido de pH bajo, se pueden añadir otros reactivos a la solución decolorante para elevar el pH para su uso en otras aplicaciones. Por ejemplo, se puede añadir SDS a una solución decolorante ácida a pH bajo para elevar el pH en comparación con la solución decolorante ácida a pH bajo sola. A modo de otro ejemplo, en algunas realizaciones, una o más tinciones de inmunofluorescencia se aplican a la muestra mediante el acoplamiento de anticuerpos. Tales tinciones se pueden eliminar utilizando técnicas tales como la escisión de enlaces disulfuro mediante tratamiento con un agente reductor y lavado con detergente, tratamiento con sal caotrópica, tratamiento con solución de recuperación de antígeno y tratamiento con un buffer de glicina ácida. Se describen, por ejemplo, métodos de tinción y decoloración multiplexados, por ejemplo, en Bolognesi *et al.*, 2017, J. Histochem. Cytochem. 65(8): 431-444, Lin *et al.*, 2015, Nat Commun. 6:8390, Pirici *et al.*, 2009, J. Histochem. Cytochem. 57:567-75, y Glass *et al.*, 2009, J. Histochem. Cytochem. 57:899-905.

(7) Inclusión en hidrogel

En algunas realizaciones, la formación del hidrogel se produce dentro de una muestra. En algunas realizaciones, una muestra (por ejemplo, una sección de tejido) se incluyen en un hidrogel. En algunas realizaciones, las subunidades del hidrogel se infunden en la muestra y la polimerización del hidrogel se inicia mediante un estímulo externo o interno. Un "hidrogel", tal como se describe en la presente, puede incluir una red 3D reticulada de cadenas poliméricas hidrofílicas. Una "subunidad de hidrogel" puede ser un monómero hidrófilo, un precursor molecular o un polímero que se puede polimerizar (por ejemplo, reticular) para formar una red de hidrogel tridimensional (3D).

Un hidrogel se puede hinchar en presencia de agua. En algunas realizaciones, un hidrogel comprende un material natural. En algunas realizaciones, un hidrogel incluye un material sintético. En algunas realizaciones, un hidrogel incluye un material híbrido, por ejemplo, el material del hidrogel comprende elementos de polímeros sintéticos y naturales. Se puede utilizar cualquiera de los materiales utilizados en hidrogeles o hidrogeles que comprenden un material basado en polipéptidos descripto en la presente. La inclusión de la muestra de esta manera implica típicamente poner en contacto la muestra con un hidrogel de tal manera que la muestra quede rodeada por el hidrogel. Por ejemplo, la muestra se puede incluir mediante el contacto de la muestra con un material polimérico adecuado, y activar el material polimérico para formar el hidrogel. En algunas realizaciones, el hidrogel se forma de tal manera que el hidrogel se internaliza dentro de la muestra.

En algunas realizaciones, la muestra se inmoviliza en el hidrogel mediante la reticulación del material polimérico que forma el hidrogel. La reticulación se puede realizar química y/o fotoquímicamente, o alternativamente mediante cualquier otro método de formación de hidrogel conocido en la técnica. Por ejemplo, la muestra se puede inmovilizar en el hidrogel por poliacrilamida. Además, los analitos de una muestra se pueden inmovilizar en un hidrogel por reticulación (por ejemplo, reticulación de poliacrilamida).

La composición y aplicación de la matriz de hidrogel a una muestra depende normalmente de la naturaleza y preparación de la muestra (por ejemplo, seccionada, no seccionada, fresca-congelada, tipo de fijación). Un hidrogel puede ser cualquier hidrogel apropiado en el que, después de la formación del hidrogel sobre la muestra, ésta queda anclada o incluida en el hidrogel. Los ejemplos no limitantes de hidrogeles se describen en la presente o son conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, cuando la muestra es una sección de tejido, el hidrogel puede incluir una solución de monómero y una solución de iniciador de persulfato de amonio (APS) / acelerador de tetrametiletendiamina (TEMED). A modo de otro ejemplo, cuando la muestra consiste en células (por ejemplo, células cultivadas o células disociadas de una muestra de tejido), las células se pueden incubar con la solución de monómero y las soluciones APS/TEMED. En el caso de las células, el hidrogel se forma en compartimentos, que incluyen, pero sin limitación, los

dispositivos utilizados para cultivar, mantener o transportar las células. Por ejemplo, los hidrogeles se pueden formar con la solución de monómero más APS/TEMED añadida al compartimento a una profundidad que varía de aproximadamente 0,1 µm a aproximadamente 2 mm.

Otros métodos y aspectos de la inclusión de muestras en hidrogel se describen, por ejemplo, en Chen et al., 2015, Science 347(6221):543-548, y en la publicación PCT 202020176788A1 titulada "Profiling of analytes with spatially barcoded oligonucleotide arrays".

(8) Transferencia de muestras

En algunas realizaciones, una muestra inmovilizada en un sustrato (por ejemplo, una muestra biológica preparada mediante fijación con metanol o fijación con formol e inclusión en parafina (FFPE)) se transfiere a una matriz espacial utilizando un hidrogel. En algunas realizaciones, se forma un hidrogel encima de una muestra sobre un sustrato (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio). Por ejemplo, la formación del hidrogel se puede producir de manera suficiente para anclar (por ejemplo, incluir) la muestra en el hidrogel. Después de la formación del hidrogel, la muestra se ancla al hidrogel (por ejemplo, se incluye en) el hidrogel y, la separación del hidrogel del sustrato, hace que la muestra se separe del sustrato junto con el hidrogel. A continuación, la muestra se puede poner en contacto con una matriz espacial, de este modo permite el perfilado espacial de la muestra. En algunas realizaciones, el hidrogel se retira después de poner en contacto la muestra con la matriz espacial. Por ejemplo, los métodos descriptos en la presente pueden incluir un hidrogel despolimerizante dependiente del evento (por ejemplo, luz o productos químicos), en el que después de la aplicación del evento (por ejemplo, estímulos externos) el hidrogel se despolimeriza. En un ejemplo, una muestra se puede anclar a un hidrogel sensible al DTT, donde la adición de DTT puede hacer que el hidrogel se despolimerice y libere la muestra anclada. Un hidrogel puede ser cualquier hidrogel apropiado en el que, después de la formación del hidrogel sobre la muestra, la muestra queda anclada o incluida en el hidrogel. Ejemplos no limitantes de hidrogeles se describen en la presente o son conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, un hidrogel incluye un ligador que permite el anclaje de la muestra al hidrogel. En algunas realizaciones, un hidrogel incluye ligadores que permiten el anclaje de analitos al hidrogel. En tales casos, el ligador se puede añadir al hidrogel antes, simultáneamente o después de la formación del hidrogel. Los ejemplos no limitantes de ligadores que anclan ácidos nucleicos al hidrogel pueden incluir el ácido 6-((Aciloil)amino) hexanoico (Aciloil X SE) (disponible en ThermoFisher, Waltham, MA), Label-IT Amine (disponible en MirusBio, Madison, WI) y Label X (Chen et al., Nat. Methods 13:679-684, 2016). Cualquier variedad de características puede determinar las condiciones de transferencia necesarias para una muestra dada. Los ejemplos no limitantes de características que pueden afectar las condiciones de transferencia incluyen la muestra (por ejemplo, grosor, fijación y reticulación) y/o el analito de interés (diferentes condiciones para conservar y/o transferir diferentes analitos (por ejemplo, ADN, ARN y proteínas)). En algunas realizaciones, la formación del hidrogel puede ocurrir de manera suficiente para anclar los analitos (por ejemplo, incluir) en la muestra al hidrogel. En algunas realizaciones, el hidrogel se puede implosionar (por ejemplo, encogerse) con los analitos anclados (por ejemplo, incluidos en el hidrogel) presentes en la muestra. En algunas realizaciones, el hidrogel se puede expandir (por ejemplo, expansión isométrica) con los analitos anclados (por ejemplo, incluidos en el hidrogel) presentes en la muestra. En algunas realizaciones, el hidrogel se puede implosionar (por ejemplo, encoger) y posteriormente expandir con los analitos anclados (por ejemplo, incluidos en el hidrogel) presentes en la muestra.

(9) Expansión isométrica

En algunas realizaciones, una muestra incluida en un hidrogel se puede expandir isométricamente. Los métodos de expansión isométrica que se pueden utilizar incluyen la hidratación, una etapa preparativa en la microscopía de expansión, como se describe en Chen et al ., 2015, Science 347(6221) 543-548, Asano et al ., 2018, Current Protocols 80:1, doi:10.1002/cpcb.56; Gao et al ., 2017, BMC Biology 15:50, doi:10.1186/s12915-017-0393-3, y Wassie et al ., 2018, Expansion microscopy: principles and uses in biological research, Nature Methods 16(1): 33-41.

En general, las etapas usadas para realizar la expansión isométrica de la muestra pueden depender de las características de la muestra (por ejemplo, grosor de la sección de tejido, fijación, reticulación), y/o del analito de interés (por ejemplo, diferentes condiciones para anclar ARN, ADN y proteínas a un gel).

La expansión isométrica se puede realizar mediante el anclaje de uno o más componentes de una muestra a un gel, seguido de la formación de gel, proteólisis e hinchartamiento. La expansión isométrica de la muestra puede ocurrir antes de la inmovilización de la muestra en un sustrato, o después de que la muestra esté inmovilizada a un sustrato. En algunas realizaciones, la muestra expandida isométricamente se puede retirar del sustrato antes de poner en contacto la muestra expandida con una matriz con código de barras espacial (por ejemplo, sondas de captura con código de barras espacial sobre un sustrato).

En algunas realizaciones, las proteínas en la muestra se anclan a un gel hinchable tal como un gel de polielectrolito. Un anticuerpo se puede dirigir a la proteína antes, después o junto con el anclaje al gel hinchable. El ADN y/o el ARN de una muestra también se pueden anclar al gel hinchable mediante un ligador adecuado. Los ejemplos de tales

ligadores incluyen, pero sin limitación, ácido 6-((Acriloil)amino) hexanoico (Acriloil-X SE) (disponible en ThermoFisher, Waltham, MA), Label-IT Amine (disponible en MirusBio, Madison, WI) y Label X (descripto por ejemplo en Chen et al., Nat. Methods 13:679-684, 2016).

La expansión isométrica de la muestra puede aumentar la resolución espacial del análisis posterior de la muestra. Por ejemplo, la expansión isométrica de la muestra puede aumentar la resolución de los perfiles espaciales (por ejemplo, los perfiles de célula única). La resolución aumentada en el perfil espacial se puede determinar mediante la comparación de una muestra expandida isométricamente con una muestra que no ha sido expandida isométricamente.

La expansión isométrica puede permitir la resolución espacial tridimensional del análisis posterior de la muestra. En algunas realizaciones, la expansión isométrica de la muestra puede ocurrir en presencia de reactivos de perfilado espacial (por ejemplo, agentes de captura de analitos o sondas de captura). Por ejemplo, el gel hinchable puede incluir agentes de captura de analitos o sondas de captura ancladas en el gel. o sondas de captura ancladas al gel hinchable mediante un ligador adecuado. En algunas realizaciones, los reactivos de perfilado espacial se pueden administrar en lugares particulares de una muestra isométricamente expandida.

En algunas realizaciones, una muestra se expande isométricamente a un volumen de al menos 2x, 2,1x, 2,2x, 2,3x, 2,4x, 2,5x, 2,6x, 2,7x, 2,8x, 2,9x, 3x, 3,1x, 3,2x, 3,3x, 3,4x, 3,5x, 3,6x, 3,7x, 3,8x, 3,9x, 4x, 4,1x, 4,2x, 4,3x, 4,4x, 4,5x, 4,6x, 4,7x, 4,8x, o 4,9x su volumen no expandido. En algunas realizaciones, la muestra se expande isométricamente a al menos 2x y menos de 20x de su volumen no expandido.

En algunas realizaciones, una muestra incluida en un hidrogel se expande isométricamente a un volumen de menos 2x, 2,1x, 2,2x, 2,3x, 2,4x, 2,5x, 2,6x, 2,7x, 2,8x, 2,9x, 3x, 3,1x, 3,2x, 3,3x, 3,4x, 3,5x, 3,6x, 3,7x, 3,8x, 3,9x, 4x, 4,1x, 4,2x, 4,3x, 4,4x, 4,5x, 4,6x, 4,7x, 4,8x, o 4,9x de su volumen no expandido. En algunas realizaciones, la muestra incluida en un hidrogel se expande isométricamente a al menos 2x y menos que 20x de su volumen no expandido.

(10) Unión al sustrato

En algunas realizaciones, la muestra puede unir a un sustrato (por ejemplo, un chip). A continuación se describen en detalle ejemplos de sustratos adecuados para este fin. La unión de la muestra puede ser irreversible o reversible, de acuerdo con la naturaleza de la muestra y las etapas subsiguientes del método analítico.

En ciertas realizaciones, la muestra se puede unir al sustrato de forma reversible mediante la aplicación de un recubrimiento polimérico adecuado al sustrato y el contacto de la muestra con el recubrimiento polimérico. A continuación, la muestra se puede separar del sustrato utilizando un solvente orgánico que disuelva al menos parcialmente el recubrimiento polimérico. Los hidrogeles son ejemplos de polímeros adecuados para este fin.

Más generalmente, en algunas realizaciones, el sustrato se puede recubrir o funcionalizar con una o más sustancias para facilitar la unión de la muestra al sustrato. Las sustancias adecuadas que se pueden usar para recubrir o funcionalizar el sustrato incluyen, pero sin limitación lectinas, polilisina, anticuerpos y polisacáridos.

(II) Desagregación de células

En algunas realizaciones, la muestra corresponde a células (por ejemplo, derivadas de un cultivo celular o una muestra de tejido). En una muestra celular con una pluralidad de células, las células individuales se pueden desagregar de forma natural. Por ejemplo, las células se pueden derivar de una suspensión de células y/o células disociadas o desagregadas de un tejido o sección de tejido.

Alternativamente, las células de la muestra pueden estar agregadas, y se pueden desagregar en células individuales utilizando, por ejemplo, técnicas enzimáticas o mecánicas. Los ejemplos de enzimas utilizadas en la desagregación enzimática incluyen, pero no se limitan a, dispasa, colagenasa, tripsina y combinaciones de las mismas. La desagregación mecánica se puede realizar, por ejemplo, utilizando un homogenizador de tejidos.

En algunas realizaciones de células no agregadas o células desagregadas, las células se distribuyen en el sustrato de manera que al menos una célula ocupa una característica espacial distinta en el sustrato. Las células se pueden inmovilizar en el sustrato (por ejemplo, para evitar la difusión lateral de las células). En algunas realizaciones, se puede utilizar un agente de inmovilización celular para inmovilizar una muestra no agregada o desagregada en una matriz con código de barras espacial antes de la captura del analito. Un "agente de inmovilización celular" se puede referir a un anticuerpo, unido a un sustrato, que puede unirse a un marcador de superficie celular. En algunas realizaciones, la distribución de la pluralidad de células sobre el sustrato sigue la estadística de Poisson.

En algunas realizaciones, las células de una pluralidad de células se inmovilizan sobre un sustrato. En algunas realizaciones, las células se inmovilizan para evitar la difusión lateral, por ejemplo, mediante la adición de un hidrogel y/o mediante la aplicación de un campo eléctrico.

(12) Células suspendidas y adherentes

En algunas realizaciones, la muestra se puede derivar de un cultivo celular *in vitro*. Las muestras derivadas de un cultivo celular pueden incluir una o más células en suspensión que son independientes del anclaje dentro del cultivo celular. Ejemplos de tales células incluyen, pero sin limitación, líneas celulares derivadas de células hematopoyéticas, y de las siguientes líneas celulares: Colo205, CCRF-CEM, HL-60, K562, MOLT-4, RPMI-8226, SR, HOP-92, NCI-H322M, y MALME-3M.

Las muestras derivadas de un cultivo celular pueden incluir una o más células adherentes que crecen en la superficie del recipiente que contiene el medio de cultivo. Los ejemplos adicionales no limitantes de células suspendidas y adherentes se encuentran en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº 16/992.569 titulada "Systems and Methods for Using the Spatial Distributions on Haplotypes to Determine a Biological Condition," presentada el 13 de agosto de 2020, y la publicación PCT Nº. 202020176788A 1 titulada "Profiling of biological analytes with spatially barcoded oligonucleotide arrays".

En algunas realizaciones, una muestra se puede permeabilizar para facilitar la transferencia de analitos fuera de la muestra, y/o para facilitar la transferencia de especies (tales como sondas de captura) dentro de la muestra. Si una muestra no se permeabiliza lo suficiente, la cantidad de analito capturado de la muestra puede ser demasiado baja para permitir un análisis adecuado. Por el contrario, si la muestra de tejido es demasiado permeable, se puede perder la relación espacial relativa de los analitos dentro de la muestra de tejido. Por lo tanto, es deseable un equilibrio entre permeabilizar la muestra de tejido lo suficiente como para obtener una buena intensidad de señal y, al mismo tiempo, mantener la resolución espacial de la distribución de analitos en la muestra.

En general, una muestra se puede permeabilizar mediante la exposición de la muestra a uno o más agentes permeabilizantes. Los agentes adecuados para este propósito incluyen, pero no se limitan a, disolventes orgánicos (por ejemplo, acetona, etanol y metanol), agentes de reticulación (por ejemplo, paraformaldehído), detergentes (por ejemplo, saponina, Triton X-100™, Tween-20™, o dodecil sulfato de sodio (SDS)), y enzimas (por ejemplo, tripsina, proteasas (por ejemplo, proteinasa K). En algunas realizaciones el detergente es un detergente aniónico (por ejemplo, SDS o solución de sal sódica de N-lauroilsarcosina). En algunas realizaciones, la muestra se puede permeabilizar utilizando cualquiera de los métodos descriptos en la presente (por ejemplo, utilizando cualquiera de los detergentes descriptos en la presente, por ejemplo, SDS y/o solución de sal sódica de N-lauroilsarcosina) antes o después del tratamiento enzimático (por ejemplo, tratamiento con cualquiera de las enzimas descriptas en la presente, por ejemplo, tripsina, proteasas (por ejemplo, pepsina y/o proteinasa K)).

En algunas realizaciones, una muestra se puede permeabilizar mediante la exposición de la muestra a más de aproximadamente 1,0 % en p/v (por ejemplo, más de aproximadamente 2,0 % en p/v, más de aproximadamente 3,0 % en p/v, más de aproximadamente 4,0 % en p/v, más de aproximadamente 5,0 % en p/v, más de aproximadamente 6,0 % en p/v, más de aproximadamente 7,0 % en p/v, más de aproximadamente 8,0 % en p/v, más de aproximadamente 9,0 % en p/v, más de aproximadamente 10,0 % en p/v, más de aproximadamente 11,0 % en p/v, más de aproximadamente 12,0 % en p/v, o más de aproximadamente 13,0 % en p/v) dodecil sulfato de sodio (SDS) y/o N-lauroilsarcosina o sal sódica de N-lauroilsarcosina. En algunas realizaciones, una muestra se puede permeabilizar mediante la exposición de la muestra (por ejemplo, durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 1 hora, aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 20 minutos, o aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos) a aproximadamente 1,0 % en p/v a aproximadamente 14,0 % en p/v (por ejemplo, aproximadamente 2,0 % en p/v a aproximadamente 14,0 % en p/v, aproximadamente 2,0 % en p/v a aproximadamente 12,0 % en p/v, aproximadamente 2,0 % en p/v a aproximadamente 10,0 % en p/v, aproximadamente 4,0 % en p/v a aproximadamente 14,0 % en p/v, aproximadamente 4,0 % en p/v a aproximadamente 12,0 % en p/v, aproximadamente 4,0 % en p/v a aproximadamente 10,0 % en p/v, aproximadamente 6,0 % en p/v a aproximadamente 14,0 % en p/v, aproximadamente 6,0 % en p/v a aproximadamente 12,0 % en p/v, aproximadamente 8,0 % en p/v a aproximadamente 14,0 % en p/v, aproximadamente 8,0 % en p/v a aproximadamente 10,0 % en p/v, aproximadamente 10,0 % en p/v a aproximadamente 14,0 % en p/v, aproximadamente 10,0 % en p/v a aproximadamente 12,0 % en p/v, o aproximadamente 12,0 % en p/v a aproximadamente 14,0 % en p/v) SDS y/o solución de sal de N- lauroilsarcosina y/o proteinasa K (por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente 4% a aproximadamente 35 °C, aproximadamente 4 °C a aproximadamente 25 °C, aproximadamente 4 °C a aproximadamente 20 °C, aproximadamente 4 °C a aproximadamente 10 °C, aproximadamente 10 °C a aproximadamente 25 °C, aproximadamente 10 °C a aproximadamente 20 °C, aproximadamente 10 °C a aproximadamente 15 °C, aproximadamente 35 °C a aproximadamente 50 °C, aproximadamente 35 °C a aproximadamente 45 °C, aproximadamente 35 °C a aproximadamente 40 °C, aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C, aproximadamente 40 °C a aproximadamente 45 °C, o aproximadamente 45 °C a aproximadamente 50 °C).

En algunas realizaciones, la muestra se puede incubar con un agente permeabilizante para facilitar la permeabilización de la muestra. Se describen métodos adicionales para la permeabilización de la muestra, por ejemplo, en Jamur *et al.*, 2010, *Method Mol. Biol.* 588:63-66, 201

Reactivos de lisis

- 5 En algunas realizaciones, la muestra se puede permeabilizar mediante la adición de uno o más reactivos de lisis a la muestra. Los ejemplos de agentes de lisis adecuados incluyen, pero sin limitación, reactivos bioactivos tales como enzimas de lisis que se utilizan para la lisis de diferentes tipos de células, por ejemplo, bacterias grampositivas o negativas, plantas, levaduras, mamíferos, tales como lisozimas, acromopeptidasa, lisostafina, labiosa, kitalasa, litiasa, y una variedad de otras enzimas de lisis disponibles comercialmente.
- 10 Otros agentes de lisis se pueden añadir adicional o alternativamente a la muestra para facilitar la permeabilización. Por ejemplo, se pueden utilizar soluciones de lisis a base de tensioactivos para lisar las células de la muestra. Las soluciones de lisis pueden incluir tensioactivos iónicos tales como, por ejemplo, sarcosil y dodecil sulfato de sodio (SDS). Más generalmente, los agentes químicos de lisis pueden incluir, sin limitación, disolventes orgánicos, agentes quelantes, detergentes, tensioactivos y agentes caotrópicos.
- 15 En algunas realizaciones, la muestra se puede permeabilizar mediante métodos de permeabilización no químicos. Los métodos de permeabilización no químicos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los métodos de permeabilización no químicos que se pueden utilizar incluyen, pero sin limitación, técnicas de lisis física tal como electroporación, métodos de permeabilización mecánica (por ejemplo, batido de perlas utilizando un homogeneizador y bolas de molienda para dispersar mecánicamente las estructuras celulares de la muestra), permeabilización acústica (por ejemplo, sonicación) y técnicas de lisis térmica tales como el calentamiento para inducir la permeabilización térmica de la muestra.
- 20

Proteasas

- En algunas realizaciones, un medio, solución o solución de permeabilización puede contener una o más proteasas.
- 25 En algunas realizaciones, una muestra tratada con una proteasa capaz de degradar proteínas de histona puede producir la generación de ADN genómico fragmentado. El ADN genómico fragmentado se puede capturar utilizando el mismo dominio de captura (por ejemplo, un dominio de captura que tenga una secuencia poli(T)) utilizado para capturar ARNm. En algunas realizaciones, una muestra se trata con una proteasa capaz de degradar las proteínas histonas y un protector de ARN antes del perfil espacial para facilitar la captura tanto de ADN genómico como de ARNm.
- 30 En algunas realizaciones, una muestra se permeabiliza mediante la exposición de la muestra a una proteasa capaz de degradar las proteínas histonas. Como se utiliza en la presente, el término "proteína histona" se refiere típicamente a una proteína histona ligadora (por ejemplo, H1) y/o a una proteína histona central (por ejemplo, H2A, H2B, H3 y H4). En algunas realizaciones, una proteasa degrada proteínas histona ligadora, proteínas histona centrales, o proteínas histona de enlace y proteínas histona centrales. Se puede utilizar cualquier proteasa adecuada capaz de degradar las proteínas histona de una muestra. Los ejemplos no limitantes de proteasas capaces de degradar proteínas histona incluyen proteasas inhibidas por leupeptina y TLCK (clorhidrato de tosil-L-lisil-clorometano), una proteasa codificada por el gen EUO de *Chlamydia trachomatis* serovar A, granzima A, una serina proteasa (por ejemplo, tripsina o proteasa similar a la tripsina, serina proteasa neutra, elastasa, catepsina G), una aspartil proteasa (por ejemplo, catepsina D), una enzima de la familia de las peptidasas C1 (por ejemplo, catepsina L), pepsina, proteinasa K, una proteasa inhibida por el inhibidor de diazometano Z-Phe-Phe-CHN(2) o el inhibidor de epóxido E-64, una proteasa lisosomal, o una enzima azurófila (por ejemplo, catepsina G, elastasa, proteinasa 3, serina proteasa neutra). En algunas realizaciones, una serina proteasa es una enzima tripsina, una enzima similar a la tripsina o una variante funcional o derivado de la misma (por ejemplo, P00761; C0HK48; Q8YP2; Q8BW11; Q6IE06; P35035; P00760; P06871; Q90627; P16049; P07477; P00762; P35031; P19799; P35036; Q29463; P06872; Q90628; P07478; P07146; P00763; P35032; P70059; P29786; P35037; Q90629; P35030; P08426; P35033; P35038; P12788; P29787; P35039; P35040; Q8NHM4; P35041; P35043; P35044; P54624; P04814; P35045; P32821; P54625; P35004; P35046; P32822; P35047; C0HKA5; C0HKA2; P54627; P35005; C0HKA6; C0HKA3; P52905; P83348; P00765; P35042; P81071; P35049; P51588; P35050; P35034; P35051; P24664; P35048; P00764; P00775; P54628; P42278; P54629; P42279; Q91041; P54630; P42280; C0HKA4) o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, una enzima tripsina es P00761, P00760, Q29463, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, una proteasa capaz de degradar una o más proteínas histona comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 80% de identidad de secuencia con P00761, P00760, o Q29463. En algunas realizaciones, una proteasa capaz de degradar una o más proteínas histona comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con P00761, P00760, o Q29463. Una proteasa se puede considerar una variante funcional si tiene al menos 50% por ejemplo, al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de la actividad relativa a la actividad de la proteasa en condiciones óptimas para la enzima. En algunas realizaciones, el tratamiento enzimático con enzima
- 55

pepsina, o enzima similar a la pepsina, puede incluir: P03954/PEPA1_MACFU; P28712/PEPA1_RABIT; P27677/PEPA2_MACFU; P27821/PEPA2_RABIT;

P0DJD8/PEPA3_HUMANO; P27822/PEPA3_RABIT; P0DJD7/PEPA4_HUMANO; P27678/PEPA4_MACFU; P28713/PEPA4_RABIT; P0DJD9/PEPA5_HUMANO; Q9D106/PEPA5_MOUSE; P27823/PEPAF_RABIT;

5 P00792/PEPA_BOVIN; Q9N2D4/PEPA_CALJA; Q9GMY6/PEPA_CANLF; P00793/PEPA_CHICK; P11489/PEPA_MACMU; P00791/PEPA_PIG; Q9GMY7/PEPA_RHIFE; Q9GMY8/PEPA_SORUN;

P81497/PEPA_SUNMU; P13636/PEPAJXRSTH y variantes funcionales y sus derivados, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la enzima pepsina puede incluir: P00791/PEPA_PIG; P00792/PEPA_BOVIN, variantes funcionales, derivados, o sus combinaciones.

- 10 Además, la proteasa puede estar contenida en una mezcla de reacción (solución), que también incluye otros componentes (por ejemplo, buffer, sal, quelante (por ejemplo, EDTA), y / o detergente (por ejemplo, SDS, solución de sal de sodio de N-Lauroilsarcosina)). La mezcla de reacción se puede regular con buffer, que tiene un pH de aproximadamente 6,5-8,5, *por ejemplo*, aproximadamente 7,0-8,0. Adicionalmente, la mezcla de reacción se puede usar a cualquier temperatura adecuada, tal como aproximadamente 10-50 °C, *por ejemplo*, aproximadamente 10-44 °C, 11-43 °C, 12-42 °C, 13-41 °C, 14-40 °C, 15-39 °C, 16-38 °C, 17-37 °C, *por ejemplo*, aproximadamente 10 °C, 12 °C, 15 °C, 18 °C, 20 °C, 22 °C, 25 °C, 28 °C, 30 °C, 33 °C, 35 °C o 37 °C, con preferencia aproximadamente 35-45 °C, *por ejemplo*, aproximadamente 37 °C.

Otros reactivos

- 20 En algunas realizaciones, una solución de permeabilización puede contener reactivos adicionales o una muestra se puede tratar con reactivos adicionales para optimizar la permeabilización de la muestra biológica. En algunas realizaciones, un reactivo adicional es un protector de ARN. Como se utiliza en la presente, el término "protector de ARN" se refiere normalmente a un reactivo que protege el ARN de las nucleasas de ARN (por ejemplo, ARNasas). Se puede utilizar cualquier protector de ARN apropiado que proteja al ARN de la degradación. Un ejemplo no limitante de un protector del ARN incluye disolventes orgánicos (por ejemplo, al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% en v/v de solvente orgánico), que incluyen, sin limitación, etanol, metanol, propan-2-ol, acetona, ácido tricloroacético, propano, polietilenglicol, ácido acético o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, un protector del ARN incluye etanol, metanol y/o propan-2-ol, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, un protector de ARN incluye RNAlater ICE (ThermoFisher Scientific). En algunas realizaciones, el protector de ARN comprende al menos aproximadamente 60% de etanol. En algunas realizaciones, el protector de ARN comprende

25 aproximadamente 60-95% de etanol, aproximadamente 0-35% de metanol y aproximadamente 0-35% de propan-2-ol, donde la cantidad total del solvente orgánico en el medio es no más de aproximadamente 95%. En algunas realizaciones, el protector de ARN comprende aproximadamente 60-95% de etanol, aproximadamente 5-20% metanol y aproximadamente 5-20% propan-2-ol, donde la cantidad total del solvente orgánico en el medio es no más de aproximadamente 95%.

30 35 En algunas realizaciones, el protector de ARN incluye una sal. La sal puede incluir sulfato de amonio, bisulfato de amonio, cloruro de amonio, acetato de amonio, sulfato de cesio, sulfato de cadmio, sulfato de cesio y hierro (II), sulfato de cromo (III), sulfato de cobalto (II), sulfato de cobre (II), cloruro de litio, acetato de litio, sulfato de litio, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, sulfato de manganeso, cloruro de manganeso, cloruro de potasio, sulfato de potasio, cloruro de sodio, acetato de sodio, sulfato de sodio, cloruro de zinc, acetato de zinc y sulfato de zinc. En algunas 40 realizaciones, la sal es una sal de sulfato, por ejemplo, sulfato de amonio, bisulfato de amonio, sulfato de cesio, sulfato de cadmio, sulfato de hierro (II) y cesio, sulfato de cromo (III), sulfato de cobalto (II), sulfato de cobre (II), sulfato de litio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, sulfato de potasio, sulfato de sodio o sulfato de zinc. En algunas realizaciones, la sal es sulfato de amonio. La sal puede estar presente en una concentración de aproximadamente 20 g/100 ml de medio o menos, tal como aproximadamente 15 g/100 ml, 10 g/100 ml, 9 g/100 ml, 8 g/100 ml, 7 g/100 ml, 6 g/100 ml, 5 g/100 ml o menos, *por ejemplo*, aproximadamente 4 g, 3 g, 2 g o 1 g/100ml.

45 Además, el protector de ARN puede estar contenido en un medio que incluya además un quelante (por ejemplo, EDTA), un buffer (por ejemplo, citrato de sodio, acetato de sodio, citrato de potasio o acetato de potasio, preferiblemente acetato de sodio), y/o buffer a un pH entre aproximadamente 4-8 (por ejemplo, aproximadamente 5).

50 En algunas realizaciones, la muestra se trata con uno o más protectores del ARN antes, simultáneamente o después de la permeabilización. Por ejemplo, una muestra se trata con uno o más protectores de ARN antes del tratamiento con uno o más reactivos de permeabilización (por ejemplo, una o más proteasas). En otro ejemplo, una muestra se trata con una solución que incluye uno o más protectores de ARN y uno o más reactivos de permeabilización (por ejemplo, una o más proteasas). En aún otro ejemplo, una muestra se trata con uno o más protectores de ARN después de que la muestra se haya tratado con uno o más reactivos de permeabilización (por ejemplo, una o más proteasas). 55 En algunas realizaciones, una muestra se trata con uno o más protectores de ARN antes de la fijación

En algunas realizaciones, la identificación de la ubicación del analito capturado en la muestra incluye una reacción de extensión del ácido nucleico. En algunas realizaciones en las que una sonda de captura capture una molécula de ADN genómico fragmentada, una reacción de extensión de ácido nucleico incluye ADN polimerasa. Por ejemplo, una reacción de extensión de ácido nucleico incluye el uso de una ADN polimerasa para extender la sonda de captura que se hibrida con el analito capturado (por ejemplo, ADN genómico fragmentado) utilizando el analito capturado (por ejemplo, ADN genómico fragmentado) como molde. El producto de la reacción de extensión incluye un analito con código de barras espacial (por ejemplo, ADN genómico fragmentado codificado espacialmente). El analito con código de barras espacial (por ejemplo, ADN genómico fragmentado codificado espacialmente) se puede utilizar para identificar la ubicación espacial del analito en la muestra. Para los métodos aquí descriptos se puede utilizar cualquier ADN polimerasa que sea capaz de extender la sonda de captura utilizando el analito capturado como molde. Los ejemplos no limitantes de ADN polimerasas incluyen la ADN polimerasa T7; ADN polimerasa BsU; y ADN polimerasa pol I de E.coli.

Medios resistentes a la difusión

En algunas realizaciones, un medio resistente a la difusión, utilizado normalmente para limitar la difusión de analitos, puede incluir al menos un reactivo de permeabilización. Por ejemplo, el medio resistente a la difusión (por ejemplo, un hidrogel) puede incluir pocillos (por ejemplo, micro-, nano-, o picopocillos o poros) que contienen un buffer o reactivos de permeabilización. En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión (por ejemplo, un hidrogel) se remoja en buffer de permeabilización antes de poner en contacto el hidrogel con una muestra. En algunas realizaciones, el hidrogel u otro medio resistente a la difusión puede contener reactivos o monómeros secos para suministrar reactivos de permeabilización cuando el medio resistente a la difusión se aplica a una muestra. En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión (por ejemplo, el hidrogel) está unido covalentemente a un sustrato sólido (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio acrílico).

En algunas realizaciones, el hidrogel se puede modificar tanto para suministrar reactivos de permeabilización como para contener sondas de captura. Por ejemplo, una película de hidrogel se puede modificar para incluir sondas de captura con código de barras espacial. La película de hidrogel con código de barras espacial se empapa entonces en buffer de permeabilización antes de poner en contacto la película de hidrogel con código de barras espacial con la muestra. En otro ejemplo, un hidrogel se puede modificar para incluir sondas de captura con código de barras espacial y diseñar para servir como una membrana porosa (por ejemplo, un hidrogel permeable) cuando se expone al buffer de permeabilización o a cualquier otro reactivo de preparación de muestras. El reactivo de permeabilización se difunde a través del hidrogel permeable con código de barras espacial y permeabiliza la muestra al otro lado del hidrogel. A continuación, los analitos se difunden en el hidrogel con código de barras espacial después de la exposición a los reactivos de permeabilización. En tales casos, el hidrogel con código de barras espacial (por ejemplo, la membrana porosa) facilita la difusión de los analitos de la muestra en el hidrogel. En algunas realizaciones, los analitos se difunden en el hidrogel antes de la exposición a los reactivos de permeabilización (por ejemplo, cuando los analitos secretados están presentes fuera de la muestra o en casos en los que una muestra se lisó o permeabilizó por otros medios antes de añadir los reactivos de permeabilización). En algunas realizaciones, el reactivo de permeabilización fluye sobre el hidrogel a un caudal de flujo variable (por ejemplo, cualquier caudal de flujo que facilite la difusión del reactivo de permeabilización a través del hidrogel con código de barras espacial). En algunas realizaciones, los reactivos de permeabilización fluyen a través de una cámara o canal microfluídico sobre el hidrogel con código de barras espacial. En algunas realizaciones, después de utilizar el flujo para introducir los reactivos de permeabilización en la muestra, los reactivos de preparación de la muestra pueden fluir sobre el hidrogel para facilitar aún más la difusión de los analitos en el hidrogel con código de barras espacial. De este modo, la película de hidrogel con código de barras espacial administra reactivos de permeabilización a una superficie de muestra en contacto con el hidrogel con código de barras espacial, lo que mejora la migración y captura de analitos. En algunas realizaciones, el hidrogel con código de barras espacial se aplica a una muestra y se coloca en una solución de permeabilización a granel. En algunas realizaciones, la película de hidrogel sumergida en reactivos de permeabilización se intercala entre una muestra y una matriz con código de barras espacial. En algunas realizaciones, los analitos diana se pueden difundir a través del hidrogel sumergido en reactivos de permeabilización e hibridar o unir a las sondas de captura al otro lado del hidrogel. En algunas realizaciones, el grosor del hidrogel es proporcional a la pérdida de resolución. En algunas realizaciones, los pocillos (por ejemplo, micropocillos, nanopocillos o picopocillos) pueden contener sondas de captura con código de barras espacial y reactivos y/o buffer de permeabilización. En algunas realizaciones, las sondas de captura de permeabilización y los reactivos de permeabilización se mantienen entre espaciadores. En algunas realizaciones, la muestra se perfora, corta o transfiere al pocillo, donde un analito diana difunde a través del reactivo o buffer de permeabilización y a las sondas de captura con código de barras espacial. En algunas realizaciones, la pérdida de resolución puede ser proporcional al grosor de la brecha (por ejemplo, la cantidad de buffer de permeabilización entre la muestra y las sondas de captura). En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión (por ejemplo, hidrogel) tiene un grosor de entre 50-500 micrómetros aproximadamente, que incluyen 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 o 50 micrómetros de grosor, o cualquier grosor entre 50 y 500 micrómetros.

En algunas realizaciones, una muestra se expone a una membrana porosa (por ejemplo, un hidrogel permeable) para ayudar a la permeabilización y limitar las pérdidas difusivas de analitos, mientras que permite que los reactivos de permeabilización lleguen a la muestra. La química de la membrana y el volumen de los poros se pueden manipular para minimizar la pérdida de analitos. En algunas realizaciones, la membrana porosa puede estar hecha de vidrio, 5 silicona, papel, hidrogel, monolitos de polímero u otro material. En algunas realizaciones, el material puede ser naturalmente poroso. En algunas realizaciones, el material puede tener poros o pozos grabados en material sólido. En algunas realizaciones, los reactivos de permeabilización fluyen a través de una cámara o canal microfluídico sobre la membrana porosa. En algunas realizaciones, el flujo controla el acceso de la muestra a los reactivos de permeabilización. En algunas realizaciones, la membrana porosa es un hidrogel permeable. Por ejemplo, un hidrogel 10 es permeable cuando los reactivos de permeabilización y/o los reactivos de preparación de muestras pueden atravesar el hidrogel mediante difusión. Cualquier reactivo de permeabilización y/o reactivo de preparación de muestras adecuado descripto en la presente se puede utilizar en condiciones suficientes para liberar analitos (por ejemplo, ácido nucleico, proteína, metabolitos, lípidos, etc.) de la muestra. En algunas realizaciones, un hidrogel se expone a la muestra por un lado y al reactivo de permeabilización por el otro. El reactivo de permeabilización se difunde a través 15 del hidrogel permeable y permeabiliza la muestra en el otro lado del hidrogel. En algunas realizaciones, los reactivos de permeabilización fluyen sobre el hidrogel a un caudal de flujo variable (por ejemplo, cualquier caudal que facilite la difusión del reactivo de permeabilización a través del hidrogel). En algunas realizaciones, los reactivos de permeabilización fluyen a través de una cámara o canal microfluídico sobre el hidrogel. El flujo de reactivos de permeabilización a través del hidrogel permite controlar la concentración de reactivos. En algunas realizaciones, la 20 química del hidrogel y el volumen de los poros se pueden ajustar para mejorar la permeabilización y limitar las pérdidas difusivas de analitos.

En algunas realizaciones, se intercala una membrana porosa entre una matriz de códigos de barras espaciales y la muestra, y se aplica una solución de permeabilización sobre la membrana porosa. Los reactivos de permeabilización se difunden a través de los poros de la membrana hasta la muestra. En algunas realizaciones, la muestra se puede colocar sobre un sustrato (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio). Los analitos biológicos se difunden a través de la membrana porosa hasta el espacio que contiene las sondas de captura. En algunas realizaciones, la membrana porosa se modifica para incluir sondas de captura. Por ejemplo, las sondas de captura se pueden unir a una superficie de la membrana porosa utilizando cualquiera de los métodos descriptos en la presente. En otro ejemplo, las sondas de captura se pueden incrustar en la membrana porosa a cualquier profundidad que permita la interacción con un analito biológico. En algunas realizaciones, la membrana porosa se coloca sobre una muestra en una configuración que permite la interacción entre las sondas de captura en la membrana porosa y los analitos biológicos de la muestra. Por ejemplo, las sondas de captura están situadas en el lado de la membrana porosa que está próximo a la muestra. En tales casos, los reactivos de permeabilización en el otro lado de la membrana porosa se difunden a través de la membrana porosa a la ubicación que contiene la muestra y las sondas de captura para facilitar la permeabilización de la muestra (por ejemplo, también facilita la captura de los analitos biológicos por las sondas de captura). En algunas realizaciones, la membrana porosa está situada entre la muestra y las sondas de captura. En algunas realizaciones, los reactivos de permeabilización fluyen a través de una cámara o canal microfluídico sobre la membrana porosa. 25 30 35

Permeabilización selectiva/Lisis selectiva

En algunas realizaciones, las muestras se pueden procesar para liberar selectivamente un analito de una región 40 subcelular de una célula de acuerdo con métodos establecidos. En algunas realizaciones, un método proporcionado en la presente puede incluir la detección de al menos un analito presente en una región subcelular de una célula en una muestra. Como se usa en la presente, una "región subcelular" se puede referir a cualquier región subcelular. Por ejemplo, una región subcelular se puede referir a un citosol, una mitocondria, un núcleo, un nucléolo, un retículo endoplásmico, un lisosoma, una vesícula, un aparato de Golgi, un plástido, una vacuola, un ribosoma, un citoesqueleto, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la región subcelular comprende al menos uno de los siguientes: citosol, núcleo, mitocondria y microsoma. En algunas realizaciones, la región subcelular es el citosol. En algunas realizaciones, la región subcelular es un núcleo. En algunas realizaciones, la región subcelular es una mitocondria. En algunas realizaciones, la región subcelular es un microsoma. 45 50 55

Por ejemplo, un analito biológico se puede liberar selectivamente de una región subcelular de una célula mediante permeabilización selectiva o lisis selectiva. En algunas realizaciones, "permeabilización selectiva" se puede referir a un método de permeabilización que puede permeabilizar una membrana de una región subcelular mientras deja una región subcelular diferente sustancialmente intacta (por ejemplo, los analitos biológicos no se liberan de la región subcelular debido al método de permeabilización aplicado). Los ejemplos no limitantes de métodos de permeabilización selectiva incluyen el uso de electroforesis y/o la aplicación de un reactivo de permeabilización. En algunas realizaciones, "lisis selectiva" se puede referir a un método de lisis que puede lisar una membrana de una región subcelular mientras deja una región subcelular diferente sustancialmente intacta (por ejemplo, los analitos biológicos no se liberan de la región subcelular debido al método de lisis aplicado). Un experto en la materia conoce varios métodos de permeabilización o lisis selectiva, incluidos los métodos descriptos en Lu et al. *Lab Chip*. 2005

Jan;5(1):23-9; Niklas et al., 2011, *Anal Biochem* 416(2):218-27; Cox y Emili., 2006, *Nat Protoc.* 1 (4):1872-8; Chiang et al., 2000, *J Biochem. Biophys. Methods.* 20;46(1-2):53-68; y Yamauchi y Herref al., 2017, *Microsyst. Nanoeng.* 3. pii: 16079;

En algunas realizaciones, "permeabilización selectiva" o "lisis selectiva" se refieren a la permeabilización selectiva o lisis selectiva de un tipo celular específico. Por ejemplo, "permeabilización selectiva" o "lisis selectiva" se puede referir a la lisis de un tipo de célula mientras se deja un tipo de célula diferente sustancialmente intacto (por ejemplo, los analitos biológicos no se liberan de la célula debido al método de permeabilización o lisis aplicado). Una célula que es un "tipo celular diferente" de otra célula se puede referir a una célula de un reino taxonómico diferente, una célula procariota frente a una célula eucariota, una célula de un tipo de tejido diferente, etc. Un experto en la materia conoce muchos métodos para permeabilizar o lisar selectivamente diferentes tipos de células. Los ejemplos no limitantes incluyen la aplicación de un reactivo de permeabilización, electroporación y/o sonicación. Ver, por ejemplo, la solicitud internacional Nº WO 2012/168003; Han et al., 2019, *Microsyst Nanoeng.* 5:30; Gould et al., 2018 *Oncotarget.* 20; 9(21): 15606-15615; Oren y Shai, 1997, *Biochemistry* 36(7), 1826-35; Algayer et al., 2019, *Mo/ecu/es.* 24(11). pii: E2079; Hipp et al. 2017, *Leukemia* 10, 2278; Solicitud internacional Nº WO 2012/168003; y patente U.S, Nº 7.785.869.

En algunas realizaciones, la aplicación de un reactivo de permeabilización o lisis selectiva comprende el contacto de la muestra con un hidrogel que comprende el reactivo de permeabilización o lisis.

En algunas realizaciones, la muestra se pone en contacto con dos o más matrices (por ejemplo, matrices flexibles, como se describe en la presente). Por ejemplo, después de permeabilizar una región subcelular y capturar un analito biológico de la región subcelular en una primera matriz, se puede retirar la primera matriz y capturar un analito biológico de una región subcelular diferente en una segunda matriz.

(13) Enriquecimiento selectivo de especies de ARN

En algunas realizaciones, cuando el ARN es el analito, se pueden enriquecer selectivamente una o más especies de analitos de ARN de interés (por ejemplo, Adiconis et al., 2013, Comparative analysis of RNA sequencing methods for degraded and low-input samples, *Nature* 10, 623-632, incorporado en la presente por referencia en su totalidad). Por ejemplo, una o más especies de ARN de interés se pueden seleccionar mediante la adición de uno o más oligonucleótidos a la muestra. En algunas realizaciones, el oligonucleótido adicional es una secuencia utilizada para cebar una reacción mediante una polimerasa. Por ejemplo, una o más secuencias de cebadores con complementariedad de secuencia con uno o más ARN de interés se pueden usar para amplificar el uno o más ARN de interés, de este modo se enriquecen selectivamente estos ARN. En algunas realizaciones, un oligonucleótido con complementariedad de secuencia con la cadena complementaria del ARN capturado (por ejemplo, ADNc) se puede unir al ADNc. Por ejemplo, los oligonucleótidos biotinilados con secuencia complementaria con uno o más ADNc de interés se unen al ADNc y se pueden seleccionar mediante afinidad biotinilación-estreptavidina utilizando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la materia (por ejemplo, perlas de estreptavidina).

Alternativamente, una o más especies de ARN (por ejemplo, ARN ribosómico y/o mitocondrial) se pueden deseleccionar (por ejemplo, eliminar, reducir) utilizando cualquiera de una variedad de métodos. Los ejemplos no limitantes de un método de hibridación y captura de reducción de ARN ribosómico incluyen RiboMinus™, RiboCop™ y Ribo-Zero™. Otro método no limitante de reducción de ARN implica la hibridación de oligonucleótidos de ADN complementario con ARN no deseado seguido de la degradación de los híbridos ARN/ADN utilizando ARNasa H. Entre los ejemplos no limitantes de un método de hibridación y degradación se incluyen NEBNext® rRNA depletion, NuGEN AnyDeplete o RiboZero Plus. Otro método no limitante de eliminación de ARN ribosómico incluye la digestión ZapR™, por ejemplo SMARTer. En el método SMARTer, los adaptadores de ácido nucleico aleatorio se hibridan con el ARN para la síntesis de la primera cadena y la cola por transcriptasa inversa, seguida de cambio de molde y extensión por transcriptasa inversa. Además, la primera ronda de amplificación por PCR añade adaptadores de secuenciación de longitud completa de Ilumina (por ejemplo, índices de Ilumina). El ARN ribosómico es escindido por sondas ZapR v2 y R v2. Se realiza una segunda ronda de PCR, se amplifican moléculas que no son ARNr (por ejemplo, ADNc). También se pueden combinar partes o etapas de estos protocolos/kits de reducción ribosómica con los métodos descriptos en la presente para optimizar los protocolos para una muestra específica.

En los protocolos de reducción, se pueden administrar a una muestra sondas que hibriden selectivamente con el ARN ribosómico (ARNr), así se reduce la mezcla y concentración de ARNr en la muestra. Se pueden administrar sondas a una muestra que hibriden selectivamente con el ARN mitocondrial (ARNmt), se reduce la mezcla y la concentración de ARNmt en la muestra. En algunas realizaciones, las sondas complementarias al ARN mitocondrial se pueden añadir durante la síntesis del ADNc o se pueden añadir sondas complementarias tanto al ARN ribosómico como al mitocondrial durante la síntesis de ADNc. La aplicación posterior de sondas de captura a la muestra puede mejorar la captura de otros tipos de ARN debido a la reducción de ARN no específico (por ejemplo, ARN deseleccionado) presente en la muestra. Además y como alternativa, el tratamiento con nucleasas dúplex-específicas (DSN) puede eliminar el ARNr (véase, por ejemplo, Archer et al, 2014, Selective and flexible depletion of problematic sequences

from RNA-seq libraries at the cDNA stage, BMC Genomics 15 401, cuyo contenido íntegro se incorpora en la presente por referencia). Además, la cromatografía de hidroxiapatita puede eliminar especies abundantes (por ejemplo, ARNr) (ver por ejemplo, Vandernoot, 2012, "cDNA normalization by hydroxyapatite chromatography to enrich transcriptome diversity in RNA-seq applications", Biotechniques, 53(6) 373-380).

5 **(14) Otros reactivos**

Se pueden añadir reactivos adicionales a una muestra para realizar diversas funciones antes del análisis de la muestra. En algunas realizaciones, se pueden añadir a la muestra inhibidores de nucleasas, tales como agentes inactivadores de ADNasa y ARNasa, o inhibidores de proteasas, tales como proteinasa K, y/o agentes quelantes, tales como EDTA. En otras realizaciones se añaden a la muestra nucleasas, tales como ADNasa y ARNasa, o proteasas, tales como pepsina o proteinasa K. En algunas realizaciones, los reactivos adicionales se pueden disolver en una solución o aplicarse como medio a la muestra. En algunas realizaciones, los reactivos adicionales (por ejemplo, pepsina) se pueden disolver en HCl antes de aplicarse a la muestra. Por ejemplo, la hematoxilina, de una tinción de H&E, se puede eliminar opcionalmente de la muestra mediante el lavado en HCl diluido (0,001M a 0,1M) antes del procesamiento posterior. En algunas realizaciones, la pepsina se puede disolver en HCl diluido (0,001M a 0,1M) antes del procesamiento posterior. En algunas realizaciones, las muestras se pueden lavar más veces (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o más veces) en HCl diluido antes de la incubación con una proteasa (por ejemplo, pepsina), pero después del tratamiento con proteinasa K.

En algunas realizaciones, la muestra se puede tratar con una o más enzimas. Por ejemplo, se pueden añadir una o más endonucleasas para fragmentar el ADN, enzimas de ADN polimerasa y dNTPs utilizados para amplificar ácidos nucleicos. Otras enzimas que también se pueden añadir a la muestra incluyen, pero no se limitan a, polimerasa, transposasa, ligasa, y ADNasa, y ARNasa.

En algunas realizaciones, se pueden añadir a la muestra enzimas de transcriptasa inversa, que incluyen enzimas con actividad de transferasa terminal, cebadores y oligonucleótidos de cambio de molde (TSO). El cambio de molde se puede utilizar para aumentar la longitud de un ADNc, por ejemplo, mediante la anexión de una secuencia de ácido nucleico predefinida al ADNc. En la FIG. 37 se ilustra una etapa de transcripción inversa de este tipo. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico añadida comprende uno o más ribonucleótidos.

En algunas realizaciones, se pueden añadir reactivos adicionales para mejorar la recuperación de una o más moléculas diana (por ejemplo, moléculas de ADNc, transcriptos de ARNm). Por ejemplo, la adición de ARN portador a un proceso de flujo de trabajo de muestras de ARN puede aumentar el rendimiento de los híbridos de ARN/ADN extraídos de la muestra. En algunas realizaciones, las moléculas portadoras son útiles cuando la concentración de moléculas de entrada o diana es baja en comparación con las moléculas restantes. Generalmente, las moléculas diana individuales no pueden formar un precipitado, y la adición de moléculas portadoras puede ayudar a formar un precipitado. Algunos protocolos de recuperación de moléculas diana utilizan ARN portador para evitar que pequeñas cantidades de ácidos nucleicos diana presentes en la muestra se unan irremediablemente. En algunas realizaciones, el ARN portador se puede añadir inmediatamente antes de la etapa de síntesis de la segunda cadena. En algunas realizaciones, el ARN portador se puede añadir inmediatamente antes de una síntesis de ADNc de segunda cadena sobre oligonucleótidos liberados de una matriz. En algunas realizaciones, el ARN portador se puede añadir inmediatamente antes de una etapa de limpieza pos-transcripción *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARN portador se puede añadir antes de la purificación y cuantificación del ARN amplificado. En algunas realizaciones, el ARN portador se puede añadir antes de la cuantificación del ARN. En algunas realizaciones, el ARN portador se puede añadir inmediatamente antes de la síntesis de ADNc de segunda cadena y de la etapa de limpieza pos transcripción *in vitro*.

(15) Pre-procesamiento para la interacción de la sonda de captura

En algunas realizaciones, los analitos de una muestra se pueden preprocesar antes de la interacción con una sonda de captura. Por ejemplo, antes de la interacción con las sondas de captura, se llevan a cabo en la muestra reacciones de polimerización catalizadas por una polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa o transcriptasa inversa). En algunas realizaciones, un cebador para la reacción de polimerización incluye un grupo funcional que mejora la hibridación con la sonda de captura. Las sondas de captura pueden incluir dominios de captura apropiados para capturar analitos biológicos de interés (por ejemplo, secuencia poli-dT para capturar ARNm poli(A)).

50 En algunas realizaciones, los analitos biológicos se preprocesan para la generación de bibliotecas mediante secuenciación de próxima generación. Por ejemplo, los analitos se pueden preprocesar mediante la adición de una modificación (por ejemplo, ligación de secuencias que permiten la interacción con sondas de captura). En algunas realizaciones, los analitos (por ejemplo, ADN o ARN) se fragmentan mediante técnicas de fragmentación (por ejemplo, utilizando transposasas y/o buffers de fragmentación).

La fragmentación puede ir seguida de una modificación del analito. Por ejemplo, una modificación puede ser la adición mediante ligación de una secuencia adaptadora que permita la hibridación con la sonda de captura. En algunas realizaciones, cuando el analito de interés es ARN, se lleva a cabo una cola de poli(A). La adición de una cola de poli(A) a ARN que no contiene una cola de poli(A) puede facilitar la hibridación con una sonda de captura que incluye un dominio de captura con una cantidad funcional de secuencia de poli(dT).

En algunas realizaciones, antes de la interacción con las sondas de captura, se llevan a cabo reacciones de ligación catalizadas por una ligasa en la muestra. En algunas realizaciones, la ligación se puede realizar mediante ligación química. En algunas realizaciones, la ligación se puede llevar a cabo mediante química de clic como se describe más adelante. En algunas realizaciones, el dominio de captura incluye una secuencia de ADN que tiene complementariedad 10 con una molécula de ARN, donde la molécula de ARN tiene complementariedad con una segunda secuencia de ADN, y donde la complementariedad de la secuencia ARN-ARN se utiliza para ligar la segunda secuencia de ADN a la secuencia de ADN en el dominio de captura. En estas realizaciones, es posible la detección directa de moléculas de ARN.

En algunas realizaciones, antes de la interacción con las sondas de captura, se llevan a cabo reacciones específicas 15 de la diana en la muestra. Los ejemplos de reacciones específicas de diana incluyen, pero sin limitación, ligación de adaptadores específicos de diana, sondas y/u otros oligonucleótidos, amplificación específica de diana utilizando cebadores específicos de uno o más analitos, y detección específica de diana utilizando hibridación in situ, microscopía de ADN y/o detección de anticuerpos. En algunas realizaciones, una sonda de captura incluye dominios de captura dirigidos a productos específicos de la diana (por ejemplo, amplificación o ligación).

20 **Metodología analítica basada en matriz espacial general**

Esta sección de la divulgación describe métodos, aparatos, sistemas y composiciones para el análisis de muestras basado en matrices espaciales.

(a) Métodos de análisis espacial

Los métodos de análisis espacial basados en matrices implican la transferencia de uno o más analitos de una muestra 25 a una matriz de puntos de captura en un sustrato, cada uno de los cuales está asociado a una ubicación espacial única en la matriz. El análisis posterior de los analitos transferidos incluye la determinación de la identidad de los analitos y la ubicación espacial de cada analito dentro de la muestra. La ubicación espacial de cada analito dentro de la muestra se determina sobre la base del punto de captura al que está unido cada analito en la matriz, y la ubicación espacial relativa del punto de captura dentro de la matriz.

30 Existen al menos dos métodos generales para asociar un código de barras espacial con una o más células vecinas, de manera que el código de barras espacial identifique la una o más células, y/o el contenido de la una o más células, como asociado con una ubicación espacial particular. Un método general consiste en promover la salida de los analitos de una célula y hacia el conjunto con código de barras espacial. La FIG. 1 muestra un ejemplo de realización de este

35 método general. En la FIG. 1, la matriz con código de barras espacial poblada con sondas de captura (como se describe más adelante en la presente) se pone en contacto con una muestra 101, y la muestra se permeabiliza 102, lo que permite que el analito diana migre fuera de la muestra y hacia la matriz 102. El analito diana interactúa con una sonda de captura de la matriz con código de barras espacial. Una vez que el analito diana se hibrida o se une a la sonda de captura, la muestra se retira opcionalmente de la matriz y las sondas de captura se analizan para obtener información del analito con código de barras espacial 103.

40 Otro método general consiste en escindir las sondas de captura con código de barras espacial de una matriz, y promover las sondas de captura con código de barras espacial hacia y/o en o sobre la muestra. En la FIG. 2 se representa un ejemplo de realización de este método general, en la que la matriz con código de barras espacial poblada con sondas de captura (como se describe más adelante en la presente) se puede poner en contacto con una muestra 201. Las sondas de captura con código de barras espaciales se escinden e interactúan con las células dentro

45 de la muestra proporcionada 202. La interacción puede ser covalente o no covalente con la superficie celular. La interacción puede ser una interacción intracelular facilitada por un sistema de administración o un péptido de penetración celular. Una vez que la sonda de captura codificada espacialmente se asocia con una célula particular, la muestra se puede extraer opcionalmente para su análisis. Opcionalmente, la muestra se puede disociar antes del análisis. Una vez que la célula marcada se asocia con la sonda de captura con código de barras espacial, las sondas 50 de captura se pueden analizar para obtener información espacialmente resuelta sobre la célula 203 marcada.

Las FIGS. 3A y 3B muestran flujos de trabajo ejemplares que incluyen la preparación de una muestra en una matriz 301 con código de barras espacial. La preparación de la muestra puede incluir la colocación de la muestra en un sustrato (por ejemplo, un chip, un portaobjetos, etc.), la fijación de la muestra y/o la tinción de la muestra para la obtención de imágenes. La muestra (teñida o no teñida) luego se visualiza en la matriz 302 usando campo claro (para visualizar la muestra, por ejemplo, usando una tinción de hematoxilina y eosina) o fluorescencia (para visualizar puntos

de captura) como se ilustra en el panel superior **302** de la **FIG. 3B**) y/o modalidades de imagen de emisión (como se ilustra en el panel inferior **304** de la **FIG. 3B**).

Las imágenes de campo claro son imágenes de microscopía de transmisión donde la luz blanca de amplio espectro se coloca en un lado de la muestra montada en un chip y el objetivo de la cámara se coloca en el otro lado y la propia muestra filtra la luz para generar colores o imágenes de intensidad en escala de grises **1124**, similar a una ventana de vitral vista desde el interior en un día luminoso.

En algunas realizaciones, además o en lugar de la imagen de campo claro, se utiliza la imagen de emisión, tal como la imagen de fluorescencia. En los métodos de formación de imágenes por emisión, la muestra del chip se expone a la luz de una banda estrecha específica (primera banda de longitud de onda) y, a continuación, se mide la luz reemisida por la muestra a una longitud de onda ligeramente diferente (segunda banda de longitud de onda). Esta absorción y reemisión se debe a la presencia de un fluoróforo que es sensible a la excitación utilizada y puede ser una propiedad natural de la muestra o un agente al que se ha expuesto la muestra para preparar la obtención de imágenes. Por ejemplo, en un experimento de inmunofluorescencia, se añade a la muestra un anticuerpo que se une a una determinada proteína o clase de proteínas y que está marcado con un determinado fluoróforo. Cuando se hace esto, las ubicaciones de la muestra que incluyen la proteína o clase de proteínas emitirán la segunda banda de longitud de onda. De hecho, se pueden utilizar múltiples anticuerpos con múltiples fluoróforos para marcar múltiples proteínas en la muestra. Cada uno de estos fluoróforos requiere excitación con una longitud de onda de luz diferente y además emite una longitud de onda de luz única diferente. Para resolver espacialmente cada una de las diferentes longitudes de onda de luz emitidas, la muestra se somete a las diferentes longitudes de onda de luz que excitarán los múltiples fluoróforos de forma seriada y las imágenes para cada una de estas exposiciones a la luz se guarda como una imagen, así se genera una pluralidad de imágenes. Por ejemplo, la imagen se somete a una primera longitud de onda que excita un primer fluoróforo para que emita a una segunda longitud de onda y se toma una primera imagen de la muestra mientras que la muestra se expone a la primera longitud de onda. A continuación, se discontiúa la exposición de la muestra a la primera longitud de onda y se expone la muestra a una tercera longitud de onda (diferente de la primera longitud de onda) que excita un segundo fluoróforo a una cuarta longitud de onda (diferente de la segunda longitud de onda) y se toma una segunda imagen de la muestra mientras se expone la muestra a la tercera longitud de onda. Este proceso se repite para cada fluoróforo diferente de los fluoróforos múltiples (por ejemplo, dos o más fluoróforos, tres o más fluoróforos, cuatro o más fluoróforos, cinco o más fluoróforos). De este modo, se obtiene una serie de imágenes del tejido, cada una de las cuales representa la disposición espacial de algún parámetro diferente, como una proteína o clase de proteína en particular. En algunas realizaciones, se visualiza más de un fluoróforo al mismo tiempo. En este caso, se utiliza una combinación de longitudes de onda de excitación, cada una para uno de los fluoróforos, y se obtiene una única imagen.

En algunas realizaciones, cada una de las imágenes recogidas mediante imágenes de emisión se escala en gris. Para diferenciar dichas imágenes en escala de grises, en algunas realizaciones se asigna un color a cada una de las imágenes (tonos de rojo, tonos de azul, etc.) y se combinan en una imagen de color compuesta para su visualización. Estas imágenes de fluorescencia permiten el análisis espacial de la abundancia de proteínas (por ejemplo, proteómica espacial) en la muestra. En algunas realizaciones, dicha abundancia espacial se analiza por sí sola. En otras realizaciones, dicha abundancia espacial se analiza junto con la transcriptómica.

En algunas realizaciones en las que la muestra se analiza con transcriptómica, junto con las imágenes de campo claro y/o de emisión (por ejemplo, imágenes de fluorescencia), los analitos diana se liberan de la muestra y las sondas de captura que forman una matriz con código de barras espacial hibridan o se unen a los analitos diana liberados **303**. Opcionalmente, la muestra se puede retirar de la matriz **304** y las sondas de captura se pueden separar opcionalmente de la matriz **305**. A continuación, la muestra y la matriz se someten a un proceso de hibridación. Opcionalmente, la muestra y la matriz se visualizan una segunda vez en ambas modalidades **305B** mientras que los analitos se transcriben inversamente en ADNc, y se prepara una biblioteca de amplicones **306** y se secuencia **307**. A continuación, los dos conjuntos de imágenes se sombrean y se secuencian. Los dos conjuntos de imágenes se superponen espacialmente para correlacionar la información de la muestra identificada espacialmente **308**. Cuando la muestra y la matriz no se visualizan por segunda vez, **305B**, se suministra en su lugar un archivo de coordenadas puntuales. El archivo de coordenadas de puntos sustituye a la segunda etapa de formación de imágenes **305B**. Además, la preparación de la biblioteca de amplicones **306** se puede realizar con un adaptador de PCR único y secuenciarse **307**.

La **FIG. 4** muestra otro ejemplo de flujo de trabajo que utiliza una matriz marcada espacialmente en un sustrato (por ejemplo, un chip), donde las sondas de captura codificadas espacialmente se agrupan en áreas denominadas puntos de captura. Las sondas de captura marcadas espacialmente pueden incluir un dominio de escisión, una o más secuencias funcionales, un código de barras espacial, un identificador molecular único y un dominio de captura. Las sondas de captura marcadas espacialmente también pueden incluir una modificación en el extremo 5' para su unión reversible al sustrato. La matriz de código de barra espacial se pone en contacto con una muestra **401**, y la muestra se permeabiliza mediante la aplicación de reactivos de permeabilización **402**. Los reactivos de permeabilización se

5 pueden administrar mediante la colocación del ensamblaje de la matriz/muestra dentro de una solución a granel. Alternativamente, los reactivos de permeabilización se pueden administrar a la muestra a través de un medio resistente a la difusión y/o una barrera física tal como una tapa, donde la muestra se intercala entre el medio resistente a la difusión y/o la barrera y el sustrato que contiene la matriz. Los analitos migran hacia la matriz de captura con código de barras espacial utilizando cualquiera de las técnicas descriptas en la presente.

10 Por ejemplo, la migración de analitos se puede producir usando por ejemplo, una tapa de medio resistente a la difusión y migración pasiva. A modo de otro ejemplo, la migración de analitos puede ser migración activa, utilizando un sistema de transferencia electroforética. Una vez que los analitos están cerca de las sondas de captura codificadas espacialmente, las sondas de captura se pueden hibridar o unir a un analito diana **403**. Opcionalmente, la muestra 15 puede retirarse de la matriz **404**. Opcionalmente, la muestra puede retirarse de la matriz **404**.

15 Las sondas de captura se pueden escindir opcionalmente de la matriz **405**, y los analitos capturados se pueden codificar espacialmente realizando una reacción de ADNc de primera cadena de transcriptasa inversa. Una reacción de ADNc de primera cadena se puede realizar opcionalmente utilizando oligonucleótidos de cambio de molde. Por ejemplo, un oligonucleótido de cambio de molde se puede hibridarse a una cola poli(C) añadida a un extremo 3' del ADNc por una enzima transcriptasa inversa. El molde de ARNm original y el oligonucleótido de cambio de molde entonces se puede desnaturalizar del ADNc y la sonda de captura codificada espacialmente entonces se puede hibridar con el ADNc y generar un complemento del ADNc. A continuación, el ADNc de la primera cadena se puede purificar y recolectar para las etapas de amplificación corriente abajo. El ADNc de la primera cadena se puede amplificar opcionalmente mediante PCR **406**, donde los cebadores directo e inverso flanquean las regiones de interés 20 con código de barras espacial y el analito diana, lo que genera una biblioteca asociada con un código de barras espacial particular **407**. En algunas realizaciones, el ADNc comprende una secuencia cebadora de secuenciación por síntesis (SBS). En algunas realizaciones, la preparación de la biblioteca se puede cuantificar y/o someter a control de calidad para verificar el éxito de las etapas de preparación de la biblioteca **408**. Los amplicones de la biblioteca se secuencian y analizan para decodificar la información espacial **407**, con una etapa adicional de control de calidad (CC) 25 de la biblioteca **408**.

30 Utilizando los métodos, composiciones, sistemas, kits y dispositivos descriptos en la presente, los transcriptos de ARN presentes en muestras biológicas (por ejemplo, muestras de tejido) se pueden utilizar para el análisis espacial del transcriptoma. En particular, en algunos casos, los oligonucleótidos con código de barras se pueden configurar para cebar, replicar y, en consecuencia, producir productos de extensión con código de barras a partir de un molde de ARN, o sus derivados. Por ejemplo, en algunos casos, los oligonucleótidos con código de barras pueden incluir secuencias 35 de cebado específicas de ARNm, por ejemplo, segmentos de cebador poli-T que permiten el cebado y la replicación de ARNm en una reacción de transcripción inversa u otras secuencias de cebado dirigidas. Alternativa o adicionalmente, el cebado de ARN aleatorio se puede llevar a cabo utilizando segmentos de cebador N-mer aleatorios de los oligonucleótidos con código de barras. Las transcriptas inversas (RT) pueden utilizar un molde de ARN y un 40 cebador complementario al extremo 3' del molde ARN para dirigir la síntesis de la primera cadena de ADN complementario (ADNc). Se pueden usar muchas RT en estas reacciones de transcripción inversa, que incluyen, por ejemplo, transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV), virus de la leucemia murina de Moloney (M-MuLV o MMLV) y otras variantes de los mismos. Algunas transcriptas inversas recombinantes de M-MuLV, como, 45 por ejemplo, la transcriptasa inversa, PROTOSCRIPT® II, puede tener una actividad ARNasa H reducida y una termoestabilidad aumentada en comparación con su homólogo de tipo salvaje, y proporcionar una especificidad más alta, un mayor rendimiento de ADNc y más productos de ADNc de longitud completa con hasta 12 kilobases (kb) de longitud. En algunas realizaciones, la enzima transcriptasa inversa es una enzima transcriptasa inversa mutante tal como, pero sin limitación la transcriptasa inversa mutante de MMLV. En otra realización, la transcriptasa inversa es una transcriptasa inversa MMLV mutante tal como, pero sin limitación una o más variantes descriptas en la Publicación de Patente U.S. N.º 20180312822 y la Solicitud de Patente Provisional U.S. N.º 62/946,885 presentada el 11 de diciembre de 2019.

50 La FIG. 5 muestra un ejemplo de flujo de trabajo en el que la muestra se retira de la matriz codificada espacialmente y las sondas de captura codificadas espacialmente se retiran de la matriz para la amplificación del analito con código de barras y la preparación de la biblioteca. Otra realización incluye la síntesis de la primera cadena utilizando oligonucleótidos de cambio de molde en la matriz codificada espacialmente sin escindir las sondas de captura. En esta 55 realización, la preparación de la muestra **501** y la permeabilización **502** se llevan a cabo como se describe en la presente. Una vez que las sondas de captura capturan el analito diana, la primera cadena de ADNc creado por el cambio de molde y la transcriptasa inversa **503** se desnaturaliza y la segunda cadena se extiende **504**. La segunda cadena de ADNc se desnaturaliza a partir de la primera cadena de ADNc, se neutraliza y se transfiere a un tubo **505**. La cuantificación y amplificación del ADNc se pueden realizar mediante las técnicas estándar descriptas en la presente. A continuación, el ADNc se puede someterse a la preparación de la biblioteca **506** y la indexación **507**, incluidas las etapas de fragmentación, reparación de extremos y a-tailing, y PCR de indexación. La biblioteca también puede someterse opcionalmente a pruebas de control de calidad (QC) **508**.

En un ejemplo no limitativo de los flujos de trabajo descriptos anteriormente, una muestra (por ejemplo, una sección de tejido) se puede fijar con metanol, teñir con hematoxilina y eosina y obtener una imagen. Opcionalmente, la muestra se puede decolorar antes de la permeabilización. Las imágenes se pueden utilizar para mapear patrones espaciales de abundancia de analitos (por ejemplo, expresión génica) en la muestra. Se puede utilizar una enzima de

- 5 permeabilización para permeabilizar la muestra directamente en el portaobjetos. Analitos (por ejemplo, ARNm poliadenilado) liberados de las células superpuestas de la muestra pueden ser capturados por sondas de captura dentro de un área de captura en un sustrato. Los reactivos de transcripción inversa (RT) se pueden añadir a las muestras permeabilizadas. La incubación con los reactivos de RT puede producir ADNc de longitud completa codificado espacialmente a partir de los analitos capturados (por ejemplo, ARNm poliadenilado). Los reactivos de
10 segunda cadena (por ejemplo, cebadores de segunda cadena, enzimas) se pueden añadir a la muestra en el portaobjetos para iniciar la síntesis de segunda cadena. El ADNc resultante se puede desnaturalizar del molde de la sonda de captura y transferir (por ejemplo, a un tubo limpio) para la amplificación y/o la construcción de la biblioteca. El ADNc de longitud completa codificado espacialmente se puede amplificar mediante PCR antes de la construcción
15 de la biblioteca. A continuación, el ADNc se puede fragmentar enzimáticamente y seleccionar por tamaño para optimizar el tamaño del amplicón de ADNc. P5, P7, i7 e i5 se pueden utilizar como índices de muestra, y TruSeq Read 2 se puede añadir mediante reparación de extremos, A-tailing, ligación del adaptador y PCR. A continuación, los
20 fragmentos de ADNc se pueden secuenciar mediante secuenciación de extremos pareados utilizando TruSeq Read 1 y TruSeq Read 2 como sitios de cebadores de secuenciación. Ver, Illumina, Indexed Sequencing view Guides, febrero de 2018, Documento 15057455v04; y Illumina Adapter Sequences, mayo de 2019, Documento #1000000002694v11, para obtener información sobre P5, P7, i7, i5, TruSeq Read 2, secuenciación indexada y otros reactivos descriptos en la presente.

En algunas realizaciones, la realización del análisis correlativo de los datos producidos por este flujo de trabajo, y otros flujos de trabajo descriptos en la presente, puede producir una correlación mayor de 95% de los genes expresados en dos áreas de captura (por ejemplo, 95% o más, 96% o más, 97% o más, 98% o más, o 99% o más). Al realizar los flujos de trabajo descriptos utilizando secuenciación de ARN de célula única de núcleo, en algunas realizaciones, el análisis correlativo de los datos puede producir una correlación mayor de 90% (por ejemplo, mayor de 90%, 91%,
25 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de los genes expresados en dos áreas de captura.

En algunas realizaciones, después de generar el ADNc (por ejemplo, mediante transcripción inversa), el ADNc se puede amplificar directamente en la superficie del sustrato. La generación de múltiples copias del ADNc (por ejemplo, ADNc sintetizado a partir de analitos capturados) mediante amplificación directamente sobre la superficie del sustrato puede mejorar la complejidad final de la biblioteca de secuenciación. Así, en algunas realizaciones, el ADNc se puede amplificar directamente en la superficie del sustrato mediante amplificación isotérmica del ácido nucleico. En algunas realizaciones, la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos puede amplificar ARN o ADN
30

En algunas realizaciones, la amplificación isotérmica puede ser más rápida que una reacción de PCR estándar. En algunas realizaciones, la amplificación isotérmica puede ser amplificación lineal (por ejemplo, asimétrica con un único cebador), o amplificación exponencial (por ejemplo, con dos cebadores). En algunas realizaciones, la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos se puede realizar mediante un cebador oligonucleótido de cambio de molde. En algunas realizaciones, el oligonucleótido de cambio de molde añade una secuencia común en el extremo 5' del ARN que se está transcribiendo inversamente. Por ejemplo, después de que una sonda de captura interactúe con un analito (por ejemplo, ARNm) y se realice la transcripción inversa, de modo que se añaden nucleótidos adicionales al extremo del ADNc, lo que crea una proyección 3' como se describe en la presente. En algunas realizaciones, un oligonucleótido de cambio de molde se hibrida con nucleótidos polí(C) no de molde añadidos por una transcriptasa inversa para continuar la replicación hasta el extremo 5' del oligonucleótido de cambio de molde, de este modo se genera ADNc de longitud completa lista para su posterior amplificación. En algunas realizaciones, el oligonucleótido de cambio de molde añade una secuencia 5' común al ADNc de longitud completa que se utiliza para la amplificación del ADNc (por ejemplo, un complemento inverso del oligonucleótido de cambio de molde).

En algunas realizaciones, una vez generada una molécula de ADNc de longitud completa, el oligonucleótido de cambio de molde puede servir como cebador en una reacción de amplificación de ADNc (por ejemplo, con una ADN polimerasa). En algunas realizaciones, el ADNc de cadena doble (por ejemplo, primera cadena de ADNc y segunda cadena de ADNc de complemento inverso) se puede amplificarse mediante amplificación isotérmica con una helicasa o recombinasa, seguida de una ADN polimerasa de desplazamiento de cadena. La ADN polimerasa de desplazamiento de cadena puede generar una segunda cadena desplazada que genera un producto amplificado.
50

En cualquiera de los métodos de amplificación isotérmica descriptos en la presente, el intercambio de código de barras (por ejemplo, código de barras espacial) puede ocurrir después del primer ciclo de amplificación donde hay sondas de captura no utilizadas en la superficie del sustrato. En algunas realizaciones, el extremo 3' OH libre de las sondas de captura no utilizadas se puede bloquear mediante cualquier método de bloqueo 3'OH adecuado. En algunas realizaciones, el 3'OH se puede bloquear mediante ligación con horquilla.
55

La amplificación isotérmica del ácido nucleico se puede utilizar además de, o como alternativa a, las reacciones de PCR estándar (por ejemplo, una reacción de PCR que requiere calentamiento a aproximadamente 95 °C para desnaturalizar el ADN de doble cadena). La amplificación isotérmica del ácido nucleico generalmente no requiere el uso de un termociclador, sin embargo, en algunas realizaciones, la amplificación isotérmica se puede realizar en un termociclador. En algunas realizaciones, la amplificación isotérmica puede realizarse entre 35 °C y 75 °C aproximadamente. En algunas realizaciones, la amplificación isotérmica se puede realizar desde aproximadamente 40 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 65 °C, o aproximadamente 70 °C o en cualquier punto intermedio de acuerdo con la polimerasa y las enzimas auxiliares utilizadas.

- 5 Las técnicas de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos son conocidas en la materia, y se pueden utilizar solas o en combinación con cualquiera de los métodos espaciales descriptos en la presente. Por ejemplo, los ejemplos no limitantes de técnicas de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos adecuadas incluyen la amplificación mediada por transcripción, amplificación basada en secuencia de ácido nucleico, amplificación mediada por señal de tecnología de ARN, amplificación por desplazamiento de cadena, amplificación por círculo rodante, amplificación isotérmica mediada por bucle de ADN (LAMP), amplificación isotérmica por desplazamiento múltiple, amplificación por recombinasa polimerasa, amplificación dependiente de helicasa, amplificación isotérmica de cebador único y la amplificación circular dependiente de helicasa (Ver, por ejemplo, Gill y Ghaemi, Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review, Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids, 27(3), 224-43, doi: 10.1080/15257770701845204(2008)).
- 10 En algunas realizaciones, la amplificación isotérmica de ácido nucleico es una amplificación de ácido nucleico dependiente de helicasa. La amplificación isotérmica de ácido nucleico dependiente de helicasa se describe en Vincent et. al., 2004, Helicase dependent isothermal DNA amplification, EMBO Rep., 795-800 y Patente U.S. Nº 7.282.328. Además, la amplificación de ácido nucleico dependiente de helicasa en un sustrato (por ejemplo, en chip) se describe en Andresen et. al., 2009, Helicase-dependent amplification: use in OnChip amplification and potential for point-of-care diagnostics, Expert Rev Mol Diagn. 9, 645-650, doi: 10.1586/erm,09,46. En algunas realizaciones, la amplificación isotérmica de ácido nucleico es la amplificación de ácido nucleico por recombinasa polimerasa. La amplificación de ácido nucleico con recombinasa polimerasa se describe en Piepenburg y otros, 2006, DNA Detection Using Recombinant Proteins, PLoS Biol. 4, 7 e204 y Li y otros, 2019, Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification, Analyst 144, 31-67, doi: 10.1039/C8AN01621F (2019).
- 15 20 En algunas realizaciones, la amplificación isotérmica de ácido nucleico es una amplificación de ácido nucleico dependiente de helicasa. La amplificación isotérmica de ácido nucleico dependiente de helicasa se describe en Vincent et. al., 2004, Helicase dependent isothermal DNA amplification, EMBO Rep., 795-800 y Patente U.S. Nº 7.282.328. Además, la amplificación de ácido nucleico dependiente de helicasa en un sustrato (por ejemplo, en chip) se describe en Andresen et. al., 2009, Helicase-dependent amplification: use in OnChip amplification and potential for point-of-care diagnostics, Expert Rev Mol Diagn. 9, 645-650, doi: 10.1586/erm,09,46. En algunas realizaciones, la amplificación isotérmica de ácido nucleico es la amplificación de ácido nucleico por recombinasa polimerasa. La amplificación de ácido nucleico con recombinasa polimerasa se describe en Piepenburg y otros, 2006, DNA Detection Using Recombinant Proteins, PLoS Biol. 4, 7 e204 y Li y otros, 2019, Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification, Analyst 144, 31-67, doi: 10.1039/C8AN01621F (2019).
- 25 25 Generalmente, las técnicas de amplificación isotérmica utilizan reactivos PCR estándar (por ejemplo, buffer, dNTPs, etc.) conocidos en la técnica. Algunas técnicas de amplificación isotérmica pueden requerir reactivos adicionales. Por ejemplo, la amplificación del ácido nucleico dependiente de la helicasa utiliza una proteína de unión de cadena única y una proteína accesoria. En otro ejemplo, la amplificación de ácido nucleico por recombinasa polimerasa utiliza recombinasa (por ejemplo, T4 UvsX), factor de carga de recombinasa (por ejemplo, TF UvsY), proteína de unión de cadena única (por ejemplo, T4 gp32), agente de aglomeración (por ejemplo, PEG-35K) y ATP.
- 30 35

Después de la amplificación isotérmica de ácido nucleico del ADNc de longitud completa descrito por cualquiera de los métodos de la presente, los ADNc amplificados isotérmicamente (por ejemplo, de cadena única o cadena doble) se pueden recuperar del sustrato, y opcionalmente seguirse por amplificación con PCR de ADNc típica en tubos de microcentrifuga. A continuación, la muestra se puede utilizar con cualquiera de los métodos espaciales descriptos en la presente.

Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

En algunas realizaciones, los protocolos de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica (técnicas de tinción directa e indirecta) se llevan a cabo como parte de, o además de, los ejemplos de flujos de trabajo espaciales presentados aquí. Por ejemplo, las secciones de tejido se pueden fijar de acuerdo con los métodos descriptos en la presente. La muestra biológica se puede transferir a una matriz (por ejemplo, una matriz de sondas de captura), donde los analitos (por ejemplo, proteínas) se prueban utilizando protocolos de inmunofluorescencia. Por ejemplo, la muestra se puede rehidratar, bloquear y permeabilizar (3XSSC, BSA 2%, Triton X 0,1%, inhibidor de ARNasa 1 U/μl durante 10 minutos a 4 °C) antes de teñir con anticuerpos primarios fluorescentes (1:100 en 3XSSC, BSA 2%, Triton X 0,1%, inhibidor de ARNasa 1 U/μl durante 30 minutos a 4 °C). La muestra biológica se puede lavar, cubrirse (en glicerol + 1 U/μl de inhibidor de ARNasa), visualizar (por ejemplo, utilizando un microscopio confocal u otro aparato capaz de detección fluorescente), lavar y procesar de acuerdo con los flujos de trabajo de captura de analitos o espaciales descriptos en la presente.

Como se utiliza en la presente, un "buffer de recuperación de antígeno" puede mejorar la captura de anticuerpos en protocolos de IF/IHC. Un ejemplo de protocolo para la recuperación de antígeno puede ser precalentar el buffer de recuperación de antígeno (por ejemplo, a 95°C), sumergir la muestra biológica en el buffer de recuperación de antígeno

calentado durante un tiempo predeterminado y, a continuación, retirar la muestra biológica del buffer de recuperación de antígeno y lavar la muestra biológica.

En algunas realizaciones, la optimización de la permeabilización puede ser útil para identificar analitos intracelulares. La optimización de la permeabilización puede incluir la selección de agentes de permeabilización, la concentración de agentes de permeabilización y la duración de la permeabilización. La permeabilización tisular se trata en otra parte de la presente.

En algunas realizaciones, el bloqueo de una matriz y/o una muestra biológica en la preparación de la marcación de la muestra biológica disminuye la unión inespecífica de los anticuerpos a la matriz y/o la muestra biológica (disminuye el fondo). Algunas realizaciones proporcionan buffer de bloqueo/ soluciones de bloqueo que se pueden aplicar antes y/o durante la aplicación de la marca, donde el buffer bloqueante puede incluir un agente bloqueante, y opcionalmente un tensioactivo y/o una solución salina. En algunas realizaciones, un agente bloqueante puede ser albúmina sérica bovina (BSA), suero, gelatina (por ejemplo, gelatina de pescado), leche (por ejemplo, leche en polvo desgrasada), caseína, polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), o polivinilpirrolidona (PVP), reactivo de bloqueo de biotina, un reactivo de bloqueo de peroxidasa, levamisol, solución de Carnoy, glicina, lisina, borohidruro de sodio, azul cielo de pontamina, negro Sudán, azul tripán, agente de bloqueo FITC, y/o ácido acético. El buffer de bloqueo/solución de bloqueo se puede aplicar a la matriz y/o a la muestra biológica antes y/o durante la marcación (por ejemplo, aplicación de anticuerpos conjugados con fluoróforos) a la muestra biológica.

En algunas realizaciones, se pueden incluir etapas u optimizaciones adicionales en la realización de protocolos de IF/IHC junto con matrices espaciales. Se pueden incluir etapas u optimizaciones adicionales en la realización de flujos de trabajo de agentes de captura de analitos marcados espacialmente descritos en la presente.

En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente métodos para detectar espacialmente un analito (por ejemplo, detectar la ubicación de un analito, por ejemplo, un analito biológico) a partir de una muestra biológica (por ejemplo, un analito presente en una muestra biológica, tal como una sección de tejido) que incluyen: (a) proporcionar una muestra biológica de un sustrato; (b) teñir la muestra biológica del sustrato, *por ejemplo*, región de interés) para someter a análisis; (c) proporcionar una matriz que comprenda una o más pluralidades de sondas de captura de un sustrato; (d) poner en contacto la muestra biológica con la matriz, así se permite que una sonda de captura de la una o más pluralidades de sondas de captura capture el analito de interés; y (e) analizar el analito capturado, de este modo se detecta espacialmente el analito de interés. De acuerdo con los métodos descriptos en la presente, se puede utilizar cualquier variedad de técnicas de tinción y formación de imágenes descriptas en la presente o conocidas en la técnica.

En algunas realizaciones, la tinción incluye marcas ópticas como las descriptas en la presente, que incluyen, pero sin limitación, marcas detectables fluorescentes, radiactivas, quimioluminiscentes, calorimétricas o colorimétricas. En algunas realizaciones, la tinción incluye un anticuerpo fluorescente dirigido a un analito diana (por ejemplo, proteínas de la superficie celular o intracelulares) en la muestra biológica. En algunas realizaciones, la tinción incluye una tinción inmunohistoquímica dirigida a un analito diana (por ejemplo, proteínas de la superficie celular o intracelulares) en la muestra biológica. En algunas realizaciones, la tinción incluye una tinción química tal como hematoxilina y eosina (H&E) o ácido periódico de Schiff (PAS). En algunas realizaciones, puede transcurrir un tiempo significativo (por ejemplo, días, meses o años) entre la tinción y/o la obtención de imágenes de la muestra biológica y la realización del análisis. En algunas realizaciones, los reactivos para realizar el análisis se añaden a la muestra biológica antes, simultáneamente o después de que la matriz se ponga en contacto con la muestra biológica. En algunas realizaciones, la etapa (d) incluye colocar la matriz sobre la muestra biológica. En algunas realizaciones, la matriz es una matriz flexible en la que la pluralidad de características con código de barras espacial (por ejemplo, un sustrato con sondas de captura, una perla con sondas de captura) están unidas a un sustrato flexible. En algunas realizaciones, se toman medidas para lentificar una reacción (por ejemplo, enfriar la temperatura de la muestra biológica o utilizar enzimas que realizan preferentemente su función primaria a una temperatura más baja o más alta en comparación con su temperatura funcional óptima) antes de que la matriz entre en contacto con la muestra biológica. En algunas realizaciones, la etapa (e) se lleva a cabo sin poner la muestra biológica en contacto con la matriz. En algunas realizaciones, la etapa (e) se lleva a cabo después de que la muestra biológica ya no está en contacto con la matriz. En algunas realizaciones, la muestra biológica se marca con un agentes de captura de analito antes, simultáneamente o después de la tinción y/o la obtención de imágenes de la muestra biológica. En tales casos, puede transcurrir un tiempo considerable (por ejemplo, días, meses o años) entre la tinción y/o la obtención de imágenes y la realización del análisis. En algunas realizaciones, la matriz está adaptada para facilitar la migración del analito biológico desde la muestra biológica teñida y/o visualizada en la matriz (por ejemplo, utilizando cualquiera de los materiales o métodos descriptos en la presente). En algunas realizaciones, una muestra biológica se permeabiliza antes de entrar en contacto con una matriz. En algunas realizaciones, la tasa de permeabilización se lentifica antes de poner en contacto una muestra biológica con una matriz (por ejemplo, para limitar la difusión de analitos fuera de sus ubicaciones originales en la muestra biológica). En algunas realizaciones, la modulación de la tasa de permeabilización (por ejemplo, modulando la actividad de un reactivo de permeabilización) puede ocurrir mediante la modulación de una condición a la que se expone la muestra biológica (por ejemplo, modulación de la temperatura, el pH y/o la luz). En

algunas realizaciones, la modulación de la tasa de permeabilización incluye el uso de estímulos externos (por ejemplo, moléculas pequeñas, enzimas y/o reactivos activadores) para modular la tasa de permeabilización. Por ejemplo, se puede proporcionar un reactivo de permeabilización a una muestra biológica antes de que entre en contacto con una matriz, y dicho reactivo de permeabilización permanece inactivo hasta que se cambia una condición (por ejemplo, temperatura, pH y/o luz) o se proporciona un estímulo externo (por ejemplo, una molécula pequeña, una enzima y/o un reactivo activador).

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para detectar espacialmente un analito (por ejemplo, detectar la ubicación de un analito, por ejemplo, un analito biológico) de una muestra biológica (por ejemplo, presente en una muestra biológica tal como una sección de tejido) que incluyen: (a) proporcionar una muestra biológica de un sustrato; (b) teñir la muestra biológica del sustrato, obtener imágenes de la muestra biológica teñida, y seleccionar la muestra biológica o subsección de la muestra biológica (por ejemplo, una región de interés) para someterla a un análisis transcriptómico espacial; (c) proporcionar una matriz que comprenda una o más pluralidades de sondas de captura de un sustrato; (d) poner en contacto la muestra biológica con la matriz, lo que así permite que una sonda de captura de las una o más pluralidades de sondas de captura capture el analito biológico de interés; y (e) analizar el analito biológico capturado, de este modo se detecta espacialmente el analito biológico de interés.

(b) Sondas de captura

Una "sonda de captura", también denominada indistintamente en la presente "sonda", se refiere a cualquier molécula capaz de capturar (directa o indirectamente) y/o marcar un analito (por ejemplo, un analito de interés en una muestra). En algunas realizaciones, la sonda de captura es un ácido nucleico o un polipéptido. En algunas realizaciones, la sonda de captura es un conjugado (por ejemplo, un conjugado oligonucleótido-anticuerpo). En algunas realizaciones, la sonda de captura incluye un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un identificador molecular único (UMI)) y un dominio de captura.

La FIG. 6 es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de una sonda de captura, como se describe en la presente. Como se muestra, la sonda de captura 602 está opcionalmente acoplada a un punto de captura 601 por un dominio de escisión 603, tal como un ligador disulfuro.

La sonda de captura 602 puede incluir secuencias funcionales que son útiles para el procesamiento posterior, tal como la secuencia funcional 604, que puede incluir una secuencia de unión a celda de flujo específica del secuenciador, por ejemplo, una secuencia P5, así como la secuencia funcional 606, que puede incluir secuencias de cebador de secuenciación, por ejemplo, un sitio de unión a cebador R1, un sitio de unión a cebador R2. En algunas realizaciones, la secuencia 604 es una secuencia P7 y la secuencia 606 es un sitio de unión de cebador R2.

Se puede incluir un código de barras espacial 605 dentro de la sonda de captura para su uso en el código de barras del analito diana. Las secuencias funcionales se pueden seleccionar por compatibilidad con una variedad de diferentes sistemas de secuenciación, por ejemplo, 454 Sequencing, Ion Torrent Proton o PGM, instrumentos Illumina, PacBio, Oxford Nanopore, etc., y los requerimientos de los mismos. En algunas realizaciones, las secuencias funcionales se pueden seleccionar para su compatibilidad con sistemas de secuenciación no comercializados. Los ejemplos de tales sistemas y técnicas de secuenciación, para los que se pueden usar secuencias funcionales adecuadas, incluyen (pero no se limitan a) secuenciación Ion Torrent Proton o PGM, secuenciación Illumina, secuenciación PacBio SMRT y secuenciación Oxford Nanopore. Además, en algunas realizaciones las secuencias funcionales se pueden seleccionar para su compatibilidad con otros sistemas de secuenciación, que incluye los sistemas de secuenciación no comercializados.

En algunas realizaciones, el código de barras espacial 605, las secuencias funcionales 604 (por ejemplo, secuencia de unión a la celda de flujo) y 606 (por ejemplo, secuencias de cebadores de secuenciación) pueden ser comunes a todas las sondas fijadas a un punto de captura dado. El código de barras espacial también puede incluir un dominio de captura 607 para facilitar la captura de un analito diana.

(i) Dominio de captura

Como se ha analizado anteriormente, cada sonda de captura incluye al menos un dominio de captura 607. El "dominio de captura" es un oligonucleótido, un polipéptido, una molécula pequeña, o cualquier combinación de los mismos, que se une específicamente a un analito deseado. En algunas realizaciones, un dominio de captura se puede utilizar para capturar o detectar un analito deseado.

En algunas realizaciones, el dominio de captura es una secuencia de ácido nucleico funcional configurada para interactuar con uno o más analitos, tales como uno o más tipos diferentes de ácidos nucleicos (por ejemplo, moléculas de ARN y moléculas de ADN). En algunas realizaciones, la secuencia funcional de ácido nucleico puede incluir una secuencia N-mer (por ejemplo, una secuencia N-mer aleatoria), cuyas secuencias N-mer están configuradas para interactuar con una pluralidad de moléculas de ADN. En algunas realizaciones, la secuencia funcional puede incluir

una secuencia poli(T), cuyas secuencias poli(T) están configuradas para interactuar con moléculas de ARN mensajero (ARNm) a través de la cola poli(A) de un transcripto de ARNm. En algunas realizaciones, la secuencia funcional de ácido nucleico es la diana de unión de una proteína (por ejemplo, un factor de transcripción, una proteína de unión al ADN o una proteína de unión al ARN), donde el analito de interés es una proteína.

- 5 Las sondas de captura pueden incluir ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos, así como residuos de nucleótidos sintéticos capaces de participar en interacciones de pares de bases del tipo Watson-Crick o análogas. En algunas realizaciones, el dominio de captura es capaz de cebar una reacción de transcripción inversa para generar ADNc complementario a las moléculas de ARN capturadas. En algunas realizaciones, el dominio de captura de la sonda de captura puede cebar una reacción de extensión de ADN (polimerasa) para generar ADN que sea complementario a las moléculas de ADN capturadas. En algunas realizaciones, el dominio de captura puede moldear una reacción de ligación entre las moléculas de ADN capturadas y una sonda de superficie que está directa o indirectamente inmovilizada en el sustrato. En algunas realizaciones, el dominio de captura se puede ligar a una cadena de las moléculas de ADN capturadas. Por ejemplo, la ligasa SplintR junto con secuencias de ARN o ADN (por ejemplo, ARN degenerado) se puede utilizar para ligar un ADN o ARN de cadena única al dominio de captura. En algunas realizaciones, se pueden usar ligasas con actividad ligasa provocada por ARN, por ejemplo, SplintR ligasa, T4 ARN ligasa 2 o KOD ligasa, para ligar un ADN o ARN de cadena única al dominio de captura. En algunas realizaciones, un dominio de captura incluye un oligonucleótido puente. En algunas realizaciones, un dominio de captura captura un oligonucleótido puente.
- 10 En algunas realizaciones, el dominio de captura está ubicado en el extremo 3' de la sonda de captura e incluye un extremo 3' libre que se puede extender, por ejemplo, por polimerización dependiente del molde, para formar una sonda de captura extendida como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el dominio de captura incluye una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridarse con el ácido nucleico, por ejemplo, ARN u otro analito, presente en las células de la muestra de tejido en contacto con la matriz. En algunas realizaciones, el dominio de captura se puede seleccionar o diseñar para unirse selectiva o específicamente a un ácido nucleico diana. Por ejemplo, el dominio de captura se puede seleccionar o diseñar para capturar ARNm mediante hibridación con la cola poli(A) del ARNm. Así, en algunas realizaciones, el dominio de captura incluye un oligonucleótido de ADN poli(T), por ejemplo, una serie de residuos de desoxitimidina consecutivos unidos por enlaces fosfodiéster, que es capaz de hibridarse a la cola poli(A) del ARNm. En algunas realizaciones, el dominio de captura puede incluir nucleótidos que son funcional o estructuralmente análogos a una cola poli(T). Por ejemplo, un oligonucleótido poli-U o un oligonucleótido incluido de análogos de desoxitimidina. En algunas realizaciones, el dominio de captura incluye al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, el dominio de captura incluye al menos 25, 30, o 35 nucleótidos.
- 15 En algunas realizaciones, una sonda de captura incluye un dominio de captura que tiene una secuencia capaz de unirse a ARNm y/o ADN genómico. Por ejemplo, la sonda de captura puede incluir un dominio de captura que incluya una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia poli(T)) capaz de unirse a una cola poli(A) de un ARNm y/o a una secuencia homopolimérica poli(A) presente en el ADN genómico. En algunas realizaciones, se añade una secuencia homopolimérica a una molécula de ARNm a una molécula de ARNm o a una molécula de ADN genómico utilizando una enzima transferasa terminal para producir un analito que tenga una secuencia poli(A) o poli(T). Por ejemplo, se puede añadir una secuencia poli(A) a un analito (por ejemplo, un fragmento de ADN genómico) para que el analito pueda ser capturado por un dominio de captura poli(T).
- 20 En algunas realizaciones, se pueden utilizar secuencias aleatorias, por ejemplo, hexámeros aleatorios o secuencias similares, para formar todo o parte del dominio de captura. Por ejemplo, las secuencias aleatorias se pueden utilizar junto con secuencias de poli(T) (o análogos de poli(T)). En consecuencia, cuando un dominio de captura incluye un oligonucleótido de poli(T) (o un "análogo de poli(T)"), también puede incluir una secuencia de oligonucleótidos aleatoria (por ejemplo, una sonda de "secuencia aleatoria de poli(T)"). Por ejemplo, esto se puede ubicar a 5' o 3' de la secuencia poli(T), por ejemplo, en el extremo 3' del dominio de captura. La sonda de secuencia poli(T) aleatoria puede facilitar la captura de la cola poli(A) del ARNm. En algunas realizaciones, el dominio de captura puede ser una secuencia completamente aleatoria. En algunas realizaciones, se pueden utilizar dominios de captura degenerados.
- 25 En algunas realizaciones, una mezcla de dos o más sondas de captura forma una mezcla, donde el dominio de captura de una o más sondas de captura incluye una secuencia poli(T) y el dominio de captura de una o más sondas de captura incluye secuencias aleatorias. En algunas realizaciones, una mezcla de dos o más sondas de captura forma una mezcla en la que el dominio de captura de una o más sondas de captura incluye una secuencia tipo poli(T) y el dominio de captura de una o más sondas de captura incluye secuencias aleatorias. En algunas realizaciones, la mezcla de dos o más sondas de captura forman una mezcla en la que el dominio de captura de una o más sondas de captura incluye una secuencia poli(T)-aleatoria y el dominio de captura de una o más sondas de captura incluye secuencias aleatorias. En algunas realizaciones, las sondas con dominios de captura degenerados se pueden añadir a cualquiera de las combinaciones precedentes enumeradas en la presente. En algunas realizaciones, las sondas con
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

dominios de captura degenerados pueden sustituir a una de las sondas en cada uno de los pares descriptos en la presente.

El dominio de captura se puede basar en una secuencia genética particular o en una secuencia motivo particular o secuencia común/conservada, que está diseñada para capturar (es decir, un dominio de captura específico de secuencia). En consecuencia, en algunas realizaciones, el dominio de captura es capaz de unirse selectivamente a un subtipo o subconjunto deseado de ácido nucleico, por ejemplo un tipo particular de ARN, tal como ARNm, ARNr, ARNt, ARNrSr, ARNtm, ARNs, ARNsno, ARNSmY, ARNsca, ARNg, ARNasa P, ARNasa MRP, TERC, SL RNA, ARNa cis-NAT, ARNcr, ARNIInc, ARNmi, ARNpi, ARNsi, ARNsh, ARNtasi, ARNrasi 7SK, ARNe, ARNnc u otros tipos de ARN. En un ejemplo no limitante, el dominio de captura puede ser capaz de unirse selectivamente a un subconjunto deseado de ácidos ribonucleicos, por ejemplo, ARN del microbioma, tal como ARNr 16S.

En algunas realizaciones, un dominio de captura incluye un "ancla" o "secuencia de anclaje", que es una secuencia de nucleótidos diseñada para garantizar que el dominio de captura se hibride con el analito biológico deseado. En algunas realizaciones, una secuencia de anclaje incluye una secuencia de nucleótidos, que incluye un secuencia de 1-mer, 2-mer, 3-mer o más larga. En algunas realizaciones, la secuencia corta es aleatoria. Por ejemplo, se puede diseñar un dominio de captura que incluya una secuencia poli(T) para capturar un ARNm. En tales realizaciones, una secuencia de anclaje puede incluir un 3-mer aleatorio (por ejemplo, GGG) que ayuda a asegurar que el dominio de captura poli(T) se hibrida con un ARNm. En algunas realizaciones, una secuencia de anclaje puede ser VN, N o NN. Alternativamente, la secuencia se puede diseñar utilizando una secuencia específica de nucleótidos. En algunas realizaciones, la secuencia de anclaje se encuentra en el extremo 3' del dominio de captura. En algunas realizaciones, la secuencia de anclaje se encuentra en el extremo 5' del dominio de captura.

En algunas realizaciones, los dominios de captura de las sondas de captura se bloquean antes de poner en contacto la muestra con la matriz, y las sondas de bloqueo se utilizan cuando el ácido nucleico de la muestra se modifica antes de su captura en la matriz. En algunas realizaciones, la sonda de bloqueo se utiliza para bloquear o modificar el extremo 3' libre del dominio de captura. En algunas realizaciones, las sondas de bloqueo se pueden hibridar con las sondas de captura para enmascarar el extremo 3' libre del dominio de captura, por ejemplo, sondas de horquilla, sondas parcialmente dobles o secuencias complementarias. En algunas realizaciones, el extremo 3' libre del dominio de captura se puede bloquear mediante modificación química, por ejemplo, adición de un grupo azidometilo como un resto de terminación químicamente reversible, de forma que las sondas de captura no incluyan un extremo 3' libre. El bloqueo o la modificación de las sondas de captura, en particular en el extremo 3' libre del dominio de captura, antes de poner en contacto la muestra con la matriz, impide la modificación de las sondas de captura, por ejemplo, impide la adición de una cola de poli(A) al extremo 3' libre de las sondas de captura.

Los ejemplos no limitantes de modificaciones 3' incluyen dideoxi C-3' (3'-ddC), 3' dT invertido, 3' espaciador C3, 3'Amino, y 3' fosforilación. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de la muestra se puede modificar de manera que pueda ser capturado por el dominio de captura. Por ejemplo, se puede añadir una secuencia adaptadora (que incluye un dominio de unión capaz de unirse al dominio de captura de la sonda de captura) al extremo del ácido nucleico, por ejemplo, ADN genómico fragmentado. En algunas realizaciones, esto se obtiene mediante la ligación de la secuencia adaptadora o la extensión del ácido nucleico. En algunas realizaciones, se utiliza una enzima para incorporar nucleótidos adicionales en el extremo de la secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, una cola de poli(A). En algunas realizaciones, las sondas de captura se pueden enmascarar o modificar reversiblemente de manera que el dominio de captura de la sonda de captura no incluya un extremo 3' libre. En algunas realizaciones, el extremo 3' se elimina, modifica o hace inaccesible de modo que el dominio de captura no sea susceptible al proceso utilizado para modificar el ácido nucleico de la muestra, por ejemplo, ligación o extensión.

En algunas realizaciones, el dominio de captura de la sonda de captura se modifica para permitir la eliminación de cualquier modificación de la sonda de captura que se produzca durante la modificación de las moléculas de ácido nucleico de la muestra. En algunas realizaciones, las sondas de captura pueden incluir una secuencia adicional corriente abajo del dominio de captura, es decir, 3' al dominio de captura, a saber, un dominio de bloqueo.

En algunas realizaciones, el dominio de captura de la sonda de captura puede ser un dominio de ácido no nucleico. Los ejemplos de dominios de captura adecuados que no se basan exclusivamente en ácidos nucleicos incluyen, pero sin limitación, proteínas, péptidos, aptámeros, antígenos, anticuerpos y análogos moleculares que imitan la funcionalidad de cualquiera de los dominios de captura descriptos en la presente.

(ii) Dominio de escisión

Cada sonda de captura puede incluir opcionalmente al menos un dominio de escisión. El dominio de escisión representa la porción de la sonda que se utiliza para unir reversiblemente la sonda a un punto de captura de la matriz, como se describirá más adelante. Además, uno o más segmentos o regiones de la sonda de captura se pueden liberar opcionalmente del punto de captura de la matriz mediante la escisión del dominio de escisión. Como ejemplo, los

códigos de barras espaciales y/o los identificadores moleculares universales (UMIs) se pueden liberar mediante la escisión del dominio de escisión.

La FIG. 7 es un esquema que ilustra una sonda de captura escindible, donde la sonda de captura escindible puede entrar en una célula no permeabilizada y unirse a analitos diana dentro de la muestra. La sonda de captura 602 contiene un dominio de escisión 603, un péptido de penetración celular 703, una molécula informadora 704 y un enlace disulfuro (-S-S-). 705 representa todas las demás partes de una sonda de captura, por ejemplo un código de barras espacial y un dominio de captura. La sonda de captura 1801 contiene un dominio de escisión 702, un péptido de penetración celular 703, una molécula informadora 704 y un enlace disulfuro (-S-S-). 705 representa todas las demás partes de una sonda de captura, por ejemplo un código de barras espacial y un dominio de captura.

En algunas realizaciones, el dominio de escisión 603 que une la sonda de captura a un punto de captura es un enlace covalente capaz de ser escindido por una enzima. Se puede añadir una enzima para escindir el dominio de escisión 603, lo que produce la liberación de la sonda de captura del punto de captura. A modo de otro ejemplo, el calentamiento también puede producir la degradación del dominio de escisión y la liberación de la sonda de captura unida desde el punto de captura de la matriz. En algunas realizaciones, la radiación láser se utiliza para calentar y degradar los dominios de escisión de las sondas de captura en ubicaciones específicas. En algunas realizaciones, el dominio de escisión es un enlace químico fotosensible (por ejemplo, un enlace químico que se disocia cuando se expone a la luz, como la luz ultravioleta). En algunas realizaciones, el dominio de escisión puede ser un dominio de escisión ultrasónico. Por ejemplo, la escisión ultrasónica puede depender de la secuencia de nucleótidos, la longitud, el pH, la fuerza iónica, la temperatura y la frecuencia ultrasónica (por ejemplo, 22 kHz, 44 kHz) (Grokhovsky, 2006, Specificity of DNA cleavage by ultrasound, Molecular Biology, 40(2), 276-283).

Otros ejemplos de dominios de escisión 603 incluyen enlaces químicos lábiles tales como, pero sin limitación, enlaces éster (por ejemplo, escindibles con un ácido, una base o hidroxilamina), un enlace diol vecino (por ejemplo, escindible mediante peryodato sódico), un enlace Diels-Alder (por ejemplo, (por ejemplo, escindible mediante calor), un enlace sulfónico (por ejemplo, escindible mediante una base), un enlace silil éter (por ejemplo, escindible mediante un ácido), un enlace glicosídico (por ejemplo, escindible mediante una amilasa), un enlace peptídico (por ejemplo, escindible mediante una proteasa), o un enlace fosfodiéster (por ejemplo, escindible mediante una nucleasa (por ejemplo, ADNasa)).

En algunas realizaciones, el dominio de escisión incluye una secuencia que es reconocida por una o más enzimas capaces de escindir una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, capaz de romper el enlace fosfodiéster entre dos o más nucleótidos. Un enlace puede ser escindible mediante otras enzimas dirigidas a moléculas de ácido nucleico, tales como las enzimas de restricción (por ejemplo, endonucleasas de restricción). Por ejemplo, el dominio de escisión puede incluir una secuencia de reconocimiento de una endonucleasa de restricción (enzima de restricción). Las enzimas de restricción cortan el ADN de cadena doble o cadena única o en secuencias de nucleótidos de reconocimiento específicas conocidas como sitios de restricción. En algunas realizaciones, se utiliza una enzima de restricción de escisión poco frecuente, es decir, enzimas con un sitio de reconocimiento largo (al menos 8 pares de bases de longitud), para reducir la posibilidad de escisión en otras partes de la sonda de captura.

Los oligonucleótidos con enlaces químicos fotosensibles (por ejemplo, enlaces fotoescindibles) presentan varias ventajas. Se pueden escindir de forma eficaz y rápida (por ejemplo, en nanosegundos y milisegundos). En algunos casos, las fotomáscaras se pueden utilizar de forma que solo regiones específicas de la matriz se expongan a estímulos escindibles (por ejemplo, exposición a luz UV, exposición a luz, exposición a calor inducido por láser). Cuando se utiliza un ligador fotoescindible, la reacción de escisión es desencadenada por la luz, y puede ser altamente selectiva para el ligador y, en consecuencia, biortogonal. Típicamente, la absorción de longitud de onda para el ligador fotoescindible se localiza en el rango de UV cercano del espectro. En algunas realizaciones, λ_{max} del ligador fotoescindible es de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 400 nm, o de aproximadamente 310 nm a aproximadamente 365 nm. En algunas realizaciones, λ_{max} del ligador fotoescindible es aproximadamente 300 nm, aproximadamente 312 nm, aproximadamente 325 nm, aproximadamente 330 nm, aproximadamente 340 nm, aproximadamente 345 nm, aproximadamente 355 nm, aproximadamente 365 nm, o aproximadamente 400 nm. Los ejemplos no limitantes de un enlace químico fotosensible que se pueden usar en el dominio de escisión se describen en la publicación PCT n

50 202020176788A1 titulada "Profiling of biological analytes with spatially barcoded oligonucleotide arrays" cuyo contenido íntegro se incorpora en la presente por referencia.

En algunas realizaciones, el dominio de escisión incluye una secuencia poli-U que puede ser escindida por una mezcla de Uracil ADN glicosilasa (UDG) y la ADN glicosilasa-lisasa Endonucleasa VIII, conocida comercialmente como la enzima USER™. Las sondas de captura liberables pueden estar disponibles para la reacción una vez liberadas. Así, por ejemplo, una sonda de captura activable se puede activar mediante la liberación de las sondas de captura de un punto de captura.

- En algunas realizaciones, donde la sonda de captura está unida indirectamente a un sustrato, por ejemplo, a través de una sonda de superficie, el dominio de escisión incluye uno o más nucleótidos no apareados, de modo que las partes complementarias de la sonda de superficie y la sonda de captura no son 100% complementarias (por ejemplo, el número de pares de bases no apareadas puede ser uno, dos o tres pares de bases). Tal mal apareamiento es
- 5 reconocido, por ejemplo, por las enzimas MutY y T7 endonucleasa 1, lo que produce la escisión de la molécula de ácido nucleico en la posición del mal apareamiento. Como se describe en la presente, una "sonda de superficie" puede ser cualquier resto presente en la superficie del sustrato capaz de unirse a un agente (por ejemplo, una sonda de captura). En algunas realizaciones, la sonda de superficie es un oligonucleótido. En algunas realizaciones, la sonda de superficie forma parte de la sonda de captura.
- 10 En algunas realizaciones, cuando la sonda de captura está unida a un punto de captura indirectamente (por ejemplo, inmovilizada), por ejemplo, a través de una sonda de superficie, el dominio de escisión incluye un sitio o secuencia de reconocimiento de nicasa. Las nicasas son endonucleasas que escinden solo una cadena de un dúplex de ADN. Por lo tanto, el dominio de escisión puede incluir un sitio de reconocimiento de nicasa cerca del extremo 5' de la sonda de superficie (y/o del extremo 5' de la sonda de captura) de tal manera que la escisión de la sonda de superficie o de la sonda de captura desestabiliza el dúplex entre la sonda de superficie y la sonda de captura de este modo se libera la sonda de captura del punto de captura.
- 15 Las enzimas nicasas también se pueden usar en algunas realizaciones donde la sonda de captura está unida (por ejemplo, inmovilizada) al punto de captura directamente. Por ejemplo, el sustrato se puede poner en contacto con una molécula de ácido nucleico que hibrida al dominio de escisión de la sonda de captura para proporcionar o reconstituir un sitio de reconocimiento de nicasa, por ejemplo, una sonda auxiliar de escisión. Por lo tanto, el contacto con una enzima nicasa producirá la escisión del dominio de escisión, de este modo se libera la sonda de captura del punto de captura. Dichas sonda auxiliares de escisión también se pueden utilizar para proporcionar o reconstituir sitios de reconocimiento de escisión para otras enzimas de escisión, por ejemplo, enzimas de restricción.
- 20 Algunas nicasas introducen mellas de cadena simple solo en sitios particulares de una molécula de ADN, mediante la unión y reconocimiento de una secuencia de reconocimiento de nucleótidos particular. Se han descubierto varias nicasas naturales, de las que en la actualidad se han determinado las propiedades de reconocimiento de secuencias de al menos cuatro. Las nicasas se describen en la patente U.S Nº 6.867.028. En general, cualquier nicasa adecuada se puede utilizar para unirse a un sitio de reconocimiento de nicasa complementario de un dominio de escisión. Despues del uso, la enzima nicasa se puede eliminar del ensayo o inactivar despues de la liberación de las sondas de captura para evitar la escisión no deseada de las sondas de captura.
- 25 En algunas realizaciones, un dominio de escisión está ausente de la sonda de captura. Ejemplos de sustratos con sondas de captura unidas que carecen de un dominio de escisión se describen, por ejemplo, en Macosko *et al.*, 2015 Cell 161, 1202-1214.
- 30 Los ejemplos de dominios de captura adecuados que no se basan exclusivamente en ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, aptámeros, antígenos, anticuerpos y análogos moleculares que imitan la funcionalidad de cualquiera de los dominios de captura descriptos en la presente.
- 35 En algunas realizaciones, la región de la sonda de captura correspondiente al dominio de escisión se puede utilizar para alguna otra función. Por ejemplo, se puede incluir una región adicional para la extensión o amplificación del ácido nucleico en el lugar donde normalmente se puede ubicar el dominio de escisión. En tales realizaciones, la región puede complementar el dominio funcional o incluso existir como un dominio funcional adicional. En algunas realizaciones, el dominio de escisión está presente pero su uso es opcional.
- 40
- (iii) Dominio funcional**
- Cada sonda de captura puede incluir opcionalmente al menos un dominio funcional. Cada dominio funcional incluye típicamente una secuencia de nucleótidos funcional para una etapa analítica corriente abajo en el procedimiento de análisis global.
- 45 Se describen más detalles de dominios funcionales que se pueden usar junto con la presente descripción en la solicitud de patente de Estados Unidos nº 16/992,569 titulada "Systems and Methods for Using the Spatial Distribution of Haplotypes to Determine a Biological Condition," presentada el 13 de agosto de 2020, así como en la publicación PCT 202020176788A1 titulada "Profiling of biological analytes with spatially barcoded oligonucleotide arrays".
- 50 (iv) Código de barras espacial
- Como se ha analizado anteriormente, la sonda de captura puede incluir uno o más códigos de barras espaciales (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más). Un "código de barras espacial" es un segmento de ácido nucleico contiguo o dos o más segmentos de ácido nucleico no contiguos que funcionan como una marca o

identificador que transmite o es capaz de transmitir información espacial. En algunas realizaciones, una sonda de captura incluye un código de barras espacial que posee un aspecto espacial, donde el código de barras se asocia con una ubicación particular dentro de una matriz o una ubicación particular en un sustrato.

Un código de barras espacial puede ser parte de un analito, o independiente de un analito (por ejemplo, parte de la sonda de captura). Un código de barras espacial puede ser una etiqueta unida a un analito (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico) o una combinación de una etiqueta además de una característica endógena del analito (por ejemplo, tamaño del analito o secuencias finales). Un código de barras espacial puede ser único. En algunas realizaciones en las que el código de barras espacial es único, el código de barras espacial funciona a la vez como código de barras espacial y como identificador molecular único (UMI), asociado a una sonda de captura particular.

Los códigos de barras espaciales pueden tener distintos formatos. Por ejemplo, los códigos de barras espaciales pueden incluir códigos de barras espaciales de polinucleótidos; secuencias aleatorias de ácidos nucleicos y/o aminoácidos; y secuencias sintéticas de ácidos nucleicos y/o aminoácidos. En algunas realizaciones, un código de barras espacial se une a un analito de forma reversible o irreversible. En algunas realizaciones, un código de barras espacial se añade, por ejemplo, a un fragmento de una muestra de ADN o ARN antes, durante y/o después de la secuenciación de la muestra. En algunas realizaciones, un código de barras espacial permite la identificación y/o cuantificación de lecturas de secuenciación individuales. En algunas realizaciones, un código de barras espacial se utiliza como un código de barras fluorescente para el cual las sondas de oligonucleótidos marcadas fluorescentemente se hibridan al código de barras espacial.

En algunas realizaciones, el código de barras espacial es una secuencia de ácido nucleico que no se hibrida sustancialmente con moléculas de ácido nucleico analito en una muestra. En algunas realizaciones, el código de barras espacial tiene menos del 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, menos del 70%, 60%, 50%, o menos del 40% de identidad de secuencia) con las secuencias de ácido nucleico a través de una parte sustancial (por ejemplo, 80% o más) de las moléculas de ácido nucleico en la muestra.

Las secuencias del código de barras espacial pueden incluir de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 o más nucleótidos dentro de la secuencia de las sondas de captura. En algunas realizaciones, la longitud de una secuencia del código de barras espacial puede ser aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 nucleótidos o más larga. En algunas realizaciones, la longitud de una secuencia del código de barras espacial puede ser al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 nucleótidos o más larga. En algunas realizaciones, la longitud de una secuencia del código de barras espaciales es como máximo de aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 nucleótidos o más corta.

Estos nucleótidos pueden ser completamente contiguos, es decir, en una extensión única de nucleótidos adyacentes, o pueden estar separados en dos o más subsecuencias separadas que están separadas por 1 o más nucleótidos. Las subsecuencias del código de barras espacial separadas pueden ser de aproximadamente 4 a aproximadamente 16 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la subsecuencia del código de barras espacial puede ser de aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 nucleótidos o más larga. En algunas realizaciones, la subsecuencia del código de barras espacial puede ser de al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 nucleótidos o más larga. En algunas realizaciones, la subsecuencia del código de barras espacial puede ser como máximo de aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 nucleótidos o más corta.

En el caso de múltiples sondas de captura acopladas a un punto de captura de matriz común, las una o más secuencias de uno o más códigos de barras espaciales de las múltiples sondas de captura pueden incluir secuencias que sean iguales para todas las sondas de captura acopladas al punto de captura, y/o secuencias que sean diferentes en todas las sondas de captura acopladas al punto de captura.

La FIG. 8 es un diagrama esquemático de un ejemplo de punto de captura marcado espacialmente multiplexado. En la FIG. 8, el punto de captura **601** se puede acoplar una sonda de captura con código de barras espacial, donde las sondas con código de barras espacial de un punto de captura particular pueden poseer el mismo código de barras espacial, pero tener diferentes dominios de captura diseñados para asociar el código de barras espacial del punto de captura con más de un analito diana. Por ejemplo, un punto de captura puede estar acoplado a cuatro tipos diferentes de sondas de captura con código de barras espacial, y cada tipo de sonda de captura con código de barras espacial posee el código de barras espacial **605**. Un tipo de sonda de captura asociada con el punto de captura puede tener el mismo código de barras espacial, pero tener diferentes dominios de captura diseñados para asociar el código de barras espacial del punto de captura con más de un analito objetivo. Un tipo de sonda de captura asociada con el punto de captura incluye el código de barras espacial **605** en combinación con un dominio de captura de poli(T) **803**, diseñado para capturar analitos diana de ARNm. Un segundo tipo de sonda de captura asociada con el punto de captura incluye el código de barras espacial **605** en combinación con un dominio de captura de N-mer aleatorio **804** para el análisis de ADNg. Un tercer tipo de sonda de captura asociada con el punto de captura incluye el código de barras espacial **605** en combinación con un dominio de captura complementario al dominio de captura en un agente

de captura de analito **805**. Un cuarto tipo de sonda de captura asociada con el punto de captura incluye el código de barras espacial **605** en combinación con una sonda de captura que puede unirse específicamente a una molécula de ácido nucleico **806** que puede funcionar en un ensayo CRISPR (por ejemplo, CRISPR/Cas9). Aunque en la FIG. 8 solo se muestran cuatro constructos diferentes con código de barras de barras, los constructos con código de barras de

- 5 sonda de captura se pueden adaptar para el análisis de cualquier analito asociado a un ácido nucleico y capaz de unirse a dicha constructo. Por ejemplo, los esquemas mostrados en la FIG. 8 también se pueden utilizar para el análisis concurrente de otros analitos divulgados en la presente, que incluyen, pero sin limitación: (a) ARNm, un constructo de trazado de linaje, proteínas y metabolitos intracelulares o de superficie celular, y ADNg; (b) ARNm, proteínas y metabolitos intracelulares o de superficie celular de cromatina accesible (por ejemplo, ATAC-seq, ADNase-seq, y/o MNase-seq) y un agente de perturbación (por ejemplo, un ARNcr/ARNsg CRISPR, TALEN, nucleasa de dedos de cinc y/u oligonucleótido antisentido como se describe en la presente); (c) ARNm, proteínas de la superficie celular o intracelulares y/o metabolitos, un agente de marcación con código de barras (por ejemplo, los multímeros del MHC descriptos en la presente), y una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias (por ejemplo, receptor de células T). En algunas realizaciones, un agente de perturbación puede ser una molécula pequeña, un anticuerpo, un fármaco, un aptámero, un ARNmi, un ambiente físico (por ejemplo, un cambio de temperatura) o cualquier otro agente de perturbación conocido.

Las sondas de captura unidas a un punto de captura de la matriz único pueden incluir secuencias de códigos de barras espaciales idénticas (o comunes), secuencias de códigos de barras espaciales diferentes o una combinación de ambas. Las sondas de captura unidas a un punto de captura pueden incluir múltiples conjuntos de sondas de captura.

- 20 20 Las sondas de captura de un conjunto determinado pueden incluir secuencias de códigos de barras espaciales idénticas. Las secuencias de código de barras espaciales idénticas pueden ser diferentes de las secuencias de código de barras espaciales de las sondas de captura de otro conjunto.

La pluralidad de sondas de captura puede incluir secuencias de código de barras espaciales (por ejemplo, secuencias de código de barras de ácido nucleico) que están asociadas con ubicaciones específicas en una matriz espacial. Por ejemplo, una primera pluralidad de sondas de captura se puede asociar con una primera región, sobre la base de una secuencia de código de barras espacial común a las sondas de captura dentro de la primera región, y una segunda pluralidad de sondas de captura se puede asociar con una segunda región, sobre la base de una secuencia de código de barras espacial común a las sondas de captura dentro de la segunda región. La segunda región puede o no estar asociada con la primera región. Pluralidades adicionales de sondas de captura se pueden asociar con secuencias de código de barras espaciales comunes a las sondas de captura dentro de otras regiones. En algunas realizaciones, las secuencias de código de barras espaciales pueden ser las mismas en una pluralidad de moléculas de sonda de captura.

En algunas realizaciones, se incorporan múltiples códigos de barras espaciales diferentes en una única sonda de captura en matriz. Por ejemplo, un conjunto mixto pero conocido de secuencias de códigos de barras espaciales puede proporcionar una dirección o atribución más fuerte de los códigos de barras espaciales a un punto o ubicación determinada, lo que proporciona una confirmación duplicada o independiente de la identidad de la ubicación. En algunas realizaciones, los múltiples códigos de barras espaciales representan una especificidad cada vez mayor de la ubicación del punto particular de la matriz.

(v) Identificador molecular único

- 40 40 La sonda de captura puede incluir uno o más (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más) identificadores moleculares únicos (UMIs). Un identificador molecular único es un segmento de ácido nucleico contiguo o dos o más segmentos de ácido nucleico no contiguos que funcionan como marca o identificador para un analito particular, o para una sonda de captura que se une a un analito particular (por ejemplo, a través del dominio de captura).
- 45 45 Otros detalles de los UMIs que se pueden utilizar con los sistemas y métodos de la presente descripción se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N1º 16/992,569 titulada "Systems and Methods for Using the Spatial Distribution of Haplotypes to Determine a Biological Condition", presentada el 13 de agosto de 2020, y en la publicación PCT 202020176788A 1 titulada "Profiling of biological analytes with spatially barcoded oligonucleotide arrays".

Otros aspectos de las sondas de captura

- 50 50 Para las sondas de captura que están unidas a un punto de captura de matriz, un punto de captura de matriz individual puede incluir una o más sondas de captura. En algunas realizaciones, un punto de captura de matriz individual incluye cientos o miles de sondas de captura. En algunas realizaciones, las sondas de captura están asociadas a un punto de captura individual particular, donde el punto de captura individual contiene una sonda de captura que incluye un código de barras espacial único para una región o ubicación definida en la matriz.

En algunas realizaciones, un punto de captura particular contiene sondas de captura que incluyen más de un código de barras espacial (por ejemplo, una sonda de captura en un punto de captura particular puede incluir un código de barras espacial que es diferente del código de barras espacial incluido en otra sonda de captura en el mismo punto de captura particular, mientras que ambas sondas de captura incluyen un segundo código de barras espacial común),

- 5 donde cada código de barras espacial corresponde a una región o ubicación definida particular en la matriz. Por ejemplo, las secuencias de códigos de barras espaciales múltiples asociadas con un punto de captura particular en una matriz pueden proporcionar una dirección o atribución más fuerte a una ubicación dada al proporcionar una confirmación duplicada o independiente de la ubicación. En algunas realizaciones, los múltiples códigos de barras espaciales representan una especificidad creciente de la ubicación de un punto particular de la matriz. En un ejemplo no limitativo, un punto de matriz particular se puede codificar con dos códigos de barras espaciales diferentes, donde cada código de barras espacial identifica una región definida particular dentro de la matriz, y un punto de matriz que posee ambos códigos de barras espaciales identifica la subregión donde dos regiones definidas se superponen, por ejemplo, como la parte superpuesta de un diagrama de Venn.

En otro ejemplo no limitante, un punto particular de la matriz se puede codificar con tres códigos de barras espaciales diferentes, en los que el primer código de barras espacial identifica una primera región dentro de la matriz, el segundo código de barras espacial identifica una segunda región, en la que la segunda región es una subregión completamente dentro de la primera región, y el tercer código de barras espacial identifica una tercera región, en la que la tercera región es una subregión completamente dentro de la primera y la segunda subregiones.

una tercera región, donde la tercera región es una subregión enteramente dentro de la primera y segunda subregiones.

- 10 20 En algunas realizaciones, las sondas de captura unidas a los puntos de captura de la matriz se liberan de los puntos de captura de la matriz para la secuenciación. Alternativamente, en algunas realizaciones, las sondas de captura permanecen unidas a los puntos de captura de la matriz, y las sondas se secuencian mientras permanecen unidas a los puntos de captura de la matriz (por ejemplo, mediante secuenciación *in situ*). En secciones posteriores de la presente descripción se describen otros aspectos de la secuenciación de las sondas de captura.

- 25 30 En algunas realizaciones, un punto de captura de la matriz puede incluir diferentes tipos de sondas de captura unidas al punto de captura. Por ejemplo, el punto de captura de la matriz puede incluir un primer tipo de sonda de captura con un dominio de captura diseñado para unir a un tipo de analito, y un segundo tipo de sonda de captura con un dominio de captura diseñado para unirse a un segundo tipo de analito. En general, los puntos de captura de la matriz pueden incluir uno o más (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, ocho o más, diez o más, 12 o más, 15 o más, 20 o más, 30 o más, 50 o más) diferentes tipos de sondas de captura unidas a un punto de captura único de la matriz.

En algunas realizaciones, la sonda de captura es un ácido nucleico. En algunas realizaciones, la sonda de captura está unida al punto de captura de la matriz por medio de su extremo 5'. En algunas realizaciones, la sonda de captura incluye del extremo 5' a 3': uno o más códigos de barra (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI) y uno o más dominios de captura. En algunas realizaciones, la sonda de captura incluye del extremo 5' a 3': un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial o un UMI) y un dominio de captura. En algunas realizaciones, la sonda de captura incluye del extremo 5' a 3': un dominio de escisión, un dominio funcional, uno o más códigos de barra (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI), y un dominio de captura. En algunas realizaciones, la sonda de captura incluye del extremo 5' a 3': un dominio de escisión, un dominio funcional, uno o más códigos de barra (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI), un segundo dominio funcional, y un dominio de captura. En algunas realizaciones, la sonda de captura incluye del extremo 5' a 3': un dominio de escisión, un dominio funcional, un código de barras espacial, un UMI, y un dominio de captura. En algunas realizaciones, la sonda de captura no incluye un código de barras espacial. En algunas realizaciones, la sonda de captura no incluye un UMI. En algunas realizaciones, la sonda de captura incluye una secuencia para iniciar una reacción de secuenciación.

- 45 50 En algunas realizaciones, la sonda de captura se inmoviliza en punto de captura por medio de su extremo 3'. En algunas realizaciones, la sonda de captura incluye desde el extremo 3' a 5': uno o más códigos de barra (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI) y uno o más dominios de captura. En algunas realizaciones, la sonda de captura incluye desde el extremo 3' a 5': un código de barras (*por ejemplo*, un código de barras espacial o un UMI) y un dominio de captura. En algunas realizaciones, la sonda de captura incluye desde el extremo 3' a 5': un dominio de escisión, un dominio funcional, uno o más códigos de barra (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI), y un dominio de captura. En algunas realizaciones, la sonda de captura incluye desde el extremo 3' a 5': un dominio de escisión, un dominio funcional, un código de barras espacial, un UMI, y un dominio de captura.

En algunas realizaciones, una sonda de captura incluye un oligonucleótido sintetizado *in situ*. El oligonucleótido sintetizado *in situ* se puede unir a un sustrato, o a una característica de un sustrato. En algunas realizaciones, el oligonucleótido sintetizado *in situ* incluye una o más secuencias constantes, una o más de las cuales sirve como secuencia cebadora (por ejemplo, un cebador para amplificar ácidos nucleicos diana). El oligonucleótido sintetizado

in situ, por ejemplo, puede incluir una secuencia constante en el extremo 3' que está unida a un sustrato, o unida a una característica del sustrato. Adicional o alternativamente, el oligonucleótido sintetizado in situ puede incluir una secuencia constante en el extremo 5' libre. En algunas realizaciones, la una o más secuencias constantes pueden ser una secuencia escindible. En algunas realizaciones, el oligonucleótido sintetizado in situ incluye una secuencia de código de barras, por ejemplo, una secuencia de código de barras variable. El código de barras puede ser cualquiera de los códigos de barra descriptos en la presente. La longitud del código de barras puede ser de aproximadamente 8 a 16 nucleótidos (por ejemplo, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleótidos). La longitud del oligonucleótido sintetizado in situ puede ser menor de 100 nucleótidos (por ejemplo, inferior a 90, 80, 75, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25 o 20 nucleótidos). En algunos casos, la longitud del oligonucleótido sintetizado in situ es de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nucleótidos. Los ejemplos de oligonucleótidos sintetizados in situ son producidos por Affymetrix. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos sintetizados in situ se une un punto de captura de una matriz.

Se pueden ligar oligonucleótidos adicionales a un oligonucleótido sintetizado in situ para generar una sonda de captura. Por ejemplo, se puede usar un cebador complementario a una porción del oligonucleótido sintetizado in situ (por ejemplo, una secuencia constante en el oligonucleótido) para hibridar un oligonucleótido adicional y extenderlo (usando el oligonucleótido sintetizado in situ como molde, por ejemplo, una reacción de extensión de cebador) para formar un oligonucleótido de doble cadena y crear además una proyección 3'. En algunas realizaciones, la proyección 3' se puede crear mediante ligasas independientes del molde (por ejemplo, desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) o polí(A) polimerasa). Un oligonucleótido adicional que comprende uno o más dominios de captura se puede ligar a la proyección 3' utilizando una enzima adecuada (por ejemplo, una ligasa) y un oligonucleótido puente, para generar una sonda de captura. Así, en algunas realizaciones, una sonda de captura es un producto de dos o más secuencias de oligonucleótidos (por ejemplo, el oligonucleótido sintetizado in situ y el oligonucleótido adicional) que se ligan entre sí. En algunas realizaciones, una de las secuencias de oligonucleótidos es un oligonucleótido sintetizado in situ.

En algunas realizaciones, la sonda de captura incluye un oligonucleótido puente. Dos o más oligonucleótidos se pueden ligar entre sí usando un oligonucleótido puente y cualquier variedad de ligadas conocidas en la técnica o descriptas en la presente (por ejemplo, SplintR ligasa).

En algunas realizaciones, uno de los oligonucleótidos incluye: una secuencia constante (por ejemplo, una secuencia complementaria con una porción de un oligonucleótido puente), una secuencia degenerada y un dominio de captura (por ejemplo, como se describe en la presente). En algunas realizaciones, la sonda de captura se genera haciendo que una enzima añada polinucleótidos al final de una secuencia de oligonucleótidos. La sonda de captura puede incluir una secuencia degenerada, que puede funcionar como un identificador molecular único.

Una sonda de captura puede incluir una secuencia degenerada, que es una secuencia en la que algunas posiciones de una secuencia de nucleótidos contienen un número de bases posibles. Una secuencia degenerada puede ser una secuencia de nucleótidos degenerada que incluya aproximadamente o al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos. En algunas realizaciones, una secuencia de nucleótidos contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, o más posiciones degeneradas dentro de la secuencia de nucleótidos. En algunas realizaciones, la secuencia degenerada se utiliza como UMI.

En algunas realizaciones, una sonda de captura incluye una secuencia de reconocimiento de endonucleasas de restricción o una secuencia de nucleótidos escindibles por actividades enzimáticas específicas. Por ejemplo, las secuencias de uracilo se pueden escindir enzimáticamente de una secuencia de nucleótidos utilizando uracilo ADN glicosilasa (UDG) o reactivo de escisión específica de uracilo (USER). A modo de otro ejemplo, otras bases modificadas (por ejemplo, modificadas por metilación) pueden ser reconocidas y escindidas por endonucleasas específicas. Las sondas de captura se pueden someter a una escisión enzimática, que elimina el dominio de bloqueo y cualquiera de los nucleótidos adicionales que se añaden al extremo 3' de la sonda de captura durante el proceso de modificación. La eliminación del dominio de bloqueo revela y/o restaura el extremo 3' libre del dominio de captura de la sonda de captura. En algunas realizaciones, se pueden eliminar nucleótidos adicionales para revelar y/o restaurar el extremo 3' del dominio de captura de la sonda de captura.

En algunas realizaciones, se puede incorporar un dominio de bloqueo en la sonda de captura cuando se sintetiza, o después de su síntesis. El nucleótido terminal del dominio de captura es un nucleótido terminador reversible (por ejemplo, terminador reversible 3'-O-bloqueado y terminador reversible 3'-desbloqueado), y se puede incluir en la sonda de captura durante o después de la síntesis de la sonda.

(vii) Sondas de captura extendidas

Una "sonda de captura extendida" es una sonda de captura con una secuencia de ácido nucleico ampliada. Por ejemplo, cuando la sonda de captura incluye ácido nucleico, un "extremo 3' extendido" indica que se han añadido otros nucleótidos al nucleótido más 3' de la sonda de captura para extender la longitud de la sonda de captura, por ejemplo,

mediante reacciones de polimerización estándar utilizadas para extender moléculas de ácido nucleico, incluida la polimerización templada catalizada por una polimerasa (por ejemplo, una ADN polimerasa o una transcriptasa inversa).

En algunas realizaciones, la extensión de la sonda de captura incluye la generación de ADNc a partir del ARN capturado (hibridado). Este proceso implica la síntesis de una cadena complementaria del ácido nucleico hibridado, 5 por ejemplo, generando ADNc sobre la base del molde ARN capturado (el ARN hibridado con el dominio de captura de la sonda de captura). En consecuencia, en una etapa inicial de la extensión de la sonda de captura, por ejemplo, la generación de ADNc, el ácido nucleico capturado (hibridado), por ejemplo, el ARN, actúa como molde para la etapa de extensión, por ejemplo, la transcripción inversa.

En algunas realizaciones, la sonda de captura se extiende utilizando transcripción inversa. Por ejemplo, la transcripción 10 inversa incluye sintetizar ADNc (ADN complementario o de copia) a partir de ARN, por ejemplo, (ARN mensajero), utilizando una transcriptasa inversa. En algunas realizaciones, la transcripción inversa se lleva a cabo mientras el tejido está todavía en su lugar, así se genera una biblioteca de analitos, donde la biblioteca de analitos incluye los códigos de barras espaciales de las sondas de captura adyacentes. En algunas realizaciones, la sonda de captura se extiende utilizando una o más ADN polimerasas.

En algunas realizaciones, el dominio de captura de la sonda de captura incluye un cebador para producir la cadena 15 complementaria del ácido nucleico hibridado a la sonda de captura, por ejemplo, un cebador para ADN polimerasa y/o transcripción inversa. Las moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, ADN y/o ADNc, generadas por la reacción de extensión incorporan la secuencia de la sonda de captura. La extensión de la sonda de captura, por ejemplo, una reacción de ADN polimerasa y/o de transcripción inversa, se puede realizar utilizando una variedad de enzimas y 20 protocolos adecuados.

En algunas realizaciones, se genera una molécula de ADN de longitud completa, por ejemplo, ADNc. En algunas realizaciones, una molécula de ADN de "longitud completa" se refiere a la totalidad de la molécula de ácido nucleico capturada. Sin embargo, si el ácido nucleico, por ejemplo, el ARN, se degradó parcialmente en la muestra de tejido, entonces las moléculas de ácido nucleico capturadas no tendrán la misma longitud que el ARN inicial de la muestra 25 de tejido. En algunas realizaciones, se modifica el extremo 3' de las sondas extendidas, por ejemplo, moléculas de la primera cadena de ADNc. Por ejemplo, se puede ligar un ligador o adaptador al extremo 3' de las sondas extendidas. Esto se puede lograr utilizando enzimas de ligación de cadena única tal como la ARN ligasa T4 o Circligase™ (disponible en Lucigen, Middleton, WI). En algunas realizaciones, se utilizan oligonucleótidos de cambio de molde para extender el ADNc con el fin de generar un ADNc de longitud completa (o lo más parecido posible a un ADNc de 30 longitud completa). En algunas realizaciones, una sonda auxiliar de síntesis de segunda cadena (una molécula de ADN parcialmente de cadena doble capaz de hibridarse con el extremo 3' de la sonda de captura extendida), se puede ligar al extremo 3' de la molécula de sonda extendida, por ejemplo, primera cadena de ADNc utilizando una enzima de ligación de cadena doble tal como la ADN ligasa T4. Otras enzimas apropiadas para la etapa de ligación son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, Tth ADN ligasa, Taq ADN ligasa, Thermococcus sp. (cepa 9°N) ADN ligasa (9°N™ 35 ADN ligasa, New England Biolabs), Ampligase™ (disponible en Lucigen, Middleton, WI), y SplintR (disponible en New England Biolabs, Ipswich, MA). En algunas realizaciones, se incorpora una cola de polinucleótido, por ejemplo, una cola de poli(A), en el extremo 3' de las moléculas de sonda extendida. En algunas realizaciones, la cola de polinucleótido se incorpora utilizando una enzima transferasa terminal activa.

En algunas realizaciones, las sondas de captura extendidas de doble cadena se tratan para eliminar cualquier sonda 40 de captura no extendida antes de la amplificación y/o análisis, por ejemplo, análisis de secuencias. Esto se puede lograr mediante una variedad de métodos, por ejemplo, utilizando una enzima para degradar las sondas no extendidas, tal como una enzima exonucleasa, o columnas de purificación.

En algunas realizaciones, las sondas de captura extendidas se amplifican para producir cantidades que son suficientes 45 para el análisis, por ejemplo, mediante secuenciación de ADN. En algunas realizaciones, la primera cadena de las sondas de captura extendidas (por ejemplo, moléculas de ADN y/o ADNc) actúa como molde para la reacción de amplificación (por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa).

En algunas realizaciones, la reacción de amplificación incorpora un grupo de afinidad en la sonda de captura extendida 50 (por ejemplo, híbrido ARN-ADNc) utilizando un cebador que incluye el grupo de afinidad. En algunas realizaciones, el cebador incluye un grupo de afinidad y las sondas de captura extendidas incluyen el grupo de afinidad. El grupo de afinidad puede corresponder a cualquiera de los grupos de afinidad descriptos anteriormente.

En algunas realizaciones, las sondas de captura extendidas que incluyen el grupo de afinidad se pueden acoplar a 55 una característica de matriz específica para el grupo de afinidad. En algunas realizaciones, el sustrato puede incluir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, la característica de matriz incluye avidina o estreptavidina y el grupo de afinidad incluye biotina. En algunas realizaciones, la característica de matriz incluye maltosa y el grupo de afinidad incluye proteína de unión a maltosa. En algunas realizaciones, la característica de

matriz incluye proteína de unión a maltosa y el grupo de afinidad incluye maltosa. En algunas realizaciones, la amplificación de las sondas de captura extendidas puede funcionar para liberar las sondas extendidas de la característica de matriz, en la medida en que las copias de las sondas extendidas no están unidas a la característica de matriz.

- 5 En algunas realizaciones, la sonda de captura extendida o complemento o amplicón de la misma se libera de una característica de matriz. La etapa de liberar la sonda de captura extendida o complemento o amplicón de la misma de una característica de matriz se puede lograr de varias maneras. En algunas realizaciones, una sonda de captura extendida o un complemento de la misma se libera de la característica por escisión del ácido nucleico y/o por desnaturalización (por ejemplo, por calentamiento para desnaturalizar una molécula de cadena doble).
- 10 En algunas realizaciones, la sonda de captura extendida o el complemento o amplicón de la misma se libera de la característica de matriz por medios físicos. Por ejemplo, los métodos para inducir la liberación física incluyen la desnaturalización de moléculas de ácido nucleico de cadena doble. Otro método para liberar las sondas de captura extendida es utilizar una solución que interfiera en los enlaces de hidrógeno de las moléculas de cadena doble. En algunas realizaciones, la sonda de captura extendida se libera aplicando agua calentada tal como agua o buffer de al
- 15 menos 85 °C, por ejemplo, al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99 °C. En algunas realizaciones, se añade una solución que incluye sales, tensioactivos, etc. que también pueden desestabilizar la interacción entre las moléculas de ácido nucleico para liberar la sonda de captura extendida de la característica de matriz. En algunas realizaciones, se puede utilizar una solución de formamida para desestabilizar la interacción entre las moléculas de ácido nucleico y liberar la sonda de captura extendida de la matriz.

20 **(viii) Amplificación de las sondas de captura**

- En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para amplificar una sonda de captura fijada a una matriz espacial, donde la amplificación de la sonda de captura aumenta el número de dominios de captura y códigos de barras espaciales en la matriz espacial. En algunas realizaciones en las que se amplifica una sonda de captura, la amplificación se lleva a cabo mediante amplificación por círculo rodante. En algunas realizaciones, la sonda de captura para amplificar incluye secuencias (por ejemplo, secuencias de acoplamiento, secuencias funcionales y/o secuencias de cebadores) que permiten la amplificación por círculo rodante. En un ejemplo, la sonda de captura puede incluir una secuencia funcional capaz de unirse a un cebador utilizado para la amplificación. En otro ejemplo, la sonda de captura puede incluir una o más secuencias de acoplamiento (por ejemplo, una primera secuencia de acoplamiento y una segunda secuencia de acoplamiento) que se pueden hibridar con uno o más oligonucleótidos (por ejemplo, una sonda candado) utilizados para la amplificación por círculo rodante. En algunas realizaciones, se fijan sondas adicionales al sustrato, donde las sondas adicionales incluyen secuencias (por ejemplo, una secuencia de acoplamiento, una secuencia o secuencias funcionales, y/o una secuencia cebadora) que permiten la amplificación por círculo rodante. En algunas realizaciones, la matriz espacial se pone en contacto con un oligonucleótido (por ejemplo, una sonda candado). Como se utiliza en la presente, una "sonda candado" se refiere a un oligonucleótido que tiene, en sus extremos 5' y 3', secuencias que son complementarias a secuencias diana adyacentes o cercanas, (por ejemplo, secuencias de acoplamiento) en una sonda de captura. Después de la hibridación con las secuencias diana (por ejemplo, secuencias de acoplamiento), los dos extremos de la sonda candado se ponen en contacto o se extiende un extremo hasta que los dos extremos se ponen en contacto, lo que permite la circularización de la sonda de candado por ligación (por ejemplo, ligación usando cualquiera de los métodos descriptos en la presente). En algunas realizaciones, después de la circularización del oligonucleótido, se puede usar la amplificación por círculo rodante para amplificar el producto de ligación, que incluye al menos un dominio de captura y un código de barras espacial de la sonda de captura. En algunas realizaciones, la amplificación de la sonda de captura utilizando un oligonucleótido candado y la amplificación por círculo rodante aumenta el número de dominios de captura y el número de códigos de barras espaciales en la matriz espacial.
- 45 En algunas realizaciones, un método para aumentar la eficiencia de captura de una matriz espacial incluye la amplificación de toda o parte de una sonda de captura fijada a un sustrato. Por ejemplo, la amplificación de todas o parte de las sondas de captura fijadas al sustrato puede aumentar la eficacia de captura de la matriz espacial al aumentar el número de dominios de captura y códigos de barras espaciales. En algunas realizaciones, un método para determinar la ubicación de un analito en una muestra biológica incluye el uso de una matriz espacial que tiene una mayor eficiencia de captura (por ejemplo, una matriz espacial en la que una sonda de captura se ha amplificado como se describe en la presente). Por ejemplo, la eficacia de captura de una matriz espacial se puede aumentar mediante la amplificación de toda o parte de la sonda de captura antes del contacto con una muestra biológica. La amplificación da como resultado un mayor número de dominios de captura que permiten la captura de más analitos en comparación con una matriz espacial en la que la sonda de captura no se amplificó antes de entrar en contacto con la muestra biológica. En algunas realizaciones, un método para producir una matriz espacial que ha aumentado la eficiencia de captura incluye amplificar toda o parte de una sonda de captura. En algunas realizaciones, cuando se produce una matriz espacial que tiene una mayor eficacia de captura mediante la amplificación de toda o parte de una

sonda de captura, la amplificación aumenta el número de dominios de captura y el número de códigos de barras espaciales en la matriz espacial. En algunas realizaciones, un método para determinar la ubicación de una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura en una característica) en una matriz espacial incluye la amplificación de la totalidad o parte de una sonda de captura. Por ejemplo, la amplificación de la sonda de captura fijada al sustrato 5 puede aumentar el número de códigos de barras espaciales utilizados para la descodificación directa (por ejemplo, descodificación directa utilizando cualquiera de los métodos descriptos en la presente, que incluye, sin limitación, secuenciación *in situ*) de la ubicación de la sonda de captura.

(ix) Agentes de captura de analitos

La presente descripción también proporciona métodos y materiales para utilizar agentes de captura de analitos para 10 el perfilado espacial de analitos biológicos (por ejemplo, ARNm, ADN genómico, cromatina accesible y proteínas y/o metabolitos intracelulares o de superficie celular). Como se utiliza en la presente, un "agentes de captura de analito" (también denominado anteriormente en ocasiones agente de "marcación celular") se refiere a un agente que interactúa con un analito (por ejemplo, un analito en una muestra) y con una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura unida a un sustrato) para identificar el analito. En algunas realizaciones, el agente de captura del analito incluye un 15 resto de unión al analito y un dominio de código de barras del agente de captura.

La FIG. 37 es un diagrama esquemático de un ejemplo de agentes de captura de analito **4002** para capturar analitos. El agente de captura de analito comprende un resto de unión al analito **4004** y un dominio de código de barras de agente de captura **4008**. Un resto de unión al analito **4004** es una molécula capaz de unirse a un analito **4006** e interactuar con una sonda de captura con código de barras espacial. El resto de unión al analito se puede unir al analito **4006** con alta afinidad y/o con alta especificidad. El agente de captura de analito **4002** puede incluir un dominio 20 de código de barras de agente de captura **4008**, una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, un oligonucleótido), que puede hibridar con al menos una porción o la totalidad de un dominio de captura de una sonda de captura. El resto de unión al analito **4004** puede incluir un polipéptido y/o un aptámero (por ejemplo, una molécula de oligonucleótido o péptido que se une a un analito diana específico). El resto de unión al analito **4004** puede incluir un anticuerpo o 25 fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno).

Como se usa en la presente, el término "resto de unión al analito" se refiere a una molécula o resto capaz de unirse a un constituyente macromolecular (por ejemplo, un analito tal como un analito biológico). En algunas realizaciones de 30 cualquier de los métodos de perfilado espacial descriptos en la presente, el resto de unión al analito **4004** del agente de captura de analito **4002** que se une a un analito biológico **4006** puede incluir, pero no se limita a, un anticuerpo, o un fragmento de unión a epítopo del mismo, una molécula de unión a receptores de la superficie celular, un ligando 35 de receptor, una molécula pequeña, un anticuerpo biespecífico, un captador de células T biespecífico, un captador de receptores de células T, un captador de receptores de células B, un pro-cuerpo, un aptámero, un monocuerpo, un afímero, una darpina y un armazón proteico, o cualquier combinación de los mismos. El resto de unión al analito **4004** se puede unir al constituyente macromolecular (por ejemplo, analito) con alta afinidad y/o con alta especificidad. El resto de unión al analito **4004** puede incluir una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, un oligonucleótido), que puede 40 corresponder al menos a una parte o a la totalidad del resto de unión al analito. El resto de unión al analito **4004** puede incluir un polipéptido y/o un aptámero (por ejemplo, un polipéptido y/o un aptámero que se une a una molécula diana específica, por ejemplo, un analito). El resto de unión al analito **4004** puede incluir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento de unión al antígeno) que se une a un analito específico (por ejemplo, un polipéptido).

En algunas realizaciones, un resto de unión al analito **4004** de un agente de captura de analito **4002** incluye uno o más anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que incluyen el resto de unión al analito **4004** se pueden unir específicamente a un analito diana. En algunas realizaciones, el analito **4006** es una proteína (por ejemplo, una proteína en una superficie de la muestra biológica, tal 45 como una célula, o una proteína intracelular). En algunas realizaciones, una pluralidad de agentes de captura de analitos que comprenden una pluralidad de moléculas de unión a analitos se unen a una pluralidad de analitos presentes en una muestra biológica. En algunas realizaciones, la pluralidad de analitos incluye una única especie de analito (por ejemplo, una única especie de polipéptido). En algunas realizaciones en las que la pluralidad de analitos incluye una única especie de analito, los restos de unión al analito de la pluralidad de agentes de captura de analitos son las mismas. En algunas realizaciones en las que la pluralidad de analitos incluye una única especie de analito, los restos de unión al analito de la pluralidad de agentes de captura de analitos son diferentes (por ejemplo, los miembros 50 de la pluralidad de agentes de captura de analitos pueden tener dos o más restos de unión a analitos, donde cada una de las dos o más especies de restos de unión a analitos se une a una única especie de analito, por ejemplo, en diferentes sitios de unión). En algunas realizaciones, la pluralidad de analitos incluye múltiples especies diferentes de analitos (por ejemplo, múltiples especies diferentes de polipéptidos)..

Un agente de captura de analito **4002** puede incluir un resto de unión al analito **4004**. El resto de unión al analito **4004** puede ser un anticuerpo. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos que se pueden usar como restos de unión al

analito **4004** en un agente de captura de analito **4002** o que se puede usar en las aplicaciones descriptas en la presente incluyen cualquiera de las siguientes variaciones de los mismos f: A-ACT, A-AT, ACTH, Actina-Músculo Específico, Actina-Músculo Liso (SMA), AE1, AE1/AE3, AE3, AFP, AKT Fosfato, ALK-1, Amiloide A, Receptor de Andrógenos, Anexina A1, B72,3, BCA-225, BCL-1 (Ciclina D1), BCL-1/CD20, BCL-2, BCL-2/BCL-6, BCL-6, Ber-EP4, Beta-amiloide, 5 Beta-catenina, BG8 (Lewis Y), BOB- 1, CA 19,9, CA 125, CAIX, Calcitonina, Caldesmon, Calponina, Calretinina, CAM 5,2, CAM 5,2/AE1, CD1a, CD2, CD3 (M), CD3 (P), CD3/CD20, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD14, CD15, CD20, CD21, CD22, CD 23, CD25, CD30, CD31, CD33, CD34, CD35, CD43, CD45 (LCA), CD45RA, CD56, CD57, CD61, CD68, CD71, CD74, CD79a, CD99, CD117 (c-KIT), CD123, CD138, CD163, CDX-2, CDX-2/CK-7, CEA (M), CEA (P), Cromogranina A, Quimotripsina, CK-5, CK-5/6, CK-7, CK-7/TTF-1, CK-14, CK-17, CK-18, CK-19, CK-20, CK-HMW, 10 CK-LMW, CMV-IH, COLL-IV, COX-2, D2-40, DBA44, Desmina, DOG1, EBER-ISH, EBV (LMP1), E-Cadherina, EGFR, EMA, ER, ERCC1, Factor VIII (vWF), Factor XIIIa, Fascina, FLI-1, FHS, Galectin-3, Gastrina, GCDFP-15, GFAP, Glucagon, Glicoforina A, Glipicano- 3, Granzima B, Hormona del crecimiento (GH), GST, HAM 56, HMVE-1, HBP, HCAg, HCG, HemoglobinaA, HEP B CORE (HBcAg), HEP B SURF, (HBsAg), HepParl, HER2, Herpes I, Herpes II, HHV-8, HLA-DR, HMB 45, HPL, HPV-IHC, HPV (6/11)-ISH, HPV (16/18)-ISH, HPV (31/33)-ISH, HPVWSS-ISH, 15 HPVHigh-ISH, HPV Low-ISH, HPV High & Low-ISH, IgA, IgD, IgG, IgG4, IgM, Inhibina, Insulina, JC Virus-ISH, Kappa-ISH, KER PAN, Ki-67, Lambda-IHC, Lambda-ISH, LH, Lipasa, Lisozima (MURA), Mammaglobina, MART-1, MBP, M-Cell Triptasa, MEL-5, Melan-A,, Melan-A/Ki-67, Mesotelina, MÍTF, MLH-1, MOC-31, MPO, MSH-2, MSH-6, MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUM-1, MYO D1, Miogenina, Mioglobina, cadena pesada de Myosina, Napsina A, NB84a, NEW-N, NF, NK1-C3, NPM, NSE, OCT-2, OCT-3/4, OSCAR, p16, p21, p27/Kip1, p53, p57, p63, p120, P504S, Pan 20 Melanoma, PANC.POLY, Parvovirus B19, PAX-2, PAX-5, PAX-5/CD43, PAX=5/CD5, PAX-8, PC, PD1, Perforina, PGP 9,5, PLAP, PMS-2, PR, Prolactina, PSA, PSAP, PSMA, PTEN, PTH, PTS, RB, RCC, S6, S100, Serotonina, Somatostatina, Tensioactivo (SP-A), Sinaptofisina, Sinucleína, TAU, TCL-1, TCR beta, TdT, Trombomodulina, Tiroglobulina, TIA-1, TOXO, TRAP, TriView™ mama, TriView™ próstata, Tripsina, TS, TSH, TTF-1, Tirosinasa, Ubiquitina, Uroplakina, VEGF, Villina, Vimentina (VIM), VIP, VZV, WT1 (M) extremo N-terminal, WT1 (P) extremo C-Terminal, y ZAP-70.

Además, los ejemplos de anticuerpos, no limitantes, que se pueden usar como restos de unión al analito **4004** en un agente de captura de analito **4002** o que se pueden usar en las aplicaciones divulgadas en la presente incluyen cualquiera de los siguientes anticuerpos (y variaciones de los mismos) contra: proteínas de la superficie celular, proteínas intracelulares, quinasas (por ejemplo, la familia de quinasas AGC como AKT1, AKT2, PDK1, ROCK1, 30 ROCK2, SGK3), familia de quinasas AGC como AKT1, AKT2, PDK1, proteína quinasa C, ROCK1, ROCK2, SGK3), familia de quinasas CAMK (por ejemplo, AMPK1, AMPK2, CAMK, Chk1, Chk2, Zip), familia de quinasas CK1, familia de quinasas TK (por ejemplo, Abl2, AXL, CD167, CD246/ALK, c-Met, CSK, c-Src, EGFR, ErbB2 (HER2/neu), ErbB3, ErbB4, FAK, Fyn, LCK, Lyn, PKT7, Syk, Zap70), familia de quinasas STE (por ejemplo, ASK1, MAPK, MEK1, MEK2, 35 MEK3 MEK4, MEK5, PAK1, PAK2, PAK4, PAK6), familia de quinasas CMGC (por ejemplo, Cdk2, Cdk4, Cdk5, Cdk6, Cdk7, Cdk9, Erk1, GSK3, Jnk/MAPK8, Jnk2/MAPK9, JNK3/MAPK1 O, p38/MAPK), y la familia de quinasas TKL (por ejemplo, ALK1, ILK1, IRAK1, IRAK2, IRAK3, IRAK4, LIMK1, LIMK2, M3K11, RAF1, RIP1, RIP3, VEGFR1, VEGFR2, 40 VEGFR3), Aurora A quinasa, Aurora B quinasa, IKK, quinasa tipo Nemoa, PINK, PLK3, ULK2, WEE1, factores de transcripción (por ejemplo, FOXP3, ATF3, BACH1, EGR, ELF3, FOXA1, FOXA2, FOXO1, GATA), receptores de factores de crecimiento y supresores tumorales (por ejemplo, anti-p53, anti-BLM, anti-Cdk2, anti-Chk2, anti-BRCA-1, anti-NBS1, anti BRCA-2, anti-WRN, anti-PTEN, anti-WT1, anti-p38).

En algunas realizaciones, agentes de captura de analito **4002** son capaces de unirse a los analitos **4006** presentes dentro de una célula. En algunas realizaciones, los agentes de captura de analitos son capaces de unirse a analitos de la superficie celular que pueden incluir, sin limitación, un receptor, un antígeno, una proteína de superficie, una proteína transmembrana, un grupo de proteínas de diferenciación, un canal proteico, una bomba proteica, una proteína portadora, un fosfolípido, una glicoproteína, un glicolípido, un complejo proteico de interacción célula-célula, un complejo presentador de antígeno, un complejo mayor de histocompatibilidad, un receptor de células T manipulado genéticamente, un receptor de células T, un receptor de células B, un receptor de antígeno químérico, una proteína de matriz extracelular, una modificación postraduccional (por ejemplo, fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, nitrosilación, metilación, acetilación o lipidación), estado de una proteína de la superficie celular, una unión de brecha y una unión adherente. En algunas realizaciones, los agentes de captura de analito **4002** son capaces de unirse a analitos de la superficie celular modificados postraduccionalmente. En tales realizaciones, los agentes de captura de analito pueden ser específicos para analitos de superficie celular basados en un estado dado de modificación postraduccional (por ejemplo, fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, nitrosilación, metilación, acetilación o lipidación), de tal manera que un perfil de analito de superficie celular puede incluir información de modificación postraduccional de uno o más analitos.

En algunas realizaciones, el agente de captura de analito **4002** incluye un dominio de código de barras de agente de captura **4008** que está conjugado o unido de otro modo al resto de unión al analito. En algunas realizaciones, el dominio de código de barras del agente de captura **4008** está unido covalentemente al resto de unión al analito **4004**. En algunas realizaciones, un dominio de código de barras de agente de captura **4008** es una secuencia de ácido

nucleico. En algunas realizaciones, un dominio de código de barras de agente de captura **4008** incluye, o está unido covalentemente a, un código de barras del resto de unión al analito y una secuencia de captura de analito **4114**.

Como se usa en la presente, el término "código de barras del resto de unión al analito" se refiere a un código de barras que está asociado con o identifica de otra manera el resto de unión al analito **4004**. En algunas realizaciones, al

5 identificar un resto de unión al analito **4004** y su código de barras del resto de unión al analito asociado, el analito **4006** al que se une el resto de unión al analito **4004** también se puede identificar. Un código de barras del resto de unión al analito puede ser una secuencia de ácido nucleico de una longitud y/o secuencia determinada asociada al resto de unión al analito **4004**. Un código de barras del resto de unión a analito puede incluir generalmente cualquiera de los diversos aspectos de los códigos de barras descriptos en la presente. Por ejemplo, un agente de captura de analito
10 **4002** que es específico para un tipo de analito puede tener acoplado un primer dominio de código de barras de agente de captura (por ejemplo, que incluye un primer código de barras del resto de unión al analito), mientras que un agente de captura de analitos que es específico para un analito diferente puede tener acoplado un dominio de código de barras de agente de captura diferente (por ejemplo, que incluye un segundo código de barras del resto de unión al analito). En algunos aspectos, dicho dominio de código de barras de agente de captura puede incluir un código de
15 barras del resto de unión al analito que permite la identificación del resto de unión al analito **4004** a la que está acoplado el dominio de código de barras de agente de captura. La selección del dominio de código de barras del agente de captura **4008** puede permitir una diversidad significativa en términos de secuencia, a la vez que puede acoplarse fácilmente a la mayoría de los restos de unión al analito (por ejemplo, anticuerpos o aptámeros), así como detectarse fácilmente (por ejemplo, utilizando tecnologías de secuenciación o de matriz).

20 En algunas realizaciones, el dominio de código de barras del agente de captura de un agente de captura de analito **4002** incluye una secuencia de captura de analito. Como se utiliza en la presente, el término "secuencia de captura de analito" se refiere a una región o resto configurado para hibridarse, unirse, acoplarse o interactuar de otro modo con un dominio de captura de una sonda de captura. En algunas realizaciones, una secuencia de captura de analito incluye una secuencia de ácido nucleico que es complementaria o sustancialmente complementaria al dominio de captura de una sonda de captura, de manera que la secuencia de captura de analito se hibrida con el dominio de captura de la sonda de captura. En algunas realizaciones, una secuencia de captura de analito comprende una secuencia de ácido nucleico poli(A) que se hibrida con un dominio de captura que comprende una secuencia de ácido nucleico poli(T). En algunas realizaciones, una secuencia de captura de analito comprende una secuencia de ácido nucleico poli(T) que se hibrida con un dominio de captura que comprende una secuencia de ácido nucleico poli(A). En algunas
25 30 realizaciones, una secuencia de captura del analito comprende una secuencia de ácido nucleico no homopolimérica que se hibrida con un dominio de captura que comprende una secuencia de ácido nucleico no homopolimérica que es complementaria (o sustancialmente complementaria) a la secuencia de ácido nucleico no homopolimérica de la región de captura del analito.

35 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos de análisis espacial descriptos en la presente que emplean un agente de captura de analito **4002**, el dominio de código de barras del agente de captura se puede acoplar directamente al resto de unión al analito **4004**, o se pueden unir a una perla, una red molecular, por ejemplo, un polímero lineal, globular, reticulado o de otro tipo, u otra estructura que esté unida o asociada de otro modo al resto de unión al analito, lo que permite la unión de múltiples dominios de código de barras del agente de captura a un único resto de unión al analito. La unión (acoplamiento) de los dominios de código de barras del agente de captura a las
40 45 resto de unión a analito **4004** se puede lograr mediante una variedad de asociaciones o acoplamientos indirectos, covalentes o no covalentes. Por ejemplo, en el caso de un dominio de código de barras de agente de captura acoplado a una resto de unión al analito **4004** que incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, dichos dominios de código de barras de agente de captura se pueden unir covalentemente a una porción del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno mediante técnicas de conjugación química (por ejemplo, kits de marcación de anticuerpos LIGHTNING-LINK® disponibles en Innova Biosciences). En algunas realizaciones, un dominio de código de barras de agente de captura se puede acoplar a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno utilizando mecanismos de unión no covalentes (por ejemplo, utilizando anticuerpos y oligonucleótidos biotinilados o perlas que incluyen uno o más ligadores biotinilados, acoplados a oligonucleótidos con un ligador de avidina o estreptavidina). Se pueden utilizar técnicas de biotinilación de anticuerpos y oligonucleótidos, que se describen por ejemplo en Fang et al., 2003, Nucleic
50 Acids Res. 31(2): 708-715. Asimismo, se han desarrollado y se pueden utilizar técnicas de biotinilación de proteínas y péptidos, que se describen, por ejemplo, en la Patente U.S. Nº 6.265.552. Además, se puede utilizar la química de reacción de clic, tal como una reacción de éster de metiltetrazina-PEG5-NHS, una reacción de éster de TCO-PEG4-NHS, o similares, para acoplar dominios de código de barras de agente de captura a restos de unión de analito **4004**. El resto reactivo en el resto de unión al analito también puede incluir una amina dirigida a aldehídos, una amina dirigida a maleimidas (por ejemplo, tioles libres), una azida dirigida a compuestos de química de clic (por ejemplo, alquinos), una biotina dirigida a estreptavidina, fosfatos dirigidos a EDC, que a su vez se dirigen a ésteres activos (por ejemplo, NH2). El resto reactivo del resto reactivo al analito **4004** puede ser un compuesto o grupo químico unido al resto reactivo. Los ejemplos de estrategias para conjugar el resto reactivo al analito **4004** con el dominio de código de barras del agente de captura incluyen el uso de kits comerciales (por ejemplo, Solulink, Thunder link), conjugación de

- reducción leve de la región bisagra y marcación con maleimida, reacción de química de clic promovida por tinción a amidas marcadas (por ejemplo, sin cobre), y conjugación de oxidación de peryodato de la cadena de azúcar y conjugación de amina. En los casos en los que el resto reactivo al analito **4004** es un anticuerpo, el anticuerpo se puede modificar antes o simultáneamente con la conjugación del oligonucleótido. Por ejemplo, el anticuerpo se puede glicosilar con un mutante químico de sustrato permisivo de β-1,4-galactosiltransferasa, GalT (Y289L) y un análogo de uridina difosfato-N-acetilgalactosamina -GalNAz. El anticuerpo modificado se puede conjugar con un oligonucleótido con un grupo dibenzocicloocteno-PEG4-NHS. En algunas realizaciones, se pueden evitar ciertas etapas (por ejemplo, activación por COOH, tal como EDC, y agentes de reticulación homobifuncionales) para impedir que los restos de unión al analito se conjuguen consigo mismas. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos de perfilado espacial descriptos en la presente, el agente de captura de analito (por ejemplo, el resto reactivo al analito **4004** acoplada a un oligonucleótido) se puede administrar a la célula, por ejemplo, por transfección (por ejemplo, transfectamina, polímeros catiónicos, fosfato de calcio o electroporación), por transducción (por ejemplo, utilizando un bacteriófago o un vector viral recombinante), por administración mecánica (por ejemplo, perlas magnéticas), por lípidos (por ejemplo, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC)) o por proteínas transportadoras.
- Un agente de captura de analitos **4002** se puede administrar a una célula mediante exosomas. Por ejemplo, se puede generar una primera célula que libere exosomas que comprenden un agente de captura de analito. Un agente de captura de analito se puede unir a una membrana de exosoma. Un agente de captura de analito puede estar contenido en el citosol de un exosoma. Los exosomas liberados se pueden recolectar y suministrar a una segunda célula, de este modo se libera el agente de captura de analito en la segunda célula. Un agente de captura de analito se puede liberar de la membrana de un exosoma antes, durante o después de su administración a una célula. En algunas realizaciones, la célula se permeabiliza para permitir que el agente de captura de analito **4002** se acople con constituyentes intracelulares (tal como, sin limitación, proteínas intracelulares, metabolitos y proteínas de la membrana nuclear). Después de la administración intracelular, los agentes de captura de analito **4002** se pueden utilizar para analizar constituyentes intracelulares como se describe en la presente.
- En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos de perfilado espacial descriptos en la presente, el dominio de código de barras del agente de captura acoplado a un agente de captura de analito **4002** puede incluir modificaciones que lo hacen no extensible por una polimerasa. En algunas realizaciones, cuando se une a un dominio de captura de una sonda de captura o ácido nucleico en una muestra para una reacción de extensión de cebador, el dominio de código de barras del agente de captura puede servir como molde, no un cebador. Cuando el dominio de código de barras del agente de captura también incluye un código de barras (por ejemplo, un código de barras del resto de unión al analito), dicho diseño puede aumentar la eficacia del código de barras molecular al aumentar la afinidad entre el dominio de código de barras del agente de captura y los ácidos nucleicos de muestra sin código de barras, y eliminar la posible formación de artefactos adaptadores. En algunas realizaciones, el dominio de código de barras del agente de captura **4008** puede incluir una secuencia N-mer aleatoria que está cubierta con modificaciones que la hacen no extensible por una polimerasa. En algunos casos, la composición de la secuencia N-mer aleatoria se puede diseñar para maximizar la eficacia de unión a moléculas de ADNss libres sin código de barras. El diseño puede incluir una composición de secuencia aleatoria con un mayor contenido de GC, una secuencia aleatoria parcial con G o C fijos en posiciones específicas, el uso de guanosinas, el uso de ácidos nucleicos bloqueados o cualquier combinación de los mismos.
- Una modificación para bloquear la extensión del cebador por una polimerasa puede ser un grupo espaciador de carbono de diferentes longitudes o un dideoxinucleótido. En algunas realizaciones, la modificación puede ser un sitio abásico que tiene una estructura de apurina o apirimidina, una base análoga, o un análogo de un esqueleto de fosfato, tal como un esqueleto de N-(2-aminoethyl)-glicina unido por enlaces amida, tetrahidrofurano, o 1', 2'-Dideoxirribosa. La modificación también puede ser una base de uracilo, ARN modificado con 2'OMe, espaciadores C3-18 (por ejemplo, estructuras con 3-18 átomos de carbono consecutivos, tal como el espaciador C3), espaciadores multiméricos de etilenglicol (por ejemplo, espaciador 18 (espaciador de hexa-etilenglicol)), biotina, di-desoxinucleótido trifosfato, etilenglicol, amina o fosfato).
- En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos de perfilado espacial descriptos en la presente, el dominio de código de barras del agente de captura **4008** acoplado al resto de unión al analito **4004** incluye un dominio escindible. Por ejemplo, después de que el agente de captura de analito se une a un analito (por ejemplo, un analito de superficie celular), el dominio de código de barras del agente de captura se puede escindir y recolectar para su análisis corriente abajo de acuerdo con los métodos descriptos en la presente. En algunas realizaciones, el dominio escindible del dominio de código de barras del agente de captura incluye un elemento de escisión en U que permite que la especie se libere de la perla. En algunas realizaciones, el elemento de escisión en U puede incluir una secuencia de ADN de cadena única (ADNss) que contiene al menos un uracilo. La especie se puede unir a una perla a través de la secuencia de ADNss. La especie se puede liberar mediante una combinación de uracilo-ADN glicosilasa (por ejemplo, para eliminar el uracilo) y una endonucleasa (por ejemplo, para inducir una rotura del ADNss). Si la endonucleasa genera un grupo fosfato 5' a partir de la escisión, se puede incluir un tratamiento enzimático adicional en el procesamiento

corriente abajo para eliminar el grupo fosfato, por ejemplo, antes de la ligación de elementos de asa de secuenciación adicionales, por ejemplo, secuencia P5 completa de Ilumina, secuencia P5 parcial, secuencia R1 completa y/o secuencia R1 parcial.

En algunas realizaciones, múltiples especies diferentes de analitos (por ejemplo, polipéptidos) de la muestra biológica se pueden asociar posteriormente con una o más propiedades físicas de la muestra biológica. Por ejemplo, las múltiples especies diferentes de analitos se pueden asociar con ubicaciones de los analitos en la muestra biológica. Dicha información (por ejemplo, información proteómica cuando el resto de unión del analito reconoce un polipéptido) se puede utilizar en asociación con otra información espacial (por ejemplo, información genética de la muestra biológica, tal como información de la secuencia de ADN, información del transcriptoma, por ejemplo secuencias de transcritos, o ambas). Por ejemplo, una proteína de la superficie celular de una célula se puede asociar con una o más propiedades físicas de la célula (por ejemplo, una forma, tamaño, actividad o un tipo de célula). Las propiedades físicas se pueden caracterizar mediante la obtención de imágenes de la célula. La célula se puede unir a un agente de captura de analitos que comprende un resto de unión al analito que se une a la proteína de la superficie celular y un código de barras de resto de unión al analito que identifica dicho resto de unión al analito, y la célula se puede someter a un análisis espacial (por ejemplo, cualquiera de los diversos métodos de análisis espacial descriptos en la presente). Por ejemplo, el agente de captura de analito **4002** unido a la proteína de superficie celular se puede unir a una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura en una matriz), cuya sonda de captura incluye un dominio de captura que interactúa con una secuencia de captura de analito presente en el dominio de código de barras del agente de captura de analito **902**. Todo o parte del dominio de código de barras del agente de captura (incluido el código de barras del resto de unión al analito) se puede copiar con una polimerasa utilizando un extremo 3' del dominio de captura como sitio de cebado, lo que genera una sonda de captura extendida que incluye toda o parte de la secuencia complementaria que corresponde a la sonda de captura (incluido un código de barras espacial presente en la sonda de captura) y una copia del código de barras del resto de unión al analito. En algunas realizaciones, un agente de captura de analito con un dominio de código de barras de agente de captura extendido que incluye una secuencia complementaria con un código de barras espacial de una sonda de captura se denomina "agente de captura de analitos marcado espacialmente".

En algunas realizaciones, la matriz espacial con agentes de captura de analitos marcados espacialmente se puede poner en contacto con una muestra, en la que el agente de captura de analito asociado a la matriz espacial captura el analito o analitos diana. El agente de captura de analito que contiene la sonda de captura extendida, que incluye una secuencia complementaria con código de barras espacial de la sonda de captura y al código de barras del resto de unión al analito, se puede desnaturalizar a partir de la sonda de captura de la matriz espacial. Esto permite reutilizar la matriz espacial. La muestra se puede disociar en células no agregadas (por ejemplo, células individuales) y analizar mediante los métodos de célula individual/gotita descriptos en la presente. El agente de captura de analitos marcado espacialmente se puede secuenciar para obtener la secuencia de ácido nucleico del código de barras espacial de la sonda de captura y el código de barras del resto de unión al analito del agente de captura de analitos. De este modo, la secuencia de ácido nucleico de la sonda de captura extendida se puede asociar con un analito (por ejemplo, una proteína de la superficie celular) y, a su vez, con una o más propiedades físicas de la célula (por ejemplo, una forma o un tipo de célula). En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico de la sonda de captura extendida se puede asociar con un analito intracelular de una célula cercana, donde el analito intracelular se liberó utilizando cualquiera de las técnicas de permeabilización celular o migración de analitos descriptas en la presente.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos de perfilado espacial descriptos en la presente, los dominios de código de barras del agente de captura liberados de los agentes de captura de analitos luego se pueden someter a un análisis de secuencia para identificar qué agentes de captura de analitos estaban unidos a los analitos. Sobre la base de los dominios del código de barras del agente de captura que están asociados con un punto de captura (por ejemplo, un punto de captura en una ubicación particular) en una matriz espacial y la presencia de la secuencia del código de barras del resto de unión al analito, se puede crear un perfil de analito para una muestra biológica. Los perfiles de células individuales o poblaciones de células se pueden comparar con perfiles de otras células, por ejemplo, células "normales", para identificar variaciones en los analitos, lo que puede proporcionar información relevante para el diagnóstico. En algunas realizaciones, estos perfiles pueden ser útiles en el diagnóstico de una variedad de trastornos que se caracterizan por variaciones en los receptores de la superficie celular, tal como cáncer y otros trastornos..

FIG. 38A, panel superior, es un diagrama esquemático que ilustra un ejemplo de interacción entre una sonda de captura inmovilizada en un elemento **602** y un agente de captura de analito **4002** (donde los términos "elemento" y "punto de captura" se usan en forma indistinta). La sonda de captura inmovilizada por elemento **602** puede incluir un código de barras espacial **605** así como una o más secuencias funcionales **604** y **606**, como se describe en otra parte de la presente. La sonda de captura **602** también puede incluir un dominio de captura **607** que es capaz de unirse a un agente de captura de analito **4002**. En algunas realizaciones, el agente de captura de analito **4002** comprende una secuencia funcional **4118**, dominio del código de barras del agente de captura **4008**, y una secuencia de captura de

analito **4114**. En algunas realizaciones, la secuencia de captura de analito **4114** es capaz de unirse al dominio de captura **607** de la sonda de captura **602**. El agente de captura de analito **4002** también puede incluir un ligador **4120** que permite que el dominio del código de barras del agente de captura **4008 (4114/4008/4118)** se acople al resto de unión al analito **4004**.

5 **FIG. 38A**, panel inferior, ilustra además un agente de captura de analito marcado espacialmente **4002** en el que la secuencia de captura de analito **4114** (secuencia poli-A) del dominio de código de barras del agente de captura **4118/4008/4114** se puede bloquear con una sonda de bloqueo (oligonucleótido poli-T).

En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura puede incluir una secuencia que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de un dominio de captura de una sonda de captura (por ejemplo, cualquiera de los 10 ejemplos de dominio de captura descriptos en la presente). La **FIG. 38B** muestra un ejemplo de dominio de unión de captura unido a un resto de unión al analito utilizado para detectar una proteína en una muestra biológica. Como se muestra en la **FIG. 38B**, un resto de unión al analito **4004** incluye un oligonucleótido que incluye una secuencia cebadora (por ejemplo, una read2) **4118**, un código de barras del resto de unión al analito **4008**, un dominio de unión de captura que tiene una primera secuencia (por ejemplo, un dominio de unión de captura) **4114** (por ejemplo, un 15 ejemplo de poli A), y una sonda de bloqueo o segunda secuencia **4120** (por ejemplo, poli T o poli U), donde la secuencia de bloqueo bloquea el dominio de unión de captura para que no hibride con un dominio de captura en una sonda de captura. En algunos casos, la secuencia de bloqueo **4120** se denomina sonda de bloqueo como se describe en la presente. En algunos casos, la sonda de bloqueo es una secuencia poli T como se exemplifica en la **FIG. 38B**.

En algunos casos, como se muestra en la **FIG. 38A**, la secuencia de la sonda de bloqueo no está en una secuencia 20 contigua con el dominio de unión de captura. En otras palabras, en algunos casos, el dominio de unión de captura (también denominado en la presente primera secuencia) y la secuencia de bloqueo son polinucleótidos independientes. En algunos casos, será evidente para un experto en la materia que los términos "dominio de unión de captura" y "primera secuencia" se utilizan indistintamente en la presente descripción.

En un ejemplo no limitante, la primera secuencia puede ser una secuencia poli(A) cuando la secuencia del dominio de captura de la sonda de captura en el sustrato es una secuencia poli(T). En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye un dominio de unión de captura sustancialmente complementario al dominio de captura de la sonda de captura. Por sustancialmente complementario, se entiende que la primera secuencia del dominio de unión de captura es al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 30 100% complementaria con una secuencia del dominio de captura de la sonda de captura. En otro ejemplo, la primera secuencia del dominio de unión de captura puede ser una secuencia aleatoria (por ejemplo, hexámero aleatorio) que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia del dominio de captura de la sonda de captura que también es una secuencia aleatoria. En otro ejemplo, un dominio de unión de captura puede ser una mezcla de una secuencia homopolimérica (por ejemplo, una secuencia poli(T)) y una secuencia aleatoria (por ejemplo, un hexámero aleatorio) 35 cuando una secuencia de dominio de captura de la sonda de captura es también una secuencia que incluye una secuencia homopolimérica (por ejemplo, una secuencia poli(A)) y una secuencia aleatoria. En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, y/o nucleótidos sintéticos que son capaces de participar en interacciones de tipo Watson-Crick o análogas. En algunas realizaciones, la primera secuencia de la secuencia del dominio de unión de captura incluye al menos 10 nucleótidos, al menos 11 nucleótidos, 40 al menos 12 nucleótidos, al menos 13 nucleótidos, al menos 14 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, al menos 16 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 18 nucleótidos, al menos 19 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos, al menos 21 nucleótidos, al menos 22 nucleótidos, al menos 23 nucleótidos, o al menos 24 nucleótidos. En algunas realizaciones, la primera secuencia del dominio de unión de captura incluye al menos 25 nucleótidos, al menos 30 nucleótidos, o al menos 35 nucleótidos.

45 En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura (por ejemplo, la primera secuencia) y la sonda de bloqueo (por ejemplo, la segunda secuencia) del dominio de unión de captura se encuentran en la misma secuencia contigua de ácido nucleico. Cuando el dominio de unión de captura y la sonda de bloqueo están ubicados en la misma secuencia contigua de ácido nucleico, la segunda secuencia (por ejemplo, una sonda de bloqueo) se ubica 3' de la primera secuencia. Cuando la primera secuencia y la segunda secuencia (por ejemplo, una sonda de bloqueo) del dominio de 50 unión de captura están ubicadas en la misma secuencia contigua de ácido nucleico, la segunda secuencia (por ejemplo, la sonda de bloqueo) está ubicada 5' de la primera secuencia. En la presente, los términos segunda secuencia y sonda de bloqueo se utilizan indistintamente.

En algunos casos, la segunda secuencia (por ejemplo, la sonda de bloqueo) del dominio de unión de captura incluye 55 una secuencia de ácido nucleico. En algunos casos, la segunda secuencia también se denomina sonda de bloqueo o dominio de bloqueo, y cada término se utiliza indistintamente. En algunos casos, el dominio de bloqueo es un oligonucleótido de ADN. En algunos casos, el dominio de bloqueo es un oligonucleótido de ARN. En algunas realizaciones, una sonda de bloqueo del dominio de unión de captura incluye una secuencia que es complementaria

o sustancialmente complementaria a una primera secuencia del dominio de unión de captura. En algunas realizaciones, la sonda de bloqueo impide que la primera secuencia del dominio de unión de captura se una al dominio de captura de la sonda de captura cuando está presente. En algunas realizaciones, la sonda de bloqueo se retira antes de unir la primera secuencia del dominio de unión de captura (por ejemplo, presente en una sonda ligada) a un dominio de captura en una sonda de captura. En algunas realizaciones, una sonda de bloqueo del dominio de unión de captura incluye una secuencia de poli-uridina, una secuencia de poli-timidina, o ambas. En algunos casos, la sonda de bloqueo (o la segunda secuencia) forma parte de una estructura de horquilla que se une específicamente a un dominio de unión de captura e impide que el dominio de unión de captura se hibride con un dominio de captura de una sonda de captura. Ver, por ejemplo, la, FIG. 38C.

10 En algunas realizaciones, la segunda secuencia (por ejemplo, la sonda de bloqueo) del dominio de unión de captura incluye una secuencia configurada para hibridarse con la primera secuencia del dominio de unión de captura. Cuando la sonda de bloqueo se hibrida con la primera secuencia, se bloquea la hibridación de la primera secuencia con un dominio de captura de una sonda de captura. En algunas realizaciones, la sonda de bloqueo incluye una secuencia complementaria con la primera secuencia. En algunas realizaciones, la sonda de bloqueo incluye una secuencia que es sustancialmente complementaria a la primera secuencia. En algunas realizaciones, la sonda de bloqueo incluye una secuencia que es al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% complementaria a la primera secuencia del dominio de unión de captura.

20 En algunas realizaciones, la sonda de bloqueo del dominio de unión de captura incluye una secuencia homopolimérica que es sustancialmente complementaria a la primera secuencia del dominio de unión de captura. En algunas realizaciones, la sonda de bloqueo está configurada para hibridar con una secuencia poli(A), poli(T) o poli-rU. En algunas realizaciones, la sonda de bloqueo incluye una secuencia poli(A), poli(T) o poli(U). En algunas realizaciones, la primera secuencia incluye una secuencia homopolimérica. En algunas realizaciones, la primera secuencia incluye una secuencia poli(A), poli(U) o poli(T).

25 En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye además una secuencia de horquilla (como se muestra en la FIG. 38C). La FIG. 38C muestra un ejemplo de dominio de unión de captura unido a un resto de unión a analito utilizado para detectar una proteína en una muestra biológica. Como se muestra en la FIG. 38C, un resto de unión a analito **4004** incluye un oligonucleótido que incluye una secuencia del cebador (por ejemplo, una read2) **4118**, un código de barras del resto de unión a analito **4008**, un dominio de unión de captura que tiene una primera secuencia **4114** (por ejemplo, un poli A ejemplar), una sonda de bloqueo **4120** y una tercera secuencia **4140**, donde la segunda y/o tercera secuencia pueden ser poli T o poli U o una combinación de las mismas, donde la sonda de bloqueo crea una estructura de tipo horquilla y la tercera secuencia bloquea la hibridación de la primera secuencia con un dominio de captura en una sonda de captura. En algunos casos, la tercera secuencia **4140** se denomina secuencia de bloqueo. Además, **4150** ejemplifica una nucleasa capaz de digerir la secuencia de bloqueo. En este ejemplo, **4150** podría ser una endonucleasa o mezcla de nucleasas capaz de digerir uracilos, tales como UDG o una mezcla de escisión específica de uracilo como USER (NEB).

Otra realización de un escenario de bloqueador de horquilla se ejemplifica en la FIG. 38D. Como se ejemplifica en la FIG . 38D, un resto de unión a analito **4004** incluye un oligonucleótido que incluye una secuencia cebadora (por ejemplo, una read2) **4118**, un código de barras del resto de unión a analito **4008**, un dominio de unión a captura que tiene una primera secuencia (por ejemplo, un dominio de unión de captura) **4114** (por ejemplo, un poli A ejemplar), una segunda secuencia de horquilla **4170** y una tercera secuencia **4180**, en la que la tercera secuencia (por ejemplo, una sonda de bloqueo) bloquea la hibridación de la primera secuencia con un dominio de captura en una sonda de captura. En este ejemplo, **4190** ejemplifica una nucleasa ARNasa H capaz de digerir la secuencia de bloqueo uracilo del híbrido ADN:ARN que se forma por bloqueo de la primera secuencia con una tercera secuencia que contiene uracilo.

45 En algunas realizaciones, la secuencia de horquilla **4170** está ubicada 5' de la sonda de bloqueo del dominio de unión de captura. En algunas realizaciones, la secuencia de horquilla **4170** está ubicada 5' de la primera secuencia en el dominio de unión de captura. En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye de 5' a 3' una primera secuencia sustancialmente complementaria con el dominio de captura de una sonda de captura, una secuencia de horquilla, y una sonda de bloqueo sustancialmente complementaria con la primera secuencia. Alternativamente, el dominio de unión de captura incluye de 3' a 5' una primera secuencia sustancialmente complementaria con el dominio de captura de una sonda de captura, una secuencia de horquilla, y una sonda de bloqueo sustancialmente complementaria con la primera secuencia.

55 En algunas realizaciones, la secuencia de horquilla **4170** incluye una secuencia de aproximadamente tres nucleótidos, aproximadamente cuatro nucleótidos, aproximadamente cinco nucleótidos, aproximadamente seis nucleótidos, aproximadamente siete nucleótidos, aproximadamente ocho nucleótidos, aproximadamente nueve nucleótidos o aproximadamente 10 o más nucleótidos. En algunos casos, la horquilla tiene al menos aproximadamente 15

nucleótidos, al menos aproximadamente 20 nucleótidos, al menos aproximadamente 25 nucleótidos, al menos aproximadamente 30 nucleótidos, o más nucleótidos.

En algunas realizaciones, la secuencia de horquilla incluye ADN, ARN, híbrido de ADN-ARN, o incluye nucleótidos modificados. En algunos casos, la horquilla es una secuencia poli(U). En algunos casos, la secuencia de horquilla de

5 ARN es digerida por USER y/o ARNasa H utilizando los métodos descriptos en la presente. En algunos casos, la secuencia de poli(U) horquilla es digerida por USER y/o ARNasa H utilizando los métodos descriptos en la presente. En algunos casos, la horquilla es una secuencia poli(T). Se aprecia que la secuencia de la horquilla (si incluye ADN, ARN, híbrido de ADN-ARN, o incluye nucleótidos modificados) puede ser casi cualquier secuencia de nucleótidos siempre que forme una horquilla, y en algunos casos, siempre que sea digerida por USER y/o ARNasa H.

10 En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente requieren que la segunda secuencia (por ejemplo, la sonda de bloqueo) del dominio de unión de captura que se hibrida con la primera secuencia del dominio de unión de captura se libre de la primera secuencia. En algunas realizaciones, la liberación de la sonda de bloqueo (o segunda secuencia) de la primera secuencia se realiza en condiciones donde la sonda de bloqueo se deshíbrida de la primera secuencia.

15 En algunas realizaciones, liberar la sonda de bloqueo de la primera secuencia incluye escindir la secuencia de horquilla. En algunas realizaciones, la secuencia de horquilla incluye un ligador escindible. Por ejemplo, el ligador escindible puede ser un ligador fotoescindible, un ligador escindible por UV o un ligador escindible por enzimas. En algunas realizaciones, la enzima que escinde ese dominio escindible enzimáticamente es una endonucleasa. En algunas realizaciones, la secuencia de horquilla incluye una secuencia diana para una endonucleasa de restricción.

20 En algunas realizaciones, la liberación de la sonda de bloqueo (o de la segunda secuencia) del dominio de unión de captura que se hibrida con la primera secuencia del dominio de unión de captura incluye el contacto de la sonda de bloqueo con una endonucleasa de restricción. En algunas realizaciones, la liberación de la sonda de bloqueo de la primera secuencia incluye el contacto de la sonda de bloqueo con una endorribonucleasa. En algunas realizaciones, cuando la sonda de bloqueo es una secuencia de ARN (por ejemplo, una secuencia que comprende uracilos) la endorribonucleasa es una o más de ARNasa H, ARNasa A, ARNasa C, o ARNasa I. En algunas realizaciones, cuando la endorribonucleasa es ARNasa H. En algunas realizaciones, la ARNasa H incluye ARNasa H1, ARNasa H2, o ARNasa H1 y ARNasa H2.

25 En algunas realizaciones, la secuencia de horquilla incluye una secuencia homopolimérica. En algunas realizaciones, la secuencia de horquilla **4170** incluye una secuencia poli(T) o poli(U). Por ejemplo, la secuencia de horquilla incluye una secuencia poli(U). En algunas realizaciones, en la presente se proporcionan métodos para liberar la sonda de bloqueo mediante el contacto de la secuencia de horquilla con una enzima del reactivo de escisión específica de uracilo (USER).

30 En algunas realizaciones, la liberación de la sonda de bloqueo de la primera secuencia incluye la desnaturización de la sonda de bloqueo en condiciones en las que la sonda de bloqueo se deshíbrida de la primera secuencia. En algunas realizaciones, la desnaturización comprende el uso de desnaturización química o desnaturización física. Por ejemplo, cuando se utiliza desnaturización física (por ejemplo, temperatura) para liberar la sonda de bloqueo. En algunas realizaciones, la desnaturización incluye la modulación de la temperatura. Por ejemplo, una primera secuencia y una sonda de bloqueo tienen temperaturas de apareamiento predeterminadas basadas en la composición (A, G, C o T) dentro de las secuencias conocidas. En algunas realizaciones, la temperatura se modula hasta 5° C, hasta 10 °C, hasta 15 °C, hasta 20 °C, hasta 25 °C, hasta 30 °C, o hasta 35 °C por encima de la temperatura de apareamiento predeterminada. En algunas realizaciones, la temperatura se modula a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, o 35° C por encima de la temperatura de apareamiento predeterminada. En algunas realizaciones, una vez que la temperatura se modula a una temperatura por encima de la temperatura de apareamiento predeterminada, la temperatura se enfria a la temperatura de apareamiento predeterminada a una tasa de aumento de aproximadamente 0,1 ° C/segundo a aproximadamente 1,0° C/segundo (por ejemplo, aproximadamente 0,1 ° C/segundo a aproximadamente 0,9° C/segundo, aproximadamente 0,1 ° C/segundo a aproximadamente 0,8° C/segundo, aproximadamente 0,1 ° C/segundo a aproximadamente 0,7° C/segundo, aproximadamente 0,1 ° C/segundo a aproximadamente 0,6° C/segundo, aproximadamente 0,1 ° C/segundo a aproximadamente 0,5° C/segundo, aproximadamente 0,1 ° C/segundo a aproximadamente 0,4° C/segundo, aproximadamente 0,1 ° C/segundo a aproximadamente 0,3° C/segundo, aproximadamente 0,1 ° C/segundo a aproximadamente 0,2° C/segundo, aproximadamente 0,2° C/segundo a aproximadamente 1,0° C/segundo, aproximadamente 0,2° C/segundo a aproximadamente 0,9° C/segundo, aproximadamente 0,2° C/segundo a aproximadamente 0,8° C/segundo, aproximadamente 0,2° C/segundo a aproximadamente 0,7° C/segundo, aproximadamente 0,2° C/segundo a aproximadamente 0,6° C/segundo, aproximadamente 0,2° C/segundo a aproximadamente 0,5° C/segundo, aproximadamente 0,2° C/segundo a aproximadamente 0,4° C/segundo, aproximadamente 0,2° C/segundo a aproximadamente 0,3° C/segundo, aproximadamente 0,3 a aproximadamente 1,0° C/segundo, aproximadamente 0,3° C/segundo a aproximadamente

0,9° C/segundo, aproximadamente 0,3° C/segundo a aproximadamente 0,8° C/segundo, aproximadamente 0,3° C/segundo a aproximadamente 0,7° C/segundo, aproximadamente 0,3° C/segundo a aproximadamente 0,6° C/segundo, aproximadamente 0,3° C/segundo a aproximadamente 0,5° C/segundo, aproximadamente 0,3° C/segundo a aproximadamente 0,4° C/segundo, aproximadamente 0,4° C/segundo a aproximadamente 1,0° C/segundo, 5 aproximadamente 0,4° C/segundo a aproximadamente 0,9° C/segundo, aproximadamente 0,4° C/segundo a aproximadamente 0,8° C/segundo, aproximadamente 0,4° C/segundo a aproximadamente 0,7° C/segundo, aproximadamente 0,4° C/segundo a aproximadamente 0,6° C/segundo, aproximadamente 0,4° C/segundo a aproximadamente 0,5° C/segundo, aproximadamente 0,5° C/segundo a aproximadamente 1,0° C/segundo, 10 aproximadamente 0,5° C/segundo a aproximadamente 0,9° C/segundo, aproximadamente 0,5° C/segundo a aproximadamente 0,8° C/segundo, aproximadamente 0,5° C/segundo a aproximadamente 0,7° C/segundo, aproximadamente 0,6° C/segundo a aproximadamente 0,8° C/segundo, aproximadamente 0,6° C/segundo a 15 aproximadamente 0,7° C/segundo, aproximadamente 0,7° C/segundo a aproximadamente 1,0° C/segundo, aproximadamente 0,7° C/segundo a aproximadamente 0,9° C/segundo, aproximadamente 0,8° C/segundo, aproximadamente 0,8° C/segundo a aproximadamente 1,0° C/segundo, aproximadamente 0,8° C/segundo a aproximadamente 0,9° C/segundo, o aproximadamente 0,9° C/segundo a 20 aproximadamente 1,0° C/segundo). En algunas realizaciones, la desnaturalización incluye ciclos de temperatura. En algunas realizaciones, la desnaturalización incluye la alternancia entre condiciones de desnaturalización (por ejemplo, una temperatura de desnaturalización) y condiciones de no desnaturalización (por ejemplo, temperatura de apareamiento).

Se aprecia que, a pesar de cualquier función particular en una realización, la secuencia de horquilla puede ser cualquier configuración de secuencia, siempre que se forme una horquilla. Así, en algunos casos, podría ser, por ejemplo, una secuencia degenerada, una secuencia aleatoria, o de otro tipo (que comprende cualquier secuencia de polinucleótidos).

En algunas realizaciones, la secuencia de horquilla **4170** también incluye una secuencia que es capaz de unirse a un dominio de captura de una sonda de captura. Por ejemplo, liberar la secuencia de horquilla del dominio de unión de captura puede requerir escindir la secuencia de horquilla, donde la porción de la secuencia de horquilla que se deja después de la escisión incluye una secuencia que es capaz de unirse a un dominio de captura de una sonda de captura. 30 En algunas realizaciones, la totalidad o una porción de la secuencia de horquilla es sustancialmente complementaria con un dominio de captura de una sonda de captura. En algunas realizaciones, la secuencia que es sustancialmente complementaria con un dominio de captura de una sonda de captura está ubicada en el extremo 5' libre o 3' libre después de la escisión de la secuencia de horquilla. En algunas realizaciones, la escisión de la horquilla produce una secuencia de cadena simple capaz de unirse a un dominio de captura de una sonda de captura en una 35 matriz espacial. Aunque la liberación de una secuencia de horquilla puede permitir la hibridación con un dominio de captura de una sonda de captura, se contempla que la liberación de la horquilla no afectaría significativamente la captura del analito diana por un resto de unión al analito o un oligonucleótido de sonda (por ejemplo, un segundo oligonucleótido de sonda).

40 En algunos casos, uno o más métodos de bloqueo descriptos en la presente incluyen una pluralidad de nucleótidos enjaulados. En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente métodos en los que un dominio de unión de captura incluye una pluralidad de nucleótidos enjaulados. Los nucleótidos enjaulados impiden que el dominio de unión de captura interactúe con el dominio de captura de la sonda de captura. Los nucleótidos enjaulados incluyen restos enjaulados que bloquean el enlace de hidrógeno Watson-Crick, de este modo impiden la interacción hasta la activación, por ejemplo, mediante fotólisis del resto enjaulado que libera el resto enjaulado y restablece la capacidad 45 de los nucleótidos enjaulados para participar en el apareamiento de bases Watson-Crick con un nucleótido complementario.

La FIG. 38E muestra el bloqueo de un dominio de unión de captura con nucleótidos enjaulados. Como se ejemplifica en la FIG. 38E, un resto de unión a analito **4004** incluye un oligonucleótido que incluye una secuencia cebadora (por ejemplo, una read2) **4118**, un código de barras de resto de unión a analito **4008** y un dominio de unión de captura que tiene una secuencia **4114** (por ejemplo, un poliA ejemplar). Los nucleótidos enjaulados **4130** bloquean la secuencia **4114**, de este modo se bloquea la interacción entre el dominio de unión de captura y el dominio de captura de la sonda de captura. En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye una pluralidad de nucleótidos enjaulados, donde un nucleótido enjaulado de la pluralidad de nucleótidos enjaulados incluye un resto enjaulado capaz de impedir la interacción entre el dominio de unión de captura y el dominio de captura de la sonda de captura. Ejemplos no 50 limitantes de nucleótidos enjaulados, también conocidos como oligonucleótidos sensibles a la luz, se describen en Liu et al., 2014, Acc. Chem. Res., 47(1): 45-55 (2014). En algunas realizaciones, los nucleótidos enjaulados incluyen un resto enjaulado seleccionado del grupo de 6-nitropiperoniloximeto (NPOM), 1-(*ortho*-nitrofenil)-etilo (NPE), 2-(*ortho*-nitrofenil)propilo (NPP), dietilaminocumarina (DEACM) y nitrodibenzofurano (NDBF).

- En algunas realizaciones, un nucleótido enjaulado incluye un nucleótido no natural seleccionado del grupo que consiste en adenosina enjaulada con 6-nitropiperoniloximetilo (NPOM), guanosina enjaulada con 6-nitropiperoniloximetilo (NPOM), uridina enjaulada con 6-nitropiperoniloximetilo (NPOM) y timidina enjaulada con 6-nitropiperoniloximetilo (NPOM). Por ejemplo, el dominio de unión de captura incluye uno o más nucleótidos enjaulados, donde los nucleótidos enjaulados incluyen uno o más de guanosina enjauladas en 6-nitropiperoniloximetilo (NPOM).
- 5 En otro ejemplo, el dominio de unión de captura incluye uno o más nucleótidos enjaulados donde los nucleótidos enjaulados incluyen una o más de uridina enjaulada en nitropiperoniloximetilo (NPOM). En otro ejemplo, el dominio de unión de captura incluye uno o más nucleótidos enjaulados donde el nucleótido enjaulado incluye una o más timidina enjaulada en 6-nitropiperoniloximetilo (NPOM).
- 10 En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye una combinación de al menos dos o más de cualquiera de los nucleótidos enjaulados descriptos en la presente. Por ejemplo, el dominio de unión de captura puede incluir una o más guanosina enjaulada en 6-nitropiperoniloximetil (NPOM) y una o más uridina enjaulada en nitropiperoniloximetil (NPOM). Se aprecia que un dominio de unión de captura puede incluir cualquier combinación de cualquiera de los nucleótidos enjaulados descriptos en la presente.
- 15 En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye un nucleótido enjaulado, dos nucleótidos enjaulados, tres nucleótidos enjaulados, cuatro nucleótidos enjaulados, cinco nucleótidos enjaulados, seis nucleótidos enjaulados, siete nucleótidos enjaulados, ocho nucleótidos enjaulados, nueve nucleótidos enjaulados, o diez o más nucleótidos enjaulados.
- 20 En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye un nucleótido enjaulado en el extremo 3'. En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye dos nucleótidos enjaulados en el extremo 3'. En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye al menos tres nucleótidos enjaulados en el extremo 3'.
- En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye un nucleótido enjaulado en el extremo 5'. En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye dos nucleótidos enjaulados en el extremo 5'. En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye al menos tres nucleótidos enjaulados en el extremo 5'.
- 25 En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye un nucleótido enjaulado en cada posición impar a partir del extremo 3' del dominio de unión de captura. En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye un nucleótido enjaulado en cada posición impar a partir del extremo 5' del dominio de unión de captura. En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye un nucleótido enjaulado en cada posición par a partir del extremo 3' del dominio de unión de captura. En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye un nucleótido enjaulado en cada posición par a partir del en el extremo 5' del dominio de unión de captura.
- 30 En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye una secuencia que incluye al menos 10%, al menos, 20%, o al menos 30% nucleótidos enjaulados. En algunos casos, el porcentaje de nucleótidos enjaulados en el dominio de unión de captura es aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80% o mayor. En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye una secuencia donde cada nucleótido es un nucleótido enjaulado. Se entiende que el límite de nucleótidos enjaulados se basa en la secuencia del dominio de unión de captura y las limitaciones estéricas de la creación de nucleótidos enjaulados en proximidad unos de otros. En consecuencia, en algunos casos, los nucleótidos particulares (por ejemplo, guaninas) se reemplazan con nucleótidos enjaulados. En algunos casos, todas las guaninas de un dominio de unión de captura se reemplazan con nucleótidos enjaulados. En algunos casos, los nucleótidos particulares (por ejemplo, uridinas o timinas) se reemplazan con nucleótidos enjaulados. En algunos casos, todas las uridinas o timinas de un dominio de unión de captura se reemplazan con nucleótidos enjaulados. En algunos casos, una fracción (por ejemplo, aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, o aproximadamente 95%) de las guaninas de un dominio de unión de captura se reemplazan con nucleótidos enjaulados. En algunos casos, los nucleótidos particulares (por ejemplo, uridinas o timinas) se reemplazan con nucleótidos enjaulados. En algunos casos, todas las uridinas o timinas de un dominio de unión de captura se reemplazan con nucleótidos enjaulados. En algunos casos, una fracción (por ejemplo, aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, o aproximadamente 95%) de uridinas o timinas de un dominio de unión de captura se reemplazan con nucleótidos enjaulados. Los nucleótidos enjaulados se describen en Govan *et al.*, 2013, *Nucleic Acids Research* 41; 22, 10518-10528, que se incorpora por referencia en su totalidad.
- 40 En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye nucleótidos enjaulados que se distribuyen uniformemente por el dominio de unión de captura. Por ejemplo, un dominio de unión de captura puede incluir una secuencia que incluye al menos 10% de nucleótidos enjaulados donde los nucleótidos enjaulados se distribuyen uniformemente por el dominio de unión de captura. En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye una secuencia que es al menos 10% de nucleótidos enjaulados y donde el 10% de nucleótidos enjaulados se ubican en el 3' del dominio de unión de captura. En algunas realizaciones, el dominio de unión de captura incluye una secuencia que es al menos 10% de nucleótidos enjaulados y donde el 10% de nucleótidos enjaulados se ubican en el
- 45
- 50
- 55

extremo 5' del dominio de unión de captura. En algunas realizaciones, los nucleótidos enjaulados se incluyen en los nucleótidos enjaulados se incluyen cada tres, cada cuatro, cada cinco, cada seis nucleótidos, o una combinación de los mismos, de la secuencia del dominio de unión de captura.

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para liberar el resto enjaulado del nucleótido enjaulado. En algunas realizaciones, la liberación del resto enjaulado del nucleótido enjaulado incluye la activación del resto enjaulado. En algunas realizaciones, la liberación del resto enjaulado del nucleótido enjaulado restablece la capacidad

5 del nucleótido enjaulado para hibridarse con un nucleótido complementario a través del enlace de hidrógeno Watson-Crick. Por ejemplo, restaurar la capacidad del nucleótido enjaulado para hibridarse con un nucleótido complementario permite/restaura la capacidad del dominio de unión de captura para interactuar con el dominio de captura. Al liberar el
10 resto enjaulado del nucleótido enjaulado, el nucleótido enjaulado ya no está "enjaulado" en el sentido de que el resto enjaulado ya no está unido (por ejemplo, de forma covalente o no covalente) al nucleótido enjaulado. Como se utiliza en la presente, el término "nucleótido enjaulado" se puede referir a un nucleótido que está unido a un resto enjaulado o a un nucleótido que estuvo unido al resto enjaulado pero que ya no está unido como resultado de la activación del resto enjaulado.

15 En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para activar el resto enjaulado, de este modo se libera el resto enjaulado del nucleótido enjaulado. En algunas realizaciones, la activación del resto enjaulado incluye la fotólisis del resto enjaulado del nucleótido. Como se usa en la presente, "fotólisis" se puede referir al proceso de eliminar o separar un resto enjaulado de un nucleótido enjaulado usando luz. En algunas realizaciones, la activación (por ejemplo, fotólisis) del resto enjaulado incluye la exposición del resto enjaulado a pulsos de luz (por ejemplo, dos o más, tres o

20 más, cuatro o más, o cinco o más pulsos de luz) que en total son suficientes para liberar el resto enjaulado del nucleótido enjaulado. En algunas realizaciones, la activación del resto enjaulado incluye la exposición del resto enjaulado a un pulso de luz (por ejemplo, un único pulso de luz) que sea suficiente para liberar el resto enjaulado del nucleótido enjaulado. En algunas realizaciones, la activación del resto enjaulado incluye la exposición del resto enjaulado a una pluralidad de pulsos (por ejemplo, uno, o dos o más pulsos de luz) donde la luz tiene una longitud de

25 onda de aproximadamente menos de 360 nm. En algunas realizaciones, la fuente de la luz que es a una longitud de onda de aproximadamente menos de 360 nm es una luz UV. La luz UV puede proceder de un microscopio de fluorescencia, un láser UV o una lámpara de flash UV, o cualquier fuente de luz UV conocida en la técnica.

30 En algunas realizaciones, una vez que el resto enjaulado se libera del dominio de unión de captura, el oligonucleótido, el oligonucleótido de sonda o el producto de ligación que incluye el dominio de unión de captura, es capaz de hibridarse con el dominio de captura de la sonda de captura. Por último, para identificar la ubicación del analito o determinar la interacción entre dos o más restos de unión al analito, toda o parte de la secuencia del oligonucleótido, sonda de oligonucleótido o producto de ligación, o un complemento de los mismos.

35 Para más información sobre realizaciones en las que la secuencia de captura del analito está bloqueada, ver la solicitud de patente internacional PCT/US2020/059472 titulada "Enhancing Specificity of Analyte Binding", presentada el 6 de noviembre de 2020.

40 La FIG. 39 ilustra cómo las sondas de bloqueo se añaden al agente de captura de analito marcado espacialmente 402 para evitar la unión no específica al dominio de captura en la matriz. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de bloqueo y los anticuerpos se administran al tejido donde, después de unirse a la diana tisular, los oligonucleótidos de bloqueo se pueden eliminar posteriormente (por ejemplo, digeridos por ARNasa). En el ejemplo ilustrado en la FIG. 39, la escisión del ligador entre el oligonucleótido y el anticuerpo permite que el oligonucleótido migre al dominio de captura en la matriz. Ver los Ejemplos 3 y 4 a continuación.

45 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos de perfilado espacial descriptos en la presente, los métodos se utilizan para identificar perfiles de células inmunitarias. Las células inmunitarias expresan diversos receptores inmunológicos adaptativos relacionados con la función inmunitaria, tales como receptores de células T (TCR) y receptores de células B (BCR). Los receptores de células T y los receptores de células B intervienen en la respuesta inmunitaria mediante el reconocimiento y unión en forma específica a抗ígenos, lo que ayuda a su destrucción. Más información sobre tales aplicaciones de los métodos divulgados se proporciona en la publicación PCT 202020176788A 1 titulada "Profiling of biological analytes with spatially barcoded oligonucleotide arrays".

(c) Sustrato

50 En los métodos analíticos basados en matrices espaciales descriptos en esta sección, el sustrato (por ejemplo, el chip) funciona como soporte para la fijación indirecta de las sondas de captura a los puntos de captura de la matriz. Además, en algunas realizaciones, un sustrato (por ejemplo, el mismo sustrato o un sustrato diferente) se utiliza para proporcionar soporte a una muestra, en particular, por ejemplo, una sección fina de tejido. Por consiguiente, un "sustrato" es un soporte que es insoluble en líquido acuoso y que permite la colocación de muestras biológicas, analitos, puntos de captura y/o sondas de captura en el sustrato.

- Se puede utilizar una amplia variedad de sustratos diferentes para los fines anteriores. En general, un sustrato puede ser cualquier material de soporte adecuado. Los ejemplos de sustratos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, vidrio modificado y/o funcionalizado, hidrogeles, películas, membranas, plásticos (incluyendo, por ejemplo, acrílicos, poliestireno, copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflon™, olefinas cíclicas, poliimidadas, etc), nylon, cerámica, resinas, Zeonor, sílice o materiales a base de sílice, que incluye silicio y silicio modificado, carbono, metales, cristales inorgánicos, haces de fibras ópticas y polímeros, tales como poliestireno, copolímeros de olefinas cíclicas (COC), polímeros de olefinas cíclicas (COP), polipropileno, polietileno y policarbonato.
- El sustrato también puede corresponder a una celda de flujo. Las celdas de flujo pueden estar formadas por cualquiera de los materiales anteriores, y pueden incluir canales que permitan el paso de reactivos, disolventes, puntos de captura y moléculas a través de la celda de flujo.
- Entre los ejemplos de materiales de sustrato analizados anteriormente, el poliestireno es un material hidrófobo adecuado para unir macromoléculas cargadas negativamente porque normalmente contiene pocos grupos hidrófilos. En el caso de los ácidos nucleicos inmovilizados en portaobjetos de vidrio, al aumentar la hidrofobicidad de la superficie de vidrio se puede incrementar la inmovilización del ácido nucleico. Tal aumento puede permitir una formación relativamente más densamente empaquetada (por ejemplo, proporcionar especificidad y resolución mejoradas).
- En algunas realizaciones, un sustrato se recubre con un tratamiento de superficie tal como poli-L-lisina. Adicional o alternativamente, el sustrato puede ser tratado por silanación, por ejemplo, con epoxi-silano, amino-silano, y/o por un tratamiento con poliacrilamida.
- En general, el sustrato puede tener cualquier forma o formato adecuado. Por ejemplo, el sustrato puede ser plano, curvado, por ejemplo, curvado en forma convexa o cóncavo hacia el área donde tiene lugar la interacción entre una muestra, por ejemplo, muestra de tejido, y el sustrato. En algunas realizaciones, el sustrato es un chip o portaobjetos plano, por ejemplo, plano. El sustrato puede contener una o más superficies modeladas (por ejemplo, canales, pozos, salientes, crestas, huecos, etc.).
- Un sustrato puede tener cualquier forma deseada. Por ejemplo, un sustrato puede tener una forma plana y fina (por ejemplo, un cuadrado o un rectángulo). En algunas realizaciones, una estructura de sustrato tiene esquinas redondeadas (por ejemplo, para aumentar la seguridad o robustez). En algunas realizaciones, una estructura de sustrato tiene una o más esquinas cortadas (por ejemplo, para su uso con una abrazadera de deslizamiento o tabla transversal). En algunas realizaciones, cuando una estructura de sustrato es plana, la estructura de sustrato puede ser cualquier tipo apropiado de soporte que tenga una superficie plana (por ejemplo, un chip o un portaobjetos tal como un portaobjetos de microscopio).
- Los sustratos pueden incluir opcionalmente varias estructuras tales como, pero no limitadas a, proyecciones, crestas y canales. Un sustrato puede ser micromodelado para limitar la difusión lateral (por ejemplo, para evitar la superposición de códigos de barras espaciales). Un sustrato modificado con tales estructuras se puede modificar para permitir la asociación de analitos, puntos de captura (por ejemplo, perlas) o sondas en sitios individuales. Por ejemplo, los sitios en los que un sustrato se modifica con diversas estructuras pueden ser contiguos o no contiguos con otros sitios.
- En algunas realizaciones, la superficie de un sustrato se puede modificar de modo que se formen sitios discretos que solo puedan tener o alojar un punto de captura único. En algunas realizaciones, la superficie de un sustrato se puede modificar para que los puntos de captura se adhieran a sitios aleatorios.
- En algunas realizaciones, la superficie de un sustrato se modifica para contener uno o más pozos, utilizando técnicas tales como (pero no limitadas a) técnicas de estampado, técnicas de micrograbado y técnicas de moldeado. En algunas realizaciones en las que un sustrato incluye uno o más pozos, el sustrato puede ser un portaobjetos cóncavo o un portaobjetos con cavidad. Por ejemplo, los pozos pueden estar formados por una o más depresiones poco profundas en la superficie del sustrato. En algunas realizaciones, en las que un sustrato incluye uno o más pocillos, los pocillos se pueden formar mediante la fijación de un casete (por ejemplo, un casete que contiene una o más cámaras) a una superficie de la estructura del sustrato.
- En algunas realizaciones, las estructuras de un sustrato (por ejemplo, pocillos) pueden llevar una sonda de captura diferente cada una. Las diferentes sondas de captura unidas a cada estructura se pueden identificar según la ubicación de las estructuras en o sobre la superficie del sustrato. Los ejemplos de sustratos incluyen matrices en las que estructuras separadas están localizadas en el sustrato incluyendo, por ejemplo, aquellas que tienen pocillos que alojan puntos de captura.
- En algunas realizaciones, un sustrato incluye una o más marcas en una superficie del sustrato, por ejemplo, para proporcionar orientación para correlacionar información espacial con la caracterización del analito de interés. Por

ejemplo, un sustrato se puede marcar con una cuadrícula de líneas (por ejemplo, para permitir que el tamaño de los objetos vistos con aumento se estime fácilmente y/o para proporcionar áreas de referencia para contar objetos). En algunas realizaciones, se pueden incluir marcadores fiduciales en el sustrato. Dichas marcas se pueden realizar mediante técnicas que incluyen, pero sin limitación, impresión, chorro de arena y depósito sobre la superficie.

5 En algunas realizaciones en las que el sustrato se modifica para contener una o más estructuras, que incluyen, pero sin limitación, pocillos, salientes, crestas o marcas, las estructuras pueden incluir sitios alterados físicamente. Por ejemplo, un sustrato modificado con varias estructuras puede incluir propiedades físicas, que incluyen, pero sin limitación, configuraciones físicas, fuerzas magnéticas o de compresión, sitios químicamente funcionalizados, sitios químicamente alterados, y/o sitios alterados electrostáticamente.

10 En algunas realizaciones en las que el sustrato se modifica para contener varias estructuras, que incluyen, pero sin limitación pocillos, salientes, crestas o marcas, las estructuras se aplican en un patrón. Alternativamente, las estructuras pueden estar distribuidas aleatoriamente.

En algunas realizaciones, se trata un sustrato para minimizar o reducir la hibridación no específica del analito dentro o entre los puntos de captura. Por ejemplo, el tratamiento puede incluir el recubrimiento del sustrato con un hidrogel, película y/o membrana que cree una barrera física a la hibridación no específica. Se puede utilizar cualquier hidrogel adecuado. Por ejemplo, se pueden usar matrices de hidrogel preparadas de acuerdo con los métodos expuestos en las patentes U.S. Nº 6.391.937, 9.512.422 y 9.889.422, y la publicación de solicitud de patente U.S. Nros 2017/0253918 y U.S. 2018/0052081.

20 El tratamiento puede incluir la adición de un grupo funcional que sea reactivo o capaz de activarse de forma que se convierta en reactivo después de recibir un estímulo (por ejemplo, fotorreactivo). El tratamiento puede incluir tratar con polímeros que tengan una o más propiedades físicas (por ejemplo, mecánicas, eléctricas, magnéticas y/o térmicas) que minimicen la unión no específica (por ejemplo, que activen un sustrato en determinados lugares para permitir la hibridación del analito en esos lugares).

25 El sustrato (por ejemplo, una perla o un punto de captura en una matriz) puede incluir de decenas a cientos de miles o millones de moléculas de oligonucleótidos individuales (por ejemplo, al menos unas 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 10.000.000, 100.000.000, 1.000.000.000 o 10.000.000.000 de moléculas de oligonucleótidos).

30 En algunas realizaciones, la superficie del sustrato está recubierta con un recubrimiento permisivo celular que permite la adhesión de células vivas. Un "recubrimiento permisivo celular" es un recubrimiento que permite o ayuda a las células a mantener la viabilidad celular (por ejemplo, permanecer viables) en el sustrato. Por ejemplo, un recubrimiento permisivo celular puede mejorar la fijación celular, el crecimiento celular y/o la diferenciación celular, por ejemplo, un recubrimiento permisivo celular puede proporcionar nutrientes a las células vivas. Un recubrimiento permisivo celular puede incluir un material biológico y/o un material sintético. Entre los ejemplos no limitantes de un recubrimiento permisivo celular se incluyen los recubrimientos que presentan uno o más componentes de la matriz extracelular (ECM) (por ejemplo, proteoglicanos y proteínas fibrosas tales como colágeno, elastina, fibronectina y laminina), polilisina, poli-L-ornitina y/o una silicona biocompatible (por ejemplo, CYTOSOFT®). Por ejemplo, un recubrimiento permisivo celular que incluye uno o más componentes de matriz extracelular puede incluir colágeno de tipo I, colágeno de tipo II, colágeno de tipo IV, elastina, fibronectina, laminina y/o vitronectina. En algunas realizaciones, el recubrimiento permisivo celular incluye una preparación de membrana basal solubilizada extraída del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) (por ejemplo, MATRIGEL®). En algunas realizaciones, el recubrimiento permisivo celular incluye colágeno.

40 Cuando el sustrato incluye un gel (por ejemplo, un hidrogel o una matriz de gel), los oligonucleótidos dentro del gel se pueden fijar al sustrato. Los términos "hidrogel" y "matriz de hidrogel" se utilizan indistintamente en la presente para referirse a un gel polimérico macromolecular que incluye una red. Dentro de la red, algunas cadenas poliméricas pueden, opcionalmente, estar reticuladas, aunque la reticulación no siempre se produce.

45 Más detalles y realizaciones no limitantes relacionadas con hidrogeles y subunidades de hidrogel que se pueden usar en la presente descripción se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos Nº 16/992.569 titulada "Systems and Methods for Using the Spatial Distribution of Haplotypes to Determine a Biological Condition," presentada el 13 de agosto de 2020.

50 Otros ejemplos de sustratos, que incluyen por ejemplo marcadores fiduciales sobre dichos sustratos, se divultan en la publicación PCT 202020176788A1 titulada "Profiling of biological analytes with spatially barcoded oligonucleotide arrays".

(d) Matrices

En muchos de los métodos descriptos en la presente, los puntos de captura se colocan colectivamente en un sustrato en una matriz. Una "matriz" es una disposición específica de una pluralidad de puntos de captura (también denominados "elementos") que puede ser irregular o formar un patrón regular. Los puntos de captura individuales de la matriz difieren entre sí en función de sus ubicaciones espaciales relativas. En general, al menos dos de la pluralidad de puntos de captura de la matriz incluyen una sonda de captura distinta (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de sondas de captura descriptos en la presente)..

Las matrices se pueden utilizar para medir un gran número de analitos simultáneamente. En algunas realizaciones, se utilizan oligonucleótidos, al menos en parte, para crear una matriz. Por ejemplo, una o más copias de una única especie de oligonucleótido (por ejemplo, sonda de captura) pueden corresponder o estar directa o indirectamente unidas a un punto de captura determinado en la matriz. En algunas realizaciones, un punto de captura dado de la matriz incluye dos o más especies de oligonucleótidos (por ejemplo, sondas de captura). En algunas realizaciones, las dos o más especies de oligonucleótidos (por ejemplo, sondas de captura) unidas directa o indirectamente a un punto de captura dado en la matriz incluyen un código de barras espacial común (por ejemplo, idéntico).

Como se definió anteriormente, un "punto de captura" es una entidad que actúa como soporte o depósito de varias entidades moleculares utilizadas en el análisis de muestras. Los ejemplos de puntos de captura incluyen, pero sin limitación, una perla, un punto de cualquier geometría bidimensional o tridimensional (por ejemplo, un punto de inyección de tinta, un punto enmascarado, un cuadrado en una cuadrícula), un pocillo y una almohadilla de hidrogel. En algunas realizaciones, los puntos de captura están directa o indirectamente adheridos o fijados a un sustrato (por ejemplo, un chip). En algunas realizaciones, los puntos de captura no están directa o indirectamente adheridos o fijados a un sustrato, sino que, por ejemplo, están dispuestos dentro de un espacio tridimensional cerrado o parcialmente cerrado (por ejemplo, pocillos o cavidades).

En algunas realizaciones, los puntos de captura están directa o indirectamente unidos o fijados a un sustrato (por ejemplo, un chip) que es permeable a los líquidos. En algunas realizaciones, los puntos de captura están directa o indirectamente unidos o fijados a un sustrato que es biocompatible. En algunas realizaciones, los puntos de captura están directa o indirectamente unidos o fijados a un sustrato que es un hidrogel.

La FIG. 12 muestra un ejemplo de disposición de puntos de captura con código de barras dentro de una matriz. De izquierda a derecha, la FIG. 12 muestra (L) un portaobjetos que incluye seis matrices con códigos de barras espaciales, (C) un esquema ampliado de una de las seis matrices con códigos de barras espaciales, que muestra una cuadrícula de puntos de captura con códigos de barras en relación con una muestra, y (R) un esquema ampliado de una sección de una matriz, que muestra la identificación específica de múltiples puntos de captura dentro de la matriz (marcados como ID578, ID579, ID580, etc.).

Como se usa en la presente, el término "matriz de perlas" se refiere a una matriz que incluye una pluralidad de perlas como puntos de captura en la matriz. En algunas realizaciones, las perlas se fijan a un sustrato (por ejemplo, a un chip). Por ejemplo, las perlas se pueden fijar opcionalmente a un sustrato tal como un portaobjetos de microscopio y en las proximidades de una muestra (por ejemplo, una sección de tejido que incluya células). Las perlas también se pueden suspender en una solución y depositar sobre una superficie (por ejemplo, una membrana, una sección de tejido o un sustrato (por ejemplo, un portaobjetos de microscopio)).

Los ejemplos de matrices de perlas sobre o dentro de un sustrato incluyen perlas situadas en pocillos tales como la matriz BeadChip (disponible en Illumina Inc., San Diego, CA), matrices utilizadas en plataformas de secuenciación de 454 LifeSciences (una filial de Roche, Basilea, Suiza), y matrices utilizadas en plataformas de secuenciación de Ion Torrent (una filial de Life Technologies, Carlsbad, CA). Los ejemplos de matrices de perlas se describen, por ejemplo, en las Patentes U.S. Nros 6.266.459, 6.355.431; 6.770.441; 6.859.570; 6.210.891; 6.258.568; y 6.274.320; las Publicaciones de solicitud de patente U.S. Nros 2009/0026082; 2009/0127589; 2010/0137143; y 2010/0282617; y las Publicaciones de solicitud de patente PCT N.º WO 00/063437 y WO 2016/162309.

(i) Matrices para captura de analitos

En algunas realizaciones, algunos o todos los puntos de captura de una matriz incluyen una sonda de captura. En algunas realizaciones, una matriz puede incluir una sonda de captura unida directa o indirectamente al sustrato.

La sonda de captura incluye un dominio de captura (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos) que se puede unir específicamente (por ejemplo, hibridarse) con un analito diana (por ejemplo, ARNm, ADN o proteína) dentro de una muestra. En algunas realizaciones, la unión de la sonda de captura a la diana (por ejemplo, hibridación) se detecta y cuantifica mediante la detección de una señal visual, por ejemplo, un fluoróforo, un metal pesado (por ejemplo, ion plata) o una marca quimioluminiscente, que se ha incorporado a la diana. En algunas realizaciones, la intensidad de la señal visual se correlaciona con la abundancia relativa de cada analito en la muestra. Dado que una matriz puede contener miles o millones de sondas de captura (o más), una matriz de puntos de captura con sondas de captura puede interrogar a muchos analitos en paralelo.

En algunas realizaciones, un sustrato incluye una o más sondas de captura que están diseñadas para capturar analitos de uno o más organismos. En un ejemplo no limitante, un sustrato puede contener una o más sondas de captura diseñadas para capturar ARNm de un organismo (por ejemplo, un ser humano) y una o más sondas de captura diseñadas para capturar ADN de un segundo organismo (por ejemplo, una bacteria).

- 5 Las sondas de captura se pueden unir a un sustrato o punto de captura mediante diversas técnicas. En algunas realizaciones, la sonda de captura se une directamente a un punto de captura que está fijado en una matriz. En algunas realizaciones, las sondas de captura se inmovilizan a un sustrato mediante inmovilización química. Por ejemplo, una inmovilización química puede tener lugar entre grupos funcionales del sustrato y elementos funcionales correspondientes en las sondas de captura. Los ejemplos de elementos funcionales correspondientes de las sondas de captura pueden ser un grupo químico inherente de la sonda de captura, por ejemplo, un grupo hidroxilo, o se puede introducir un elemento funcional en la sonda de captura. Un ejemplo de grupo funcional del sustrato es un grupo amina. En algunas realizaciones, la sonda de captura que se va a inmovilizar incluye un grupo amino funcional o se modifica químicamente para incluir un grupo amino funcional. Los medios y métodos para tal modificación química son bien conocidos en la técnica.
- 10 15 En algunas realizaciones, la sonda de captura es un ácido nucleico. En algunas realizaciones, la sonda de captura está inmovilizada en el punto de captura o el sustrato por medio de su extremo 5'. En algunas realizaciones, la sonda de captura está inmovilizada en un punto de captura o un sustrato por medio de su extremo 5' e incluye del extremo 5' a 3': uno o más códigos de barra (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI) y uno o más dominios de captura. En algunas realizaciones, la sonda de captura está inmovilizada en un punto de captura por medio de su extremo 5' e incluye del extremo 5' a 3': un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial o un UMI) y un dominio de captura. En algunas realizaciones, la sonda de captura está inmovilizada en un punto de captura o un sustrato por medio de su extremo 5' e incluye del extremo 5' a 3': un dominio de escisión, un dominio funcional, uno o más códigos de barra (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI), y un dominio de captura.
- 20 25 30 35 40 45 50 55 En algunas realizaciones, la sonda de captura está inmovilizada en un punto de captura o un sustrato por medio de su extremo 5' e incluye del extremo 5' a 3': un dominio de escisión, un dominio funcional, uno o más códigos de barra (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI), un segundo dominio funcional, y un dominio de captura. En algunas realizaciones, la sonda de captura está inmovilizada en un punto de captura o un sustrato por medio de su extremo 5' e incluye del extremo 5' a 3': un dominio de escisión, un dominio funcional, un código de barras espacial, un UMI, y un dominio de captura. En algunas realizaciones, la sonda de captura está inmovilizada en un punto de captura o un sustrato por medio de su extremo 5' y no incluye un código de barras espacial. En algunas realizaciones, la sonda de captura está inmovilizada en un punto de captura o un sustrato por medio de su extremo 5' y no incluye un UMI. En algunas realizaciones, la sonda de captura incluye una secuencia para iniciar una reacción de secuenciación.
- En algunas realizaciones, la sonda de captura está inmovilizada en un punto de captura o un sustrato por medio de su extremo 3'. En algunas realizaciones, la sonda de captura está inmovilizada en un punto de captura o un sustrato por medio de su extremo 3' e incluye desde el extremo 3' a 5': uno o más códigos de barra (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI) y uno o más dominios de captura. En algunas realizaciones, la sonda de captura está inmovilizada en un punto de captura o un sustrato por medio de su extremo 3' e incluye desde el extremo 3' a 5': un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial o un UMI) y un dominio de captura. En algunas realizaciones, la sonda de captura está inmovilizada en un punto de captura o un sustrato por medio de su extremo 3' e incluye desde el extremo 3' a 5': un dominio de escisión, un dominio funcional, uno o más códigos de barra (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI), y un dominio de captura. En algunas realizaciones, la sonda de captura está inmovilizada en un punto de captura o un sustrato por medio de su extremo 3' e incluye desde el extremo 3' a 5': un dominio de escisión, un dominio funcional, un código de barras espacial, un UMI, y un dominio de captura.
- La localización del grupo funcional dentro de la sonda de captura para inmovilizar se puede utilizar para controlar y moldear el comportamiento de unión y/o la orientación de la sonda de captura, por ejemplo, el grupo funcional se puede colocar en el extremo 5' o 3' de la sonda de captura o dentro de la secuencia de la sonda de captura. En algunas realizaciones, una sonda de captura puede incluir además un soporte (por ejemplo, un soporte unido a la sonda de captura, un soporte unido al punto de captura o un soporte unido al sustrato). Un soporte típico para una sonda de captura para inmovilizar incluye restos capaces de unirse a dichas sondas de captura, por ejemplo, a ácidos nucleicos functionalizados con aminas. Ejemplos de tales soportes son los soportes carboxílico, aldehído o epoxis.
- En algunas realizaciones, los sustratos en los que se pueden inmovilizar las sondas de captura se pueden activar químicamente, por ejemplo, mediante la activación de grupos funcionales, disponibles en el sustrato. El término "sustrato activado" se refiere a un material en el que se establecen o habilitan grupos funcionales químicos interactivos o reactivos mediante procedimientos de modificación química. Por ejemplo, un sustrato que incluye grupos carboxílico se puede activar antes de su uso. Además, ciertos sustratos contienen grupos funcionales que pueden reaccionar con restos específicos ya presentes en las sondas de captura.

- En algunas realizaciones, se utiliza un enlace covalente para acoplar directamente una sonda de captura a un sustrato. En algunas realizaciones, una sonda de captura se acopla indirectamente a un sustrato a través de un ligador que separa el "primer" nucleótido de la sonda de captura del soporte, es decir, un ligador químico. En algunas realizaciones, una sonda de captura no se une directamente a la matriz, sino que interactúa indirectamente, por ejemplo, mediante la unión a una molécula que a su vez se une directa o indirectamente a la matriz. En algunas realizaciones, la sonda de captura se une indirectamente a un sustrato (por ejemplo, a través de una solución que incluye un polímero).
- 5 En algunas realizaciones, cuando la sonda de captura se inmoviliza en el punto de captura de la matriz indirectamente, por ejemplo, mediante hibridación con una sonda de superficie capaz de unirse a la sonda de captura, la sonda de captura puede incluir además una secuencia corriente arriba (5' de la secuencia que hibrida con el ácido nucleico, por ejemplo, ARN de la muestra de tejido) que es capaz de hibridarse con el extremo 5' de la sonda de superficie. Solo, el dominio de captura de la sonda de captura se puede ver como un oligonucleótido de dominio de captura, que se puede usar en la síntesis de la sonda de captura en realizaciones en las que la sonda de captura se inmoviliza en la matriz indirectamente.
- 10 En algunas realizaciones, un sustrato se compone de un material o matriz inerte (por ejemplo, portaobjetos de vidrio) que ha sido funcionalizado por, por ejemplo, tratamiento con un material que comprende grupos reactivos que permiten la inmovilización de sondas de captura. Ver, por ejemplo, WO 2017/019456; Entre los ejemplos no limitantes se incluyen hidrogeles de poliacrilamida soportados sobre un sustrato inerte (por ejemplo, portaobjetos de vidrio; ver WO 2005/065814 y la Solicitud de patente U.S. Nº 2008/0280773).
- 15 En algunas realizaciones, las biomoléculas funcionalizadas (por ejemplo, sondas de captura) se inmovilizan en un sustrato funcionalizado mediante métodos covalentes. Los métodos para la unión covalente incluyen, por ejemplo, condensación de aminas y ésteres carboxílicos activados (por ejemplo, ésteres de N-hidroxisuccinimida); condensación de amina y aldehídos en condiciones de aminación reductora; y reacciones de cicloadición tales como la reacción de Diels-Alder [4+2], reacciones de cicloadición 1,3-dipolar y reacciones de cicloadición [2+2]. Los métodos para la unión covalente también incluyen, por ejemplo, reacciones de química de clic, incluidas las reacciones de cicloadición [3+2] (por ejemplo, reacción de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen y la cicloadición azida-alquino catalizada por cobre(I) (CuAAC)); reacciones tiol-eno; reacción de Diels-Alder [4+2] y las reacciones de cicloadición [2+2]. Alder y la reacción de Diels-Alder de demanda inversa de electrones; cicloadición [4+1] de isonitrilos y tetrazinas; y la apertura de anillo nucleófila de pequeños carbociclos (por ejemplo, la apertura de epóxidos con amino oligonucleótidos). Los métodos para la unión covalente también incluyen, por ejemplo, maleimidas y tioles; y oligonucleótidos funcionalizados con ésteres de para-nitrofenilo y sustrato funcionalizado con polilisina. Los métodos para la unión covalente también incluyen, por ejemplo, reacciones de disulfuro; reacciones radicales (ver, por ejemplo, la Patente U.S Nº 5 919 626)-y sustrato funcionalizado con hidrazida (por ejemplo, donde el grupo funcional hidrazida está unido directa o indirectamente al sustrato) y oligonucleótidos funcionalizados con aldehído (ver, por ejemplo, Yershov *et al.* (1996) Proc. Nati. Acad. Sci. USA 93, **4913-4918**).
- 20 En algunas realizaciones, las biomoléculas funcionalizadas (por ejemplo, sondas de captura) se inmovilizan en un sustrato funcionalizado mediante métodos covalentes fotoquímicos. Los métodos de unión covalente fotoquímica incluyen, por ejemplo, la inmovilización de oligonucleótidos conjugados con antraquinona (ver, por ejemplo, Koch *et al.*, 2000, Bioconjugate Chem. 11, 474-483).
- 25 En algunas realizaciones, las biomoléculas funcionalizadas (por ejemplo, sondas de captura) se inmovilizan en un sustrato funcionalizado utilizando métodos no covalentes. Los métodos para la unión no covalente incluyen, por ejemplo, oligonucleótidos funcionalizados con biotina y sustratos tratados con estreptavidina (ver, por ejemplo, Holmstrom *et al.* (1993) Analytical Biochemistry 209, 278-283 y Gilles *et al.* (1999) Nature Biotechnology 17, 365-370).
- 30 En algunas realizaciones, las biomoléculas funcionalizadas (por ejemplo, sondas de captura) se inmovilizan en un sustrato funcionalizado mediante métodos covalentes fotoquímicos. Los métodos de unión covalente fotoquímica incluyen, por ejemplo, la inmovilización de oligonucleótidos conjugados con antraquinona (ver, por ejemplo, Koch *et al.*, 2000, Bioconjugate Chem. 11, 474-483).
- 35 En algunas realizaciones, las biomoléculas funcionalizadas (por ejemplo, sondas de captura) se inmovilizan en un sustrato funcionalizado mediante métodos covalentes fotoquímicos. Los métodos de unión covalente fotoquímica incluyen, por ejemplo, la inmovilización de oligonucleótidos conjugados con antraquinona (ver, por ejemplo, Koch *et al.*, 2000, Bioconjugate Chem. 11, 474-483).
- 40 En algunas realizaciones, las biomoléculas funcionalizadas (por ejemplo, sondas de captura) se inmovilizan en un sustrato funcionalizado utilizando métodos no covalentes. Los métodos para la unión no covalente incluyen, por ejemplo, oligonucleótidos funcionalizados con biotina y sustratos tratados con estreptavidina (ver, por ejemplo, Holmstrom *et al.* (1993) Analytical Biochemistry 209, 278-283 y Gilles *et al.* (1999) Nature Biotechnology 17, 365-370).
- 45 En algunas realizaciones, un oligonucleótido (*por ejemplo*, una sonda de captura) se puede unir a un sustrato o punto de captura de acuerdo con los métodos conocidos expuestos en las Patentes U.S. Nros. 6.737.236, 7.259.258, 7.375.234, 7.427.678, 5.610.287, 5.807.522, 5.837.860, y 5.472.881; Publicación de la solicitud de patente U.S. Nros. 2008/0280773 y 2011/0059865; Shalon *et al.* (1996) Genome Research, 639-645; Rogers *et al.* (1999) Analytical Biochemistry 266, 23-30; Stimpson *et al.* (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 6379-6383; Beattie *et al.* (1995) Clin. Chem. 45, 700-706; Lamture *et al.* (1994) Nucleic Acids Research 22, 2121-2125; Beier *et al.* (1999) Nucleic Acids Research 27, 1970-1977; Joos *et al.* (1997) Analytical Biochemistry 247, 96-101; Nikiforov *et al.* (1995) Analytical Biochemistry 227, 201-209; Timofeev *et al.* (1996) Nucleic Acids Research 24, 3142-3148; Chrisey *et al.* (1996) Nucleic Acids Research 24, 3031-3039; Guo *et al.* (1994) Nucleic Acids Research 22, 5456-5465; Running and Urdea (1990) BioTechniques 8, 276-279; Fahy *et al.* (1993) Nucleic Acids Research 21, 1819-1826; Zhang *et al.* (1991) 19, 3929-3933; y Rogers *et al.* (1997) Gene Therapy 4, 1387-1392.
- 50 En algunas realizaciones, la superficie de un sustrato se recubre con un recubrimiento permisivo celular para facilitar la adherencia de células vivas. Un "recubrimiento permisivo celular" es un recubrimiento que permite o ayuda a las

células a mantener la viabilidad celular (por ejemplo, permanecer viables) en el sustrato. Por ejemplo, un recubrimiento permisivo celular puede mejorar la fijación celular, el crecimiento celular y/o la diferenciación celular, por ejemplo, un recubrimiento permisivo celular puede proporcionar nutrientes a las células vivas. Un recubrimiento permisivo celular puede incluir un material biológico y/o un material sintético. Entre los ejemplos no limitantes de un recubrimiento permisivo celular se incluyen los recubrimientos que presentan uno o más componentes de la matriz extracelular (ECM) (por ejemplo, proteoglicanos y proteínas fibrosas como colágeno, elastina, fibronectina y laminina), poli-lisina, poli-L-ornitina y/o una silicona biocompatible (por ejemplo, CYTOSOFT®). Por ejemplo, un recubrimiento permisivo celular que incluye uno o más componentes de matriz extracelular puede incluir colágeno de tipo 1, colágeno de tipo 11, colágeno de recubrimiento permisivo celular incluye una preparación de membrana basal solubilizada extraída del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) (por ejemplo, MATRIGEL®). En algunas realizaciones, el recubrimiento permisivo celular incluye colágeno.

Un "recubrimiento condicionalmente removible" es un recubrimiento que se puede retirar de la superficie de un sustrato después de la aplicación de un agente de liberación. En algunas realizaciones, 5 un recubrimiento condicionalmente removible que incluye un hidrogel como se describe con más detalle en la Solicitud 10 de patente U.S. Número 16/992,569, titulada "Systems and Methods for Using the Spatial Distribution of Haplotypes to Determine a Biological Condition" presentada el 13 de agosto de 2020.

(ii) Generación de sondas de captura en un formato de matriz.

Las matrices se pueden preparar por diversos métodos. En algunas realizaciones, las matrices se preparan mediante 20 la síntesis (por ejemplo, síntesis *in situ*) de oligonucleótidos en la matriz, o mediante impresión por chorro o litografía. Por ejemplo, la síntesis dirigida por luz de oligonucleótidos de ADN de alta densidad se puede lograr mediante fotolitografía o síntesis de ADN en fase sólida. Para implementar la síntesis fotolitográfica, los ligadores sintéticos 25 modificados con grupos protectores fotoquímicos se pueden unir a un sustrato y los grupos protectores fotoquímicos se pueden modificar usando una máscara fotolitográfica (aplicada a áreas específicas del sustrato) y luz, de este modo se produce una matriz que tiene foto desprotección localizada. Muchos de estos métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Miller et al., 2009, "Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology." Clinical microbiology reviews 22,4, 611- 633; US201314111482A; US9593365B2; US2019203275; y WO2018091676.

(1) Punteado o impresión

En algunas realizaciones, las matrices se "puntean" o "imprimen" con oligonucleótidos y estos oligonucleótidos (por 30 ejemplo, sondas de captura) luego se unen al sustrato. Los oligonucleótidos se pueden aplicar mediante impresión sin contacto o por contacto. Una impresora sin contacto puede utilizar el mismo método que las impresoras de computadora (por ejemplo, chorro de burbujas o chorro de tinta) para expulsar pequeñas gotas de solución de sonda sobre el sustrato. La impresora especializada de chorro de tinta puede expulsar gotitas de volumen de nanolitro a picolitro de solución de oligonucleótidos, en lugar de tinta, sobre el sustrato. En la impresión por contacto, cada aguja 35 de impresión aplica directamente la solución de oligonucleótidos en un lugar específico de la superficie. Los oligonucleótidos luego se pueden unir a la superficie del sustrato mediante la interacción electrostática de la carga negativa del esqueleto de fosfato del ADN con un recubrimiento cargado positivamente de la superficie del sustrato o mediante enlaces covalentes reticulados por UV entre las bases de timidina del ADN y los grupos amina de la superficie tratada del sustrato. En algunas realizaciones, el sustrato es un portaobjetos de vidrio. En algunas realizaciones, los 40 oligonucleótidos (por ejemplo, sondas de captura) se unen al sustrato mediante un enlace covalente a una matriz química, por ejemplo, epoxi-silano, amino-silano, lisina, poliacrilamida, etc.

(2) Síntesis *in situ*

Las matrices también se pueden preparar mediante síntesis *in situ*. En algunas realizaciones, estas matrices se pueden preparar mediante fotolitografía. La fotolitografía se basa normalmente en el enmascaramiento UV y la síntesis 45 química combinatoria dirigida por luz sobre un sustrato para sintetizar selectivamente sondas directamente sobre la superficie de la matriz, un nucleótido a la vez por punto para muchos puntos simultáneamente. En algunas realizaciones, un sustrato contiene moléculas ligadoras covalentes que tienen un grupo protector en el extremo libre que puede ser eliminado por la luz. La luz UV se dirige a través de una máscara fotolitográfica para desproteger y activar sitios seleccionados con grupos hidroxilo que inician el acoplamiento con nucleótidos protegidos entrantes que 50 se unen a los sitios activados. La máscara está diseñada de tal manera que se pueden seleccionar los sitios de exposición, y así especificar las coordenadas en la matriz donde se puede unir cada nucleótido. El proceso se puede repetir, se aplica una nueva máscara activando diferentes conjuntos de sitios y acoplando diferentes bases, lo que permite construir oligonucleótidos arbitrarios en cada sitio. Este proceso se puede utilizar para sintetizar cientos de miles de oligonucleótidos diferentes. En algunas realizaciones, se puede utilizar la tecnología de sintetizador de matriz

sin máscara, que utiliza una matriz de microespejos programables para crear máscaras digitales que reflejan el patrón deseado de luz UV para desproteger los elementos característicos.

En algunas realizaciones, el proceso de impresión de chorro de tinta también se puede utilizar para la síntesis *in situ* de oligonucleótidos. Los diferentes precursores de nucleótidos más el catalizador se pueden imprimir en el sustrato, y 5 a continuación se combinan con etapas de acoplamiento y desprotección. Este método se basa en la impresión de volúmenes de picolitros de nucleótidos en la superficie de la matriz en rondas repetidas de impresión base por base que extiende la longitud de las sondas de oligonucleótidos en la matriz.

(3) Campos eléctricos

Las matrices también se pueden preparar mediante hibridación activa a través de campos eléctricos para controlar el 10 transporte de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos cargados negativamente se pueden transportar a sitios específicos, o puntos de captura, cuando se aplica una corriente positiva a uno o más sitios de prueba de la matriz. La superficie de la matriz puede contener una molécula de unión, por ejemplo, estreptavidina, que permite la formación 15 de enlaces (por ejemplo, enlaces estreptavidina-biotina) una vez que las sondas biotiniladas dirigidas electrónicamente alcanzan su ubicación objetivo. A continuación, se retira la corriente positiva de los puntos de captura activos y se 20 pueden activar nuevos sitios de prueba mediante la aplicación dirigida de una corriente positiva. El proceso se repite hasta que se cubren todos los sitios de la matriz.

Una matriz para el análisis espacial se puede generar mediante diversos métodos, tal como se describe en la presente. En algunas realizaciones, la matriz tiene una pluralidad de sondas de captura que comprenden códigos de barras espaciales. Se pueden determinar estos códigos de barras espaciales y su relación con las ubicaciones en la matriz. 20 En algunos casos, dicha información está fácilmente disponible, porque los oligonucleótidos están punteados, impresos o sintetizados en la matriz con un patrón predeterminado. En algunos casos, el código de barras espacial se puede decodificar mediante métodos descriptos en la presente, por ejemplo, mediante secuenciación *in situ*, mediante diversas marcas asociadas con los códigos de barras espaciales, etc. En algunas realizaciones, una matriz se puede 25 utilizar como molde para generar una matriz hija. Así, el código de barras espacial se puede transferir a la matriz hija con un patrón conocido.

(4) Ligación

En algunas realizaciones, una matriz que comprende sondas con código de barras se puede generar mediante la ligación de una pluralidad de oligonucleótidos. En algunos casos, un oligonucleótido de la pluralidad contiene una 30 porción de un código de barras, y el código de barras completo se genera después de la ligación de la pluralidad de oligonucleótidos. Por ejemplo, un primer oligonucleótido que contiene una primera porción de un código de barras se puede unir a un sustrato (por ejemplo, utilizando cualquiera de los métodos de fijación de un oligonucleótido a un sustrato descriptos en la presente), y un segundo oligonucleótido que contiene una segunda porción del código de 35 barras se puede ligar al primer oligonucleótido para generar un código de barras completo. Se pueden utilizar diferentes combinaciones de la primera, segunda y cualquier porción adicional de un código de barras para aumentar la diversidad de los códigos de barras. En los casos en los que el segundo oligonucleótido también está unido al sustrato antes de la ligación, el primer y/o el segundo oligonucleótido pueden estar unidos al sustrato a través de un 40 ligador superficial que contiene un sitio de escisión. Después de la ligación, el oligonucleótido ligado se linealiza por escisión en el sitio de escisión.

Para aumentar la diversidad de los códigos de barras, una pluralidad de segundos oligonucleótidos que comprenden dos o más secuencias de código de barras diferentes se pueden ligar a una pluralidad de primeros oligonucleótidos que comprenden la misma secuencia de código de barras, de este modo se generan dos o más especies diferentes de códigos de barras. Para obtener una ligación selectiva, un primer oligonucleótido unido a un sustrato que contiene una primera porción de un código de barras se puede proteger inicialmente con un grupo protector (por ejemplo, un grupo protector fotoescindible), y el grupo protector se puede eliminar antes de la ligación entre el primer y el segundo 45 oligonucleótido. En los casos en que las sondas con código de barras de una matriz se generan mediante la ligación de dos o más oligonucleótidos, se puede aplicar un gradiente de concentración de los oligonucleótidos a un sustrato de manera que se incorporen diferentes combinaciones de los oligonucleótidos a una sonda con código de barras de acuerdo con su ubicación en el sustrato.

Las sondas se pueden generar mediante la ligación directa de los oligonucleótidos adicionales sobre los 50 oligonucleótidos existentes mediante un oligonucleótido puente. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de una matriz existente pueden incluir una secuencia de reconocimiento que se puede hibridar con un oligonucleótido puente. La secuencia de reconocimiento puede estar en el extremo 5' libre o en el extremo 3' libre de un oligonucleótido de la matriz existente. Las secuencias de reconocimiento útiles para los métodos de la presente descripción pueden no 55 contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción o estructuras secundarias (por ejemplo, horquillas), y pueden incluir altos contenidos de nucleótidos de guanina y citosina.

(5) Polimerasas

Las sondas con código de barras en una matriz también se pueden generar mediante la adición de nucleótidos individuales a oligonucleótidos existentes en una matriz, por ejemplo, utilizando polimerasas que funcionen de manera independiente del molde. Se pueden añadir nucleótidos individuales a oligonucleótidos existentes en un gradiente de concentración, así se generan sondas de longitud variable, de acuerdo con la ubicación de las sondas en la matriz.

(6) Modificación de las sondas de captura existentes

Las matrices también se pueden preparar mediante la modificación de las matrices existentes, por ejemplo, mediante la modificación de los oligonucleótidos unidos a las matrices. Por ejemplo, se pueden generar sondas en una matriz que comprenda oligonucleótidos que estén unidos a la matriz por el extremo 3' y tengan un extremo 5' libre. Los oligonucleótidos se pueden sintetizar *in situ*, y pueden incluir un código de barras. La longitud de los oligonucleótidos puede ser menor de 50 nucleótidos (nts) (por ejemplo, menor de 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, o 10 nts). Para generar sondas usando estos oligonucleótidos, se puede usar un cebador complementario con una porción de un oligonucleótido (por ejemplo, una secuencia constante compartida por los oligonucleótidos) para hibridar con el oligonucleótido y extenderse (usando el oligonucleótido como molde) para formar un dúplex y crear una proyección 3'. La proyección 3' permite añadir nucleótidos u oligonucleótidos adicionales al dúplex. Una sonda de captura se puede generar, por ejemplo, mediante la adición de uno o más oligonucleótidos al extremo de la proyección 3' (por ejemplo, mediante ligación mediada por oligonucleótidos puente), donde los oligonucleótidos añadidos pueden incluir la secuencia o una porción de la secuencia de un dominio de captura.

En algunas realizaciones, las matrices se preparan de acuerdo con los métodos expuestos en WO 2012/140224, WO 2014/060483, WO 2016/162309, WO 2017/019456, WO 2018/091676 y WO 2012/140224, y la solicitud de patente U.S. N.º 2018/0245142.

En algunas realizaciones, un punto de captura de la matriz incluye una perla. En algunas realizaciones, dos o más perlas se dispersan sobre un sustrato para crear una matriz, donde cada perla es un punto de captura en la matriz. Opcionalmente, las perlas se pueden dispersar en pocillos en un sustrato, por ejemplo, de tal manera que solo se aloja una perla por pocillo.

Otros detalles y realizaciones no limitantes relacionados con perlas, matrices de perlas, propiedades de las perlas (por ejemplo, estructura, materiales, construcción, reticulación, degradación, reactivos y/o propiedades ópticas), y para la unión covalente y no covalente de perlas a sustratos se describen en la Solicitud de patente U.S Número 16/992,569, la publicación de patente U.S N.º 20110059865A1, la solicitud de patente provisional US N.º 62/839,346, la patente U.S N.º 9,012,022, y la publicación PCT 202020176788A 1 titulada "Profiling of biological analytes with spatially barcoded oligonucleotide arrays".

(i) Tamaños del puente de captura

Los puntos de captura de una matriz pueden tener una variedad de tamaños. En algunas realizaciones, un punto de captura de una matriz tiene un diámetro o dimensión máxima entre 1 µm a 100 µm. En algunas realizaciones, un punto de captura de una matriz tiene un diámetro o dimensión máxima entre 1 µm a 10 µm, 1 µm a 20 µm, 1 µm a 30 µm, 1 µm a 40 µm, 1 µm a 50 µm, 1 µm a 60 µm, 1 µm a 70 µm, 1 µm a 80 µm, 1 µm a 90 µm, 90 µm a 100 µm, 80 µm a 100 µm, 70 µm a 100 µm, 60 µm a 100 µm, 50 µm a 100 µm, 40 µm a 100 µm, 30 µm a 100 µm, 20 µm a 100 µm, o 10 µm a 100 µm. En algunas realizaciones, el punto de captura tiene un diámetro o dimensión máxima entre 30 µm a 100 µm, 40 µm a 90 µm, 50 µm a 80 µm, 60 µm a 70 µm, o cualquier rango dentro de los subrangos indicados. En algunas realizaciones, el punto de captura tiene un diámetro o dimensión máxima no mayor de 95 µm, 90 µm, 85 µm, 80 µm, 75 µm, 70 µm, 65 µm, 60 µm, 55 µm, 50 µm, 45 µm, 40 µm, 35 µm, 30 µm, 25 µm, 20 µm, 15 µm, 14 µm, 13 µm, 12 µm, 11 µm, 10 µm, 9 µm, 8 µm, 7 µm, 6 µm, 5 µm, 4 µm, 3 µm, 2 µm, o 1 µm. En algunas realizaciones, el punto de captura tiene un diámetro o dimensión máxima de aproximadamente 65 µm.

En algunas realizaciones, una pluralidad de puntos de captura tiene un diámetro medio o una dimensión máxima media entre 1 µm a 100 µm. Por ejemplo, entre 1 µm a 10 µm, 1 µm a 20 µm, 1 µm a 30 µm, 1 µm a 40 µm, 1 µm a 50 µm, 1 µm a 60 µm, 1 µm a 70 µm, 1 µm a 80 µm, 1 µm a 90 µm, 90 µm a 100 µm, 80 µm a 100 µm, 70 µm a 100 µm, 60 µm a 100 µm, 50 µm a 100 µm, 40 µm a 100 µm, 30 µm a 100 µm, 20 µm a 100 µm, o 10 µm a 100 µm. En algunas realizaciones, la pluralidad de puntos de captura tiene un diámetro medio o una dimensión máxima media entre 30 µm a 100 µm, 40 µm a 90 µm, 50 µm a 80 µm, 60 µm a 70 µm, o cualquier rango dentro de los subrangos descriptos. En algunas realizaciones, la pluralidad de puntos de captura tiene un diámetro medio o una dimensión máxima media no mayor de 95 µm, 90 µm, 85 µm, 80 µm, 75 µm, 70 µm, 65 µm, 60 µm, 55 µm, 50 µm, 45 µm, 40 µm, 35 µm, 30 µm, 25 µm, 20 µm, 15 µm, 14 µm, 13 µm, 12 µm, 11 µm, 10 µm, 9 µm, 8 µm, 7 µm, 6 µm, 5 µm, 4 µm, 3 µm, 2 µm, o 1 µm. En algunas realizaciones, la pluralidad de puntos de captura tiene un diámetro promedio medio o una dimensión máxima media de aproximadamente 65 µm.

En algunas realizaciones, donde el punto de captura es una perla, la perla puede tener un diámetro o dimensión máxima no mayor de 100 μm (por ejemplo, no mayor de 95 μm , 90 μm , 85 μm , 80 μm , 75 μm , 70 μm , 65 μm , 60 μm , 55 μm , 50 μm , 45 μm , 40 μm , 35 μm , 30 μm , 25 μm , 20 μm , 15 μm , 14 μm , 13 μm , 12 μm , 11 μm , 10 μm , 9 μm , 8 μm , 7 μm , 6 μm , 5 μm , 4 μm , 3 μm , 2 μm , o 1 μm).

- 5 En algunas realizaciones, una pluralidad de perlas tiene un diámetro promedio no mayor de 100 μm . En algunas realizaciones, una pluralidad de perlas tiene un diámetro promedio o dimensión máxima no mayor de 95 μm , 90 μm , 85 μm , 80 μm , 75 μm , 70 μm , 65 μm , 60 μm , 55 μm , 50 μm , 45 μm , 40 μm , 35 μm , 30 μm , 25 μm , 20 μm , 15 μm , 14 μm , 13 μm , 12 μm , 11 μm , 10 μm , 9 μm , 8 μm , 7 μm , 6 μm , 5 μm , 4 μm , 3 μm , 2 μm , o 1 μm .

10 En algunas realizaciones, el volumen de la perla puede ser al menos aproximadamente 1 μm^3 , por ejemplo, al menos 1 μm^3 , 2 μm^3 , 3 μm^3 , 4 μm^3 , 5 μm^3 , 6 μm^3 , 7 μm^3 , 8 μm^3 , 9 μm^3 , 10 μm^3 , 12 μm^3 , 14 μm^3 , 16 μm^3 , 18 μm^3 , 20 μm^3 , 25 μm^3 , 30 μm^3 , 35 μm^3 , 40 μm^3 , 45 μm^3 , 50 μm^3 , 55 μm^3 , 60 μm^3 , 65 μm^3 , 70 μm^3 , 75 μm^3 , 80 μm^3 , 85 μm^3 , 90 μm^3 , 95 μm^3 , 100 μm^3 , 125 μm^3 , 150 μm^3 , 175 μm^3 , 200 μm^3 , 250 μm^3 , 300 μm^3 , 350 μm^3 , 400 μm^3 , 450 μm^3 , 500 μm^3 , 550 μm^3 , 600 μm^3 , 650 μm^3 , 700 μm^3 , 750 μm^3 , 800 μm^3 , 850 μm^3 , 900 μm^3 , 950 μm^3 , 1000 μm^3 , 1200 μm^3 , 1400 μm^3 , 1600 μm^3 , 1800 μm^3 , 2000 μm^3 , 2200 μm^3 , 2400 μm^3 , 2600 μm^3 , 2800 μm^3 , 3000 μm^3 , o mayor.

- 15 En algunas realizaciones, la perla puede tener un volumen de entre aproximadamente 1 μm^3 y 100 μm^3 , tal como entre aproximadamente 1 μm^3 y 10 μm^3 , entre aproximadamente 10 μm^3 y 50 μm^3 , o entre aproximadamente 50 μm^3 y 100 μm^3 . En algunas realizaciones, la perla puede incluir un volumen de entre aproximadamente 100 μm^3 y 1000 μm^3 , tal como entre aproximadamente 100 μm^3 y 500 μm^3 o entre aproximadamente 500 μm^3 y 1000 μm^3 . En algunas realizaciones, la perla puede incluir un volumen entre aproximadamente 1000 μm^3 y 3000 μm^3 , tal como entre 20 aproximadamente 1000 μm^3 y 2000 μm^3 o entre aproximadamente 2000 μm^3 y 3000 μm^3 . En algunas realizaciones, la perla puede incluir un volumen entre aproximadamente 1 μm^3 y 3000 μm^3 , tal como entre aproximadamente 1 μm^3 y 2000 μm^3 , entre aproximadamente 1 μm^3 y 1000 μm^3 , entre aproximadamente 1 μm^3 y 500 μm^3 , o entre aproximadamente 1 μm^3 y 250 μm^3 .

25 El punto de captura puede incluir una o más secciones transversales que pueden ser iguales o diferentes. En algunas realizaciones, el punto de captura puede tener una primera sección transversal que es diferente de una segunda sección transversal. El punto de captura puede tener una primera sección transversal que es al menos aproximadamente 0.0001 micrómetro, 0,001 micrómetro, 0,01 micrómetro, 0,1 micrómetro, o 1 micrómetro. En algunas realizaciones, el punto de captura puede incluir una sección transversal (*por ejemplo*, una primera sección transversal) de al menos aproximadamente 1 micrómetro (μm), 2 μm , 3 μm , 4 μm , 5 μm , 6 μm , 7 μm , 8 μm , 9 μm , 10 μm , 11 μm , 12 μm , 13 μm , 14 μm , 15 μm , 16 μm , 17 μm , 18 μm , 19 μm , 20 μm , 25 μm , 30 μm , 35 μm , 40 μm , 45 μm , 50 μm , 55 μm , 60 μm , 65 μm , 70 μm , 75 μm , 80 μm , 85 μm , 90 μm , 100 μm , 120 μm , 140 μm , 160 μm , 180 μm , 200 μm , 250 μm , 300 μm , 350 μm , 400 μm , 450 μm , 500 μm , 550 μm , 600 μm , 650 μm , 700 μm , 750 μm , 800 μm , 850 μm , 900 μm , 950 μm , 1 milímetro (mm), o mayor. En algunas realizaciones, el punto de captura puede incluir una sección transversal (*por ejemplo*, una primera sección transversal) de entre aproximadamente 1 μm y 500 μm , tal como entre 30 aproximadamente 1 μm y 100 μm , entre aproximadamente 100 μm y 200 μm , entre aproximadamente 200 μm y 300 μm , entre aproximadamente 300 μm y 400 μm , o entre aproximadamente 400 μm y 500 μm . Por ejemplo, el punto de captura puede incluir una sección transversal (*por ejemplo*, una primera sección transversal) de entre aproximadamente 1 μm y 100 μm . En algunas realizaciones, el punto de captura puede tener una segunda sección transversal que es al menos aproximadamente 1 μm . Por ejemplo, el punto de captura puede incluir una segunda sección transversal de al menos aproximadamente 1 micrómetro (μm), 2 μm , 3 μm , 4 μm , 5 μm , 6 μm , 7 μm , 8 μm , 9 μm , 10 μm , 11 μm , 12 μm , 13 μm , 14 μm , 15 μm , 16 μm , 17 μm , 18 μm , 19 μm , 20 μm , 25 μm , 30 μm , 35 μm , 40 μm , 45 μm , 50 μm , 55 μm , 60 μm , 65 μm , 70 μm , 75 μm , 80 μm , 85 μm , 90 μm , 100 μm , 120 μm , 140 μm , 160 μm , 180 μm , 200 μm , 250 μm , 300 μm , 350 μm , 400 μm , 450 μm , 500 μm , 550 μm , 600 μm , 650 μm , 700 μm , 750 μm , 800 μm , 850 μm , 900 μm , 950 μm , 1 milímetro (mm), o mayor. En algunas realizaciones, el punto de captura puede incluir una segunda sección transversal de entre aproximadamente 1 μm y 500 μm , tal como entre 40 aproximadamente 1 μm y 100 μm , entre aproximadamente 100 μm y 200 μm , entre aproximadamente 200 μm y 300 μm , entre aproximadamente 300 μm y 400 μm , o entre aproximadamente 400 μm y 500 μm . Por ejemplo, el punto de captura puede incluir una segunda sección transversal de entre aproximadamente 1 μm y 100 μm .

45 En algunas realizaciones, los puntos de captura puede ser de una escala nanométrica (*por ejemplo*, los puntos de captura puede tener un diámetro o dimensión transversal máxima de aproximadamente 100 nanómetros (nm) a aproximadamente 900 nanómetros (nm) (*por ejemplo*, 850 nm o menos, 800 nm o menos, 750 nm o menos, 700 nm o menos, 650 nm o menos, 600 nm o menos, 550 nm o menos, 500 nm o menos, 450 nm o menos, 400 nm o menos, 350 nm o menos, 300 nm o menos, 250 nm o menos, 200 nm o menos, 150 nm o menos). Una pluralidad de puntos de captura puede tener un diámetro promedio o dimensión media transversal máxima de aproximadamente 100 nanómetros (nm) a aproximadamente 900 nanómetros (nm) (*por ejemplo*, 850 nm o menos, 800 nm o menos, 750 nm o menos, 700 nm o menos, 650 nm o menos, 600 nm o menos, 550 nm o menos, 500 nm o menos, 450 nm o menos, 400 nm o menos, 350 nm o menos, 300 nm o menos, 250 nm o menos, 200 nm o menos, 150 nm o menos). En 50 55

algunas realizaciones, un punto de captura tiene un diámetro o tamaño que es aproximadamente del tamaño de una célula única (por ejemplo, una célula única bajo evaluación).

Los puntos de captura pueden ser de tamaño uniforme o heterogéneo. "Polidispersidad" generalmente se refiere a la heterogeneidad de tamaños de moléculas o partículas. La polidispersidad (POI) se puede calcular utilizando la ecuación $POI = M_w/M_n$, donde M_w es la masa molar media ponderada y M_n es la masa molar media numérica. En ciertas realizaciones, los puntos de captura se pueden proporcionar como una población o pluralidad de puntos de captura que tienen una distribución de tamaños relativamente monodispersa. Cuando puede ser deseable proporcionar cantidades relativamente constantes de reactivos, el mantenimiento de características relativamente constantes del punto de captura, tal como el tamaño, puede contribuir a la consistencia general.

- 5 10 En algunas realizaciones, las perlas proporcionadas en la presente pueden tener distribuciones de tamaño que tienen un coeficiente de variación en sus dimensiones transversales de menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20%, menos de 15%, menos de 10%, menos de 5%, o inferior. En algunas realizaciones, una pluralidad de perlas proporcionadas en la presente tiene un índice de polidispersidad de menos de 50%, menos de 45%, menos de 40%, menos de 35%, menos de 30%, menos de 25%, menos de 20%, menos de 15%, menos de 10%, menos de 5%, o inferior.
- 15

(ii) Densidad del punto de captura

En algunas realizaciones, una matriz (por ejemplo, matriz bidimensional) comprende una pluralidad de número de puntos de captura. En algunas realizaciones, una matriz incluye entre 4000 y 10.000 puntos de captura, o cualquier rango dentro de 4000 a 6000 puntos de captura. Por ejemplo, una matriz incluye entre 4.000 a 4,400 puntos de captura, 20 20 25 30 35 40 4.000 a 4,800 puntos de captura, 4.000 a 5,200 puntos de captura, 4.000 a 5,600 puntos de captura, 5,600 a 6.000 puntos de captura, 5,200 a 6.000 puntos de captura, 4,800 a 6.000 puntos de captura, o 4,400 a 6.000 puntos de captura. En algunas realizaciones, la matriz incluye entre 4,100 y 5,900 puntos de captura, entre 4,200 y 5,800 puntos de captura, entre 4,300 y 5,700 puntos de captura, entre 4,400 y 5,600 puntos de captura, entre 4,500 y 5,500 puntos de captura, entre 4,600 y 5,400 puntos de captura, entre 4,700 y 5,300 puntos de captura, entre 4,800 y 5,200 puntos de captura, entre 4,900 y 5,100 puntos de captura, o cualquier rango dentro de los subrangos indicados. Por ejemplo, la matriz puede incluir aproximadamente 4.000 puntos de captura, aproximadamente 4,200 punto de captura, aproximadamente 4,400 puntos de captura, aproximadamente 4,800 puntos de captura, aproximadamente 5.000 puntos de captura, aproximadamente 5,200 puntos de captura, aproximadamente 5,400 puntos de captura, aproximadamente 5,600 puntos de captura, o aproximadamente 6.000 puntos de captura. En algunas realizaciones, la matriz comprende al menos 4.000 puntos de captura. En algunas realizaciones, la matriz incluye aproximadamente 5.000 puntos de captura.

En algunas realizaciones, los puntos de captura de la matriz se pueden disponer en un patrón. En algunas realizaciones, el centro de un punto de captura de una matriz es entre 1 μm y 100 μm desde el centro de otro punto de captura de la matriz. Por ejemplo, el centro de un punto de captura está entre 20 μm a 40 μm , 20 μm a 60 μm , 20 μm a 80 μm , 80 μm a 100 μm , 60 μm a 100 μm , o 40 μm a 100 μm desde el centro de otro punto de captura de la matriz. En algunas realizaciones, el centro de un punto de captura de una matriz es entre 30 μm y 100 μm , 40 μm y 90 μm , 50 μm y 80 μm , 60 μm y 70 μm , o cualquier rango dentro de los subrangos indicados desde el centro de otro punto de captura de la matriz. En algunas realizaciones, el centro de un punto de captura de una matriz es aproximadamente 65 μm desde el centro de otro punto de captura de la matriz. En algunas realizaciones, el centro de un punto de captura de una matriz es entre 80 μm a 120 μm desde el centro de otro punto de captura de la matriz.

En algunas realizaciones, una pluralidad de puntos de captura de una matriz se ubica de manera uniforme. En algunas realizaciones, una pluralidad de puntos de captura de una matriz se ubica de manera no uniforme. En algunas realizaciones, las posiciones de una pluralidad de puntos de captura de una matriz están predeterminadas. En algunas realizaciones, las posiciones de una pluralidad de puntos de captura de una matriz no están predeterminadas.

- 45 En algunas realizaciones, el tamaño y/o forma de una pluralidad de puntos de captura de una matriz son aproximadamente uniformes. En algunas realizaciones, el tamaño y/o forma de una pluralidad de puntos de captura de una matriz es sustancialmente no uniforme.

En algunas realizaciones, una matriz es aproximadamente 8 mm en 8 mm. En algunas realizaciones, una matriz es menor de 8 mm en 8 mm.

- 50 55 En algunas realizaciones, la matriz puede ser de alta densidad. En algunas realizaciones, la matriz de alta densidad se puede disponer en un patrón. En algunas realizaciones, el patrón de alta densidad de la matriz se produce mediante compactado o compresión de puntos de captura juntos en una o más dimensiones. En algunas realizaciones, el patrón de alta densidad se puede crear mediante impresión de puntos u otras técnicas descriptas en la presente. En algunas realizaciones, el centro de un punto de captura de la matriz está entre 80 μm y 120 μm del centro de otro punto de captura de la matriz. En algunas realizaciones, el centro de un punto de captura de la matriz está entre 85 μm y 115

μm, entre 90 μm y 110 μm, 95 μm y 105 μm, o cualquier rango dentro de los subrangos indicados desde el centro de otro punto de captura de la matriz. En algunas realizaciones, el centro de un punto de captura de la matriz es aproximadamente 100 μm desde el centro de otro punto de captura de la matriz.

(iii) Resolución de la matriz

- 5 Como se usa en la presente, una matriz de "baja resolución" (por ejemplo, una matriz espacial de baja resolución) se refiere a una matriz con puntos de captura que tienen un diámetro medio aproximadamente 20 micrones o mayor. En algunas realizaciones, sustancialmente la totalidad (por ejemplo, el 80% o más) de las sondas de captura de un mismo punto de captura incluyen el mismo código de barras (por ejemplo, código de barras espacial), de modo que, después de la deconvolución, los datos de secuenciación resultantes de la detección de uno o más analitos se pueden correlacionar con el código de barras espacial del punto de captura, de este modo se identifica la ubicación del punto de captura en la matriz y así determina la ubicación de uno o más analitos en la muestra..

Una matriz de "alta resolución" se refiere a una matriz con puntos de captura que tienen un diámetro medio de aproximadamente 1 micrón a aproximadamente 10 micrones. Este rango de diámetros medios de los puntos de captura corresponde aproximadamente al diámetro de una célula de mamífero única. Por lo tanto, una matriz espacial de alta resolución es capaz de detectar analitos a escala de célula única de mamífero o por debajo de la misma.

15 En algunas realizaciones, la resolución de una matriz se puede mejorar mediante la construcción de una matriz con puntos de captura más pequeños. En algunas realizaciones, la resolución de una matriz se puede mejorar aumentando el número de puntos de captura en la matriz. En algunas realizaciones, la resolución de una matriz se puede mejorar colocando los puntos de captura más juntos. Por ejemplo, se determinó que las matrices que incluyen 5.000 puntos de captura proporcionan una mayor resolución en comparación con las matrices que incluyen 1.000 puntos de captura (datos no mostrados).

20 En algunas realizaciones, los puntos de captura de la matriz pueden estar dispuestos en un patrón y, en algunos casos, en un patrón de alta densidad. En algunas realizaciones, el patrón de alta densidad de la matriz se produce compactando o comprimiendo los puntos de captura en una o más dimensiones. En algunas realizaciones, un patrón de alta densidad se puede crear mediante impresión de puntos u otras técnicas descriptas en la presente. La mediana del número de genes capturados por célula y la mediana de los recuentos de UMI por célula fueron mayores cuando se utilizó una matriz que incluye 5.000 puntos de captura en comparación con una matriz que incluye 1.000 puntos de captura (datos no mostrados).

25 En algunas realizaciones, una matriz incluye un punto de captura, donde el punto de captura incluye una o más sondas de captura (por ejemplo, cualquiera de las sondas de captura descriptas en la presente).

(e) Captura del analito

30 En esta sección se describen aspectos generales de los sistemas y métodos de captura de analitos. Las etapas individuales del método y las características del sistema pueden estar presentes en combinación en muchas realizaciones diferentes; las combinaciones específicas descriptas en la presente no limitan en modo alguno otras combinaciones de etapas y características.

35 Generalmente, los analitos se pueden capturar cuando se pone en contacto una muestra con, por ejemplo, un sustrato que comprende sondas de captura (por ejemplo, sustrato con sondas de captura incrustadas, punteadas, impresas en el sustrato o un sustrato con puntos de captura (por ejemplo, perlas, pocillos) que comprenden sondas de captura).

40 Como se usa en la presente, "contacto", "contactado" y/o "contactando" una muestra con un sustrato que comprende puntos de captura se refiere a cualquier contacto (por ejemplo, directo o indirecto) de forma que las sondas de captura puedan interactuar (por ejemplo, capturar) con analitos de la muestra. Por ejemplo, el sustrato puede estar cerca o adyacente a la muestra sin contacto físico directo, pero capaz de capturar analitos de la muestra. En algunas realizaciones, la muestra está en contacto físico directo con el sustrato. En algunas realizaciones, la muestra está en contacto físico indirecto con el sustrato. Por ejemplo, puede haber una capa líquida entre la muestra y el sustrato. En algunas realizaciones, los analitos se difunden a través de la capa líquida. En algunas realizaciones, las sondas de captura se difunden a través de la capa líquida. En algunas realizaciones, los reactivos se pueden administrar a través de la capa líquida entre la muestra y el sustrato. En algunas realizaciones, el contacto físico indirecto puede ser la presencia de un segundo sustrato (por ejemplo, un hidrogel, una película, una membrana porosa) entre la muestra y el primer sustrato que comprende puntos de captura con sondas de captura. En algunas realizaciones, los reactivos son suministrados por el segundo sustrato a la muestra.

(i) Medio resistentes a la difusión/Tapas

Para aumentar la eficacia favoreciendo la difusión del analito hacia las sondas de captura marcadas espacialmente, se puede utilizar un medio resistente a la difusión. En general, la difusión molecular de los analitos biológicos se produce en todas las direcciones, incluso hacia las sondas de captura (por ejemplo, hacia la matriz con códigos espaciales), y lejos de las sondas de captura (por ejemplo, en la solución a granel). El aumento de la difusión hacia la matriz con códigos espaciales reduce la difusión del analito lejos de la matriz con códigos espaciales y aumenta la eficiencia de captura de las sondas de captura.

En algunas realizaciones, una muestra se coloca en la parte superior de un sustrato con código de barras espacial y un medio resistente a la difusión se coloca en la parte superior de la muestra. Por ejemplo, el medio resistente a la difusión se puede colocar sobre una matriz que se ha puesto en contacto con una muestra. En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión y la matriz marcada espacialmente son el mismo componente. Por ejemplo, el medio resistente a la difusión puede contener sondas de captura espacialmente marcadas dentro o sobre el medio resistente a la difusión (por ejemplo, cubreobjetos, portaobjetos, hidrogel o membrana). En algunas realizaciones, una muestra se coloca sobre un soporte y un medio resistente a la difusión se coloca encima de la muestra. Además, se puede colocar una matriz de sondas de captura con código de barras espacial muy cerca del medio resistente a la difusión. Por ejemplo, un medio resistente a la difusión se puede intercalar entre una matriz marcada espacialmente y una muestra sobre un soporte. En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión se dispone o puentea sobre la muestra. En otras realizaciones, el medio resistente a la difusión se coloca muy cerca de la muestra.

En general, el medio resistente a la difusión puede ser cualquier material conocido por limitar la difusividad de los analitos biológicos. Por ejemplo, el medio resistente a la difusión puede ser una tapa sólida (por ejemplo, cubreobjetos o portaobjetos de vidrio). En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión puede ser de vidrio, silicio, papel, monolitos de polímero de hidrogel u otro material. En algunas realizaciones, el lado de vidrio puede ser un portaobjetos de vidrio acrilado. En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión es una membrana porosa. En algunas realizaciones, el material puede ser naturalmente poroso. En algunas realizaciones, el material puede tener poros o pocillos grabados en el material sólido. En algunas realizaciones, el tamaño de poro se puede manipular para minimizar la pérdida de analitos diana. En algunas realizaciones, la química de la membrana se puede manipular para minimizar la pérdida de analitos objetivo. En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión (es decir, el hidrogel) está unido covalentemente a un soporte sólido (es decir, un portaobjetos de vidrio). En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión puede ser cualquier material conocido por limitar la difusividad de los transcriptos poliA. En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión puede ser cualquier material conocido para limitar la difusividad de las proteínas. En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión puede ser cualquier material conocido para limitar la difusividad de los constituyentes macromoleculares.

En algunas realizaciones, un medio resistente a la difusión incluye uno o más medios resistentes a la difusión. Por ejemplo, uno o más medios resistentes a la difusión se puede combinar de diversas maneras antes de poner los medios en contacto con una muestra, que incluyen, sin limitación, recubrimiento, colocación de capas o puenteados. A modo de otro, un hidrogel se puede colocar sobre una muestra seguido de la colocación de una tapa (por ejemplo, portaobjetos de vidrio) en la parte superior del hidrogel.

En algunas realizaciones, se aplica una fuerza (por ejemplo, presión hidrodinámica, vibración ultrasónica, contrastes de soluto, radiación de microondas, circulación vascular u otras fuerzas eléctricas, mecánicas, magnéticas, centrífugas y/o térmicas) para controlar la difusión y mejorar la captura del analito. En algunas realizaciones, se utilizan una o más fuerzas y uno o más medios resistentes a la difusión para controlar la difusión y mejorar la captura. Por ejemplo, se pueden utilizar simultáneamente una fuerza centrífuga y un portaobjetos de vidrio. Se puede utilizar cualquiera de las diversas combinaciones de una fuerza y un medio resistente a la difusión para controlar o mitigar la difusión y mejorar la captura del analito.

En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión, junto con la matriz con código de barras espacial y la muestra, se sumerge en una solución a granel. En algunas realizaciones, la solución a granel incluye reactivos de permeabilización. En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión incluye al menos un reactivo de permeabilización. En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión (es decir, el hidrogel) se empapa en reactivos de permeabilización antes de poner en contacto el medio resistente a la difusión con la muestra. En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión puede incluir pocillos (por ejemplo, micro-, nano-, o picopocillos) que contienen un buffer o reactivo de permeabilización. En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión puede incluir reactivos de permeabilización. En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión puede contener reactivos secos o monómeros para suministrar reactivos de permeabilización cuando el medio resistente a la difusión se aplica a una muestra. En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión se añade a la matriz con código de barras espacial y ensamblaje de muestra antes de que el ensamblaje e sumerja en una solución a granel. En algunas realizaciones, el medio resistente a la difusión se añade a la matriz con código de barras espacial y al ensamblaje de muestra después de que la muestra haya sido expuesta a reactivos de permeabilización. En algunas realizaciones, los reactivos de permeabilización fluyen a través de una cámara o canal microfluídico sobre el medio

resistente a la difusión. En algunas realizaciones, el flujo controla el acceso de la muestra a los reactivos de permeabilización. En algunas realizaciones, los analitos diana se difunden fuera de la muestra y hacia una solución a granel y se incrustan en un medio resistente a la difusión incrustado con una sonda de captura marcada espacialmente.

La FIG. 13 es una ilustración de un ejemplo de uso de un medio resistente a la difusión. Un medio resistente a la difusión 1302 se puede poner en contacto con una muestra 1303. En la FIG. 13, un portaobjetos de vidrio 1304 está poblado con sondas de captura codificadas espacialmente 1306, y la muestra 1303, 1305 se pone en contacto con la matriz 1304, 1306. Se puede aplicar un medio resistente a la difusión 1302 a la muestra 1303, donde la muestra 1303 se intercala entre un medio resistente a la difusión 1302 y un portaobjetos recubierto de sonda de captura 1304. Cuando se aplica una solución de permeabilización 1301 a la muestra, el uso del medio resistente a la difusión/tapa 1306 dirige la migración de los analitos 1305 hacia las sondas de captura 1306 mediante la reducción de la difusión de los analitos hacia fuera en el medio. Alternativamente, la tapa puede contener reactivos de permeabilización.

(ii) Condiciones para la captura

Las sondas de captura en el sustrato (o en un punto de captura en el sustrato) interactúan con los analitos liberados a través de un dominio de captura, descripto en otra parte, para capturar analitos. En algunas realizaciones, se llevan a cabo ciertas etapas para mejorar la transferencia o captura de analitos por las sondas de captura del conjunto. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen, pero sin limitación, el ajuste de las condiciones para el contacto del sustrato con una muestra (por ejemplo, tiempo, temperatura, orientación, niveles de pH, pretratamiento de muestras, etc.), usando la fuerza para transportar analitos (por ejemplo, electroforética, centrífuga, mecánica, etc.), la realización de reacciones de amplificación para aumentar la cantidad de analitos biológicos (por ejemplo, amplificación PCR, amplificación in situ, amplificación clonal), y/o el uso de sondas marcadas para la detección de amplicones y códigos de barras.

En algunas realizaciones, la captura de analitos se facilita mediante el tratamiento de la muestra con reactivos de permeabilización. Si una muestra no está suficientemente permeabilizada, la cantidad de analito capturado en el sustrato puede ser demasiado baja para permitir un análisis adecuado. A la inversa, si la muestra es demasiado permeable, el analito se puede difundir fuera de su origen en la muestra, de forma que se pierde la relación espacial relativa de los analitos dentro de la muestra. Por lo tanto, se desea un equilibrio entre permeabilizar la muestra lo suficiente como para obtener una buena intensidad de señal y mantener la resolución espacial de la distribución del analito en la muestra. Los métodos de preparación de muestras para la facilitación son conocidos en la técnica y se pueden modificar en función de la muestra y de cómo se prepare (por ejemplo, congelada, FFPE, etc.).

(iii) Métodos de captura pasiva

En algunas realizaciones, los analitos migran de una muestra a un sustrato. Los métodos para facilitar la migración pueden ser pasivos (por ejemplo, difusión) y/o activos (por ejemplo, migración electroforética de ácidos nucleicos). Los ejemplos no limitantes de migración pasiva pueden incluir la difusión simple y la presión osmótica creada por la rehidratación de objetos deshidratados.

La migración pasiva por difusión utiliza gradientes de concentración. La difusión es el movimiento de objetos no ligados hacia el equilibrio. Por lo tanto, cuando hay una región de alta concentración de objeto y una región de baja concentración de objeto, el objeto (sonda de captura, el analito, etc.) se mueve a un área de menor concentración. En algunas realizaciones, los analitos no ligados se mueven por un gradiente de concentración.

En algunas realizaciones, se añaden diferentes reactivos a la muestra, de tal manera que la muestra se rehidrata a la vez que se mejora la captura de analitos. En algunas realizaciones, la muestra se rehidrata con reactivos de permeabilización. En algunas realizaciones, la muestra se rehidrata con una solución de tinción (por ejemplo, tinción de hematoxilina y eosina).

(iv) Métodos de captura activa

En algunos ejemplos de cualquiera de los métodos descriptos en la presente, un analito en una muestra de célula o puede ser transportado (por ejemplo, pasiva o activamente) a una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura fijada a una superficie sólida).

Por ejemplo, los analitos en una célula o una muestra pueden ser transportados a una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura inmovilizada) usando un campo eléctrico (por ejemplo, usando electroforesis), un gradiente de presión, flujo de fluido, un gradiente de concentración química, un gradiente de temperatura, y/o un campo magnético.

Por ejemplo, los analitos se pueden transportar a través de, por ejemplo, un gel (por ejemplo, una matriz de hidrogel), un fluido o una célula permeabilizada, hasta una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura inmovilizada).

En algunos ejemplos, se puede aplicar un campo electroforético a los analitos para facilitar su migración hacia una sonda de captura. En algunos ejemplos, una muestra entra en contacto con un sustrato y sondas de captura fijadas en un sustrato (por ejemplo, un portaobjetos, un cubreobjetos o una perla), y se aplica una corriente eléctrica para promover la migración direccional de los analitos cargados hacia las sondas de captura fijadas en el sustrato. Un ensamblaje de electroforesis, en el que una célula o una muestra está en contacto con un cátodo y sondas de captura (por ejemplo, sondas de captura fijadas en un sustrato), y en el que las sondas de captura (por ejemplo, sondas de captura fijadas en un sustrato) están en contacto con la célula o la muestra y un ánodo, se pueden usar para aplicar la corriente.

La transferencia electroforética de analitos se puede realizar mientras se retiene la alineación espacial relativa de los analitos en la muestra. Como tal, un analito capturado por las sondas de captura (por ejemplo, sondas de captura fijadas en un sustrato) retiene la información espacial de la célula o la muestra.

En algunos ejemplos, se utiliza una matriz de microelectrodos direccionable espacialmente para la captura espacialmente restringida de al menos un analito cargado de interés por una sonda de captura. La matriz de microelectrodos se puede configurar para incluir una alta densidad de sitios discretos que tienen un área pequeña para aplicar un campo eléctrico para promover la migración de analitos cargado de interés. Por ejemplo, la captura electroforética se puede realizar en una región de interés utilizando una matriz de microelectrodos espacialmente direccionable.

(v) Región de interés

Una muestra puede tener regiones que muestran características morfológicas que pueden indicar la presencia de enfermedad o el desarrollo de un fenotipo de enfermedad. Por ejemplo, las características morfológicas en un sitio específico dentro de una muestra de biopsia tumoral pueden indicar la agresividad, resistencia terapéutica, potencial metastásico, migración, estadio, diagnóstico y/o pronóstico del cáncer en un sujeto. Un cambio en las características morfológicas de un sitio específico dentro de una muestra de biopsia tumoral a menudo se correlaciona con un cambio en el nivel o expresión de un analito en una célula dentro del sitio específico, lo que se puede, a su vez, utilizar para proporcionar información relativa a la agresividad, resistencia terapéutica, potencial metastásico, migración, estadio, diagnóstico y/o pronóstico del cáncer en un sujeto. Una región o área dentro de una muestra que se selecciona para un análisis específico (por ejemplo, una región en una muestra que tiene características morfológicas de interés) a menudo se describe como "una región de interés".

Una región de interés en una muestra se puede utilizar para analizar un área específica de interés dentro de una muestra y, de este modo, centrar la experimentación y la recopilación de datos en una región específica de una muestra biológica (en lugar de una muestra biológica completa). Esto da como resultado una mayor eficiencia de tiempo en el análisis de una muestra.

Una región de interés se puede identificar en una muestra utilizando una variedad de técnicas diferentes, por ejemplo, microscopía de expansión, microscopía de campo claro, microscopía de campo oscuro, microscopía de contraste de fase, microscopía electrónica, microscopía de fluorescencia, microscopía de reflexión, microscopía de interferencia y microscopía confocal, y combinaciones de las mismas. Por ejemplo, la tinción y la obtención de imágenes de una muestra se pueden realizar para identificar una región de interés. En algunos ejemplos, la región de interés puede corresponder a una estructura específica de la citoarquitectura. En algunas realizaciones, una muestra se puede teñir antes de la visualización para proporcionar contraste entre las diferentes regiones de la muestra. El tipo de tinción se puede elegir en función del tipo de muestra y la región de las células que se deseé teñir. En algunas realizaciones, se puede utilizar más de una tinción para visualizar diferentes aspectos de la muestra, por ejemplo, diferentes regiones de la muestra, estructuras celulares específicas (por ejemplo, organelas) o diferentes tipos de células. En otras realizaciones, la muestra se puede visualizar u obtener imágenes sin teñir la muestra.

En algunas realizaciones, la formación de imágenes se puede realizar usando uno o más marcadores fiduciales, es decir, objetos colocados en el campo de visión de un sistema de formación de imágenes que aparecen en la imagen producida. Los marcadores fiduciales se utilizan normalmente como punto de referencia o escala de medición. Los marcadores fiduciales pueden incluir, pero sin limitación, marcas detectables tales como las marcas fluorescentes, radioactivas, quimioluminiscentes, calorimétricas y colorimétricas. El uso de marcadores fiduciales para estabilizar y orientar muestras se describe, por ejemplo, en Carter et al., 2007, Applied Optics 46:421-427), cuyo contenido íntegro se incorpora en la presente por referencia,

En algunas realizaciones, un marcador fiducial puede estar presente en un sustrato para proporcionar la orientación de la muestra. En algunas realizaciones, una perla se puede acoplar a un sustrato para ayudar en la orientación de la muestra. En algunos ejemplos, una perla acoplada a un sustrato puede producir una señal óptica (por ejemplo, fluorescencia). En otro ejemplo, una perla se puede unir a una porción (por ejemplo, esquina) de una matriz en un patrón o diseño específico (por ejemplo, diseño hexagonal) para ayudar en la orientación de una muestra en una

- matriz de puntos de captura en el sustrato. En algunas realizaciones, un marcador fiducial puede ser una molécula inmovilizada con la que una molécula de señal detectable puede interactuar para generar una señal. Por ejemplo, un ácido nucleico marcador puede estar unido o acoplado a un resto químico capaz de emitir fluorescencia cuando se somete a la luz de una longitud de onda específica (o rango de longitudes de onda). Dicha molécula de ácido nucleico
- 5 marcador se puede poner en contacto con una matriz antes, simultáneamente o después de teñir la muestra de tejido para visualizar o crear imágenes de la sección de tejido. Aunque no es necesario, puede ser ventajoso utilizar un marcador que se pueda detectar utilizando las mismas condiciones (por ejemplo, condiciones de obtención de imágenes) utilizadas para detectar el ADNc marcado.
- En algunas realizaciones, se incluyen marcadores fiduciales para facilitar la orientación de una muestra de tejido o
- 10 una imagen del mismo en relación con una sonda de captura inmovilizada en un sustrato. Se puede utilizar cualquier método para marcar una matriz de manera que un marcador sea detectable solo cuando se obtiene una imagen de una sección de tejido. Por ejemplo, una molécula, por ejemplo, una molécula fluorescente que genera una señal, se puede inmovilizar directa o indirectamente en la superficie de un sustrato. Los marcadores se pueden proporcionar sobre un sustrato en un patrón (por ejemplo, un borde, una o más filas, una o más líneas, etc.).
- 15 En algunas realizaciones, un marcador fiducial se puede colocar aleatoriamente en el campo de visión. Por ejemplo, un oligonucleótido que contiene un fluoróforo se puede imprimir, estampar, sintetizar o unir aleatoriamente a un sustrato (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio) en una posición aleatoria del sustrato. Se puede poner en contacto una sección de tejido con el sustrato de forma que el oligonucleótido que contiene el fluoróforo entre en contacto con, o esté cerca de, una célula de la sección de tejido o un componente de la célula (por ejemplo, una molécula de ARNm o ADN). Se puede obtener una imagen del sustrato y la sección de tejido, y se puede determinar la posición del fluoróforo dentro de la imagen de la sección de tejido (por ejemplo, mediante la revisión de una imagen óptica de la sección de tejido superpuesta con la detección del fluoróforo). En algunas realizaciones, los marcadores fiduciales se pueden colocar con precisión en el campo de visión (por ejemplo, en ubicaciones conocidas de un sustrato). En este caso, se puede estampar, unir o sintetizar un marcador fiducial en el sustrato y ponerlo en contacto con una muestra.
- 20 25 Normalmente, se toma una imagen de la muestra y el marcador de referencia, y la posición del marcador fiducial en el sustrato se puede confirmar mediante la visualización de la imagen.
- En algunos ejemplos, los marcadores fiduciales pueden rodear la matriz. En algunas realizaciones, los marcadores fiduciales permiten detectar, por ejemplo, el reflejo. En algunas realizaciones, los marcadores fiduciales pueden rodear completamente la matriz. En algunas realizaciones, los marcadores fiduciales pueden no rodear completamente la matriz. En algunas realizaciones, los marcadores fiduciales identifican las esquinas de la matriz. En algunas realizaciones, uno o más marcadores fiduciales identifican el centro de la matriz. En algunas realizaciones, los marcadores fiduciales comprenden puntos modelados, donde el diámetro de uno o más marcadores fiduciales de punto modelado es de aproximadamente 100 micrómetros. El diámetro de los marcadores fiduciales puede ser cualquier diámetro útil que incluyen, pero sin limitación, 50 micrómetros a 500 micrómetros de diámetro. Los
- 30 35 marcadores fiduciales se pueden disponer de tal manera que el centro de un marcador fiducial esté entre 100 micrómetros y 200 micrómetros del centro de uno o más marcadores fiduciales que rodean la matriz. En algunas realizaciones, la matriz con los marcadores fiduciales circundantes es de aproximadamente 8 mm por 8 mm. En algunas realizaciones, la matriz sin los marcadores fiduciales circundantes es menor de 8 mm por 8 mm.
- En algunas realizaciones, la tinción y la obtención de imágenes de una muestra antes de ponerla en contacto con una
- 40 matriz espacial se lleva a cabo para seleccionar muestras para el análisis espacial. En algunas realizaciones, la tinción incluye la aplicación de un marcador fiducial como describió anteriormente, que incluyen marcadores detectables fluorescentes, radiactivos, quimioluminiscentes, calorimétricos o colorimétricos. En algunas realizaciones, la tinción y la obtención de imágenes de las muestras permite al usuario identificar la muestra específica (o región de interés) que el usuario desea evaluar.
- 45 En algunas realizaciones, se puede utilizar una tabla de consulta (LUT) para asociar una propiedad con otra propiedad de un punto de captura. Estas propiedades incluyen, por ejemplo, ubicaciones, códigos de barras (por ejemplo, moléculas de código de barras de ácido nucleico), códigos de barras espaciales, marcas ópticas, etiquetas moleculares y otras propiedades.
- En algunas realizaciones, una tabla de consulta puede asociar una molécula de código de barras de ácido nucleico
- 50 55 con un punto de captura. En algunas realizaciones, una marca óptica de un punto de captura puede permitir asociar el punto de captura con una partícula biológica (por ejemplo, célula o núcleo). La asociación de un punto de captura con una partícula biológica puede permitir además asociar una secuencia de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico de la partícula biológica a una o más propiedades físicas de la partícula biológica (por ejemplo, un tipo de célula o una ubicación de la célula). Por ejemplo, sobre la base de la relación entre el código de barras y la marca óptica, la marca óptica se puede utilizar para determinar la ubicación de un punto de captura, de este modo se asocia la ubicación del punto de captura con la secuencia del código de barras del punto de captura. El análisis posterior (por ejemplo, la secuenciación) puede asociar la secuencia del código de barras y el analito de la muestra. En

consecuencia, sobre la base de la relación entre la ubicación y la secuencia del código de barras, se puede determinar la ubicación del analito biológico (por ejemplo, en un tipo específico de célula o en una célula en una ubicación específica de la muestra).

En algunas realizaciones, un punto de captura puede tener adheridas una pluralidad de moléculas de código de barras de ácido nucleico. La pluralidad de moléculas de código de barras de ácido nucleico puede incluir secuencias de código de barras. La pluralidad de moléculas de ácido nucleico unidas a un punto de captura dado puede tener las mismas secuencias de código de barras, o dos o más secuencias de código de barras diferentes. Se pueden utilizar diferentes secuencias de código de barras para proporcionar una precisión de localización espacial mejorada.

En algunas realizaciones, se trata un sustrato para minimizar o reducir la hibridación no específica del analito dentro o entre los puntos de captura. Por ejemplo, el tratamiento puede incluir el recubrimiento del sustrato con un hidrogel, película y/o membrana que crea una barrera física a la hibridación no específica. Se puede utilizar cualquier hidrogel adecuado. Por ejemplo, se pueden utilizar las matrices de hidrogel preparadas según los métodos establecidos en la Patente U.S. Nros. 6.391.937, 9.512.422, y 9.889.422, y la Publicación de patente U.S. Nros. 2017/0253918 y EE.UU. 2018/0052081.

El tratamiento puede incluir la adición de un grupo funcional reactivo o capaz de activarse de forma que se vuelva reactivo después de recibir un estímulo (por ejemplo, fotorreactivo). El tratamiento puede incluir el tratamiento con polímeros que tengan una o más propiedades físicas (por ejemplo, mecánicas, eléctricas, magnéticas y/o térmicas) que minimicen la unión no específica (por ejemplo, que activen un sustrato en ciertos lugares para permitir la hibridación del analito en esos lugares).

En algunos ejemplos, una matriz (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de matrices descriptos en la presente) puede estar contenida con solo una porción de una muestra (por ejemplo, una célula, una característica, o una región de interés). En algunos ejemplos, una muestra se pone en contacto con solo una porción de una matriz (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de matrices descriptos en la presente). En algunos ejemplos, una porción de la matriz se puede desactivar para que no interactúe con los analitos de la muestra (por ejemplo, desactivación óptica, desactivación química, desactivación térmica o bloqueo de las sondas de captura de la matriz (por ejemplo, mediante sondas de bloqueo)). En algunos ejemplos, una región de interés se puede retirar de una muestra y, a continuación, la región de interés se puede poner en contacto con la matriz (por ejemplo, cualquiera de las matrices descriptas en la presente). Una región de interés se puede extraer de una muestra mediante microcirugía, microdissección por captura láser, troceado, un micrótomo, corte en dados, tripsinización, marcación y/o clasificación celular asistida por fluorescencia.

(f) Análisis de analitos capturados

En algunas realizaciones, después de poner en contacto una muestra con un sustrato que incluye sondas de captura, se puede realizar opcionalmente una etapa de eliminación para retirar toda o una parte de la muestra del sustrato. En algunas realizaciones, la etapa de eliminación incluye la degradación enzimática y/o química de las células de la muestra. Por ejemplo, la etapa de eliminación puede incluir el tratamiento de la muestra con una enzima (por ejemplo, una proteinasa, por ejemplo, proteinasa K) para eliminar al menos una parte de la muestra del sustrato. En algunas realizaciones, la etapa de eliminación puede incluir la ablación del tejido (por ejemplo, ablación láser).

En algunas realizaciones, un método para detectar espacialmente un analito (por ejemplo, detectar la ubicación de un analito, por ejemplo, un analito biológico) de una muestra (por ejemplo, presente en una muestra biológica), comprende: (a) opcionalmente teñir y/u obtener imágenes de una muestra sobre un sustrato; (b) permeabilizar (por ejemplo proporcionar una solución que comprende un reactivo de permeabilización a) la muestra on el sustrato; (c) poner en contacto la muestra con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, donde una sonda de captura de la pluralidad captura el analito biológico; y (d) analizar el analito biológico capturado, de este modo se detecta espacialmente el analito biológico; donde la muestra se retira total o parcialmente del sustrato.

En algunas realizaciones, la muestra no se retira del sustrato. Por ejemplo, la muestra no se retira del sustrato antes de liberar una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura unida a un analito) del sustrato. En algunas realizaciones, dicha liberación comprende la escisión de la sonda de captura del sustrato (por ejemplo, a través de un dominio de escisión). En algunas realizaciones, dicha liberación no comprende la liberación de la sonda de captura del sustrato (por ejemplo, se puede hacer una copia de la sonda de captura unida a un analito y la copia se puede liberar del sustrato, por ejemplo, mediante desnaturalización). En algunas realizaciones, la muestra no se retira del sustrato antes del análisis de un analito unido a una sonda de captura después de que se libere del sustrato. En algunas realizaciones, la muestra permanece en el sustrato durante la retirada de una sonda de captura del sustrato y/o el análisis de un analito unido a la sonda de captura después de que se libere del sustrato. En algunas realizaciones, el análisis de un analito unido a la sonda de captura del sustrato se puede llevar a cabo sin someter la

muestra a degradación enzimática y/o química de las células (por ejemplo, células permeabilizadas) o ablación del tejido (por ejemplo, ablación láser).

En algunas realizaciones, al menos una porción de la muestra no se retira del sustrato. Por ejemplo, una parte de la muestra puede permanecer en el sustrato antes de liberar una sonda de captura (por ejemplo, una prueba de captura unida a un analito) del sustrato y/o analizar un analito unido a una sonda de captura liberada del sustrato. En algunas realizaciones, al menos una porción de la muestra no se somete a degradación enzimática y/o química de las células (por ejemplo, células permeabilizadas) o ablación del tejido (por ejemplo, ablación con láser) antes del análisis de un analito unido a una sonda de captura desde el soporte.

En algunas realizaciones, un método para detectar espacialmente un analito (por ejemplo, detectar la ubicación de un analito, por ejemplo, un analito biológico) de una muestra (por ejemplo, presente en una muestra biológica) comprende: (a) opcionalmente teñir y/u obtener imágenes de una muestra sobre un sustrato; (b) permeabilizar (por ejemplo, proporcionar una solución que comprende un reactivo de permeabilización) la muestra sobre el sustrato; (c) poner en contacto la muestra con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, donde una sonda de captura de la pluralidad captura el analito biológico; y (d) analizar el analito biológico capturado, de este modo detecta espacialmente el analito biológico; donde la muestra no se retira del sustrato.

En algunas realizaciones, un método para detectar espacialmente un analito biológico de interés a partir de una muestra biológica comprende: (a) teñir y obtener imágenes de una muestra sobre un soporte; (b) proporcionar una solución que comprende un reactivo de permeabilización a la muestra sobre el soporte; (c) poner en contacto la muestra con una matriz sobre un sustrato, donde la matriz comprende una o más pluralidades de sondas de captura, de este modo permite que la una o más pluralidades de sondas de captura capturen el analito biológico de interés; y (d) analizar el analito biológico capturado, de este modo se detecta espacialmente el analito biológico de interés; donde la muestra no se retira del soporte.

En algunas realizaciones, el método incluye además la selección de una región de interés en la muestra para someterla a un análisis transcriptómico espacial. En algunas realizaciones, una o más de las una o más sondas de captura incluyen un dominio de captura. En algunas realizaciones, una o más de las una o más pluralidades de sondas de captura comprenden un identificador molecular único (UMI). En algunas realizaciones, una o más de las una o más pluralidades de sondas de captura comprenden un dominio de escisión. En algunas realizaciones, el dominio de escisión comprende una secuencia reconocida y escindida por una uracil-ADN glicosilasa, una endonucleasa apurínica/apirimidíntica (AP) (APE1), un reactivo de escisión específico de uracilo (USER), y/o una endonucleasa VIII. En algunas realizaciones, una o más sondas de captura no comprenden un dominio de escisión y no se escinden de la matriz.

Después de que los analitos de la muestra se han hibridado o asociado de otro modo con sondas de captura, agentes de captura de analitos u otras secuencias de oligonucleótidos con código de barras según cualquiera de los métodos descriptos anteriormente en relación con la metodología analítica espacial general basada en células, los constructos con código de barras que resultan de la hibridación/asociación se analizan mediante secuenciación para identificar los analitos.

En algunas realizaciones, los métodos en la presente se pueden utilizar para evaluar los niveles y/o la expresión de analitos en una célula o una muestra a lo largo del tiempo (por ejemplo, antes o después del tratamiento con un agente o en diferentes etapas de diferenciación). En algunos ejemplos, los métodos descriptos en la presente se pueden realizar en múltiples muestras o células similares obtenidas del sujeto en diferentes puntos de tiempo (por ejemplo, antes o después del tratamiento con un agente, diferentes etapas de diferenciación, diferentes etapas de progresión de la enfermedad, diferentes edades del sujeto, o antes o después del desarrollo de resistencia a un agente).

Se describen más detalles y realizaciones no limitantes en relación con la extracción de la muestra de la matriz, la liberación y amplificación de analitos, el análisis de analitos capturados (por ejemplo, mediante secuenciación y/o multiplexación) y la resolución espacial de la información de analitos por ejemplo, utilizando tablas de búsqueda) en la solicitud de patente U.S. Número16/992,569, titulada "Systems and Methods for Using the Spatial Distribution of Haplotypes to Determine a Biological Condition".

III. Realizaciones específicas de sistemas y métodos para el análisis espacial de analitos usando la alineación fiducial

Esta divulgación también proporciona métodos y sistemas para el análisis espacial de analitos. A continuación se ofrecen descripciones y explicaciones detalladas de diversas realizaciones de la presente descripción. Estas realizaciones no son limitativas y no excluyen alternativas, variaciones, cambios y sustituciones que pueden ocurrir a los expertos en la materia desde el alcance de esta divulgación.

(a) Sistemas para el análisis especial de analitos

La FIG. 11 es un diagrama de bloques que ilustra un ejemplo del sistema no limitativo, para el análisis espacial de analitos de acuerdo con algunas implementaciones. El sistema 1100 en algunas implementaciones incluye una o más unidades de procesamiento CPU(s) 1102 (también denominadas como procesadores), una o más interfaces de red 1104, una interfaz de usuario 1106, una memoria 1112, y uno o más buses de comunicación 1114 para interconectar estos componentes.

Los buses de comunicación 1114 incluyen opcionalmente circuitos (a veces llamados chipset) que interconectan y controlan las comunicaciones entre los componentes del sistema. La memoria 1112 típicamente incluye memoria de acceso aleatorio de alta velocidad, tal como DRAM, SRAM, DDR RAM, ROM, EEPROM, memoria flash, CD-ROM, discos versátiles digitales (DVD) u otro almacenamiento óptico, cassetes magnéticos, cinta magnética, almacenamiento en disco magnético u otros dispositivos de almacenamiento magnético, otros dispositivos de memoria de estado sólido de acceso aleatorio, o cualquier otro medio que se pueda utilizar para almacenar la información deseada; y opcionalmente incluye memoria no volátil, tal como uno o más dispositivos de almacenamiento en disco magnético, dispositivos de almacenamiento en disco óptico, dispositivos de memoria flash, u otros dispositivos de almacenamiento de estado sólido no volátil. La memoria 1112 incluye opcionalmente uno o más dispositivos de almacenamiento ubicados remotamente de las CPU1102. La memoria 1112, o alternativamente los dispositivos de memoria dentro de la memoria 1112, comprende un medio de almacenamiento no transitorio. Se apreciará que esta memoria 1112 puede estar distribuida en una o más computadoras. En algunas realizaciones, la memoria 1112 o alternativamente el medio de almacenamiento legible por computadora no transitorio almacena los siguientes programas, módulos y estructuras de datos, o un subconjunto de los mismos:

- un sistema operativo opcional 1116, que incluye procedimientos para manejar diversos servicios básicos del sistema y para realizar tareas dependientes del hardware;
- un módulo de comunicación en red opcional (o instrucciones) 1118 para conectar el dispositivo 1100 con otros dispositivos, o una red de comunicación;
- un módulo de análisis 1120 para el análisis espacial de los analitos;
- una estructura de datos 1122 que comprende una (i) imagen de sustrato 1124, la imagen de sustrato que comprende una pluralidad de valores de píxel 1126-1..... 1126-N y (ii) un identificador de sustrato 1128;
- una pluralidad de puntos fiduciales derivados 1130-1..... 1130-L, y coordenadas correspondientes 1132-1.....,1132-L identificadas en el sustrato imagen 1124;
- un constructo de datos 1134 para un conjunto de puntos de captura del sustrato, el constructo de datos que comprende, para cada punto de captura 1136-1..... 1136-Q, las lecturas secuenciación 1138-1-1 1138-1-M,... 1138-Q-1 1138-Q-T data, donde las lecturas de secuencia 1138 incluye códigos de barras espacial únicos 1150 (por ejemplo, 1150-1-1-1) y porciones codificadoras de analitos 1152 (por ejemplo, 1152-1-1-1); y
- un repositorio de moldes 1140 que comprende una pluralidad de moldes 1142-1, ... 1142-Q, respectivamente que comprende los correspondientes sistemas de coordenadas 1144-1, ..., 1144-Q, puntos fiduciales de referencia 1146-1-1, ..., 1146-1-K, 1146-Q-1, ..., 1146-Q-P, y las correspondientes coordenadas 1148-1-1, ..., 1148-1-K, 1148-Q-1, ..., 1146-Q-P.

En algunas implementaciones, la interfaz de usuario 1106 incluye un dispositivo de entrada (por ejemplo, un teclado, un ratón, un panel táctil, un track pad, y/o una pantalla táctil) 1110 para que un usuario interactúe con el sistema 1100 y una pantalla 1108.

En algunas implementaciones, uno o más de los elementos identificados anteriormente se almacenan en uno o más de los dispositivos de memoria mencionados anteriormente, y corresponden a un conjunto de instrucciones para realizar una función descripta anteriormente. Los módulos o programas identificados anteriormente (por ejemplo, conjuntos de instrucciones) no necesitan ser implementados como programas de software, procedimientos o módulos separados, y por lo tanto varios subconjuntos de estos módulos se pueden combinar o reorganizar de otra manera en varias implementaciones. En algunas implementaciones, la memoria 1112 almacena opcionalmente un subconjunto de los módulos y estructuras de datos identificados anteriormente. Además, en algunas realizaciones, la memoria almacena módulos y estructuras de datos adicionales no descriptos anteriormente. En algunas realizaciones, uno o más de los elementos identificados anteriormente se almacenan en un sistema informático, distinto del sistema 1100, que es direccionable por el sistema 1100 de modo que el sistema 1100 puede recuperar todos o una parte de dichos datos cuando sea necesario.

Aunque la FIG. 11 muestra un ejemplo del sistema 1100, la figura pretende ser más una descripción funcional de las diversas características que pueden estar presentes en los sistemas informáticos que un esquema estructural de las implementaciones descriptas en este documento. En la práctica, y como reconocen los expertos en la materia, los elementos que se muestran por separado se pueden combinar y algunos elementos se podrían separar.

(b) *Métodos para el análisis espacial de analitos.*

La **FIG. 10** es un diagrama de flujo 1000 que ilustra un método de análisis espacial de analitos 1002. En algunas realizaciones, el método tiene lugar en un sistema informático 1100 que tiene uno o más procesadores 1102, y memoria 1112 que almacena uno o más programas para su ejecución por el uno o más procesadores 1102. Se apreciará que la memoria puede estar en una computadora única, distribuida en varias computadoras en una o más máquinas virtuales y/o en una arquitectura de computación en nube.

Con referencia al bloque **1004**, el método divulgado comprende obtener una estructura de datos 1122 en forma electrónica que comprende (i) una imagen **1124** de una muestra (por ejemplo, la muestra de tejido seccionada **1204** de la **FIG. 12**) de un sustrato (por ejemplo, de un sujeto) y (ii) un identificador de sustrato 1128 que es único para el sustrato. El sustrato incluye una pluralidad de marcadores de referencia y un conjunto de puntos de captura **1136**.

Una imagen se puede obtener en cualquier formato de archivo de imagen electrónico, que incluye, pero sin limitación JPEG/JFIF, TIFF, Exif, PDF, EPS, GIF, BMP, PNG, PPM, PGM, PBM, PNM, WebP, formato de trama HDRs, HEIF, BAT, BPG, DEEP, DRW, ECW, FITS, FLIF, ICO, ILBM, IMG, PAM, PCX, PGF, JPEGXR, Formato de archivo de imagen por capas, PLBM, SGI, SID, CD5, CPT, PSD, PSP, XCF, PDN, CGM, SVG, PostScript, PCT, WMF, EMF, SWF, XAML, y/o RAW.

En algunas realizaciones, la imagen se adquiere mediante microscopía óptica de transmisión y comprende una matriz de valores de píxel 1126. En algunas realizaciones la matriz de valores de píxel comprende al menos 100, 10.000, 100.000, 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 5×10^6 , 8×10^6 , 10×10^6 , o 15×10^6 valores de píxel. En algunas realizaciones, la muestra se somete a inmunohistoquímica antes de la adquisición de la imagen y se utiliza microscopía de fluorescencia para adquirir la imagen. En algunas realizaciones, la imagen se adquiere utilizando el modo Epi-iluminación, en el que tanto la iluminación como la detección se realizan desde un lado de la muestra. En algunas realizaciones, la imagen se adquiere utilizando microscopía confocal, imágenes de dos fotones, microscopía multifotónica de campo amplio, microscopía de iluminación de plano único o microscopía de fluorescencia de lámina de luz. Ver, por ejemplo, *Adaptive Optics for Biological Imaging*, 2013, Kubby ed., CRC Press, Boca Ratón, Florida; y *Confocal y Dos-Photon Microscopy: Foundations, Applications y Advances*, 2002, Diaspro ed., Wiley Liss, New York, New York; y *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2002, Pawley ed., Springer Science+Business Media, LLC, New York, New York, cada uno de los cuales se incorpora por referencia.

Como ilustración, la **FIG. 14** muestra un ejemplo de una imagen **1124** de una muestra sobre un sustrato de acuerdo con algunas realizaciones. En algunas realizaciones, los sustratos se utilizan para proporcionar soporte a una muestra, en particular, por ejemplo, una sección fina de tejido. En algunas realizaciones, un sustrato es un soporte que permite el posicionamiento de muestras, analitos, puntos de captura, y/o sondas de captura sobre el sustrato.

En algunas realizaciones, la imagen se adquiere utilizando un Nikon Eclipse Ti2 con capacidad de campo claro y fluorescencia (TRITC) o un ImageXpress sistema automatizado de imagen celular Nano. En algunas realizaciones, la imagen se adquiere con un microscopio que tiene una lente objetivo de 4X (Plan APO 11; NA 0,20), 10X (Plan APO 11; NA 0,45) o 20X (Plan APO 11; NA 0,75).

En algunas realizaciones, la imagen es una imagen en color (por ejemplo, 3 x 8 bits, 2424 x 2424 píxeles de resolución). En algunas realizaciones, la imagen es una imagen monocroma (por ejemplo, 14 bits, 2424 x 2424 píxeles de resolución).

En algunas realizaciones, el tiempo de exposición para la imagen está entre 2 y 10 milisegundos. En algunas realizaciones, la muestra se expone a una fuente de luz (o equivalente) con un rango de longitud de onda de 380-680 nm durante la adquisición de la imagen. En algunas realizaciones, la resolución mínima de captura es de 2,18 $\mu\text{m}/\text{píxel}$.

En algunas realizaciones, la imagen se obtiene en cualquier modo de color electrónico, que incluye, pero sin limitación, escala de grises, mapa de bits, indexado, RGB, CMYK, HSV, color de laboratorio, duoton y/o multicanal. En algunas realizaciones, la imagen está manipulada (por ejemplo, cosida, comprimida y/o aplanada). En algunas realizaciones, el tamaño del archivo de imagen está entre 1 KB y 1 MB, entre 1 MB y 0,5 GB, entre 0,5 GB y 5 GB, entre 5 GB y 10 GB, o superior a 10 GB.

En algunas realizaciones, la imagen se representa como una matriz (por ejemplo, matriz) que comprende una pluralidad de píxeles, de tal manera que la ubicación de cada píxel respectivo en la pluralidad de píxeles en la matriz (por ejemplo, matriz) corresponde a su ubicación original en la imagen. En algunas realizaciones, la imagen se representa como un vector que comprende una pluralidad de píxeles, de manera que cada píxel respectivo en la pluralidad de píxeles en el vector comprende información espacial correspondiente a su ubicación original en la imagen.

En algunas realizaciones, un sustrato puede comprender cualquier material de soporte adecuado, que incluye, pero sin limitación, vidrio, vidrio modificado y/o funcionalizado, hidrogeles, películas, membranas, plásticos (incluyendo, por ejemplo, acrílicos, poliestireno, copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, TEFLON™, olefinas cíclicas, poliimidas, etc), nylon, cerámica, resinas, Zeonor, sílice o materiales a base

- 5 de sílice, incluido el silicio y el silicio modificado, carbono, metales, cristales inorgánicos, haces de fibras ópticas y polímeros, tales como poliestireno, copolímeros de olefinas cíclicas (COC), polímeros de olefinas cíclicas (COP), polipropileno, polietileno y policarbonato. En algunas realizaciones, un sustrato se puede imprimir, modelar o modificar de otro modo para incluir puntos de captura que permitan la asociación con analitos después del contacto con una muestra (por ejemplo, una sección de tejido). Otras realizaciones detalladas de las propiedades, estructura y/o modificaciones del sustrato se describen anteriormente en la Descripción detallada (por ejemplo, en II. General Spatial Array-Based Analytical Methodology; (c) Substrate).

Haciendo referencia a la FIG. 12, en algunas realizaciones, el sustrato comprende un área de captura 1206, donde el área de captura comprende una pluralidad de puntos de captura con código de barras 1136 para una o más reacciones y/o ensayos, y donde una reacción comprende uno o más tipos de tejido para análisis espacial. En algunas realizaciones, el sustrato comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, más de 20, más de 30, más de 40, o más de 50 áreas de captura 1206 para una pluralidad de reacciones y/o ensayos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sustrato es un portaobjetos de expresión génica espacial (por ejemplo, Visium) que comprende cuatro áreas de captura 1206, y cada área de captura que tiene las dimensiones de 6,5 mm x 6,5 mm, de tal manera que el sustrato comprende una capacidad para cuatro reacciones y hasta cuatro tipos de tejido. En algunas 20 de dichas realizaciones, cada área de captura comprende 5000 puntos de captura con código de barras 1136, donde cada punto de captura tiene 55 µm de diámetro y la distancia entre los centros de dos puntos de captura respectivos es de 100 µm. Ver, 10X, 2019, "Visium Spatial Gene Expression Solution".

Otras realizaciones específicas de puntos de captura se detallan más adelante en la presente descripción. Ver también Solicitud de patente provisional de Estados Unidos Nº 62/886.233 titulado "Systems and Methods for Using the Spatial 25 Distribution of Haplotypes to Determine a Biological Condition," presentada el 13 de agosto de 2019, y Solicitud de patente provisional de Estados Unidos Nº 62/839.346 titulada "Spatial Transcriptomics of Biological Analytes in Tissue Samples," presentado el 26 de abril de 2019.

Con referencia nuevamente al bloque 1004, la muestra se obtiene (por ejemplo, de un sujeto). Como se ha definido anteriormente, en algunas realizaciones, un sujeto es un mamífero tal como un roedor, ratón, rata, conejo, cobayo, 30 ungulado, caballo, oveja, cerdo, cabra, vaca, gato, perro, primate (por ejemplo, humano o primate no humano); una planta como como *Arabidopsis thaliana*, maíz, sorgo, avena, trigo, arroz, colza o soja; un alga tal como *Chlamydomonas reinhardtii*; un nematodo tal como *Caenorhabditis elegans*; un insecto tal como *Drosophila melanogaster*, mosquito, mosca de la fruta, abeja de la miel o araña; un pez tal como pez cebra; un reptil; un anfibio 35 tal como rana o *Xenopus laevis*; un *Dictyostelium discoideum*; un hongo tal como *Pneumocystis carinii*, *Takifugu rubripes*, levadura, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*, o a *Plasmodium falciparum*. Estos ejemplos no son limitativos y no excluyen la sustitución de cualquier sujeto alternativo que se le ocurra a un experto en la materia.

En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tejido, y la muestra de tejido se obtiene de cualquier tejido y/u órgano derivado de cualquier sujeto, que incluyen pero sin limitación los sujetos enumerados anteriormente. En 40 algunas realizaciones, una muestra de tejido se obtiene de, por ejemplo, corazón, riñón, ovario, mama, ganglio linfático, adiposo, cerebro, intestino delgado, estómago, hígado, cuádriceps, pulmón, testículos, tiroides, ojos, lengua, intestino grueso, bazo, y/o glándula mamaria, piel, músculo, diafragma, páncreas, vejiga, próstata, entre otros. Las muestras de tejido se pueden obtener de tejido sano o enfermo (por ejemplo, inflamado, tumor, carcinoma u otro). Otros ejemplos de muestras de tejido son muestran en la Tabla 1 y se catalogan, por ejemplo, en 10X, 2019, "Visium Spatial Gene Expression Solution".

Tabla 1: Ejemplos de muestras de tejido

Organismo	Tejido	Sano/enfermo
Humano	Cerebro	Glioblastoma multiforme cerebral
Humano	Mama	Sano
Humano	Mama	Carcinoma ductal invasivo
Humano	Mama	Carcinoma lobular invasivo
Humano	Corazón	Sano

Humano	Riñón	Sano
Humano	Riñón	Nefritis
Humano	Intestino grueso	Cáncer colorrectal
Humano	Pulmón	Carcinoma papilar
Humano	Ganglio linfático	Sano
Humano	Ganglio linfático	Inflamado
Humano	Ovarios	Tumor
Humano	Bazo	Inflamado
Ratón	Cerebro	Sano
Ratón	Ojos	Sano
Ratón	Corazón	Sano
Ratón	Riñón	Sano
Ratón	Intestino grueso	Sano
Ratón	Hígado	Sano
Ratón	Pulmones	Sano
Ratón	Ovario	Sano
Ratón	Cuádriceps	Sano
Ratón	Intestino delgado	Sano
Ratón	Bazo	Sano
Ratón	Estómago	Sano
Ratón	Testículos	Sano
Ratón	Tiroides	Sano
Ratón	Lengua	Sano
Rata	Cerebro	Sano
Rata	Corazón	Sano
Rata	Riñón	Sano
Ratón	Lengua	Sano
Rata	Cerebro	Sano
Rata	Corazón	Sano
Rata	Riñón	Sano

En algunas realizaciones, el tejido seccionado se prepara mediante seccionamiento tisular, como se describe anteriormente en la Descripción detallada (por ejemplo, en I. Introducción; (d) Muestras biológicas; (ii) Preparación de muestras biológicas; (1) Seccionamiento tisular). Brevemente, en algunas realizaciones, se preparan secciones delgadas de tejido a partir de una muestra (por ejemplo, utilizando un aparato de corte mecánico tal como un micrótomo de cuchilla vibratoria, o mediante la aplicación de una impresión táctil de una muestra a un material de sustrato adecuado). En algunas realizaciones, una muestra se congela, fija y/o reticula, o se encapsula en una matriz (por ejemplo, un bloque de resina o parafina) antes del seccionamiento para preservar la integridad de la muestra durante el seccionamiento. En la Descripción detallada (por ejemplo, en I. Introducción; (d) Muestras Biológicas; (ii)

- 5) de la descripción detallada).

Preparación de Muestras Biológicas; (2) Congelación, (3) Fijación con formalina e inclusión en parafina, (4) Fijación, y (5) Inclusión) se proporcionan otras implementaciones de la preparación de muestras. Como ejemplo, en referencia a la FIG. 3, la preparación de una muestra biológica mediante seccionamiento de tejido comprende una primera etapa 301 de un ejemplo de flujo de trabajo para el análisis espacial.

- 5 Con referencia al bloque 1006, en algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tejido seccionada que tiene una profundidad de 100 micrones o menos. En algunas realizaciones, la muestra de tejido seccionada tiene una profundidad de 80 micrones o menos, 70 micrones o menos, 60 micrones o menos, 50 micrones o menos, 40 micrones o menos, 30 micrones o menos, o 20 micrones o menos. En algunas realizaciones, la muestra de tejido seccionada tiene una profundidad de entre 10 micrones y 20 micrones. Ver, 10X, 2019, "Visium Spatial Gene Expression Solution."
- 10 En algunas realizaciones, la muestra de tejido seccionada tiene una profundidad de entre 1 y 10 micrones. Otras realizaciones de la muestra de tejido seccionadas se proporcionan en la Descripción detallada (por ejemplo, I. Introducción; (d) Muestras biológicas; (ii) Preparación de muestras biológicas; (1) Seccionamiento tisular). En algunas realizaciones, una sección de tejido es de tamaño y forma similar al sustrato sobre el cual está. En algunas realizaciones, una sección de tejido es de tamaño y forma diferente al sustrato sobre el cual está. En algunas realizaciones, una sección de tejido se superpone en la totalidad o una porción del sustrato. Por ejemplo, la FIG. 9A ilustra una sección de tejido con dimensiones aproximadamente comparables con el sustrato, de modo que una gran proporción del sustrato está en contacto con la sección de tejido.

- 15 En algunas realizaciones, una sección de tejido en un sustrato es una única sección uniforme. En algunas realizaciones alternativas, hay múltiples secciones de tejido en un sustrato. En algunas de estas realizaciones, una única área de captura 1206 de un sustrato puede contener múltiples secciones de tejido, donde cada sección de tejido se obtiene de la misma muestra y/o sujeto o de diferentes muestras y/o sujetos. En algunas realizaciones, una sección de tejido es una única sección de tejido que comprende una o más regiones en las que no hay células presentes (por ejemplo, orificios desgarros o huecos en el tejido). Por lo tanto, en algunas realizaciones como las anteriores, una imagen de una sección de tejido en un sustrato puede contener regiones en las que el tejido está presente y regiones en las que el tejido no está presente.

- 20 Con referencia al bloque 1008 y como se ilustra por ejemplo en la FIG. 12, en algunas realizaciones, cada punto de captura respectivo 1136 en el conjunto de puntos de captura está (i) en una posición diferente en una matriz bidimensional y (ii) se asocia con uno o más analitos del tejido. Además, en tales realizaciones, cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura está caracterizado por al menos un código de barras espacial único en una pluralidad de códigos de barras espaciales.

- 25 Con referencia al bloque 1010, en algunas realizaciones, el uno o más analitos comprende cinco o más analitos, diez o más analitos, cincuenta o más analitos, cien o más analitos, quinientos o más analitos, 1000 o más analitos, 2000 o más analitos, entre 2000 y 10.000 analitos, entre 5.000 y 20.000 analitos, o entre 10.000 y 100.000 analitos.

- 30 Con referencia al bloque 1012, en algunas realizaciones, el código de barras espacial único codifica un valor único predeterminado seleccionado del conjunto {1 1024}, {1 4096}, {1 16384}, {1 165536}, {1 262144}, {1 1048576}, {1 4194304}, {1 16777216}, {1 67108864}, o {1 1 x 10¹²}.

- 35 Con referencia al bloque 1014, en algunas realizaciones, el uno o más analitos es una pluralidad de analitos. Un punto de captura respectivo 1136 en el conjunto de puntos de captura incluye una pluralidad de sondas de captura. Cada sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura incluye un dominio de captura que se caracteriza por un tipo de dominio de captura en una pluralidad de tipos de dominio de captura. Cada respectivo tipo de dominio de captura en la pluralidad de tipos de dominio de captura se configura para unirse a un analito diferente de la pluralidad de analitos.

- 40 En consecuencia, en algunas de estas realizaciones, cada tipo de dominio de captura corresponde a un analito específico (por ejemplo, un oligonucleótido o resto de unión específico para un gen específico). En algunas realizaciones, cada tipo de dominio de captura de la pluralidad de tipos de dominio de captura se configura para unirse al mismo analito (por ejemplo, complementariedad de unión específica con ARNm para un gen único) o con diferentes analitos (por ejemplo, complementariedad de unión específica con ARNm para una pluralidad de genes).

- 45 Con referencia al bloque 1016, en algunas realizaciones, la pluralidad de tipos de dominio de captura comprende entre 5 y 15.000 tipos de dominio de captura y el punto de captura respectivo 1136 incluye al menos cinco, al menos 10, al menos 100, al menos 1000 sondas de captura, al menos 5000 sondas de captura o al menos 10.000 sondas de captura para cada tipo de dominio de captura de la pluralidad de tipos de dominio de captura.

- 50 Con referencia al bloque 1018, en algunas realizaciones, el uno o más analitos es una pluralidad de analitos. Un punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura incluye una pluralidad de sondas de captura, cada sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura que incluye un dominio de captura que se caracteriza por un tipo de dominio de captura único configurado para unirse a cada analito de la pluralidad de analitos de manera no sesgada.

En consecuencia, en algunas de estas realizaciones, el dominio de captura comprende un resto de captura no específico (por ejemplo, un resto de unión oligo-dT).

Con referencia al bloque 1020, en algunas realizaciones, cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura está contenido en un cuadrado de 100 micrones por 100 micrones del sustrato (por ejemplo, on el sustrato

5 del sustrato). En algunas realizaciones, cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura está contenido en un cuadrado de 50 micrones por 50 micrones del sustrato. En algunas realizaciones, cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura está contenido en un cuadrado de 10 micrones por 10 micrones del sustrato. En algunas realizaciones, cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura está contenida en un cuadrado de 1 micrón por 1 micrón on el sustrato. En algunas realizaciones, cada punto de captura
10 respectivo en el conjunto de puntos de captura está contenida en un cuadrado de 0,5 micrones por 0,5 micrones del sustrato. En algunas realizaciones, cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura está contenida en un cuadrado de 0,3 micrones por 0,3 micrones del sustrato. En algunas realizaciones, cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura está contenida en un cuadrado de 0,2 micrones por 0,2 micrones del sustrato.

15 Con referencia al bloque 1022, en algunas realizaciones, una distancia entre un centro de cada punto de captura respectivo a un punto de captura vecino en el conjunto de puntos de captura en el sustrato está entre 300 nanómetros y 300 micrones. En algunas realizaciones, una distancia entre un centro de cada punto de captura respectivo a un punto de captura vecino es entre 300 nanómetros y 15 micrones, entre 800 nanómetros y 10 micrones, o entre dos micrones y siete micrones. En algunas realizaciones, una distancia entre un centro de cada punto respectivo a un punto de captura vecino es entre 100 micrones y 200 micrones.

20 Con referencia al bloque 1024 de la FIG. 10B, en algunas realizaciones, una forma de cada punto de captura en el conjunto de puntos de captura on el sustrato es una configuración de forma cerrada. En algunas realizaciones, la configuración de forma cerrada es circular, elíptica, o un N-gon, donde N es un valor entre 1 y 20. En algunas realizaciones, la configuración de forma cerrada es hexagonal. Con referencia al bloque 1026, en algunas de estas

25 realizaciones, la configuración de forma cerrada es circular y cada punto de captura en el conjunto de puntos de captura tiene un diámetro de entre 25 micrones y 65 micrones. En algunas realizaciones, la configuración de forma cerrada es circular o hexagonal, y cada punto de captura en el conjunto de puntos de captura tiene un diámetro de entre 30 nanómetros y 200 micrones, y/o un diámetro de 100 micrones o menos. En algunas realizaciones, la configuración de forma cerrada es circular y cada punto de captura en el conjunto de puntos de captura tiene un diámetro de entre 30 micrones y 200 micrones. En algunas realizaciones, la configuración de forma cerrada es circular
30 o hexagonal y cada punto de captura en el conjunto de puntos de captura tiene un diámetro de entre 0,5 micrones y 60 micrones. Con referencia al bloque 1028, en algunas realizaciones, una distancia entre un centro de cada punto de captura respectivo a un punto de captura vecino en el conjunto de puntos de captura en el sustrato está entre 40 micrones y 100 micrones. En algunas realizaciones, una distancia entre un centro de cada punto de captura respectivo a un punto de captura vecino en el conjunto de puntos de captura en el sustrato está entre 300 nanómetros y 300 micrones.

35 En algunas realizaciones, una distancia entre un centro de cada punto respectivo a un punto de captura vecino en el conjunto de puntos de captura en el sustrato está entre 700 nanómetros y 10 micrones. En algunas realizaciones, una distancia entre un centro de cada punto respectivo a un punto de captura vecino en el conjunto de puntos de captura en el sustrato está entre 800 nanómetros y 3 micrones.

40 En algunas realizaciones, las posiciones de una pluralidad de puntos de captura de una matriz están predeterminadas. En algunas realizaciones, las posiciones de una pluralidad de puntos de captura de una matriz no están predeterminadas. En algunas realizaciones, el sustrato comprende marcadores fiduciales, y la posición de los marcadores fiduciales está predeterminada de tal manera que se puede mapear a una ubicación espacial. En algunas realizaciones, un sustrato comprende un número de puntos de captura que está entre 500 y 1000, entre 1000 y 5000, entre 5000 y 10.000, entre 10.000 y 15.000, entre 15.000 y 20.000, o entre 20.000 y 100.000. En algunas realizaciones, un sustrato comprende entre 1000 y 5000 puntos de captura, o entre 4000 y 100.000 puntos de captura donde los puntos de captura se disponen en el sustrato en forma hexagonal o en una cuadrícula.

45 Con referencia al bloque 1030, en algunas realizaciones, un punto de captura 1136 en el conjunto de puntos de captura comprende un dominio de captura. Con referencia al bloque 1032, en algunas realizaciones, un punto de captura en el conjunto de puntos de captura comprende un dominio de escisión. Con referencia al bloque 1034, en algunas realizaciones, cada punto de captura en el conjunto de puntos se une directamente o se une indirectamente al sustrato.

50 Con referencia al bloque 1036, en algunas realizaciones, cada punto de captura respectivo incluye 1000 o más sondas de captura, 2000 o más sondas de captura, 10.000 o más sondas de captura, 100.000 o más sondas de captura, 1 x 10^6 o más sondas de captura, 2 x 10^6 o más sondas de captura, o 5 x 10^6 o más sondas de captura. Con referencia al bloque 1038, en algunas realizaciones, cada sonda de captura en el punto de captura respectivo incluye una secuencia poli-A o una secuencia poli-T y el código de barras espacial único que caracteriza el punto de captura respectivo. Con referencia al bloque 1040 y bloque 1042, en algunas realizaciones, cada sonda de captura en el punto de captura

respectivo incluye el mismo código de barras espacial o un diferente código de barras espacial de la pluralidad de códigos de barras espaciales.

5 También son posibles numerosas combinaciones alternativas de tipos de dominios de captura, tamaños de puntos de captura, matrices, sondas, analitos de códigos de barras espaciales y/u otras características de los puntos de captura, que incluye, pero sin limitación dimensiones, diseños y modificaciones, y se tratan detalladamente más arriba (por ejemplo, en la Sección (11) Metodología analítica general basada en matrices espaciales; Subsecciones (b) Sondas de captura, (c) Sustrato y (d) Matrices).

10 Con referencia nuevamente al bloque **1004**, la imagen se obtiene como una matriz de valores de píxeles. Como ejemplo, en referencia a la **FIG. 3**, la obtención de imágenes de una muestra de tejido y/o una matriz en un sustrato comprende una segunda etapa **302** de ejemplo de flujo de trabajo para el análisis espacial. Una imagen se puede obtener en cualquier formato de archivo de imagen electrónico, que incluye, pero sin limitación JPEG/JFIF, TIFF, Exif, PDF, EPS, GIF, BMP, PNG, PPM, PGM, PBM, PNM, WebP, formatos de trama HDRR, HEIF, BAT, BPG, DEEP, DRW, ECW, FITS, FLIF, ICO, ILBM, IMG, PAM, PCX, PGF, JPEGXR, Formato de archivo de imagen por capas, PLBM, SGI, SID, CD5, CPT, PSD, PSP, XCF, PDN, CGM, SVG, PostScript, PCT, WMF, EMF, SWF, XAML, y/o RAW. En algunas realizaciones la matriz de valores de píxel comprende al menos 100, 10.000, 100.000, 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 5×10^6 , 8×10^6 , 10×10^6 , o 15×10^6 valores de píxel.

15 En algunas realizaciones, la imagen se obtiene en cualquier modo de color electrónico, que incluye, pero sin limitación, escala de grises, mapa de bits, indexado, RGB, CMYK, HSV, color de laboratorio, duoton y/o multicanal. En algunas realizaciones, la imagen está manipulada (por ejemplo, cosida, comprimida y/o aplanada). En algunas realizaciones, el tamaño del archivo de imagen está entre 1 KB y 1 MB, entre 1 MB y 0,5 GB, entre 0,5 GB y 5 GB, entre 5 GB y 10 GB, o superior a 10 GB.

20 En algunas realizaciones, la imagen se representa como una matriz (por ejemplo, matriz) que comprende una pluralidad de píxeles, de tal manera que la ubicación de cada píxel respectivo en la pluralidad de píxeles en la matriz (por ejemplo, matriz) corresponde a su ubicación original en la imagen. En algunas realizaciones, la imagen se representa como un vector que comprende una pluralidad de píxeles, de manera que cada píxel respectivo en la pluralidad de píxeles en el vector comprende información espacial correspondiente a su ubicación original en la imagen.

25 Con referencia de nuevo al bloque **1004**, el sustrato del que se obtienen las imágenes incluye una pluralidad de marcadores fiduciales. Los marcadores fiduciales se describen con más detalle en la Descripción detallada anterior (por ejemplo, en 11. Metodología analítica basada en matriz espacial general; (c) Captura de sustrato y (e) analito; (v) Región de interés). Brevemente, en algunas realizaciones, los marcadores fiduciales se incluyen en el sustrato como una o más marcas en la superficie del sustrato. En algunas realizaciones, los marcadores fiduciales sirven como guías para correlacionar la información espacial con la caracterización del analito de interés. En algunas realizaciones, los marcadores fiduciales se preparan sobre el sustrato utilizando cualquiera de las siguientes técnicas no limitantes: 30 deposición de cromo sobre vidrio, nanopartículas de oro, grabado por láser, tinta de máquina de escribir, perlas, Epson 802, HP 65 Black XL, rotulador permanente, oligos fluorescentes, nanopartículas de óxido de hierro amónico, nanofosforos de conversión ascendente dopados con tulio amónico y/o puntos cuánticos basados en Cd amónico. Otras técnicas de preparación de marcadores fiduciales incluyen chorro de arena, impresión, depósito o la modificación física 35 de la superficie del sustrato. En algunos casos, los marcadores fiduciales no se unen a los analitos, ni directa ni indirectamente.

40 En algunas realizaciones, los marcadores fiduciales están unidos de forma no transitoria al límite exterior del sustrato (por ejemplo, el límite exterior del área de captura **1206**) y la muestra se superpone dentro del límite de los marcadores fiduciales. En algunas realizaciones, los marcadores fiduciales se unen transitoriamente al límite exterior del sustrato (por ejemplo, mediante la fijación de un adaptador, un soporte de portaobjetos y/o un cubreobjetos). En algunas 45 realizaciones, los marcadores fiduciales se fijan transitoriamente al límite exterior del sustrato antes o después de que la muestra esté sobre el sustrato. En algunas realizaciones, los marcadores fiduciales se fijan de forma transitoria o no transitoria al sustrato después de que la muestra esté sobre él pero antes de obtener la imagen.

45 La **FIG. 12** ilustra una imagen **1124** de un tejido **1204** sobre un sustrato, donde la imagen incluye una pluralidad de marcadores fiduciales, de acuerdo con algunas realizaciones. Los marcadores fiduciales están dispuestos a lo largo 50 del borde externo del sustrato, rodeando la matriz de puntos de captura y la superposición de tejido. En algunas realizaciones, los marcadores fiduciales comprenden puntos modelados, y los puntos modelados indican los bordes y las esquinas de la matriz de puntos de captura. En algunas de estas realizaciones, se proporciona un patrón diferente de marcadores fiduciales en cada esquina, lo que permite correlacionar la imagen con la información espacial utilizando cualquier orientación (por ejemplo, imagen girada y/o reflejada).

- En algunas realizaciones, la imagen se adquiere mediante microscopía óptica de transmisión. En algunas realizaciones, la muestra se tiñe antes de obtener la imagen utilizando, por ejemplo, marcadores detectables fluorescentes, radiactivos, quimioluminiscentes, calorimétricos o colorimétricos. En algunas realizaciones, la muestra se tiñe utilizando tinción vivo/muerto (por ejemplo, azul tripán). En algunas realizaciones, las muestras se tiñen como se indica en la Descripción detallada anterior (por ejemplo, en I. Introducción; (d) Muestras Biológicas; (ii) Preparación de Muestras Biológicas; (6) Tinción). En algunas realizaciones, la imagen se adquiere usando microscopía óptica (por ejemplo, campo claro, campo oscuro, tinción de dispersión, contraste de fase, contraste de interferencia diferencial, reflexión de interferencia, fluorescencia, confocal, iluminación de plano único, multifotón de campo amplio, deconvolución, microscopía electrónica de transmisión y/o microscopía electrónica de barrido). En algunas realizaciones, la imagen se adquiere después de teñir la sección de tejido pero antes de la captura del analito. En algunas realizaciones, la muestra se somete a inmunohistoquímica antes de la adquisición de la imagen y se utiliza microscopía de fluorescencia para adquirir la imagen. En algunas de estas realizaciones, la imagen se adquiere utilizando el modo Epi-iluminación, en el que tanto la iluminación como la detección se realizan desde un lado de la muestra. En algunas realizaciones, la imagen se adquiere mediante microscopía confocal, imágenes de dos fotones, microscopía multifotónica de campo, microscopía multifotónica de campo amplio, microscopía de iluminación de plano único o microscopía de fluorescencia de lámina de luz. Ver por ejemplo, *Confocal and Two-Photon Microscopy: Foundations, Applications and Advances*, 2002, Diaspro ed., Wiley Liss, New York, New York; and *Handbook of Biologica/ Confocal Microscopy*, 2002, Pawley ed., Springer Science+Business Media, LLC, New York, New York.
- Con referencia al bloque 1044 de la FIG. 10C, la matriz de valores de píxeles se analiza para identificar una pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen. Con referencia al bloque 1046 de la FIG. 10C, en algunas realizaciones esto se lleva a cabo mediante la identificación de una pluralidad de puntos fiduciales derivados candidatos dentro de la imagen mediante la determinación del umbral de la matriz de valores de píxeles dentro de la imagen con una pluralidad de diferentes valores de umbral, de este modo se logra una pluralidad de imágenes de umbral y se identifica, dentro de la pluralidad de imágenes de umbral, grupos de píxeles que tienen valores blancos. En una realización, para un valor umbral T , cada respectivo píxel_{ij} de la imagen se reemplaza con un píxel negro si la intensidad del píxel_{ij} respectivo es menor que el valor umbral ($i,j < T$), o con un píxel blanco si la intensidad del píxel_{ij} respectivo es mayor que el valor umbral ($i,j > T$). En algunas realizaciones, el valor del umbral se selecciona automáticamente utilizando la imagen. Véase, por ejemplo, Sezgin and Sankur, 2004, "Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation," Journal of Electronic Imaging 13(1), 146-165 para la divulgación de métodos de umbralización, que incluyen la selección de valores de umbral adecuados, y tipos de umbralización que incluyen métodos basados en la forma del histograma. Como se divulga en Sezgin y Sankur, Id., los métodos de umbralización adecuados incluyen, pero no se limitan a métodos de umbralización basados en la forma del histograma donde, por ejemplo, se analizan los picos, valles y curvaturas del histograma suavizado. Los métodos de umbralización adecuados también incluyen métodos basados en agrupación donde las muestras de nivel de gris se agrupan en dos partes como fondo y primer plano (objeto), o alternativamente se modelan como una mezcla de dos Gaussianos.
- Los métodos de umbralización adecuados también incluyen métodos basados en la entropía que utilizan la entropía de las regiones de primer plano y de fondo, la entropía cruzada entre la imagen original y la binarizada, etc. Ver, por ejemplo, Zhang, 2011, "Optimal multi-level Thresholding based on Maximum Tsallis Entropy via an Artificial Bee Colony Approach", Entropy 13(4): pp. 841-859, que se incorpora por referencia en la presente. Los métodos de umbralización adecuados incluyen además métodos de umbralización basados en atributos de objeto que buscan una medida de similitud entre el nivel de gris y las imágenes binarizadas, como la similitud de forma difusa, la coincidencia de bordes, etc. Métodos de umbralización adecuados incluyen además métodos espaciales [que] utilizan distribución de probabilidad de orden superior y/o correlación entre píxeles.
- Los métodos de umbralización adecuados incluyen además métodos locales que adaptan el valor umbral en cada píxel a las características locales de la imagen. En tales métodos de umbralización local, se selecciona un T diferente para cada píxel de la imagen.
- Así, como se ha indicado anteriormente, en algunas realizaciones se utilizan varios valores diferentes de T para umbralizar una imagen, mientras que en otras realizaciones se utiliza un único valor de T para umbralizar una imagen. El resultado neto de la umbralización es la identificación de una pluralidad de puntos fiduciales derivados candidatos. Bajo umbralización clásica, estos puntos fiduciales derivados candidatos son grupos de píxeles blancos. Sin embargo, la presente descripción no está tan limitada y un experto en la materia apreciará plenamente que el blanco y el negro se pueden invertir, de modo que los puntos fiduciales derivados candidatos sean grupos de píxeles negros. Sin embargo, para facilitar la descripción del flujo de trabajo, los puntos fiduciales derivados candidatos se considerarán grupos de píxeles blancos identificados por el umbral.
- La FIG 17 ilustra una imagen 1124 que incluye la muestra 1204 y una pluralidad de puntos fiduciales derivados candidatos 1702 en el perímetro de la imagen. En algunas realizaciones, hay entre 5 y 1000 puntos fiduciales derivados

candidatos 1702, entre 5 y 500 puntos fiduciales derivados candidatos 1702, o entre 5 y 300 puntos fiduciales derivados candidatos 1702.

Continuando con el bloque 1046 de la FIG. 10C, la pluralidad de puntos fiduciales derivados candidatos se agrupan sobre la base del tamaño del punto (por ejemplo, área del tamaño del punto, diámetro del tamaño del punto, circunferencia del tamaño del punto), de este modo se distribuye la pluralidad de puntos fiduciales derivados candidatos en una pluralidad de subconjuntos de puntos fiduciales derivados candidatos.

El agrupamiento se describe en las páginas 211-256 de Duda y Hart, Pattern Classification and Scene Analysis, 1973, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, (en adelante "Duda 1973"). Como se describe en la Sección 6,7 de Duda 1973, el problema del agrupamiento consiste en encontrar agrupaciones naturales en un conjunto de datos. Para identificar agrupaciones naturales, se abordan dos cuestiones. En primer lugar, se determina una forma de medir la similitud (o disimilitud) entre dos muestras. Esta métrica (por ejemplo, la medida de similitud) se utiliza para asegurar que las muestras de un agrupamiento se parezcan más entre sí que a las muestras de otros agrupamientos. En segundo lugar, se determina un mecanismo para dividir los datos en agrupamientos utilizando la medida de similitud. Las medidas de similitud se analizan en la Sección 6,7 de Duda 1973, donde se afirma que una forma de comenzar una investigación de agrupamiento es definir una función de distancia y calcular la matriz de distancias entre todos los pares de muestras del conjunto de entrenamiento. Si la distancia es una buena medida de similitud, entonces la distancia entre entidades de referencia en el mismo agrupamiento será significativamente menor que la distancia entre las entidades de referencia en agrupamientos diferentes. Sin embargo, como se indica en la página 215 de Duda 1973, el agrupamiento no requiere el uso de una métrica de distancia. Por ejemplo, se puede utilizar una función de similitud no métrica $s(x, x')$ para comparar dos vectores x y x' . Convencionalmente, $s(x, x')$ es una función simétrica cuyo valor es grande cuando x y x' son de algún modo "similares". En la página 218 de Duda 1973 se ofrece un ejemplo de función de similitud no métrica $s(x, x')$. Una vez seleccionado un método para medir la "similitud" o "disimilitud" entre puntos de un conjunto de datos, el agrupamiento requiere una función criterio que mida la calidad del agrupamiento de cualquier partición de los datos. Las particiones del conjunto de datos que extremen la función criterio se utilizan para agrupar los datos. Ver la página 217 de Duda 1973. Las funciones criterio se analizan en la Sección 6,8 de Duda 1973. Más recientemente, se ha publicado Duda et al., Pattern Classification, 2^a edición, John Wiley & Sons, Inc. Nueva York. Las páginas 537-563 describen en detalle el agrupamiento que se puede usar de acuerdo con el bloque 1046 de la FIG. 10C. Más información sobre técnicas adecuadas de agrupamiento se encuentra en Kaufman and Rousseeuw, 1990, Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis, Wiley, New York, N.Y.; Everitt, 1993, Cluster analysis (3d ed.), Wiley, New York, N.Y.; y Backer, 1995, Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

Algunos ejemplos de técnicas de agrupamiento que se pueden utilizar en la presente descripción incluyen, pero sin limitación, el agrupamiento jerárquico (agrupamiento por aglomeración mediante el algoritmo del vecino más cercano, algoritmo del vecino más lejano, algoritmo de relación media, algoritmo del centroide o algoritmo de la suma de cuadrados), agrupamiento de k-medias, algoritmo de agrupamiento de k-medias difusas y agrupamiento de Jarvis-Patrick. En algunas realizaciones, el agrupamiento comprende la agrupación no supervisada, en la que no se impone ninguna noción preconcebida de los agrupamientos que se deben formar cuando se agrupa el conjunto de entrenamiento.

En algunas realizaciones, la pluralidad de puntos fiduciales derivados candidatos se agrupan en dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, diecisés, diecisiete, dieciocho, diecinueve o veinte subconjuntos. En algunas realizaciones, los puntos fiduciales derivados candidatos se agrupan en entre dos y 100 subconjuntos. Cada subconjunto respectivo de puntos fiduciales derivados candidatos en la pluralidad de subconjuntos de puntos fiduciales derivados candidatos tiene un tamaño característico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tamaño característico es el número medio de píxeles en cada punto fiduciario derivado candidato en el subconjunto respectivo. El subconjunto de puntos fiduciales derivados candidatos de la pluralidad de subconjuntos de puntos fiduciales derivados candidatos que tiene el mayor tamaño característico se selecciona como la pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen. Por ejemplo, se debe considerar el caso en el que la pluralidad de puntos fiduciales derivados candidatos se agrupan en dos subconjuntos, subconjunto A y subconjunto B, y el tamaño medio de los puntos fiduciales derivados candidatos en el subconjunto A es de 49 píxeles y el tamaño medio de los puntos fiduciales derivados candidatos en el subconjunto B es de 58 píxeles. En este caso, los puntos fiduciales derivados candidatos del subconjunto B se pueden elegir como puntos fiduciales derivados de la imagen y los puntos fiduciales derivados candidatos del subconjunto A se pueden descartar como ruido.

Con referencia al bloque 1048 de la FIG. 10D y con referencia adicional a la FIG. 17, en algunas realizaciones, en algunas realizaciones, se fusionan los respectivos pares de puntos fiduciales derivados candidatos que se encuentran dentro de una distancia umbral entre sí. En algunas realizaciones, esta distancia umbral es un número umbral de píxeles, tal como un píxel, dos píxeles, tres píxeles, cuatro píxeles, cinco píxeles, seis píxeles, siete píxeles, ocho píxeles, nueve píxeles, diez píxeles, veinte píxeles, etc. En algunas realizaciones, esta distancia umbral es una

distancia umbral entre centros de puntos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se fusionan un par respectivo de puntos fiduciales derivados candidatos cuyos centros están dentro de 0,5 μM , dentro de 1 μM , dentro de 2 μM , dentro de 3 μM , dentro de 4 μM , dentro de 5 μM , dentro de 10 μM o dentro de 20 μM entre sí. En algunas realizaciones, el punto fiducial candidato derivado fusionado resultante se toma a medio camino entre el par original de puntos fiduciales derivados candidatos que se fusionan.

5 En la **Fig. 17**, el par respectivo de puntos fiduciales derivados candidatos **1702-1 / 1702-2** se fusiona porque no superan un umbral de distancia. En algunas realizaciones, el filtro de distancia umbral se aplica a los puntos fiduciales derivados candidatos. En realizaciones alternativas, el filtro de distancia umbral no se aplica a los puntos fiduciales derivados candidatos, sino que se aplica a los puntos fiduciales derivados después de completar el bloque **1046**.

10 Con referencia al bloque **1050** de la **FIG. 10D**, en algunas realizaciones se filtran los respectivos puntos fiduciales derivados candidatos que no satisfacen un criterio de tamaño máximo o mínimo. En algunas realizaciones, este filtro de tamaño se aplica a los puntos fiduciales derivados candidatos. En realizaciones alternativas, este filtro de tamaño no se aplica a los puntos fiduciales derivados candidatos, sino que se aplica a los puntos fiduciales derivados una vez completado el bloque **046**. En algunas realizaciones, la aplicación de este filtro de tamaño hace que se descarten que los respectivos puntos fiduciales derivados candidatos de menos de 50 píxeles, 200 píxeles, 150 píxeles, 100 píxeles, 50 píxeles, 40 píxeles, 35 píxeles, 30 píxeles, 25 píxeles, 20 píxeles, 18 píxeles, 16 píxeles, 14 píxeles, 12 píxeles, 10 píxeles, 9 píxeles, 8 píxeles, 7 píxeles, 6 píxeles, 5 píxeles, o 4 píxeles o menos. En algunas realizaciones, la aplicación del filtro de tamaño hace que los respectivos puntos fiduciales derivados candidatos tengan más de 200 píxeles, 150 píxeles, 100 píxeles, 50 píxeles, 40 píxeles, 35 píxeles, 30 píxeles, 25 píxeles, 20 píxeles, 18 píxeles, 16 píxeles, 14 píxeles, 12 píxeles, o 10 píxeles.

15 Con referencia al bloque **1052** de la **FIG. 10D**, en algunas realizaciones, se filtran los respectivos puntos fiduciales derivados candidatos que no cumplen un criterio de circularidad. En algunas realizaciones, este filtro de circularidad se aplica a puntos fiduciales derivados candidatos. En realizaciones alternativas, esta circularidad no se aplica a puntos fiduciales derivados candidatos sino que se aplica a los puntos fiduciales derivados después de completar el bloque **1046**. En algunas de estas realizaciones, la circularidad de un punto fiducial derivado respectivo se define mediante:

$$\text{circularidad} = \frac{\text{Área}}{(\text{perímetro})^2}$$

20 donde "Área" es el área del punto fiducial derivado respectivo, y "perímetro" es el perímetro del punto fiducial derivado respectivo. Por lo tanto, en tales realizaciones, cuando este criterio de circularidad se halla fuera de un rango adecuado, el respectivo punto fiducial derivado candidato se considera que no es circular, y por lo tanto no es posiblemente representativo de un verdadero punto fiducial en el sustrato, que en algunas realizaciones se imprimen de tal manera de que sean circulares. En algunas realizaciones, la circularidad de cada punto fiducial candidato derivado respectivo se determina usando un método de traza única para la determinación de la redondez. En algunas 25 realizaciones, la circularidad de cada punto fiducial candidato derivado respectivo se determina utilizando un método de traza múltiple para la determinación de la redondez.

30 En algunas realizaciones, la circularidad de cada punto fiducial derivado candidato respectivo se determina utilizando un enfoque de círculo de referencia de mínimos cuadrados (LSCI) en el que el círculo de referencia se ajusta al punto fiducial derivado candidato respectivo de tal manera que la suma de los cuadrados de la desviación del punto fiducial derivado candidato respectivo de ese círculo de referencia es mínima. La falta de redondez se expresa entonces en términos de la desviación máxima del perfil de la LSCI, es decir, del pico más alto al valle más bajo. En tales 35 realizaciones, cuando la falta de redondez supera un valor umbral aceptable, se descarta el punto fiducial derivado candidato respectivo. En otras realizaciones, la redondez se mide utilizando un método de círculo circunscripto mínimo, método de círculo zonal mínimo. Ver, por ejemplo, Petrick et al., 2009, Measurement 2009, Proceedings of the 7th International Conference, Smolenice, Slovakia, pp. 352-355, que se incorpora en la presente por referencia. El umbral exacto utilizado para descartar los respectivos puntos fiduciales derivados candidatos (o puntos fiduciales derivados candidatos) utilizando cualquiera de los métodos divulgados para calcular la circularidad, o cualquier método para calcular la excentricidad conocido en la técnica, depende de la aplicación y, en muchos casos, se optimiza dinámicamente para un conjunto de datos dado.

40 45 50 55 Con referencia al bloque **1054** de la **FIG. 10D**, en algunas realizaciones, se descartan los respectivos puntos fiduciales derivados candidatos que no satisfacen un criterio de convexidad. En algunas realizaciones, este filtro de convexidad se aplica a puntos fiduciales derivados candidatos. En realizaciones alternativas, este filtro de convexidad no se aplica a puntos fiduciales derivados candidatos sino que se aplica a puntos fiduciales derivados después de completar el bloque **1046**. En algunas realizaciones, el filtro de convexidad requiere que cada respectivo punto fiducial derivado candidato no se halle en un rango entre una convexidad mínima (menos de o igual a uno) y una convexidad máxima.

En algunas realizaciones, la convexidad de a respectivo punto fiducial derivado candidato se calcula mediante la fórmula:

convexidad = Área

"Área de envolvente convexa"²

- 5 donde, "Área" es el área del respectivo punto fiducial derivado candidato, y "Área de envolvente de Hull" el área de la
 envolvente convexa del respectivo punto fiducial derivado. Ver Andrew, 1979, "Another efficient algorithm for convex
 hulls in two dimensions", Information Processing Letters 9 (5), pp. 216-219; y Brown, 1979, "Voronoi diagrams from
 convex hulls", Information Processing Letters 9(5), pp. 223-228 para el cálculo de las envolventes convexas. Para más
 10 información sobre el cálculo de la convexidad en general, ver Emerging Technology in Modeling and Graphics:
 Processing of IEM Graph 2018, Jyotsna Kumar Mandal, Debika ed. En algunas realizaciones, el filtro de convexidad
 requiere que cada punto fiducial derivado candidato respectivo se halla dentro de un rango entre una convexidad
 mínima de 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35 o 0,45 y una convexidad máxima de 0,95, 0,90, 0,85, 0,80, 0,75, 0,70,
 0,65 o 0,60.ç

15 Con referencia al bloque 1056 de la FIG. 10D, en algunas realizaciones, se descartan los respectivos puntos fiduciales
 derivados candidatos que no satisfacen un criterio de la relación de inercia. En algunas realizaciones, este filtro de la
 relación de inercia se aplica a puntos fiduciales derivados candidatos. En realizaciones alternativas, este filtro de la
 relación de inercia no se aplica a los puntos fiduciales derivados candidatos sino que se aplica a los puntos fiduciales
 20 derivados después de completar el bloque 1056. En algunas realizaciones, el filtro de la relación de inercia requiere
 que cada respectivo punto fiducial derivado candidato se halle en un rango entre una inercia mínima (menor de o igual
 a uno) y una inercia máxima. Para mayor información sobre el cálculo de la inercia en general, ver *Emerging
 Technology in Modeling and Graphics: Processing of IEM Graph 2018*, Springer Singapore, Jyotsna Kumar Mandal,
 Debika eds.. En algunas realizaciones, el filtro de inercia requiere que cada respectivo punto fiducial derivado
 candidato se halle en un rango entre una inercia mínima de 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, o 0,70 y a inercia máxima
 25 de 1 (circulo completo).

25 Con referencia al bloque 1058 de la FIG. 10D, el identificador de sustrato 1128 de la estructura de datos 1122 se utiliza
 para seleccionar un primer molde de una pluralidad de moldes (por ejemplo, de un sistema informático remoto, de
 entre la pluralidad de moldes, en respuesta al envío del identificador de sustrato al sistema informático remoto). En
 otras palabras, el identificador de sustrato del sustrato que se está analizando se utiliza para identificar un molde que
 30 tenga un identificador de sustrato coincidente. Por ejemplo, con referencia a la FIG. 11B, en algunas realizaciones, la
 pluralidad de moldes se encuentra en un repositorio de moldes 1140. Cada molde 1142 en la pluralidad de moldes
 incluye al menos un identificador de chip 1128 que se puede utilizar y comprende posiciones de referencia 1148
 (coordenadas) para una correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia 1146 y un sistema de
 35 coordenadas correspondiente 1144. En algunas realizaciones, el sistema de coordenadas se infiere a partir de las
 coordenadas 1148. En algunas realizaciones, el sistema de coordenadas 1144 comprende la ubicación (coordenadas)
 de los puntos de captura 1136 en el sustrato del chip tiene un identificador de sustrato 1128 que coincide con el
 identificador de sustrato de la molde 1142

40 En algunas realizaciones, un molde 1142 se forma a partir de un archivo de instrucciones de impresión de sustrato
 (por ejemplo, un archivo de lista de matrices GenePix (GAL)) que especifica cómo imprimir los puntos de captura de
 la matriz 1136 en el sustrato. En algunas realizaciones, el archivo de instrucciones de impresión de sustrato se analiza
 para crear un molde 1142 para cada sustrato y este molde se proporciona cuando se proporciona el identificador de
 sustrato coincidente 1128. Para más información sobre ejemplos de archivos de instrucciones de impresión de
 45 sustratos, ver Zhai, 2001, "Making GenePix Array List (GAL) Files," GenePix Application Note, Molecular Devices, pp.
 1-9. La FIG. 18 ilustra un ejemplo de la formación de un molde 1142 a partir de un archivo GAL.

50 Con referencia al bloque 1060 de la FIG. 10D, en algunas realizaciones, la correspondiente pluralidad de puntos
 fiduciales de referencia 1146 del primer molde 1142 consiste en entre 100 puntos fiduciales y 1000 puntos fiduciales,
 entre 200 puntos fiduciales y 800 puntos fiduciales, entre 300 puntos fiduciales y 700 puntos fiduciales o entre 500 y
 600 puntos fiduciales. Es decir, el molde 1142 tiene entre 100 puntos fiduciales y 1000 puntos fiduciales porque ese
 es el número de puntos fiduciales que hay en el sustrato que corresponde al molde. En algunas realizaciones, el molde
 55 1142 y el correspondiente sustrato tienen menos de 100 puntos fiduciales, menos de 50 puntos fiduciales o menos de
 25 puntos fiduciales. En algunas realizaciones, el molde 1142 y el correspondiente sustrato tienen más de 1000 puntos
 fiduciales, más de 1500 puntos fiduciales o más de 3000 puntos fiduciales. La FIG. 19 ilustra las posiciones de puntos
 fiduciales en el perímetro del sustrato. Como también se ilustra en la FIG. 19, el sustrato también incluye puntos de
 60 captura 1136 y el sistema de coordenadas 1144 del molde 1142 especifica la ubicación de estos puntos de captura en
 el sustrato y, en algunas realizaciones, con precisión qué sondas de captura se han impreso en cada punto de captura.
 65 En algunas realizaciones, cada punto de captura se ha impreso con las mismas sondas de captura. En otras
 realizaciones, cada punto de captura se imprime con un conjunto independiente de sondas de captura y el molde 1142

rastrea no solo la posición en el sustrato de cada punto de captura respectivo, sino también el conjunto independiente de sondas de captura que se han impreso en el punto de captura respectivo. En algunas realizaciones, el sistema de coordenadas **1144** proporciona una ubicación explícita de cada punto de captura **1136** en el sustrato. En algunas realizaciones, el sistema de coordenadas **1144** proporciona una orientación del sustrato en relación con la lista de puntos fiduciales y la orientación se utiliza para hacer referencia a una lista de ubicaciones de puntos de captura en una fuente de datos externa al molde **1142**. Un experto en la materia apreciará que hay varias maneras de implementar el sistema de coordenadas del molde **1144** basado en la presente descripción (por ejemplo, como una lista explícita de ubicaciones de puntos de captura, como una orientación derivada de los puntos fiduciales acoplado con una lista externa de ubicaciones de puntos de captura, etc.) y todos estos métodos están incluidos en la presente descripción.

- 5 Con referencia al bloque **1062** de la FIG. 10E, la pluralidad de puntos fiduciales derivados **1130** de la imagen **1124** se alinea con la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia **1146** del primer molde **1142** utilizando un algoritmo de alineación para obtener una transformación entre la pluralidad de puntos fiduciales derivados **1130** de la imagen **1124** y la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia **1146** del primer molde **1142**. Este es un problema de registro de conjuntos de puntos, cuyo objetivo es asignar correspondencias entre dos conjuntos de puntos (la pluralidad de puntos fiduciales derivados **1130** de la imagen **1124** y la pluralidad de puntos fiduciales de referencia **1146** del molde **1142**) y/o recuperar la transformación que mapea un conjunto de puntos al otro. En algunas realizaciones, para determinar en cuál de las ocho orientaciones posibles se encuentra un sustrato (cuatro rotaciones de 90 grados más la reflexión), se ejecutan concurrentemente las ocho orientaciones y se elige la orientación con el error residual más bajo, siempre y cuando el segundo error residual más bajo sea significativamente mayor.
- 10 Con referencia al bloque **1064** de la FIG. 10E, en algunas realizaciones, la transformación entre la pluralidad de puntos fiduciales derivados **1130** de la imagen **1124** y la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia **1146** del molde **1142** es una transformación de similitud. Una transformación de similitud solo permite la traslación, la rotación y el escalado isotrópico. Por lo tanto, cuando se utiliza una transformación de similitud, la pluralidad de puntos fiduciales derivados **1130** de la imagen **1124** se giran, se trasladan y/o se escalan isotópicamente para minimizar un error residual entre la pluralidad de puntos fiduciales derivados **1130** y la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia **1146**.
- 15 Con referencia al bloque **1064** de la FIG. 10E, en algunas realizaciones, la transformación entre la pluralidad de puntos fiduciales derivados **1130** de la imagen **1124** y la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia **1146** del molde **1142** es una transformación rígida. Una transformación rígida solo permite la traslación y la rotación. Así, cuando se utiliza una transformación rígida, la pluralidad de puntos fiduciales derivados **1130** de la imagen **1124** se giran y/o trasladan para minimizar un error residual entre la pluralidad de puntos fiduciales derivados **1130** y la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia.
- 20 Con referencia al bloque **1064** de la FIG. 10E, en algunas realizaciones, la transformación entre la pluralidad de puntos fiduciales derivados **1130** de la imagen **1124** y la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia **1146** del molde **1142** es una transformación no rígida que comprende escalado anisotrópico y sesgado de la pluralidad de puntos fiduciales derivados **1130** de la imagen **1124** para minimizar un error residual entre la pluralidad de puntos fiduciales derivados **1130** y la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia **1146**. Con referencia al bloque **1068** de la FIG. 10E, en algunas realizaciones la transformación no rígida es una transformación affine. Con referencia al bloque **1070** de la FIG. 10E, en algunas realizaciones el algoritmo de alineación es un algoritmo de deriva de punto coherente. Ver Myronenko et al., 2007, "Non-rigid point set registration: Coherent Point Drift," NIPS, 1009-1016; y Myronenko and Song, "Point Set Registration: Coherent Point Drift," arXiv:0905.2635v1, 15 May 2009, para la descripción en el algoritmo de deriva de punto coherente. En algunas realizaciones, el algoritmo de deriva de punto coherente que se usa en una implementación en Python llamada pycpd." Ver, Internet al github.com/siavashk/pycpd.
- 25 Con referencia al bloque **1072** de la FIG. 10E, en algunas realizaciones es un algoritmo iterativo de punto más cercano. Vere, por ejemplo, Chetverikov et al., 2002, "The Trimmed Iterative Closest Point Algorithm", Object recognition supported by user interaction for service robots, Quebec City, Quebec, Canada, ISSN: 1051-4651; y Chetverikov et al., 2005, "Robust Euclidean alignment of 3D point sets; the trimmed iterative closest point algorithm", Image and Vision Computing 23(3), pp. 299-309.

- 30 Con referencia al bloque **1072** de la FIG. 10E, en algunas realizaciones es un algoritmo iterativo de punto más cercano. Vere, por ejemplo, Chetverikov et al., 2002, "The Trimmed Iterative Closest Point Algorithm", Object recognition supported by user interaction for service robots, Quebec City, Quebec, Canada, ISSN: 1051-4651; y Chetverikov et al., 2005, "Robust Euclidean alignment of 3D point sets; the trimmed iterative closest point algorithm", Image and Vision Computing 23(3), pp. 299-309.
- 35 Con referencia al bloque **1074** de la FIG. 10E, en algunas realizaciones, el algoritmo de alineación es un algoritmo de coincidencia de puntos robusto (ver, por ejemplo, Chui and Rangarajan, 2003, "A new point matching algorithm for non-rigid registration", Computer Vision and Image Understanding 89(2-3), pp. 114-141) o un algoritmo de coincidencia de puntos robusto con spline de placa fina (ver, por ejemplo, Yang, 2011, "The thin plate spline robust point matching (TPS-RPM) algorithm: A revisit", Pattern Recognition Letters 32(7), pp. 910-918).
- 40 Con referencia al bloque **1074** de la FIG. 10E, en algunas realizaciones, el algoritmo de alineación es un algoritmo de coincidencia de puntos robusto (ver, por ejemplo, Chui and Rangarajan, 2003, "A new point matching algorithm for non-rigid registration", Computer Vision and Image Understanding 89(2-3), pp. 114-141) o un algoritmo de coincidencia de puntos robusto con spline de placa fina (ver, por ejemplo, Yang, 2011, "The thin plate spline robust point matching (TPS-RPM) algorithm: A revisit", Pattern Recognition Letters 32(7), pp. 910-918).
- 45 Con referencia al bloque **1074** de la FIG. 10E, en algunas realizaciones, el algoritmo de alineación es un algoritmo de coincidencia de puntos robusto (ver, por ejemplo, Chui and Rangarajan, 2003, "A new point matching algorithm for non-rigid registration", Computer Vision and Image Understanding 89(2-3), pp. 114-141) o un algoritmo de coincidencia de puntos robusto con spline de placa fina (ver, por ejemplo, Yang, 2011, "The thin plate spline robust point matching (TPS-RPM) algorithm: A revisit", Pattern Recognition Letters 32(7), pp. 910-918).
- 50 Con referencia al bloque **1074** de la FIG. 10E, en algunas realizaciones, el algoritmo de alineación es un algoritmo de coincidencia de puntos robusto (ver, por ejemplo, Chui and Rangarajan, 2003, "A new point matching algorithm for non-rigid registration", Computer Vision and Image Understanding 89(2-3), pp. 114-141) o un algoritmo de coincidencia de puntos robusto con spline de placa fina (ver, por ejemplo, Yang, 2011, "The thin plate spline robust point matching (TPS-RPM) algorithm: A revisit", Pattern Recognition Letters 32(7), pp. 910-918).

Con referencia al bloque **1076** de la FIG. 10E, la transformación y el sistema de coordenadas **1144** del primer molde **1142** se usa para registrar la imagen **1124** en el conjunto de puntos de captura **1136**. Las FIGS. 20 y 21 ilustran. En la FIG. 20, la alineación causa la transformación que mapea los puntos fiduciales derivados del sustrato **1130** de la imagen en los puntos fiduciales **1148** del molde **1142**. Después de este mapeo, como se ilustra en la FIG. 21, es posible determinar la ubicación de cada punto de captura **1136** en la imagen **1124**.

Con referencia al bloque **1078** de la FIG. 10E, la imagen **1124** se analiza en conjunción con datos espaciales de analitos tales como datos de secuenciación de ácido nucleico (por ejemplo, lecturas de secuencia **1138**) asociados con cada punto de captura **1136**, de este modo se realiza un análisis espacial de ácido nucleico. Los métodos para dicho análisis se divulan en 62/938,336, titulado "Pipeline for spatial analysis of analytes," presentado el 21 de noviembre de 2019. Esto se ilustra en la FIG. 22, después de que los puntos de capturarse superponen en la imagen, los puntos que están debajo de la muestra de tejido del tejido se pueden identificar y los datos de secuenciación de ácido nucleico de cada una de tales puntos de captura se pueden analizar usando, por ejemplo, las técnicas divulgadas en la presente descripción, así como las detalladas en la Solicitud de patente provisional de Estados Unidos Nros. 62/886.233, titulada "Systems and Methods for Using the Spatial Distribution of Haplotypes to Determine a Biological Condition", presentada el 13 de agosto de 2019; 62/909,071, titulada "Systems and Methods for Visualizing a Pattern in a Dataset", presentada el 1 de octubre de 2019; 62/839,346, titulada "Spatial Transcriptomics of Biological Analytes in Tissue Samples", presentada el 26 de abril de 2019, y 62/938,336, titulada "Pipeline for spatial analysis of analytes", presentada el 21 de noviembre de 2019. Dicho análisis se ilustra adicionalmente en la FIG. 23, que especifica que las puntos de captura **1136** que están bajo tejido se usan para generar una matriz de código de barras filtrada que se usa para el análisis secundario que se ilustra adicionalmente en las FIGS. 24-35. En particular, la FIG. 24 ilustra cómo se extraen los códigos de barras espaciales **1150** y UMIs de cada lectura de secuencia **1136** (por ejemplo, usando la lectura 1) que se ha obtenido, como se explica con más detalle en la solicitud provisional de Estados Unidos N° 62/839.346, titulada "Spatial Transcriptomics of Biological Analytes in Tissue Samples", presentada el 26 de abril de 2019. La FIG. 25 ilustra cómo se alinean las lecturas de secuencia **1138** con el genoma de referencia (por ejemplo, usando la lectura de inserción de la lectura 2). La FIG. 26 ilustra cómo las lecturas de secuencia **1138** no se mapean todas exactamente al mismo lugar, aunque comparten un código de barras y una UMI, debido a la fragmentación aleatoria que se produce durante las etapas del flujo de trabajo. La FIG. 27 ilustra cómo los códigos de barras espaciales en las lecturas de secuencia en los puntos de captura deben estar en una lista de códigos de barras espaciales de puntos de captura conocidos. Por ejemplo, si se usan las perlas de gel químico Chromium Single Cell 3' v3 (10X, Pleasanton, California) para realizar la secuenciación de analitos de los puntos de captura de acuerdo con la solicitud provisional de Estados Unidos N.º 62/839,346, titulada "Spatial Transcriptomics of Biological Analytes in Tissue Samples", presentada el 26 de abril de 2019, cada código de barras espacial **1150** debe estar en el conjunto de 3,6 millones de códigos de barras celulares distintos en las perlas de gel químico Chromium Single Cell 3' v3. Como se detalla en la FIG. 27, en algunas realizaciones se permite un error de coincidencia único en el código de barras. En otras realizaciones, no se permite ningún error de coincidencia en el código de barras espacial **1150** y se descartan las lecturas de secuencia que tienen un código de barras espacial **1150** que no está en el conjunto de códigos de barras espaciales del kit de secuenciación utilizado (por ejemplo, las perlas de gel químico Chromium Single Cell 3' v3). La FIG. 28 ilustra cómo se utilizan los identificadores únicos de molécula (UMIs) para evaluar y filtrar las lecturas de secuencia **1138** también en algunas realizaciones. Así, con referencia a la FIG. 29, en algunas realizaciones solo se utilizan lecturas de secuencia **1138** mapeadas con confianza **1138**, con códigos de barras espaciales **1150** y UMIs válidos. En algunas realizaciones, el UMI de las lecturas de secuencia se corrige con UMIs más abundantes que están a un desajuste de secuencia. En algunas realizaciones, las lecturas de secuencia que son duplicados de la misma molécula de ARN se registran y solo se cuentan los UMIs únicos como moléculas de ARN únicas. En tales realizaciones, estos recuentos de UMIs forman la matriz de código de barras de características en bruto. La FIG. 30 ilustra además cómo se analiza la imagen **1124** junto con los datos de secuenciación de ácido nucleico asociados con cada punto de captura **1136**. En algunas realizaciones, la matriz de código de barras sin procesar se somete a un algoritmo de reducción de dimensión, tal como el análisis de componentes principales, para reducir los genes G a los 10 metagenes principales. A continuación, se ejecuta t-SNE en el espacio PCA para generar una proyección bidimensional. Además, se utilizan agrupamientos basados en gráficos (Louvain) y agrupamiento de medias k ($k=2\dots 10$) en el espacio PCA para identificar grupos de células. En algunas realizaciones se utiliza un algoritmo sSeq (prueba binomial negativa) para encontrar los genes que definen de forma más exclusiva cada agrupamiento. Ver por ejemplo, la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 62/909,071, titulada "Systems and Methods for Visualizing a Pattern in a Dataset", presentada el 1 de octubre de 2019.

La FIG. 31 ilustra cómo la adquisición de la imagen **1124** se realiza en paralelo, y en conjunción con la secuenciación espacial descripta anteriormente. La FIG. 32 ilustra el resultado final de este análisis paralelo, en el que la imagen **1124** se muestra junto con los datos de secuenciación de ácidos nucleicos asociados a cada punto de captura **1136** de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción. La FIG. 33 ilustra cómo la imagen y el análisis correspondiente de los datos de secuenciación de ácidos nucleicos se pueden ampliar para ver más detalles, como se describe en la solicitud de Estados Unidos N° 17/039.935, titulada "Systems and Methods for Identifying Morphological Patterns in Tissue Samples," presentada el 30 de septiembre de 2020. La FIG. 34 ilustra cómo las

categorías y agrupamientos a medida para el análisis de expresión diferencial se pueden realizar como parte del análisis de la imagen 1124 después de la conjunción con los datos de secuenciación de ácido nucleico asociados con cada punto de captura 1136 de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción. La FIG. 35 ilustra cómo la expresión espacial de genes en el contexto de la imagen 1124 se puede realizar como parte del análisis de la imagen 1124 junto con los datos de secuenciación de ácido nucleico asociados con cada punto de captura 1136 de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción. Ver por ejemplo, la solicitud provisional de los Estados Unidos N° 62/909.071, titulada "Systems and Methods for Visualizing a Pattern in a Dataset, presentada el 1 de octubre de 2019. *Ejemplos de realizaciones.*

El siguiente ejemplo proporciona esquemas de reacción para la preparación de lecturas de secuencias para el análisis espacial. La FIG. 36 también proporciona un esquema de reacción para la preparación de lecturas de secuencia para el análisis espacial.

En algunos ejemplos no limitantes de los flujos de trabajo descriptos en la presente, la muestra se puede sumergir en metanol enfriado 100% e incubar durante 30 minutos a -20 °C. Después de 20 minutos, la muestra se puede retirar y enjuagarse con agua ultrapura. Después de enjuagar la muestra, se prepara una solución fresca de eosina y se puede cubrir la muestra con isopropanol. Después de incubar la muestra en isopropanol durante 1 minuto, se puede retirar el reactivo sujetando el portaobjetos en ángulo, donde el borde inferior del portaobjetos puede estar en contacto con una toallita de laboratorio y secarse al aire. La muestra se puede cubrir uniformemente en solución de hematoxilina e incubar durante 7 minutos a temperatura ambiente. Después de incubar la muestra en hematoxilina durante 7 minutos, el reactivo se puede retirar sujetando el portaobjetos en ángulo, de modo que el borde inferior del portaobjetos pueda estar en contacto con una toallita de laboratorio. El portaobjetos que contiene la muestra se puede sumergir en agua y eliminar el exceso de líquido. A continuación, la muestra se puede cubrir con buffer de azulado e incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente. El portaobjetos que contiene la muestra se puede sumergir de nuevo en agua, cubrir uniformemente con solución de eosina e incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente. El portaobjetos se puede secar al aire durante no más de 30 minutos e incubarse durante 5 minutos a 37°C. La muestra se puede visualizar utilizando la configuración de imagen de campo claro.

Además, la muestra se puede procesar mediante los siguientes ejemplos de etapas para la permeabilización de la muestra y la generación de ADNc. La muestra se puede exponer a una enzima de permeabilización e incubar a 37 °C durante el tiempo de permeabilización predeterminado (que es específico del tipo de tejido). La enzima de permeabilización se puede retirar y la muestra prepararse para la captura del analito mediante la adición de buffer SSC 0,1X. A continuación, la muestra se puede someter a un protocolo de termociclado de preequilibrado (por ejemplo, temperatura de tapa y preequilibrado a 53 °C, transcripción inversa a 53 °C durante 45 minutos y, a continuación, retención a 4 °C) y se puede eliminar el buffer SSC. Se puede añadirse a la muestra y al sustrato una mezcla maestra que contiene agua libre de nucleasas, un reactivo de transcriptasa inversa, un oligo de cambio de molde, un agente reductor y una enzima de transcriptasa inversa, y la muestra con la mezcla maestra se puede someter a un protocolo de termociclado (por ejemplo, realizar la transcripción inversa a 53 °C durante 45 minutos y retener a 4 °C). La síntesis de la segunda cadena se puede realizar en el sustrato mediante la sujeción del sustrato a un protocolo de termociclado (por ejemplo, preequilibrado a 65 °C, síntesis de la segunda cadena a 65 °C durante 15 minutos y retención a 4 °C). Los reactivos de la mezcla maestra se pueden retirarse de la muestra y se puede aplicar KOH 0,8 M e incubarse durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se puede retirar el KOH y añadir el buffer de elución y retirar de la muestra. Se puede añadir a la muestra una mezcla de segunda cadena, que incluye un reactivo de segunda cadena, un cebador de segunda cadena y una enzima de segunda cadena, y la muestra se puede sellar e incubar. Al final de la incubación, se pueden retirar los reactivos y añadir buffer de elución y retirar de la muestra, y se puede añadir de nuevo KOH 0,8 M a la muestra e incubar la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se puede añadir Tris-HCl y mezclar los reactivos. La muestra se puede transferir a un tubo nuevo, agitar en vórtex y colocar en hielo.

Además, la muestra se puede procesar mediante las siguientes etapas ejemplares para la amplificación del ADNc y el control de calidad. Se puede preparar una mezcla qPCR, que incluya agua libre de nucleasas, mezcla maestra qPCR y cebadores de ADNc, y pipetear en los pocillos de una placa qPCR. Se puede añadir una pequeña cantidad de muestra a la mezcla de qPCR incubada y termociclar según un protocolo de termociclado predeterminado (por ejemplo, etapa 1: 98 °C durante 3 minutos, etapa 2: 98 °C durante 5 segundos, etapa 3: 63 °C durante 30 segundos, etapa 4: registro de la señal de amplificación, etapa 5: repetición de 98 °C durante 5 segundos, 63 °C durante 30 segundos para un total de 25 ciclos). Después de completar el termociclado, se puede preparar una mezcla de amplificación de ADNc, que incluya la mezcla de amplificación y los cebadores de ADNc, y combinar con la muestra restante y mezclar. A continuación, la muestra se puede incubar y termociclar (por ejemplo, temperatura de tapa a 105 °C durante~45-60 minutos; etapa 1: 98 °C durante 3 minutos, etapa 2: 98 °C durante 15 segundos, etapa 3: 63 °C durante 20 segundos, etapa 4: 72 °C durante un minuto, etapa 5: el número de ciclos determinado por los valores de Cq qPCR], etapa 6: 72 °C durante 1 minuto, y etapa 7: retención a 4 °C). La muestra luego se puede almacenar a 4 °C durante hasta 72 horas o a -20 °C durante hasta 1 semana o se resuspende en reactivo 0,6X SPRIselect y se pipetea para asegurar una mezcla adecuada. A continuación, la muestra se puede incubar durante 5 minutos a

temperatura ambiente, y aclarar colocando la muestra sobre un imán (por ejemplo, el imán en posición alta). Se puede retirar el sobrenadante y añadir etanol 80% al pellet, e incubar durante 30 segundos. El etanol se puede retirar y el pellet se puede lavar de nuevo. A continuación, la muestra se puede centrifugar y colocar sobre un imán (por ejemplo, el imán está en la posición baja). Se puede eliminar cualquier resto de etanol y la muestra se puede secar al aire

5 durante hasta 2 minutos. Se puede retirar el imán y añadir el buffer de elución a la muestra, se mezcla y se incuba durante 2 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se puede colocar en el imán (por ejemplo, en posición baja) hasta que la solución se aclare. La muestra se puede transferir a una nueva tira de tubos y almacenar a 4 °C durante hasta 72 horas o a -20 °C durante hasta 4 semanas. Una porción de la muestra se puede analizar en un chip de alta sensibilidad de Agilent Bioanalyzer, donde se puede seleccionar una región y medir la concentración

10 de ADNC para calcular el rendimiento total de ADNC. Alternativamente, la cuantificación se puede determinar mediante Agilent Bioanalyzer o Agilent TapeStation.

Además, la muestra se puede procesar mediante las siguientes etapas ejemplares para la construcción de bibliotecas de expresión génica espacial. Se puede preparar en hielo una mezcla de fragmentación, que incluye un buffer de fragmentación y una enzima de fragmentación. El buffer de elución y la mezcla de fragmentación se pueden añadir a cada muestra, mezclar y centrifugar. A continuación, la mezcla de muestras se puede colocar en un termociclador y ciclar de acuerdo con un protocolo predeterminado (por ejemplo, temperatura de la tapa a 65 °C durante ~ 35 minutos, bloqueo de preenfriamiento hasta 4 °C antes de la fragmentación a 32 °C durante 5 minutos, reparación final y cola A a 65 °C durante 30 minutos, y retención a 4 °C). El reactivo SPRIselect 0,6X se puede añadir a la muestra e incubarse durante 5 minutos a temperatura ambiente. La muestra se puede colocar sobre un imán (por ejemplo, en posición alta) hasta que la solución se aclare, y el sobrenadante se puede transferir a una nueva tira de tubos. El reactivo SPRIselect 0,8X se puede añadir a la muestra, mezclar e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. La muestra se puede colocar sobre un imán (por ejemplo, en posición alta) hasta que la solución se aclare. Se puede eliminar el sobrenadante y añadir etanol al 80% la pellet, incubar el pellet durante 30 segundos y eliminar el etanol. Se puede repetir el lavado con etanol y colocar la muestra sobre un imán (por ejemplo, en posición baja) hasta que la solución se aclare. Se puede eliminar el etanol restante y añadir el buffer de elución a la muestra, mezclar e incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Muestra se puede colocar sobre un imán (*por ejemplo, en la*

posición alta) hasta que la solución se aclare, y una porción de la muestra se puede mover a una nueva tira de tubos. Se puede preparar y centrifugarse una mezcla de ligación adaptadora, que incluye buffer de ligación, ADN ligasa y oligos adaptadores. La mezcla de ligación adaptadora se puede añadir a la muestra, mezclar con pipeta y centrifugar brevemente. A continuación, la muestra se puede termociclar según un protocolo predeterminado (por ejemplo, temperatura de la tapa a 30 °C durante ~15 minutos, etapa 1: 20 °C durante 15 minutos, etapa 2: 4 °C de retención). La muestra se puede agitar en vórtex para resuspender el reactivo SPRIselect, se puede añadir reactivo SPRIselect 0,8X adicional a la muestra e incubarse durante 5 minutos a temperatura ambiente, y colocar sobre un imán (por ejemplo, en posición alta) hasta que la solución se aclare. Se puede eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con etanol 80%, incubar durante 30 segundos y eliminar el etanol. Se puede repetir el lavado con etanol y centrifugar brevemente la muestra antes de colocarla sobre un imán (por ejemplo, en la posición baja). Se puede eliminar cualquier resto de etanol y la muestra se puede secarse al aire durante un máximo de 2 minutos. Se puede retirar el imán, añadir buffer de elución a la muestra y mezclar la muestra con una pipeta, incubar la muestra durante 2 minutos a temperatura ambiente y colocarla sobre un imán (por ejemplo, en posición baja) hasta que la solución se aclare. Una porción de la muestra se puede transferir a una nueva tira de tubos. La mezcla de amplificación se puede preparar y combinar con la muestra. Se puede añadir a la muestra un TT Set A de doble índice individual, mezclar con pipeta y someter a un protocolo de termociclado predeterminado (por ejemplo, temperatura de la tapa a 105 °C durante ~25-40 minutos, etapa 1: 98 °C durante 45 segundos, etapa 2: 98 °C durante 20 segundos, etapa 3: 54 °C durante 30 segundos; etapa 4: 72 °C durante 20 segundos, etapa 5: volver a la etapa 2 durante un número predeterminado de ciclos, etapa 6: 72 °C durante 1 minuto, y 4 °C de retención). Agitar en vórtex para resuspender el reactivo SPRIselect, añadir reactivo SPRIselect 0,6X adicional a cada muestra, mezclar e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. La muestra se puede colocar sobre un imán (por ejemplo, en la posición alta) hasta que la solución se aclare, y el sobrenadante se puede transferir a una nueva tira de tubos. El reactivo SPRIselect 0,8X se puede añadir a cada muestra, mezclar con pipeta e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se puede colocar sobre un imán (por ejemplo, en la posición alta) hasta que la solución se aclare. El sobrenadante se puede eliminar y el pellet se puede lavar con etanol al 80%, incubar durante 30 segundos, y luego se puede eliminar el etanol. Se puede repetir el lavado con etanol, centrifugar la muestra y colocarla sobre un imán (por ejemplo, en posición baja) para eliminar cualquier resto de etanol. La muestra se puede retirar del imán y se le puede añadir buffer de elución, mezclar con pipeta e incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente. La muestra se puede colocar en un imán (por ejemplo, en la posición baja) hasta que la solución se aclare y se puede transferir una porción de la muestra a una nueva tira de tubos. La muestra se puede almacenar a 4 °C durante hasta 72 horas, o a -20 °C para un almacenamiento a largo plazo. El tamaño medio de los fragmentos se puede determinar utilizando un trazador Bioanalyzer o una TapeStation Agilent.

La biblioteca se puede secuenciar utilizando las plataformas de secuenciación disponibles, incluidas MiSeq, NextSeq 500/550, HiSeq 2500, HiSeq 3000/4000, NovaSeq e iSeq.

- En ejemplos no limitantes de cualquiera de los flujos de trabajo descriptos en la presente, se produce una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos contigua que comprende: (a) una primera secuencia cebadora (por ejemplo, Lectura 1); (b) un código de barras espacial; (c) una secuencia molecular única (UMI); (d) un dominio de captura; (e) una secuencia complementaria con una secuencia presente en un ácido nucleico de una muestra; (f) una segunda secuencia cebadora (por ejemplo, Lectura 2) que es sustancialmente complementaria con una secuencia de un oligonucleótido de cambio de molde (TSO). En algunas realizaciones de estas moléculas de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico de cadena simple. En algunas 5 realizaciones de estas moléculas de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico de cadena doble. En algunas realizaciones de estas moléculas de ácido nucleico, (a) a (f) se colocan en una dirección de 5' a 3' en la secuencia de nucleótidos contigua. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico está unida a un sustrato (por ejemplo, un portaobjetos). En algunas 10 realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, el extremo 5' de la secuencia contigua de ácido nucleico está unido al sustrato (por ejemplo, un portaobjetos). En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la secuencia de nucleótidos contigua es una secuencia químérica de ARN y ADN. En algunas 15 realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la secuencia de nucleótidos contigua es una secuencia de ADN.
- En ejemplos no limitantes de cualquiera de los flujos de trabajo descriptos en la presente, se produce una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos contigua que comprende: (a) una secuencia complementaria con una primera secuencia cebadora (por ejemplo, una secuencia complementaria con la lectura 1); (b) una secuencia complementaria con un código de barras espacial; (c) una secuencia complementaria con una secuencia molecular única; (d) una secuencia complementaria con un dominio de captura; (e) una secuencia presente 20 en un ácido nucleico de una muestra; y (f) una secuencia de un oligonucleótido de cambio de molde (TSO). En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico es de cadena simple. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico es de cadena doble. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la secuencia de nucleótidos contigua es una secuencia de ADN. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, (a) a (f) se ubican en dirección 3' a 5' en la secuencia de nucleótidos contigua. 25
- En ejemplos no limitantes de cualquiera de los flujos de trabajo descriptos en la presente, se produce una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos contigua que comprende: (a) una primera secuencia cebadora (por ejemplo, Lectura 1); (b) un código de barras espacial; (c) una secuencia molecular única (UMI); (d) un dominio de captura; (e) una secuencia complementaria con una secuencia presente en un ácido nucleico de una muestra; y (f) una segunda secuencia cebadora (Lectura 2). En algunas 30 realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico de cadena simple. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico de cadena doble. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la secuencia de nucleótidos contigua es una secuencia de ADN. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, (a) a (f) están ubicadas en dirección 5' a 3' en la secuencia de nucleótidos contigua. En algunas 35 realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la secuencia de nucleótidos contigua es una secuencia de ADN.
- En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la secuencia de nucleótidos contigua comprende además 3' a (f): (g) una secuencia complementaria con una primera secuencia adaptadora; y (h) una secuencia complementaria con una tercera secuencia cebadora. En algunas realizaciones de cualquiera de las 40 moléculas de ácido nucleico, la primera secuencia adaptadora es una secuencia de índice de muestra i7. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la tercera secuencia cebadora es una secuencia cebadora P7. Véase, Illumina, Indexed Sequencing OverView Guides, Febrero de 2018, Documento 15057455v04; e Secuencias adaptadoras Illumina, Mayo 2019, Documento#1000000002694v11, para obtener información sobre P5, P7, i7, i5, TruSeq Read 2, secuenciación indexada y otros reactivos descriptos en la presente. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, (h) está en posición 3' con respecto a (g) en la secuencia de nucleótidos contigua. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la secuencia de nucleótidos contigua comprende además 5' a (a): (i) una segunda secuencia adaptadora; y (ii) una cuarta secuencia cebadora. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la segunda secuencia adaptadora es una secuencia de índice de muestra i5. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la cuarta secuencia cebadora es una secuencia cebadora P5. En algunas realizaciones de cualquiera 45 de estas moléculas de ácido nucleico, (ii) está en posición 5' con respecto a (i) en la secuencia de nucleótidos contigua.
- En ejemplos no limitantes de cualquiera de los flujos de trabajo descriptos en la presente, se produce una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos contigua que comprende: (a) una secuencia complementaria con una primera secuencia cebadora; (b) una secuencia complementaria con un código de barras espacial; (c) una secuencia complementaria con una secuencia molecular única; (d) una secuencia complementaria 50

con un dominio de captura; (e) una secuencia presente en un ácido nucleico de una muestra; y (f) una secuencia complementaria con una segunda secuencia cebadora. En algunas realizaciones de estas moléculas de ácido nucleico, una secuencia complementaria con una primera secuencia cebadora es una secuencia complementaria con la lectura 1. En algunas realizaciones de estas moléculas de ácido nucleico, una secuencia complementaria con una

5 segunda secuencia cebadora es una secuencia complementaria con la lectura 2. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico de cadena simple. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico de cadena doble. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, (a) a (f) están ubicadas en la dirección 3' a 5' en la secuencia de nucleótidos contigua.

10 En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la secuencia de nucleótidos contigua es una secuencia de ADN. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la secuencia de nucleótidos contigua comprende además 5' a (f): (g) una primera secuencia adaptadora; y (h) una tercera secuencia cebadora. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la primera secuencia adaptadora es una secuencia de índice de muestra i7. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de

15 ácido nucleico, la tercera secuencia cebadora es una secuencia cebadora P7. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, (h) está en posición 5' con respecto a (g) en la secuencia de nucleótidos contigua. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la secuencia de nucleótidos contigua comprende además 3' a (a): (i) una secuencia complementaria con una segunda secuencia adaptadora; y (ii)

20 una secuencia complementaria con una cuarta secuencia cebadora. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la segunda secuencia adaptadora es una secuencia de índice de muestra i5. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, la cuarta secuencia cebadora es una secuencia cebadora P5. En algunas realizaciones de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico, (ii) está en posición 3' con respecto a (i) en la secuencia de nucleótidos contigua.

25 La presente invención se puede implementar como un producto de programa de computador a que comprende un mecanismo de programa de computadora incrustado en un medio de almacenamiento legible por computadora no transitorio. Por ejemplo, el producto de programa de computadora podría contener los módulos de programa mostrados en las FIGS. 11A y 11B, y/descriptos en las FIGS. 10A, 10B, 10C, 10D, y 10E. Estos módulos de programa pueden ser almacenados en un CD-ROM, DVD, producto de almacenamiento en disco magnético, llave USB, o cualquier otro producto no transitorio de almacenamiento de datos o programas legibles por computadora.

30 Se pueden hacer muchas modificaciones y variaciones de esta invención sin apartarse de su alcance definido por las reivindicaciones adjuntas, como será evidente para los expertos en la técnica. Las realizaciones específicas descriptas en la presente se ofrecen únicamente a modo de ejemplo. Las realizaciones se eligieron y describieron para explicar mejor los principios de la invención y sus aplicaciones prácticas, para permitir así a otros expertos en la materia utilizar mejor la invención y las diversas realizaciones con diversas modificaciones que se adapten al uso particular contemplado. La invención está limitada únicamente por los términos de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de análisis espacial de analitos que comprende:
 - A) obtener una estructura de datos en forma electrónica que comprende (i) una imagen de una muestra en un substrato y (ii) un identificador de sustrato único para el substrato, donde:
 - 5 el substrato incluye una pluralidad de marcadores fiduciales,
 - el sustrato incluye un conjunto de puntos de captura, donde el conjunto de puntos de captura comprende al menos 1000 puntos de captura; y
 - la imagen comprende una matriz de valores de píxel, donde la matriz de valores de píxel comprende al menos 100.000 valores de píxel;
 - 10 B) analizar la matriz de valores de píxel para identificar una pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen;
 - C) usar el identificador de sustrato de la estructura de datos para seleccionar un primer molde en una pluralidad de moldes, donde cada molde de la pluralidad de moldes comprende posiciones de referencia para una correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia y un sistema de coordenadas correspondiente;
 - 15 D) alinear la pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen con la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia del primer molde usando un algoritmo de alineación para obtener una transformación entre la pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen y la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia del primer molde;
 - E) usar la transformación y el sistema de coordenadas del primer molde para registrar la imagen en el conjunto
 - 20 de puntos de captura; y
 - F) analizar la imagen después de usar E) junto con los datos espaciales de los analitos asociados a cada punto de captura, de este modo se realiza un análisis espacial de los analitos;

donde el análisis de B) comprende:
- 25 identificar una pluralidad de puntos fiduciales derivados candidatos mediante la umbralización de la matriz de valores de píxel en una pluralidad de imágenes umbral e identificar, dentro de la pluralidad de imágenes umbral, los grupos de píxeles que tienen valores blancos,
- 30 agrupar la pluralidad de puntos fiduciales derivados candidatos sobre la base del tamaño del punto, de este modo se distribuye la pluralidad de puntos fiduciales derivados candidatos en una pluralidad de subconjuntos de puntos fiduciales derivados candidatos, donde cada respectivo subconjunto de puntos fiduciales derivados candidatos de la pluralidad de subconjuntos de puntos fiduciales derivados candidatos tiene un tamaño característico, y
- seleccionar el subconjunto de puntos fiduciales derivados candidatos de la pluralidad de subconjuntos de puntos fiduciales derivados candidatos que tiene el tamaño característico mayor que la pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde la identificación además comprende
- 35 fusionar los respectivos pares de puntos fiduciales derivados candidatos que están dentro de una distancia umbral de uno a otro o filtrar respectivos puntos fiduciales derivados candidatos que no satisfacen un criterio de tamaño de máximo o mínimo o
- filtrar los respectivos puntos fiduciales derivados candidatos que no satisfacen un criterio de circularidad, donde la circularidad de un respectivo punto fiducial derivado se define mediante:

$$4\pi \text{Área} / (\text{perímetro})^2$$
- 40 donde,
- "Área" es el área del punto fiducial derivado respectivo, y
- "perímetro" es el perímetro del respectivo punto fiducial derivado .
- 45 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde identificación además comprende

filtrar los respectivos puntos fiduciales derivados candidatos que no satisfacen a criterio de convexidad o no satisfacen un criterio de la relación de inercia.

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde

5 la transformación es una transformada de similitud que comprende rotación, traslación y escalado isotrópico de la pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen para minimizar en error residual entre la pluralidad de puntos fiduciales derivados y la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia o

la transformación no es una transformación rígida que comprende escalado anisotrópico y sesgado de la pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen para minimizar un error residual entre la pluralidad de puntos fiduciales derivados y la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia.

10 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde el algoritmo de alineación es un algoritmo de deriva de punto coherente, un algoritmo de punto más cercano iterativo, o un algoritmo de coincidencia de punto robusto o un algoritmo de coincidencia de punto robusto Thin-Plate-Spline.

6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde:

la muestra es una muestra de tejido seccionada,

15 cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura está (i) en una posición diferente en una matriz bidimensional y (ii) se asocia con uno o más analitos de la muestra de tejido seccionada, y

cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura se caracteriza por al menos un código de barras espacial único en una pluralidad de códigos de barras espaciales.

7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6,

20 donde un punto de captura en el conjunto de puntos de captura comprende un dominio de captura o un dominio de escisión o

donde cada punto de captura en el conjunto de puntos de captura se une directamente o se une indirectamente al sustrato.

8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7,

25 donde cada punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura incluye 1000 o más sondas de captura y

donde cada sonda de captura del punto de captura respectivo incluye una secuencia poli-A o una secuencia poli-T y un código de barras espacial único que caracteriza el punto de captura respectivo o cada sonda de captura del punto de captura respectivo incluye el mismo código de barras espacial de una pluralidad de códigos de barras espaciales o cada sonda de captura en el punto de captura respectivo incluye un código de barras espacial diferente de una pluralidad de códigos de barras espaciales.

30 9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la muestra es una muestra de tejido seccionada y donde la muestra de tejido seccionada tiene una profundidad de 100 micrones o menos.

10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, donde

el uno o más analitos es una pluralidad de analitos,

35 a punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura incluye una pluralidad de sondas de captura, cada sonda de la pluralidad de sondas de captura que incluye un dominio de captura que se caracteriza por a tipo de dominio de captura en una pluralidad de tipos de dominio de captura, y

cada respectivo tipo de dominio de captura de la pluralidad de tipos de dominio de captura está configurado para unir a un analito diferente de la pluralidad de analitos y

40 donde la pluralidad de tipos de dominio de captura comprende entre 5 y 15.000 tipos de dominio de captura y el punto de captura respectivo incluye al menos cinco, al menos 10, al menos 100, o al menos 1000 sondas de captura para cada tipo de dominio de captura en la pluralidad de tipos de dominio de captura.

11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, donde:

45 el uno o más analitos es una pluralidad de analitos, y un punto de captura respectivo en el conjunto de puntos de captura incluye una pluralidad de sondas de captura, cada sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura

que incluye un dominio de captura que se caracteriza por a tipo de dominio de captura único configurado para unirse a cada analito en la pluralidad de analitos de una manera no sesgada.

12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde una forma de cada punto de captura en el conjunto de puntos de captura en el sustrato es circular y cada punto de captura en el conjunto de puntos de captura tiene un diámetro de entre 2 micrones y 7 micrones y donde una distancia entre un centro de cada punto de captura respectivo a un punto de captura vecino en el conjunto de puntos de captura en el sustrato está entre 2 micrones y 7 micrones.

5 13. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde los datos de analitos espaciales asociados con cada punto de captura son datos de secuenciación de ácidos nucleicos asociados con cada punto de captura.

10 14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, donde el uno o más analitos son ácidos nucleicos, ARN, ADN o proteínas.

15. Un sistema informático que comprende:

uno o más procesadores;

15 memoria; y

uno o más programas, donde el uno o más programas se almacenan en la memoria y están configurados para ser ejecutados por el uno o más procesadores, el uno o más programas para el análisis espacial de analitos, el uno o más programas que incluye las instrucciones para:

20 A) obtener una estructura de datos en formato electrónico que comprende (i) una imagen de una muestra sobre un sustrato, y (ii) un identificador de sustrato único para el sustrato, donde:

el sustrato incluye una pluralidad de marcadores fiduciales,

el sustrato incluye un conjunto de puntos de captura, donde el conjunto de puntos de captura comprende al menos 1000 puntos de captura; y

25 B) la imagen comprende una matriz de valores de píxel, donde la matriz de valores de píxel comprende al menos 100.000 valores de píxel;

C) analizar la matriz de valores de píxel para identificar una pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen;

30 D) usar el identificador de sustrato de la estructura de datos para seleccionar un primer molde en una pluralidad de moldes, donde cada molde de la pluralidad de moldes comprende posiciones de referencia para una correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia y un sistema de coordenadas correspondiente;

E) alinear la pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen con la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia del primer molde utilizando un algoritmo de alineación para obtener una transformación entre la pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen y la correspondiente pluralidad de puntos fiduciales de referencia del primer molde;

35 F) usar la transformación y el sistema de coordenadas del primer molde para registrar la imagen en el conjunto de puntos de captura; y

G) analizar la imagen después de usar E) junto con los datos espaciales de los analitos asociados a cada punto de captura, de este modo se realiza un análisis espacial de los analitos;

donde el análisis de B) comprende:

40 H) donde el análisis de B) comprende:

identificar una pluralidad de puntos fiduciales derivados candidatos mediante la umbralización de la matriz de valores de píxel en una pluralidad de imágenes umbral e identificar, dentro de la pluralidad de imágenes umbral, los grupos de píxeles que tienen valores blancos,

45 I) agrupar la pluralidad de puntos fiduciales derivados candidatos sobre la base del tamaño del punto, de este modo se distribuye la pluralidad de puntos fiduciales derivados candidatos en una pluralidad de subconjuntos de puntos fiduciales derivados candidatos, donde cada respectivo subconjunto de puntos fiduciales derivados candidatos de la pluralidad de subconjuntos de puntos fiduciales derivados candidatos tiene un tamaño característico, y

seleccionar el subconjunto de puntos fiduciales derivados candidatos de la pluralidad de subconjuntos de puntos fiduciales derivados candidatos que tiene el tamaño característico mayor que la pluralidad de puntos fiduciales derivados de la imagen.

Poner en contacto de la muestra con una matriz de sondas
captura con códigos de barra espaciales (101)

Capturar analitos mediante sondas de captura
(102)

Analizar las sondas de captura para obtener información de
analitos espacialmente resuelta
(103)

Figura 1

Poner en contacto la muestra con una matriz de sondas de captura con códigos de barra espaciales (201)

Opcionalmente, escindir las sondas de captura de la matriz y capturar el analito en la muestra
(202)

Analizar las sondas de captura para obtener información espacialmente resuelta sobre un analito
(203)

Figura 2

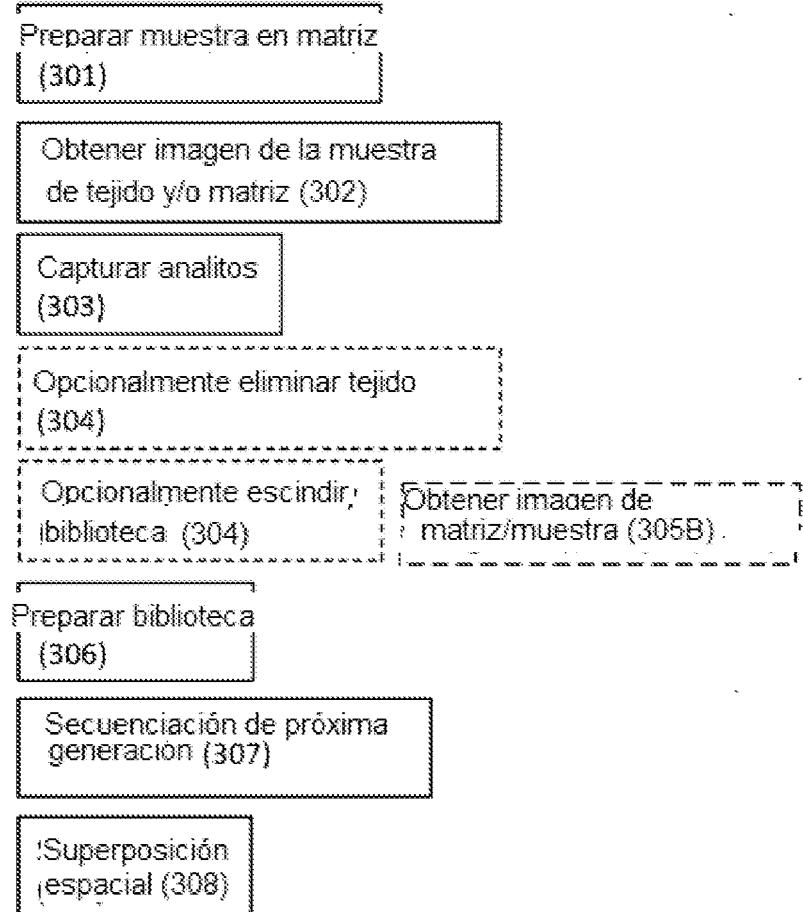


Figura 3A

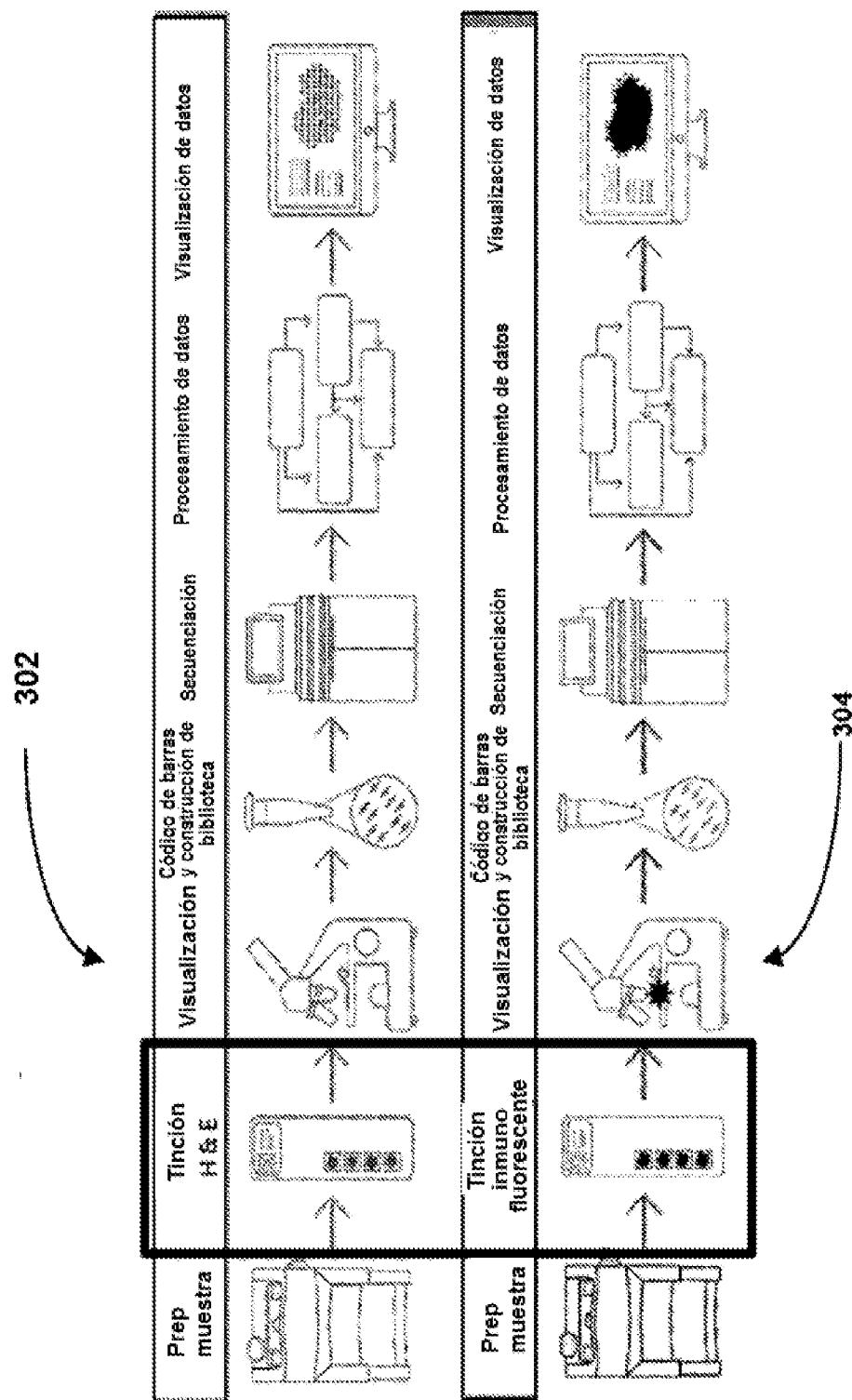


Figura 3B

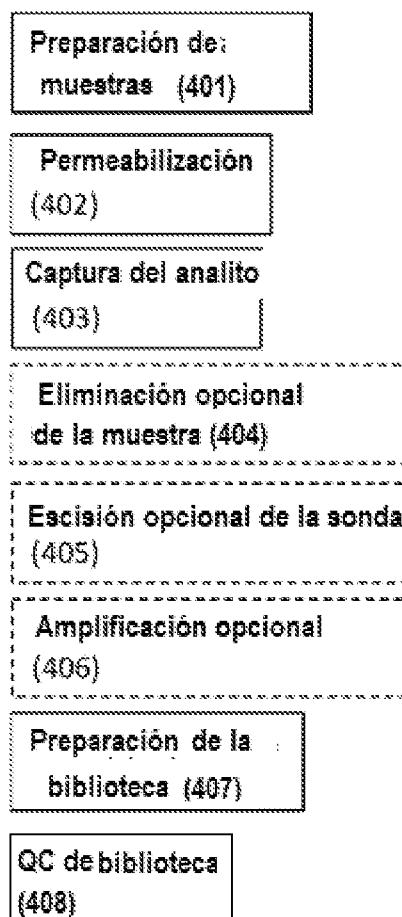


Figura 4

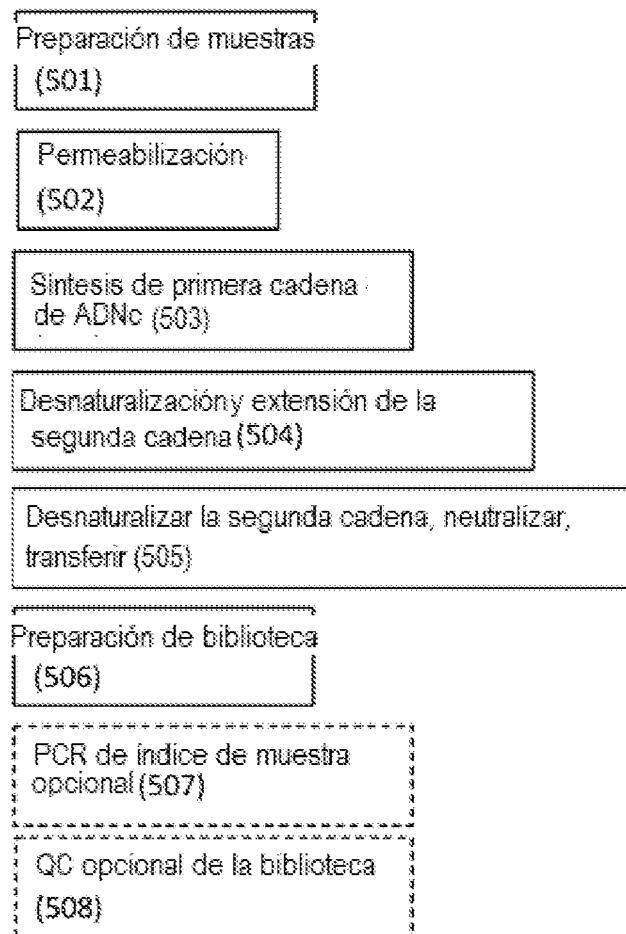


Figura 5

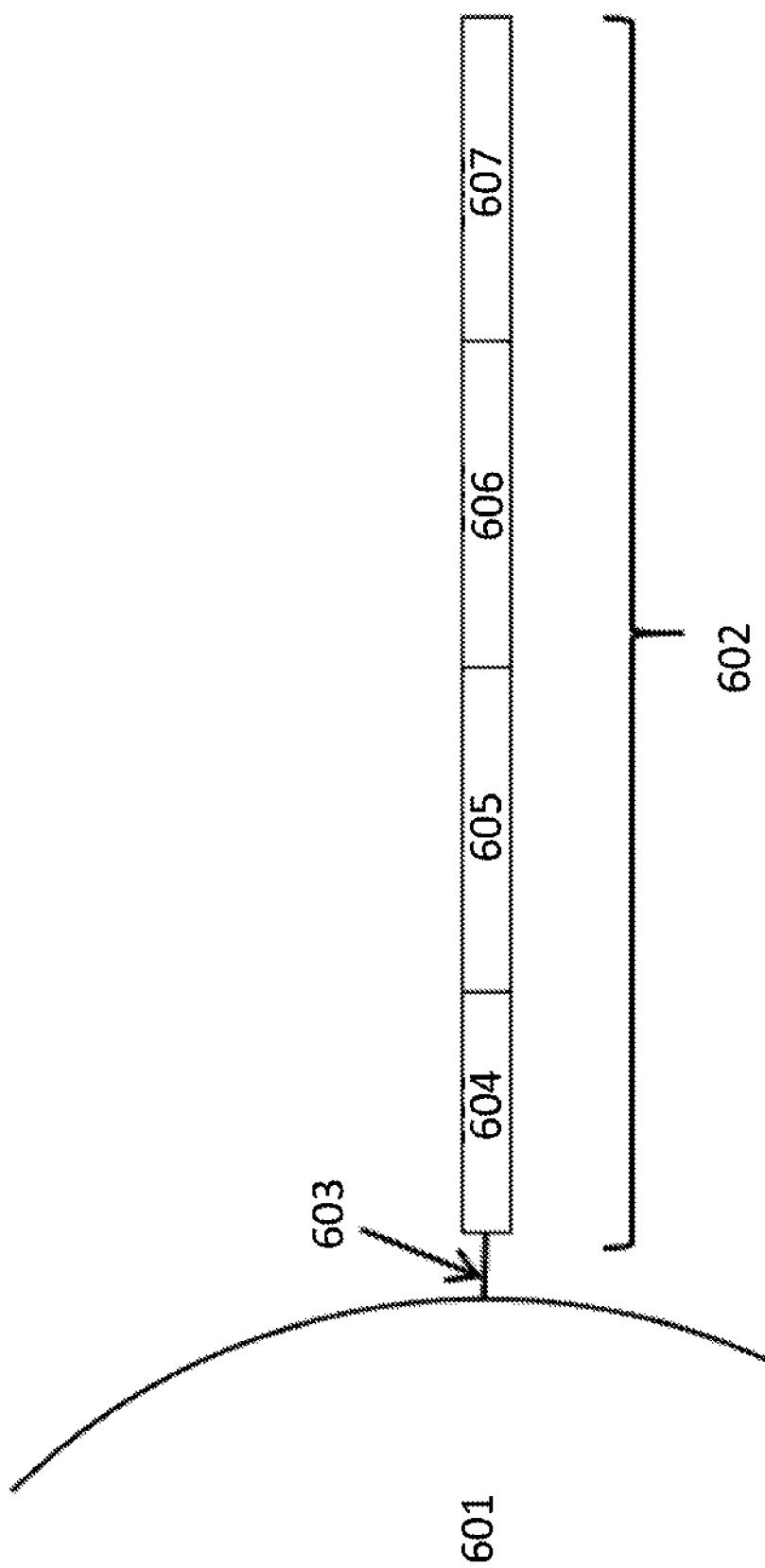


Figura 6

ES 2 980 694 T3

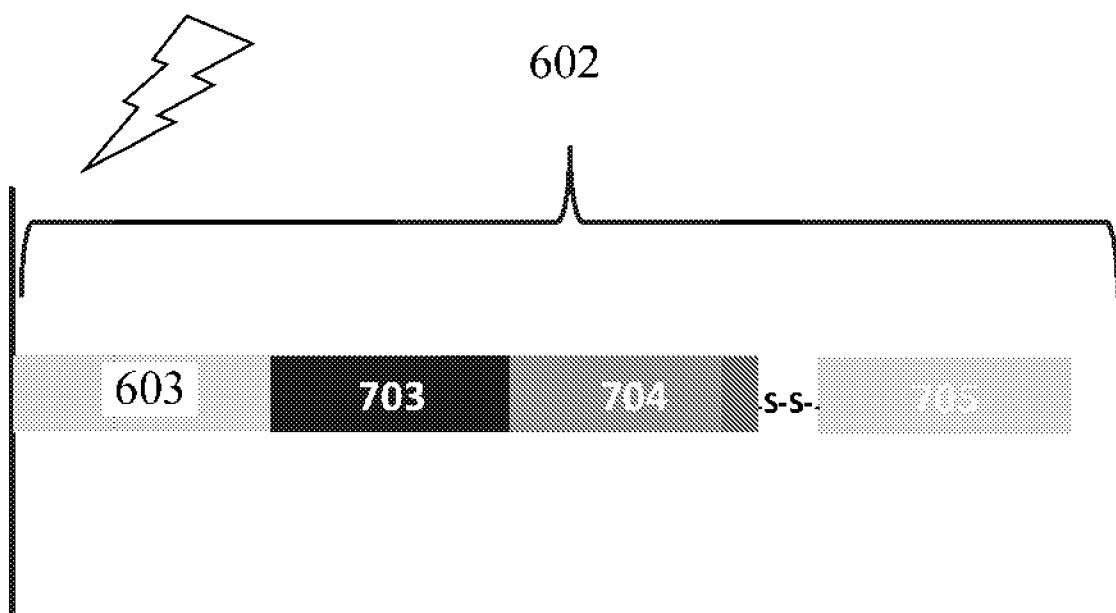


Figura 7

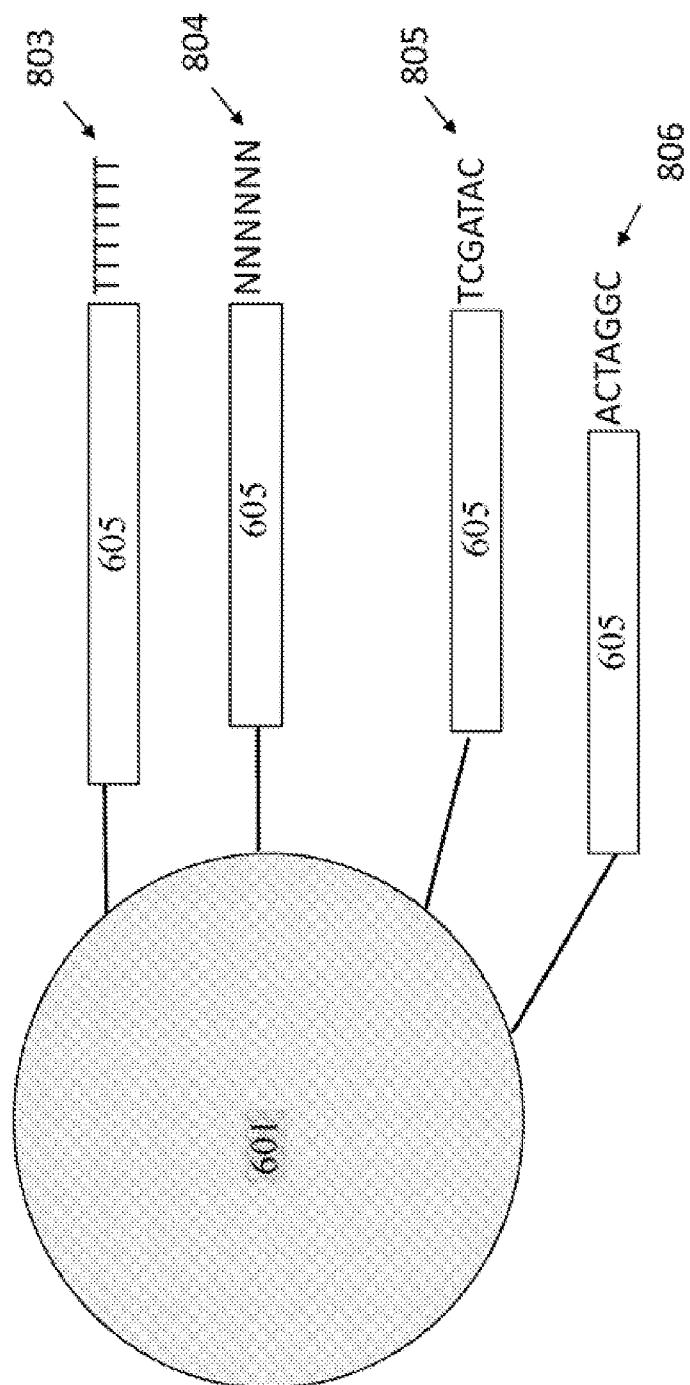


Figura 8

Fijación, tinción y imagen de tejidos (2101)
Escindir sondas de captura de la matriz (2102)
Migrar sondas de captura sobre/en la muestra (2103)
Obtener imágenes de la muestra para confirmar la captación de la sonda (2104)
Dissociar tejido (2105)
Formar una pluralidad de gotas que contienen códigos de barra marcados espacialmente (2106)
Secuenciar los analitos con códigos de barra espaciales (2107)
Aplicar un algoritmo para correlacionar los datos de secuenciación con la ubicación espacial (2108)

Figura 9

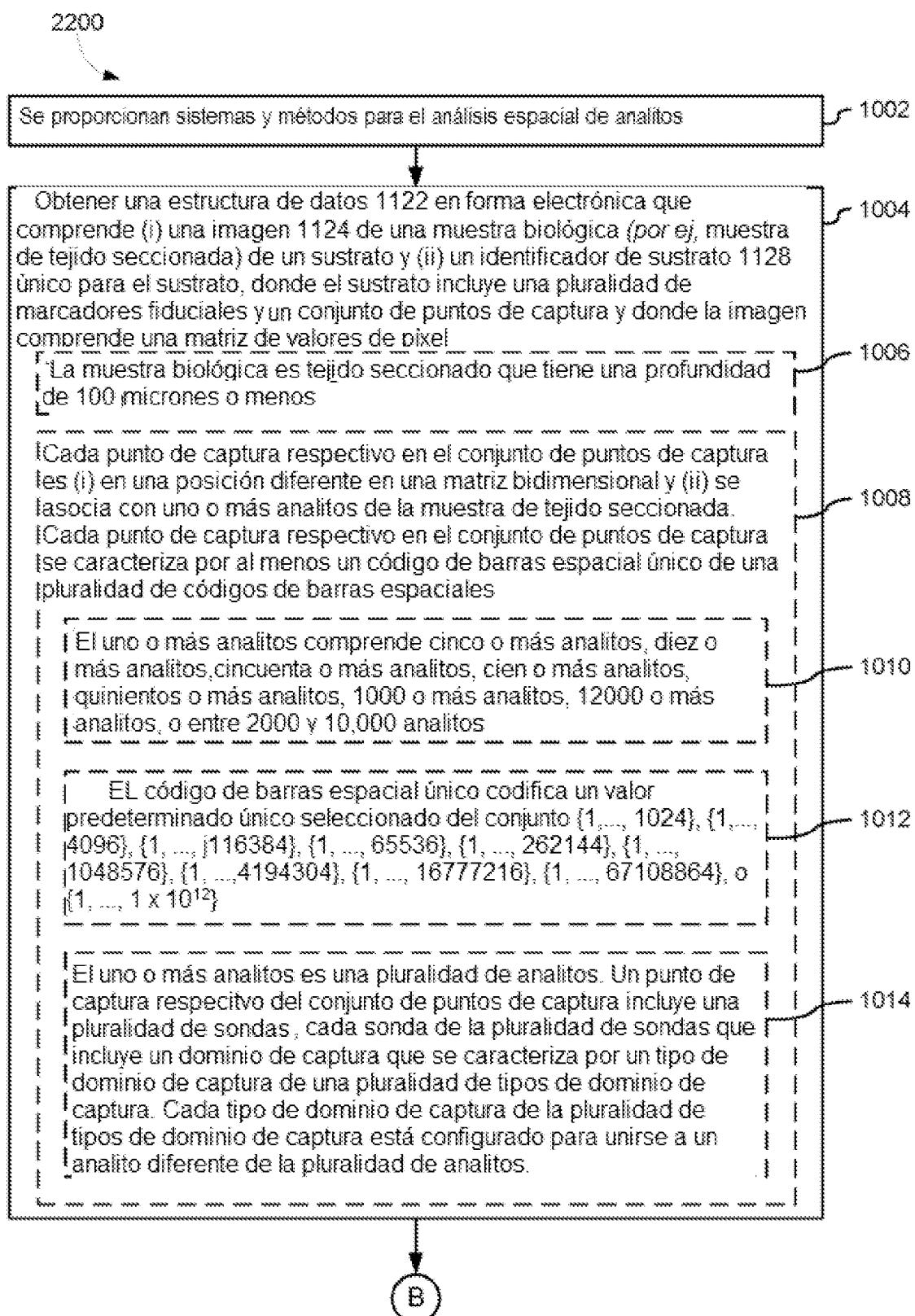


Figura 10A

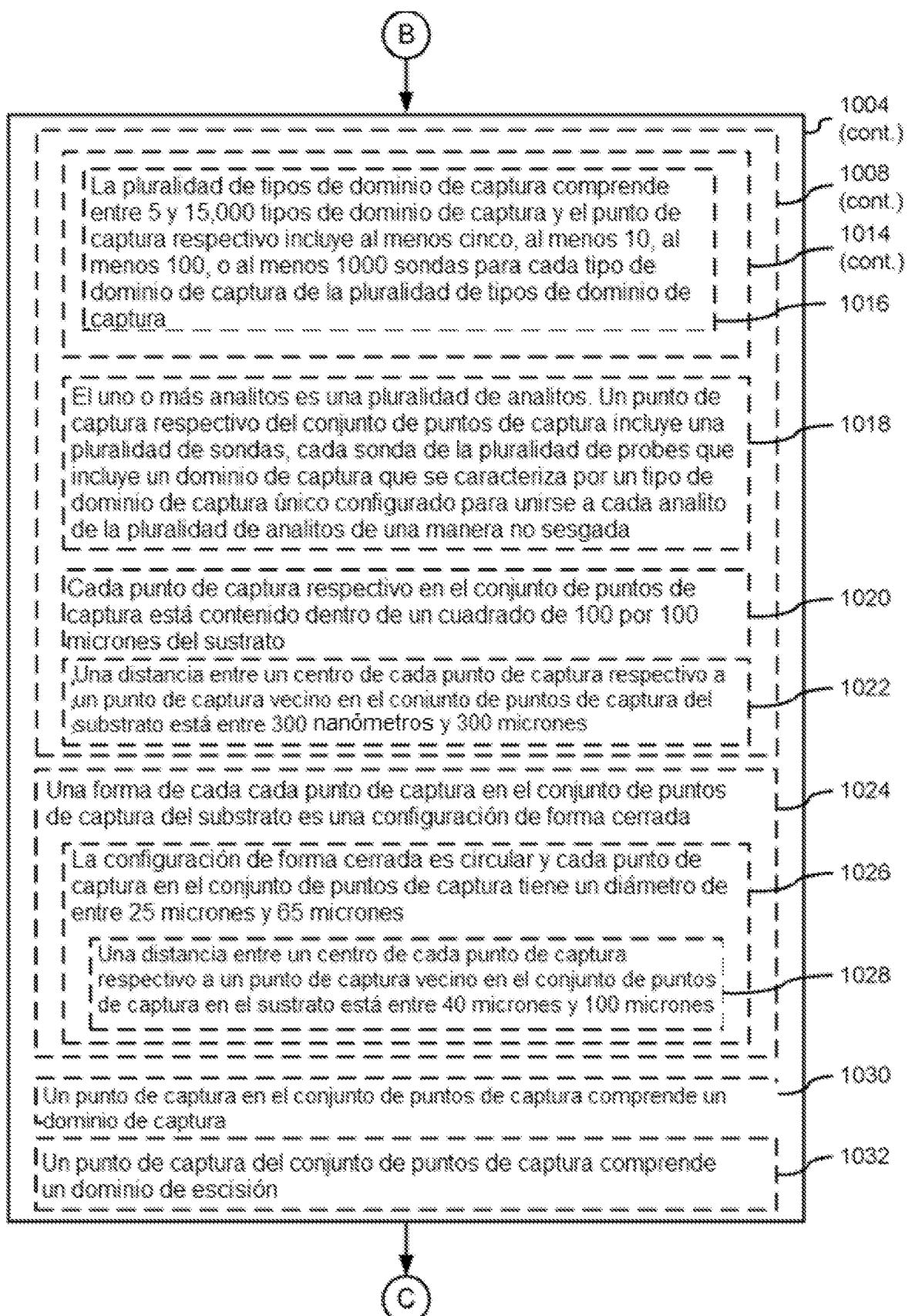


Figura 10B

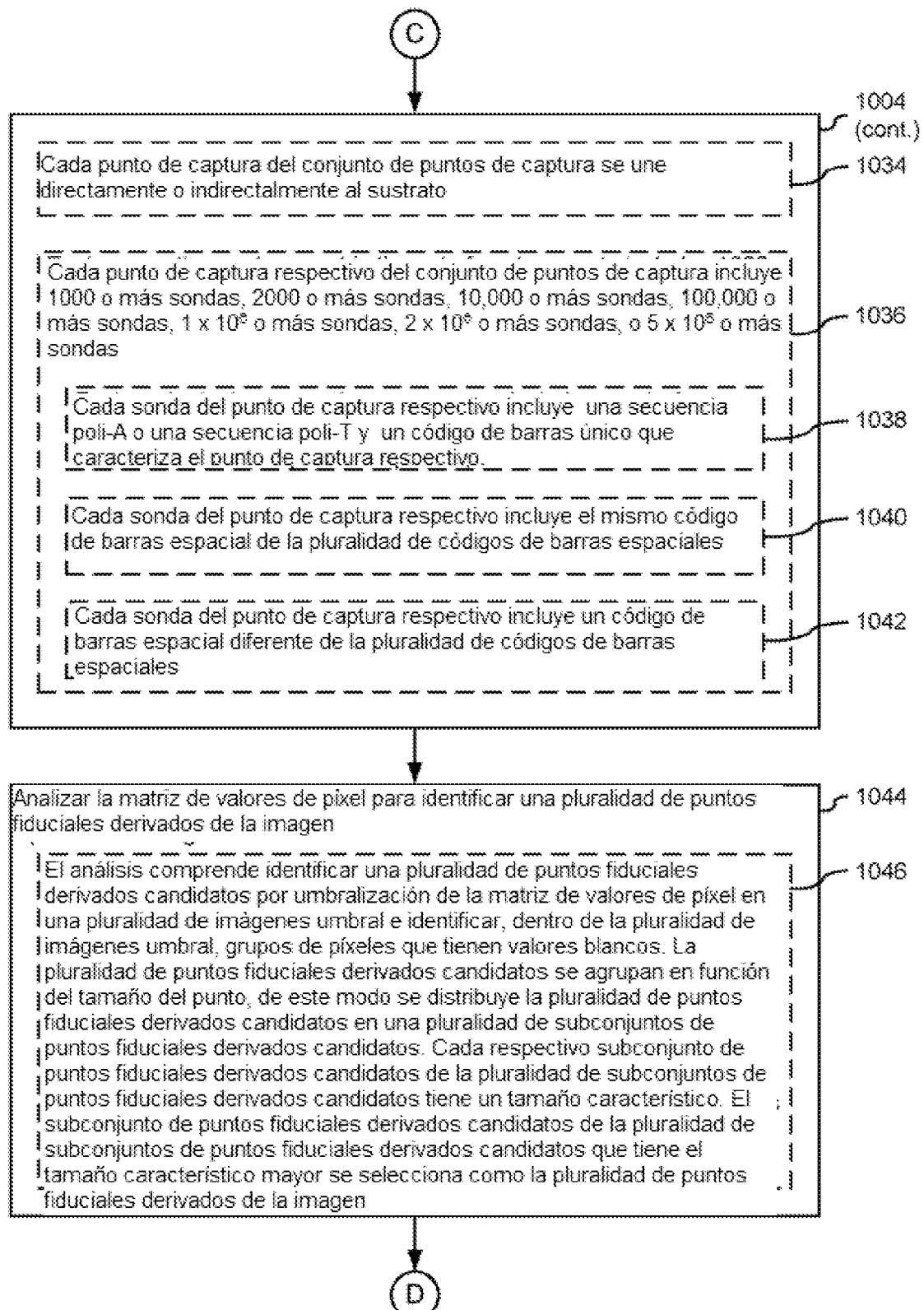


Figura 10C

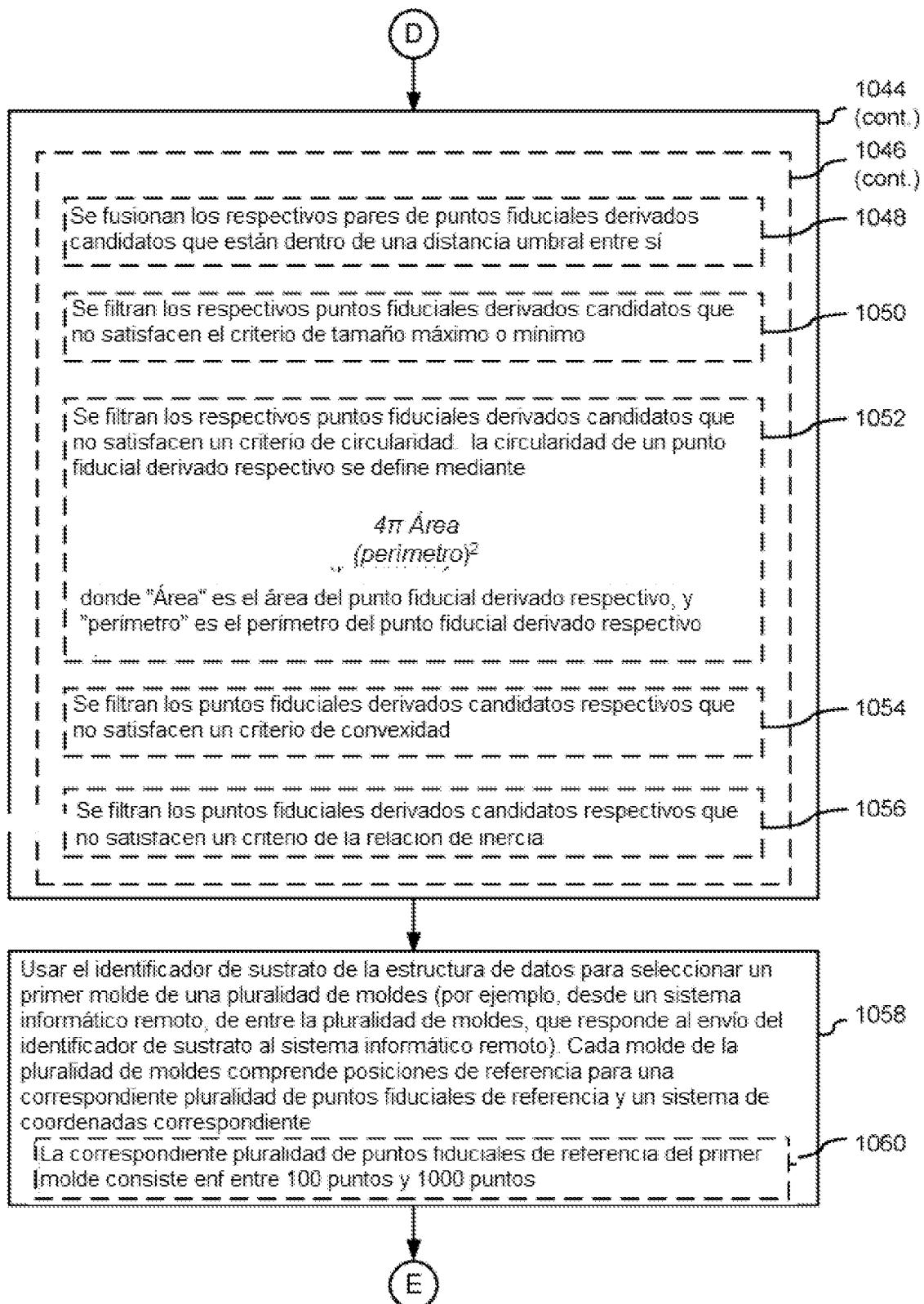


Figura 10D

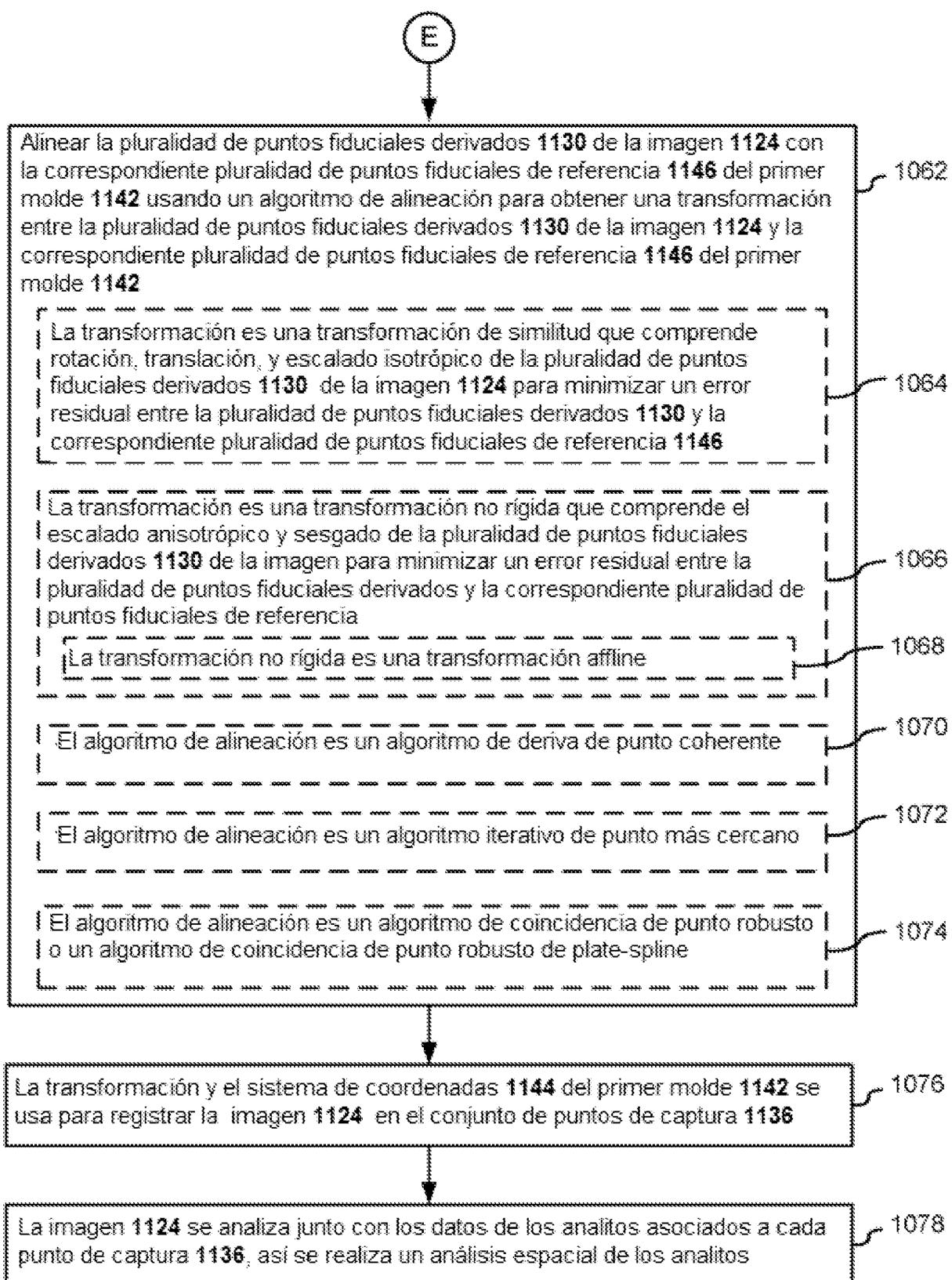


Figura 10E

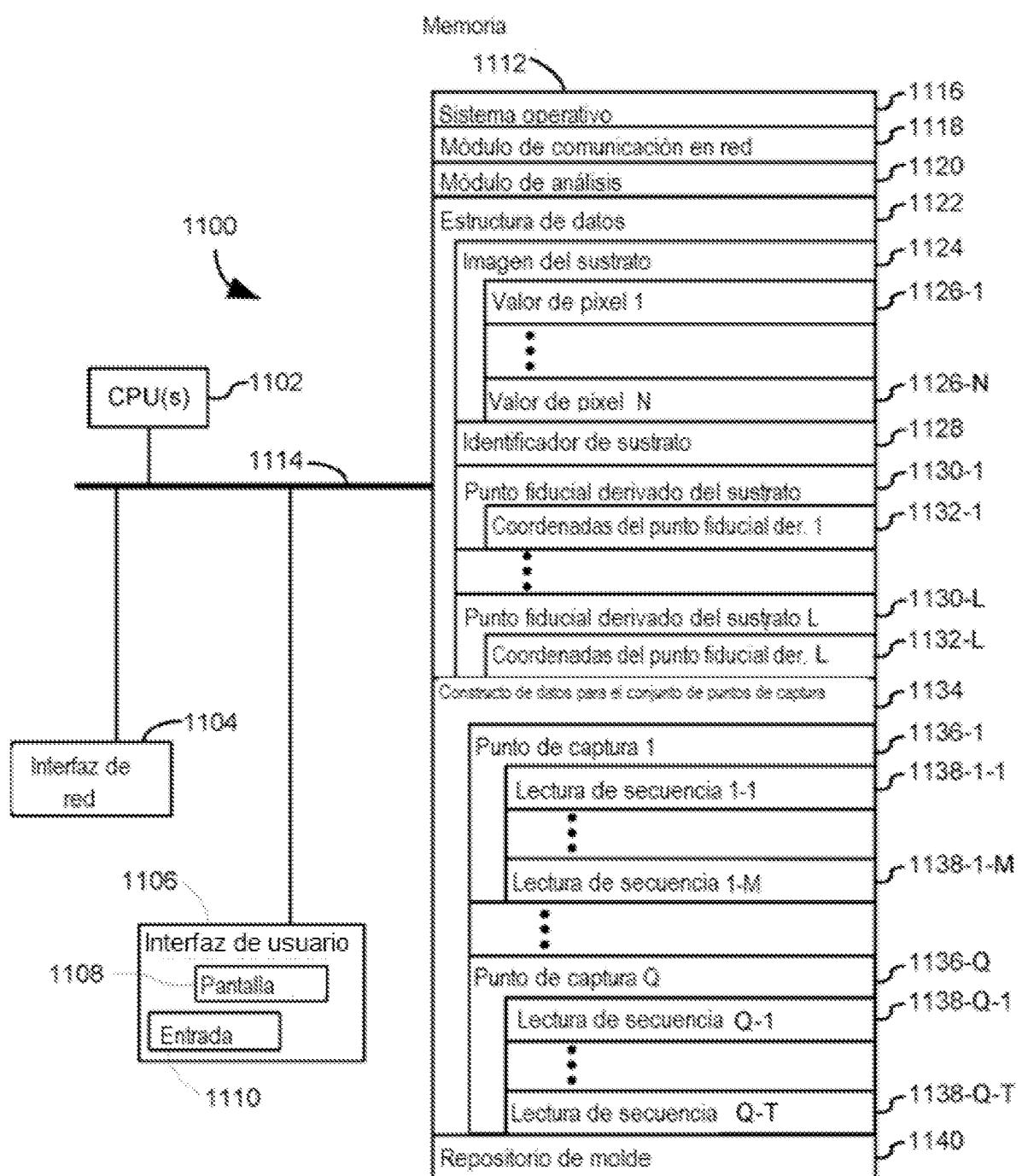


Figura 11A

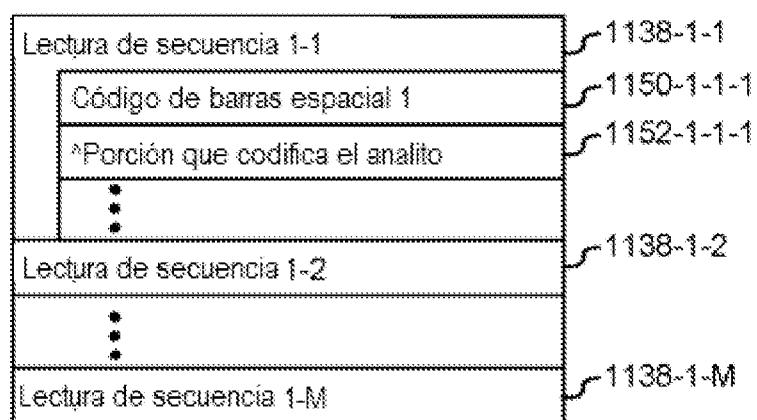
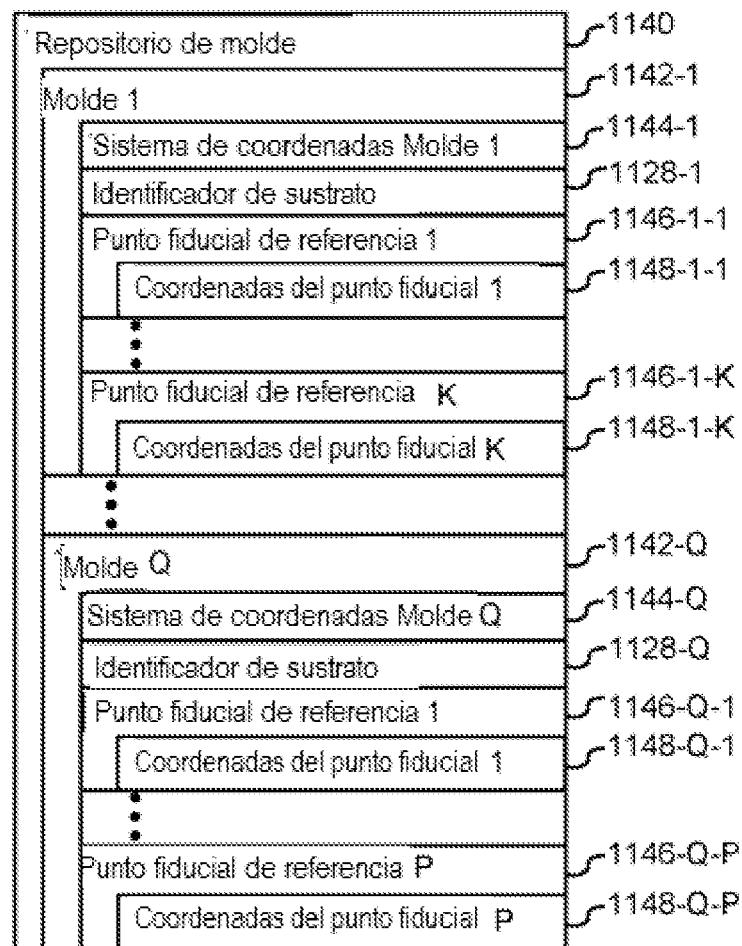


Figura 11B

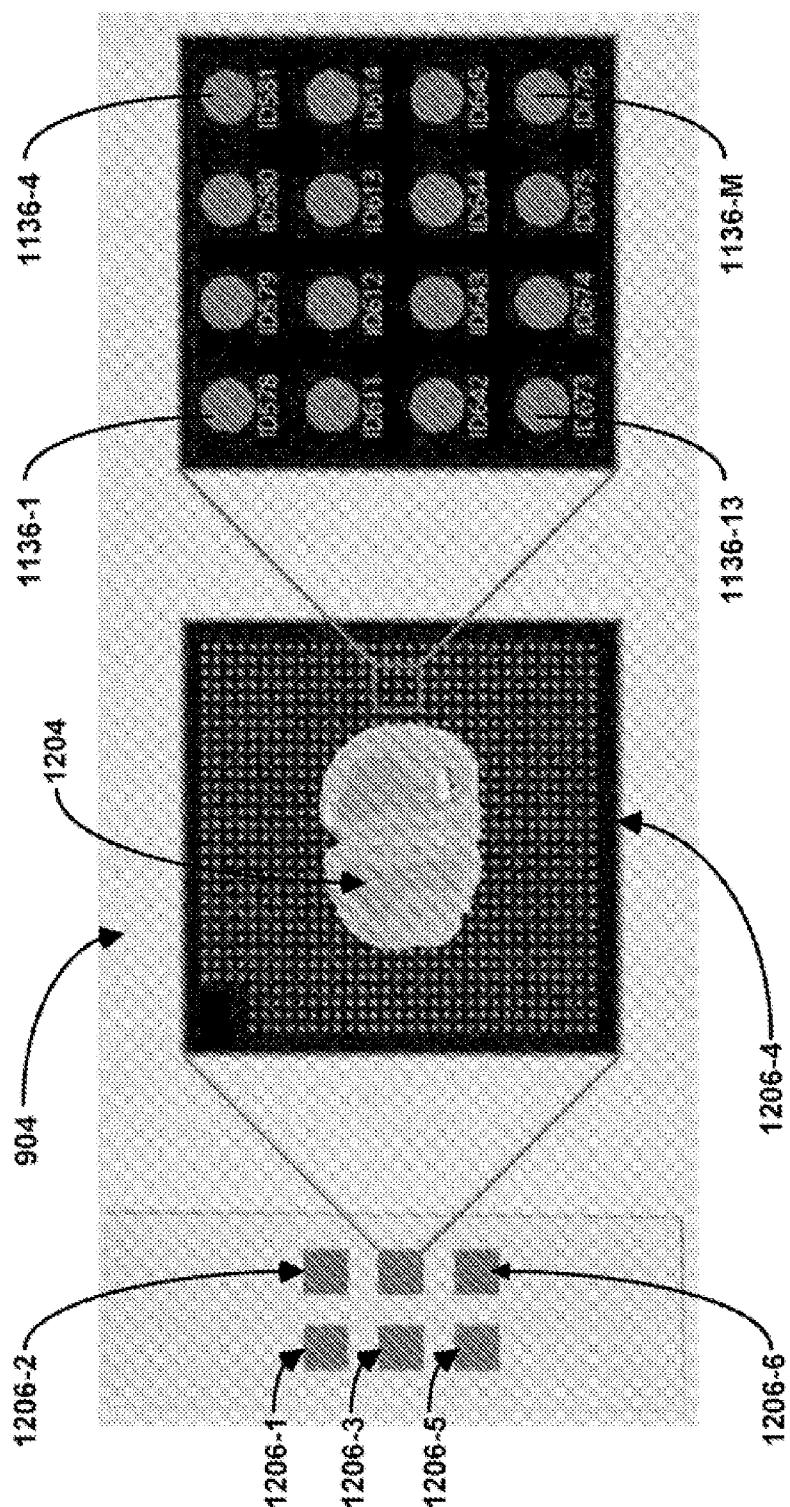


Figura 12

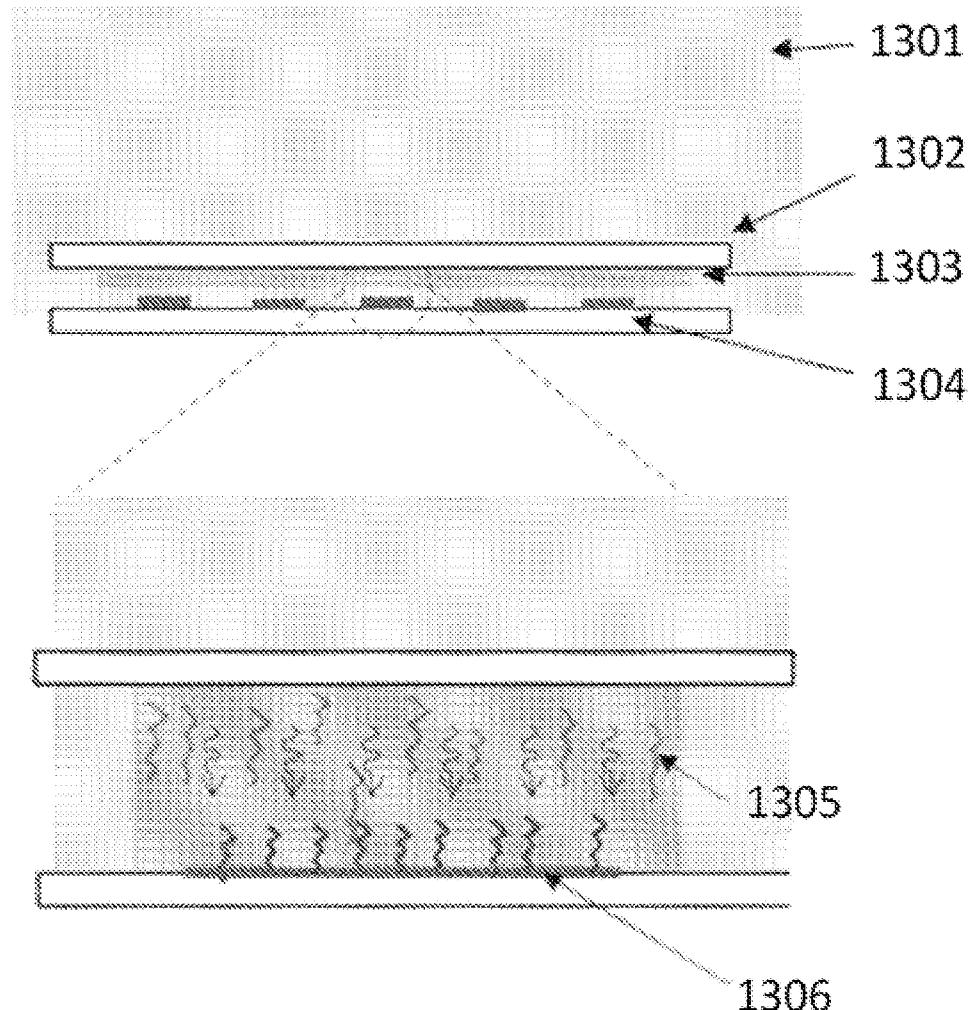


Figura 13

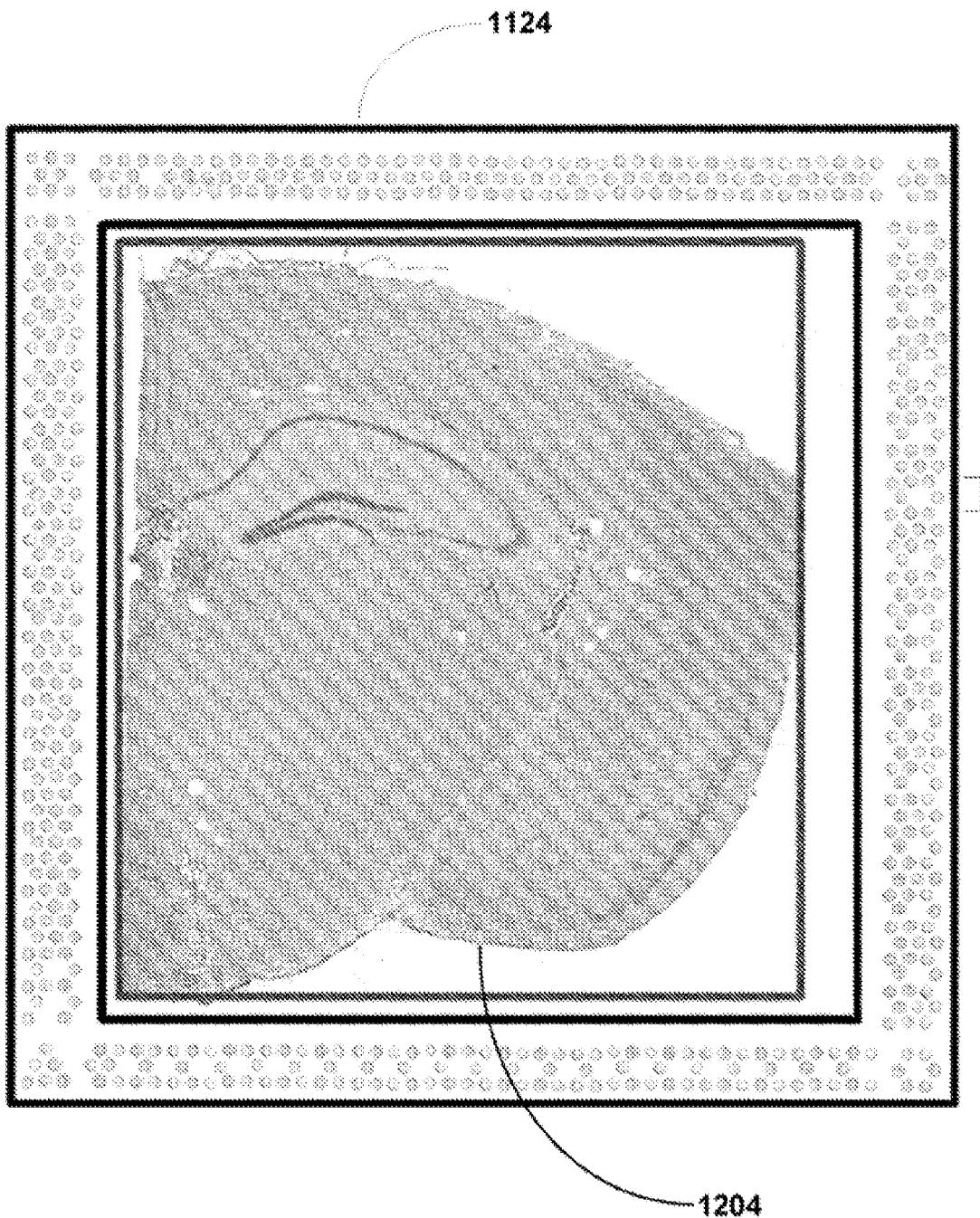


Figura 14

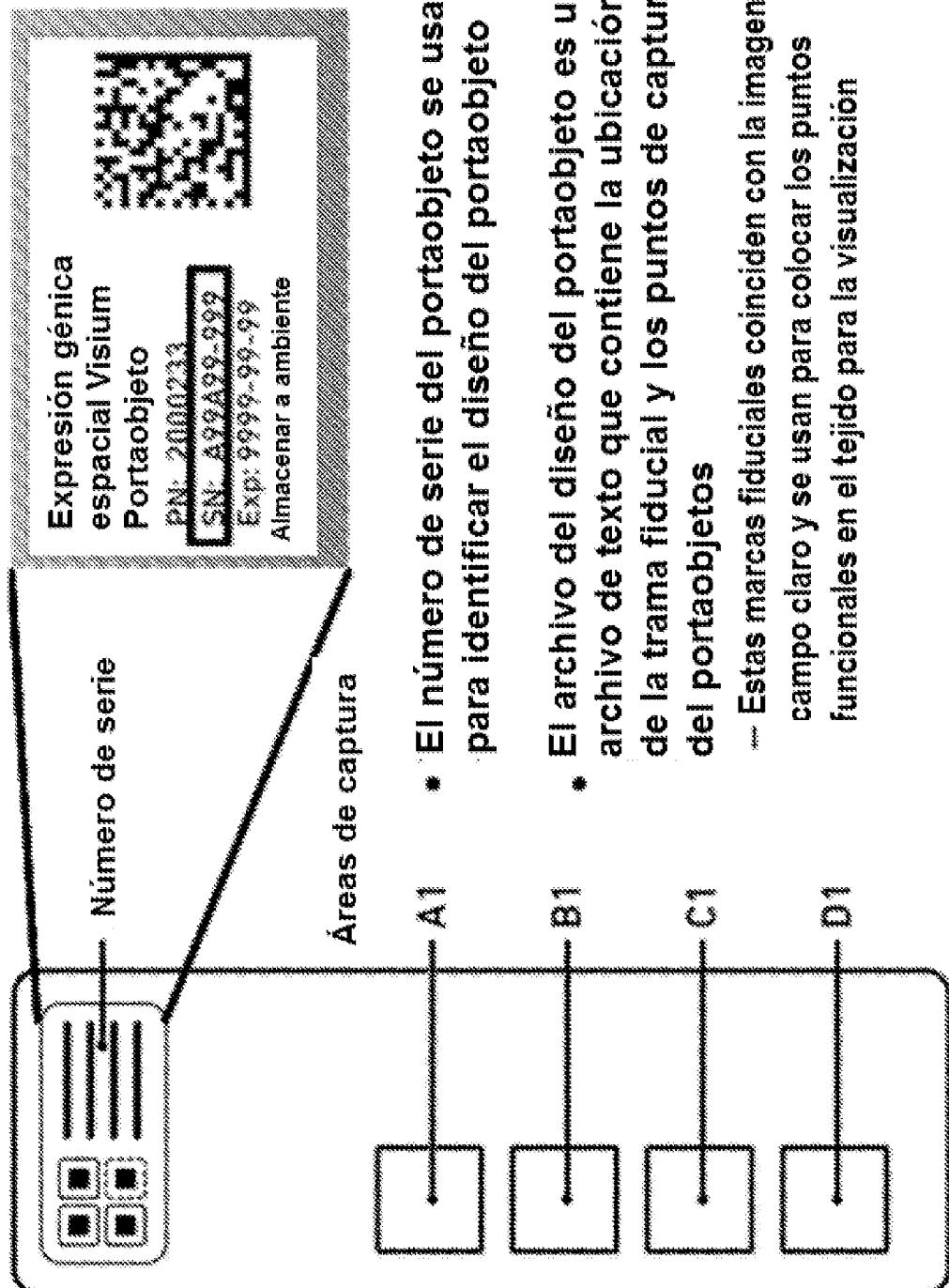


Figura 15

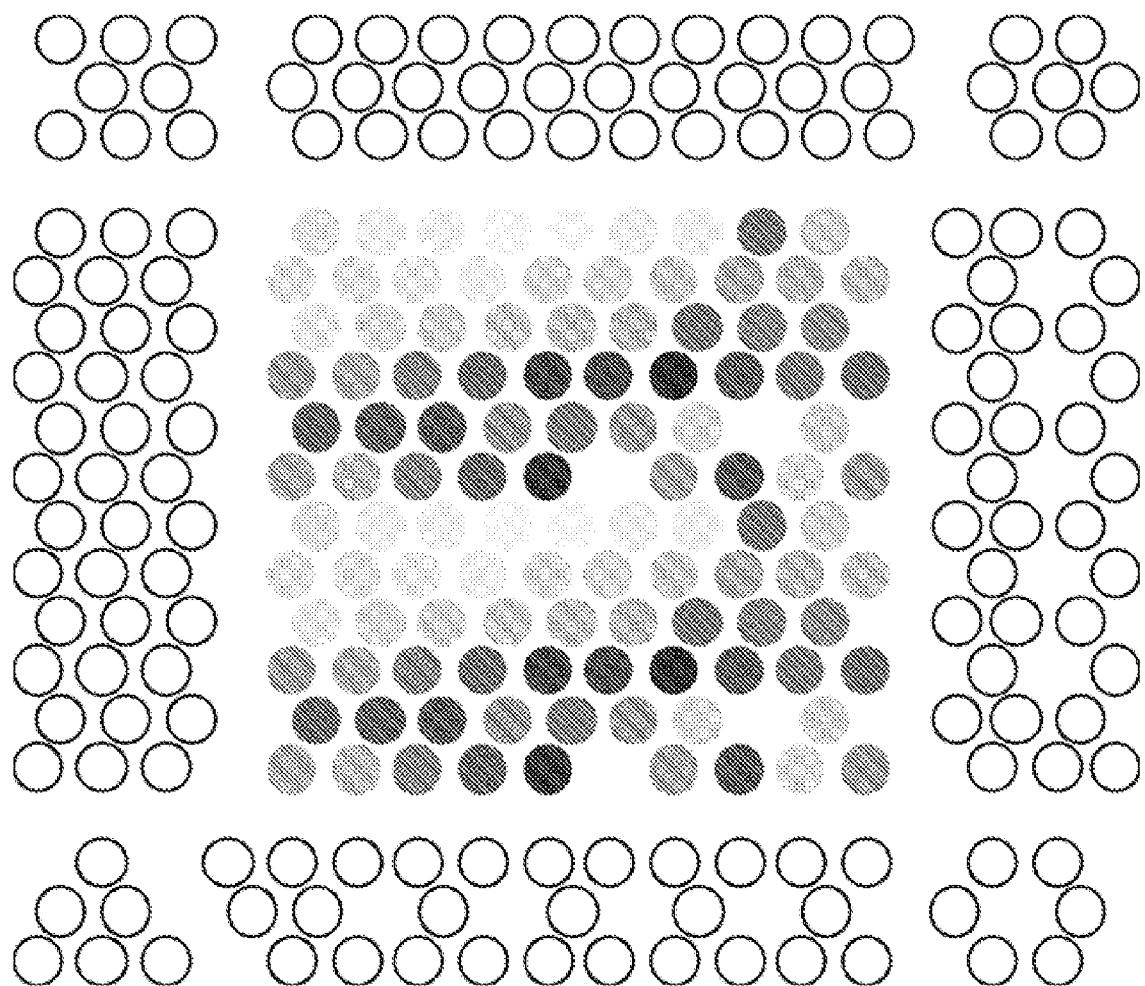


Figura 16

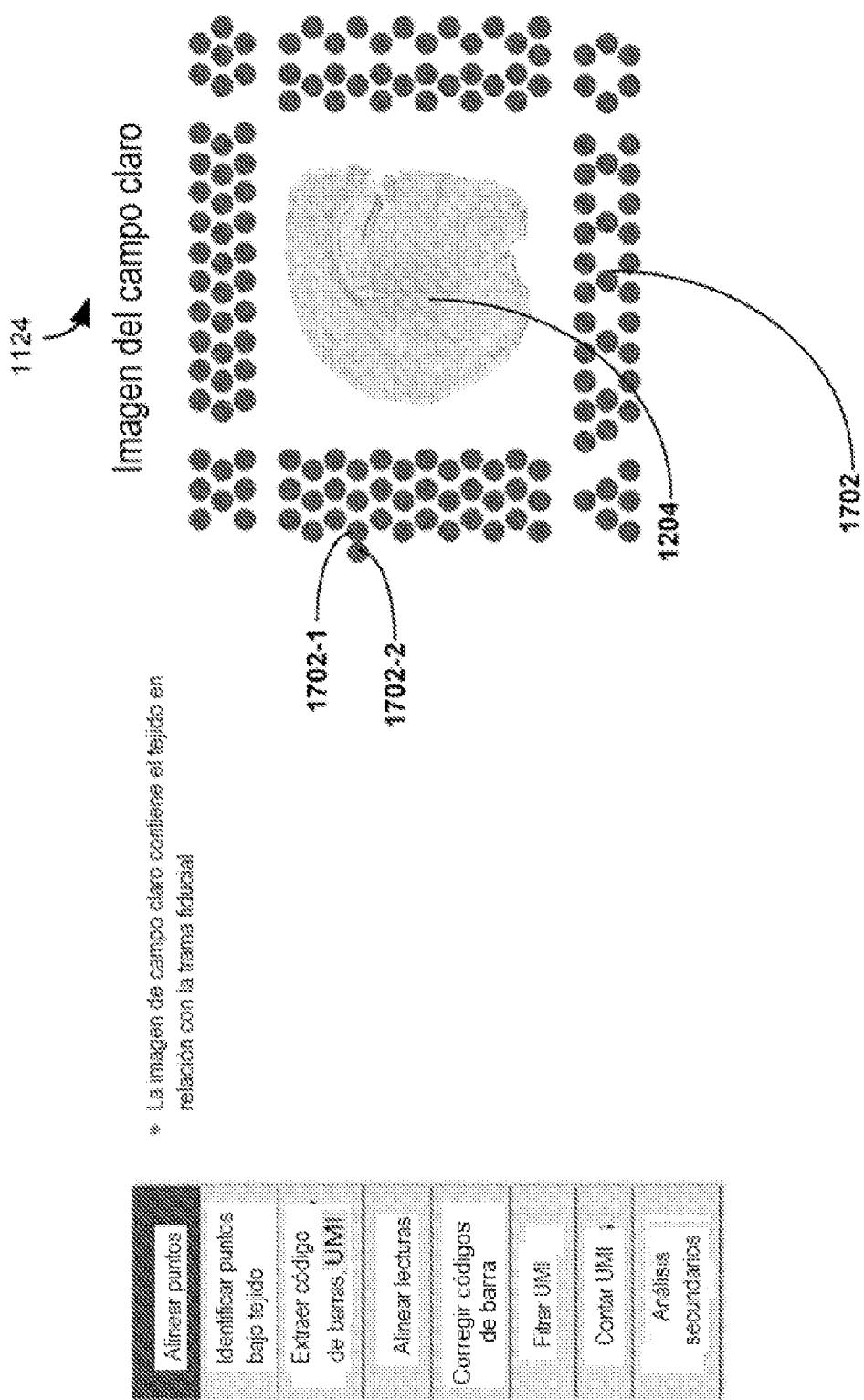


Figura 17

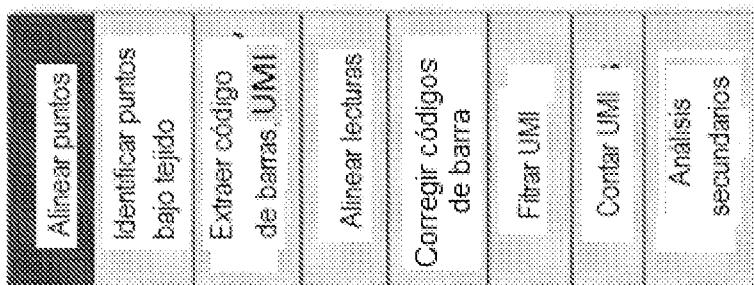
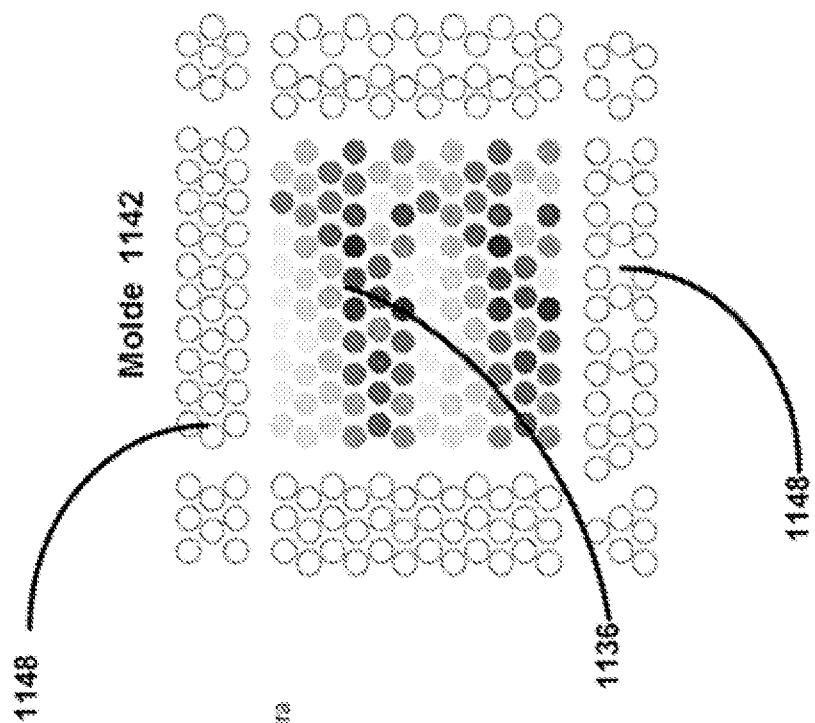


Figure 18



- » La imagen del campo claro contiene la ubicación del tejido en relación con la trama fibrilar
- » El archivo de diseño de punto/círculo contiene la ubicación de los puntos de captura en relación con la trama fibrilar

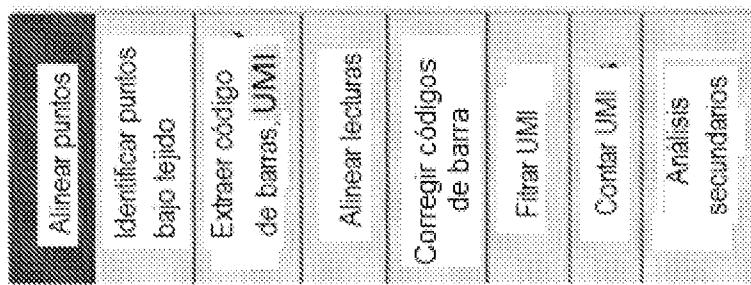


Figura 19

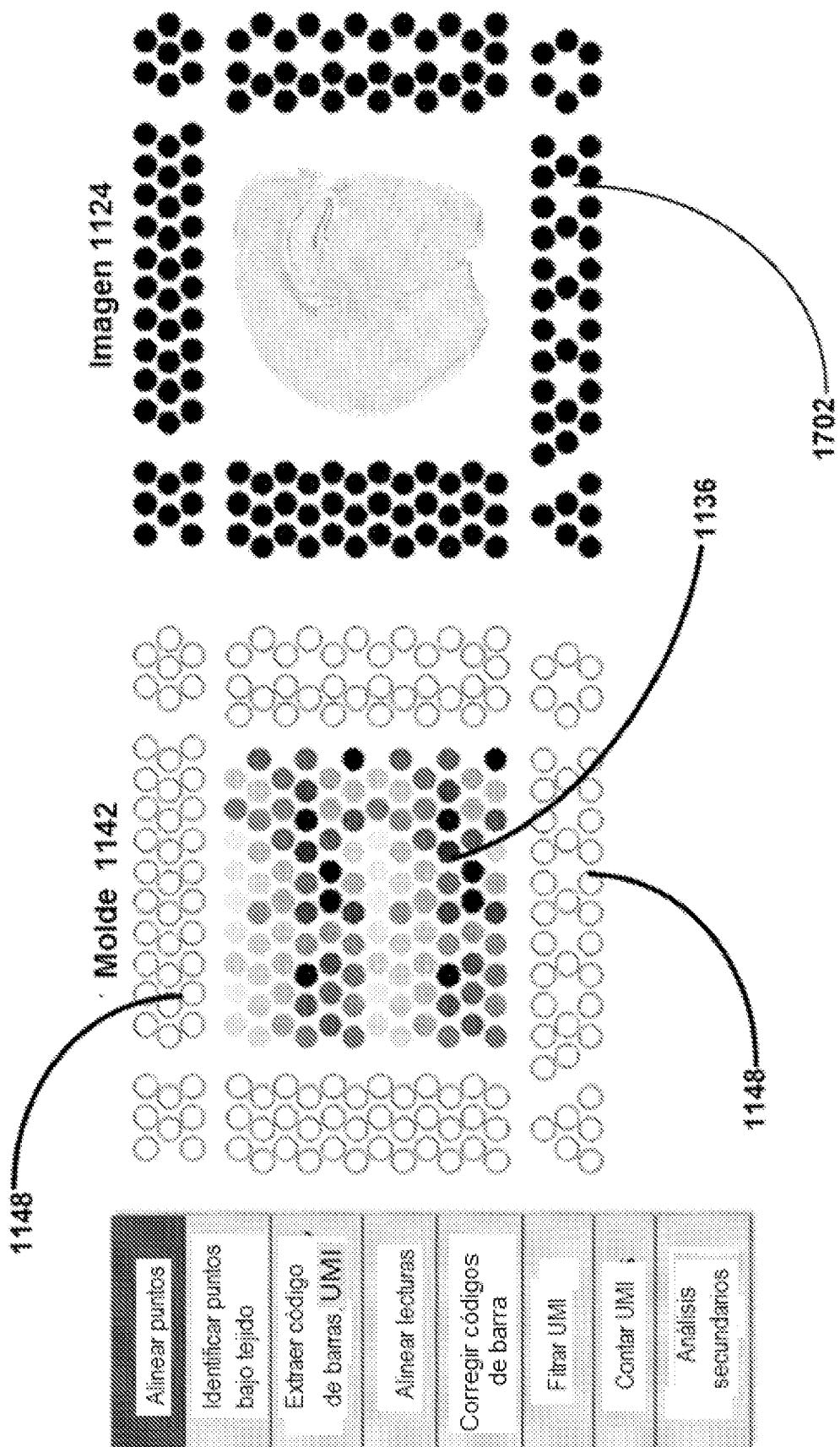
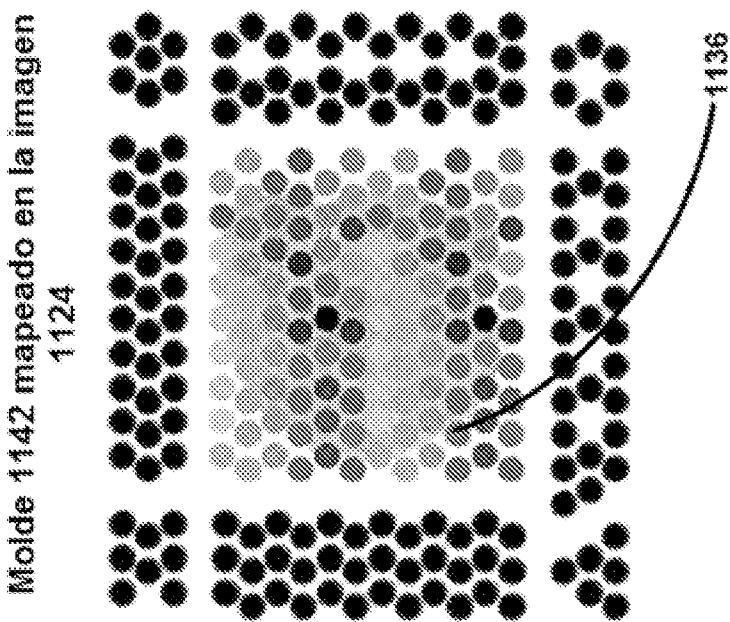


Figura 20



- La imagen del campo claro contiene la ubicación del tejido en relación con la trama fiducial.
- El archivo de diseño de portachefeo contiene la ubicación de los puntos de captura en relación con la trama fiducial.
- Usando la trama de referencia común a ambas entradas, la tecnología Space Ranger superpone la ubicación exacta de los puntos activos en el tejido.
- Es decir, Space Ranger utiliza el diseño del portachefeo para dibujar los puntos activos en el tejido.

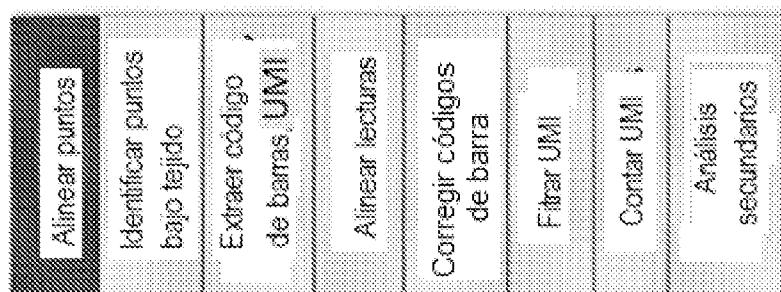
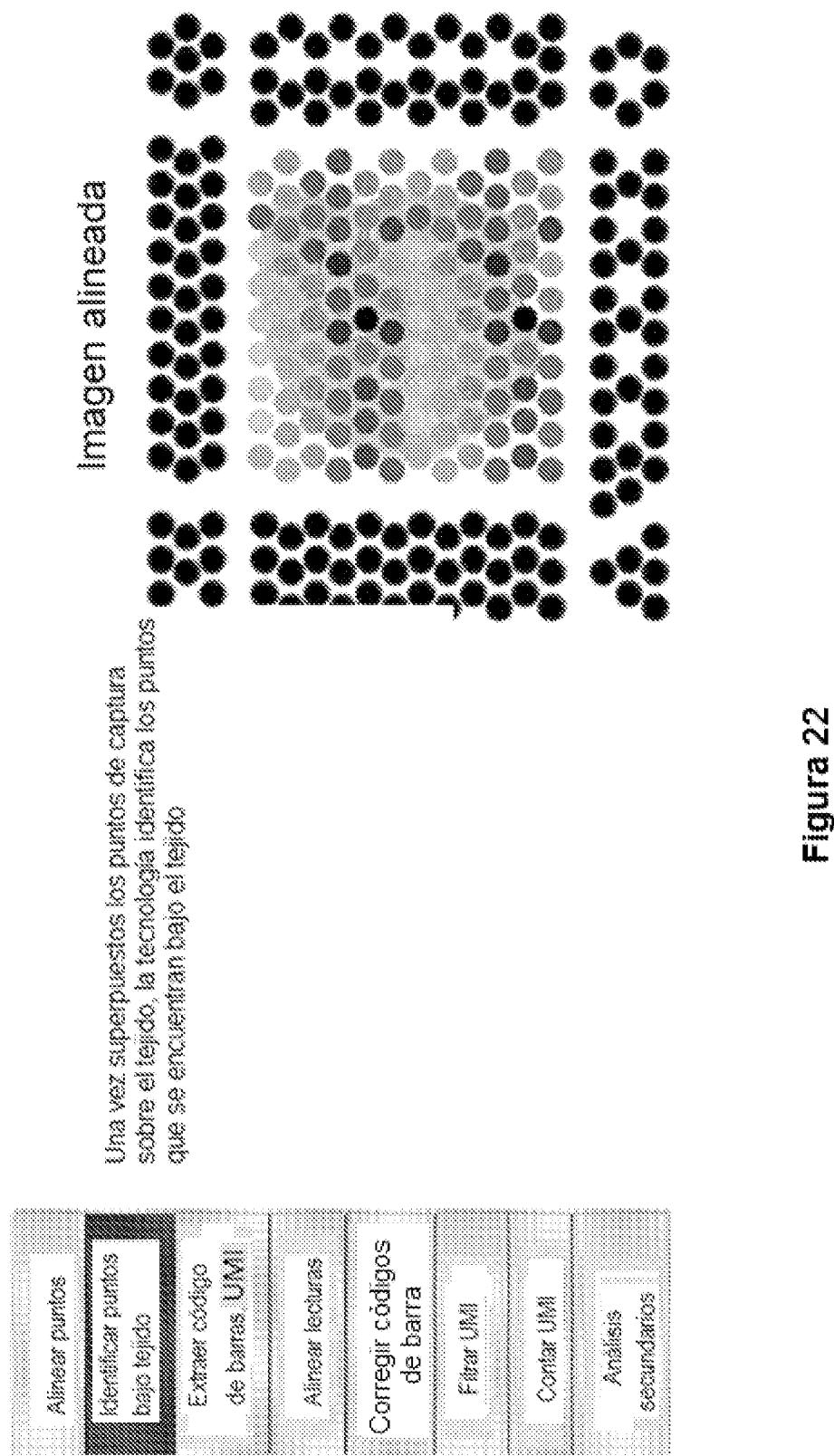


Figura 24

**Figura 22**

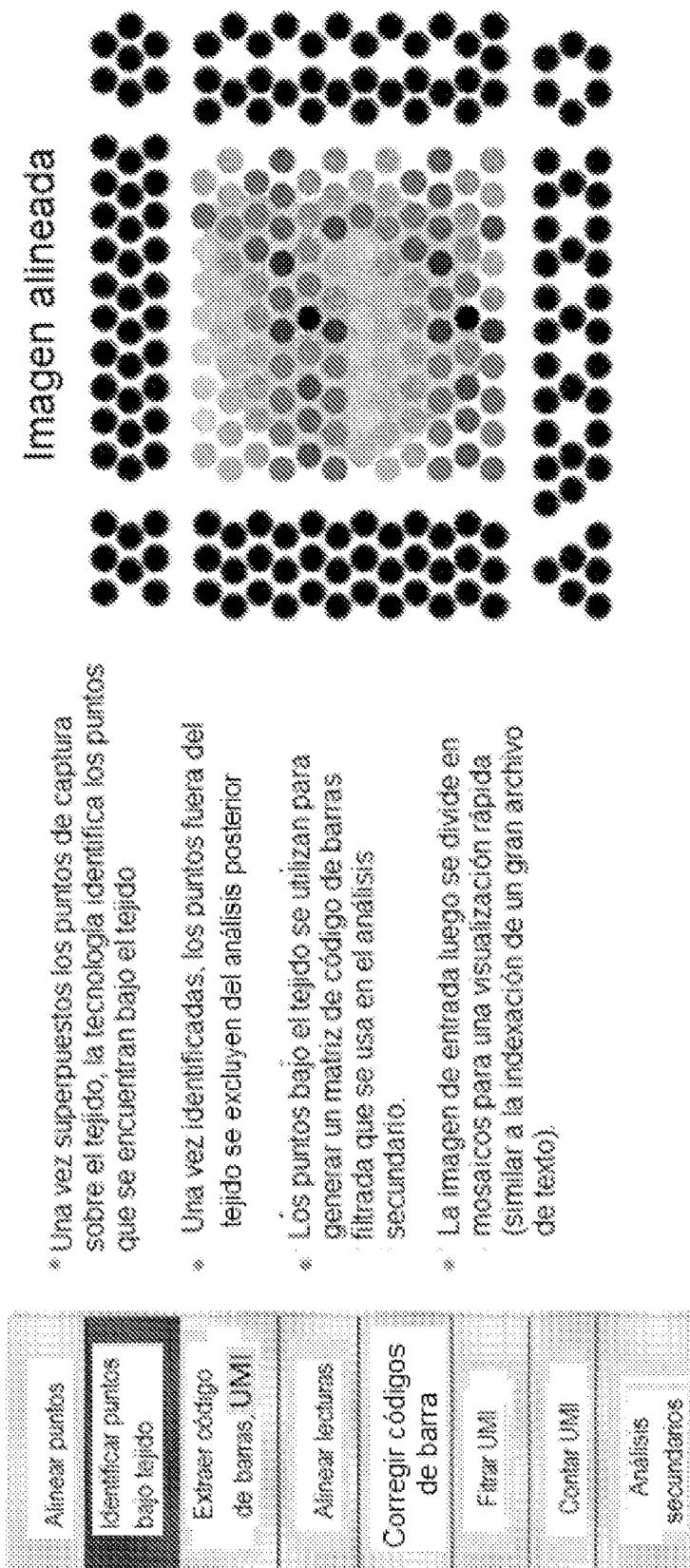


Figura 23

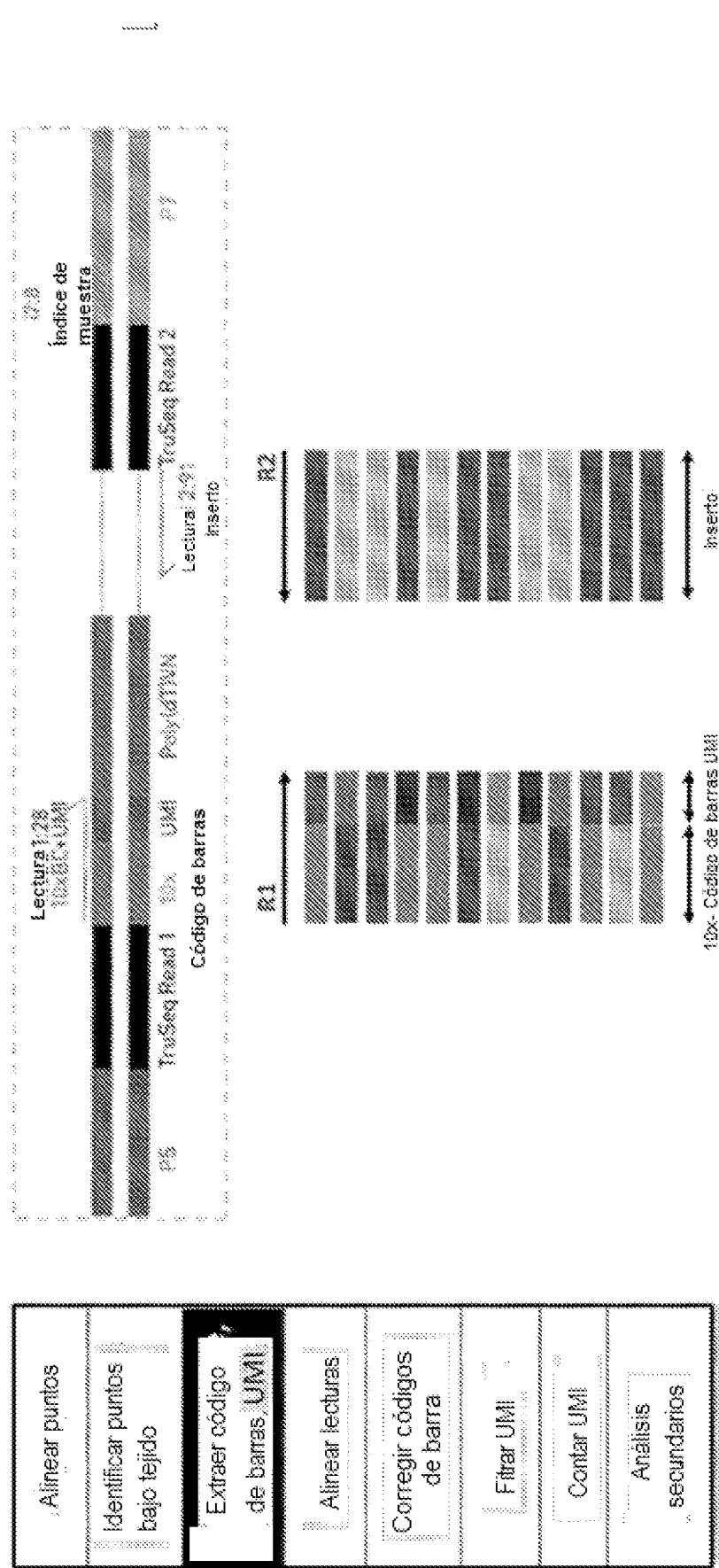
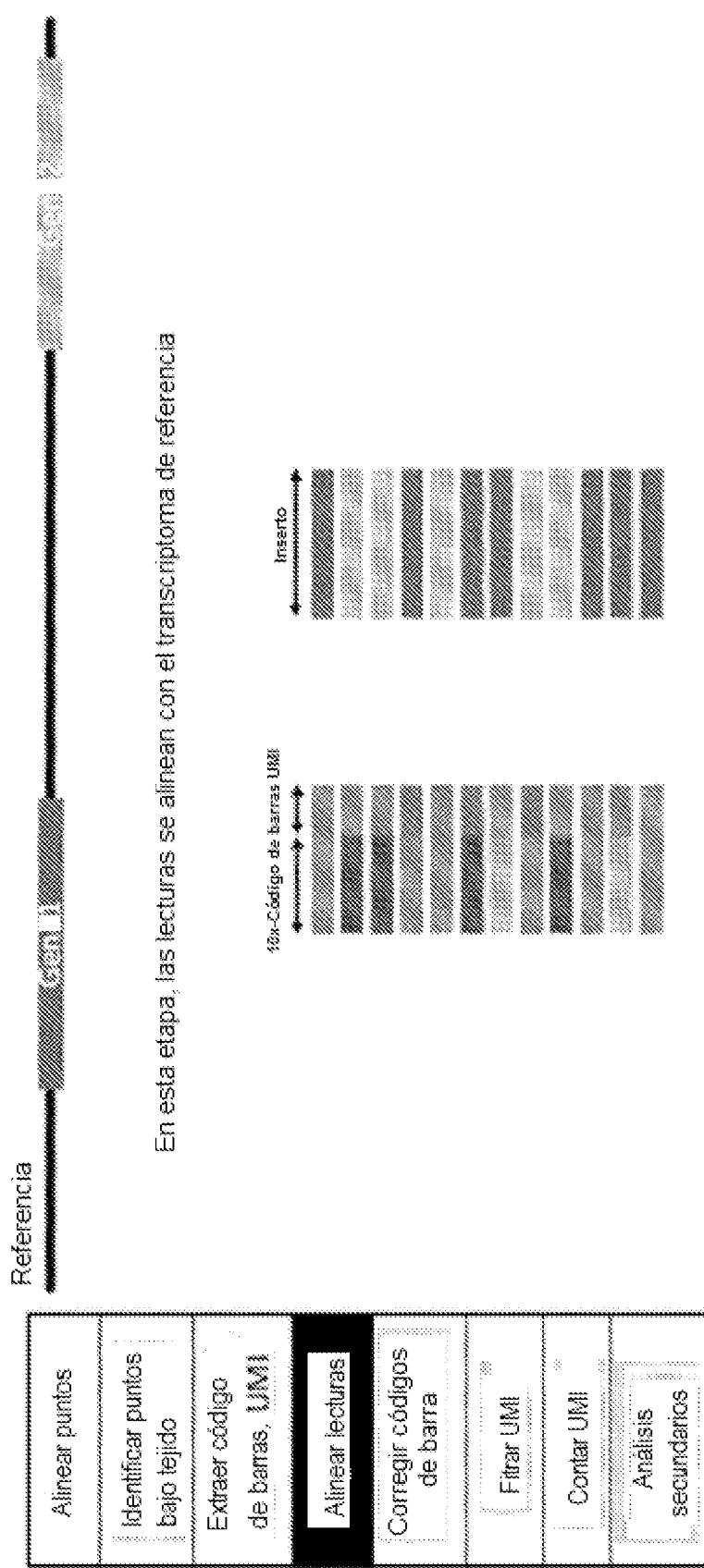


Figura 24

**Figura 25**

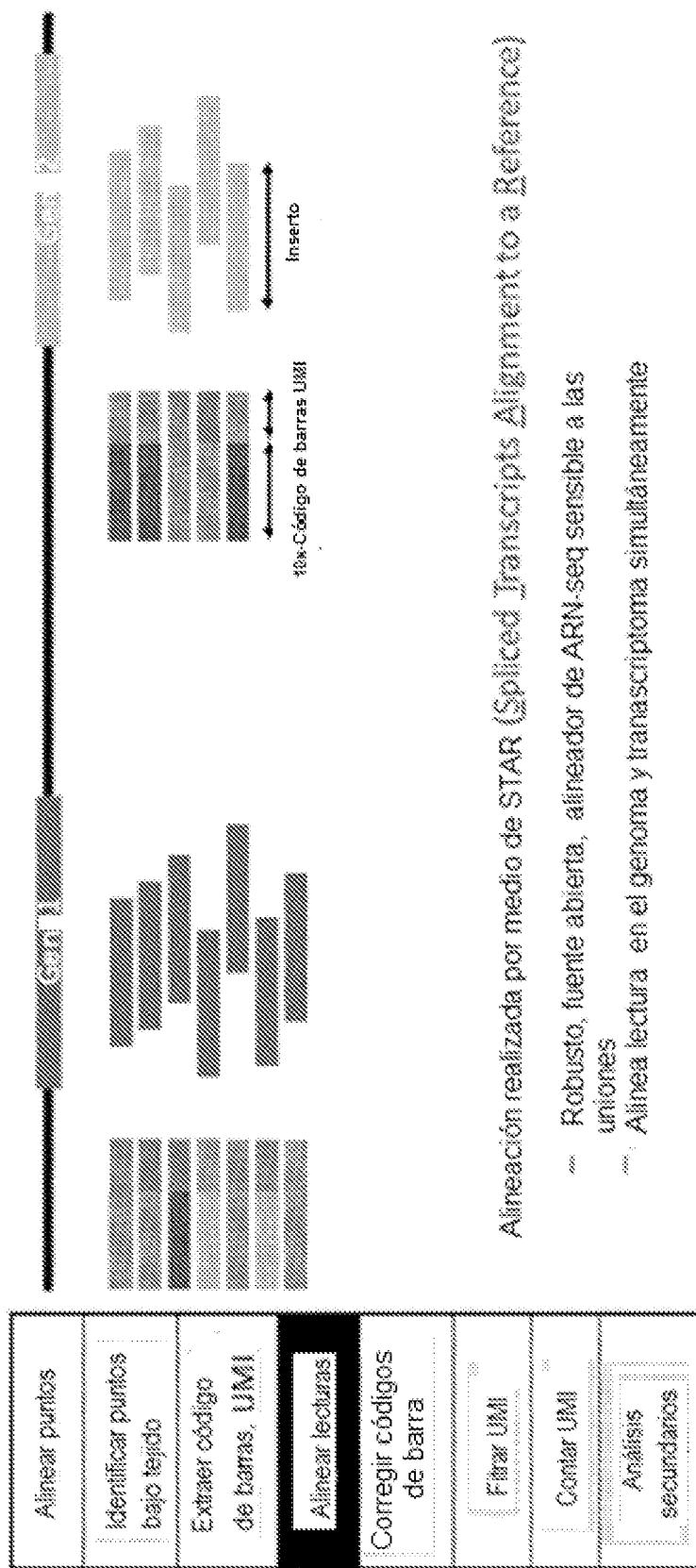


Figura 26

- » Códigos de barra del punto de captura
 - Debe estar en una lista secuencias de códigos de barras del punto de captura
 - Puede permitir un error de coincidencia de 1bp si el error ocurre en una posición de calidad baja (el código de barras entonces se corrige)

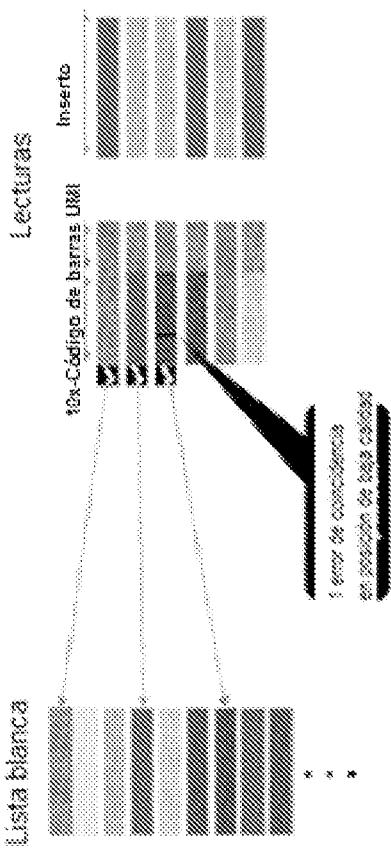
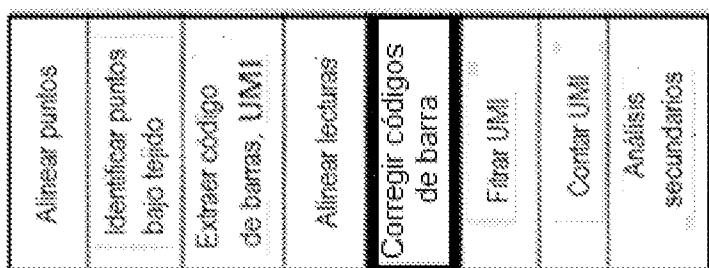


Figura 27



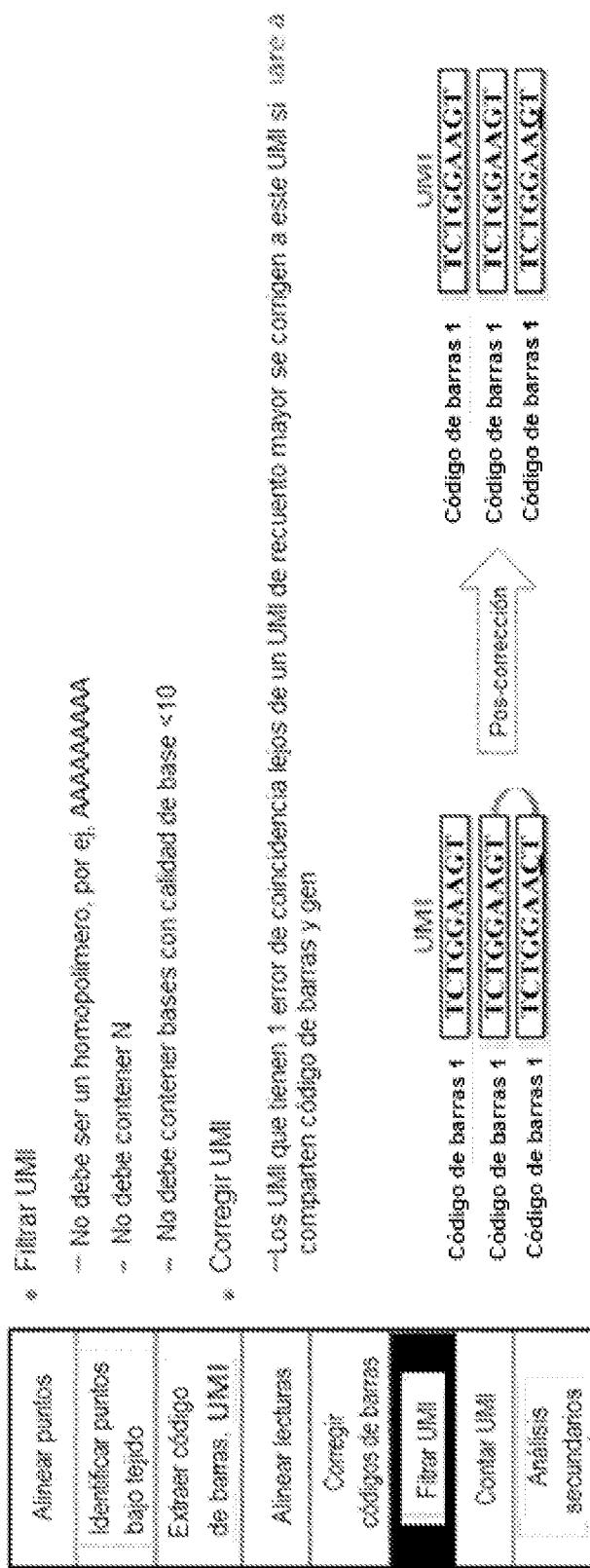
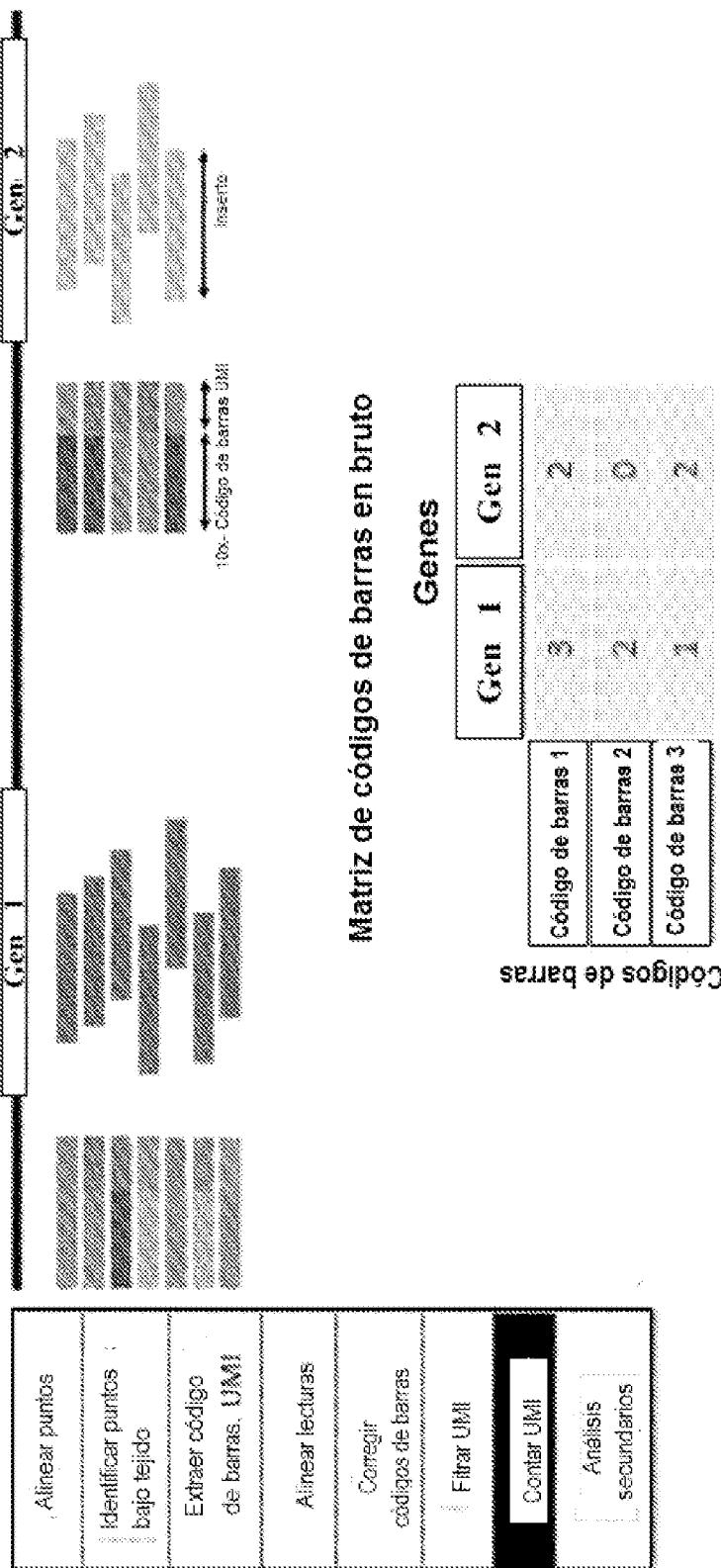


Figura 28



- * Solo se usan las lecturas mapeadas con confianza con códigos de barras válidos y UVII para el recuento
- * El recuento se realiza para todos los códigos de barras observados que generan una matriz de código de barras de característica no filtrada

Figura 29

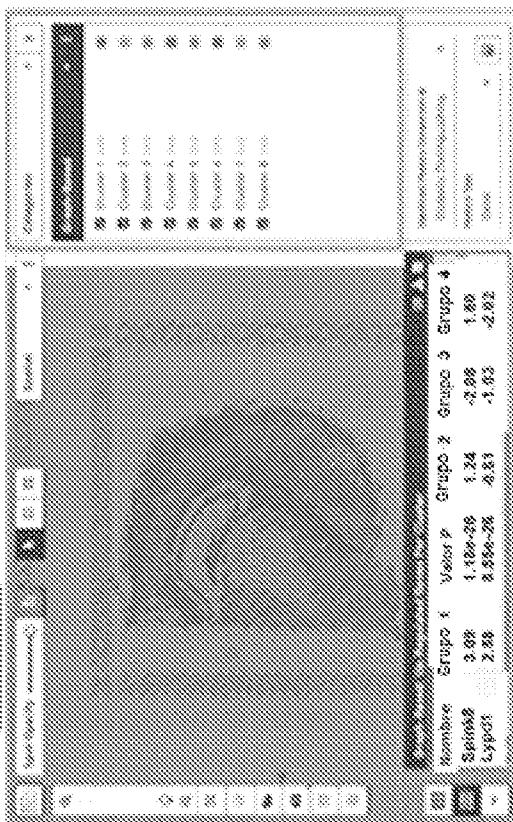
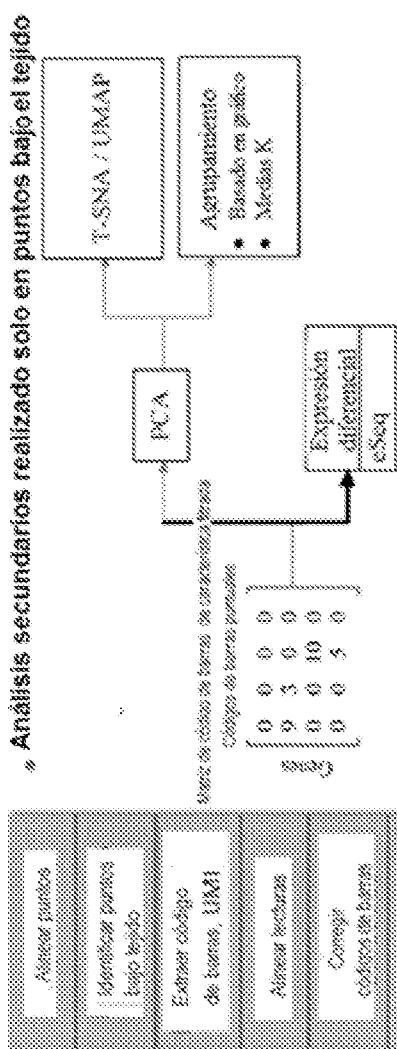


Fig. 3

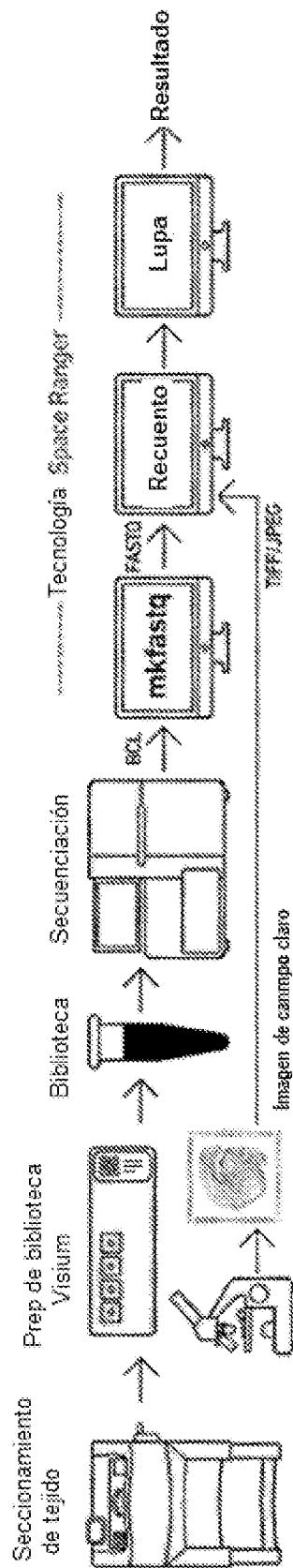


Figura 34

Visualización de datos

- Navegador de lupa con scopete de expresión génica espacial
- Ver los clusters de puntos en el contexto de la imagen del tejido

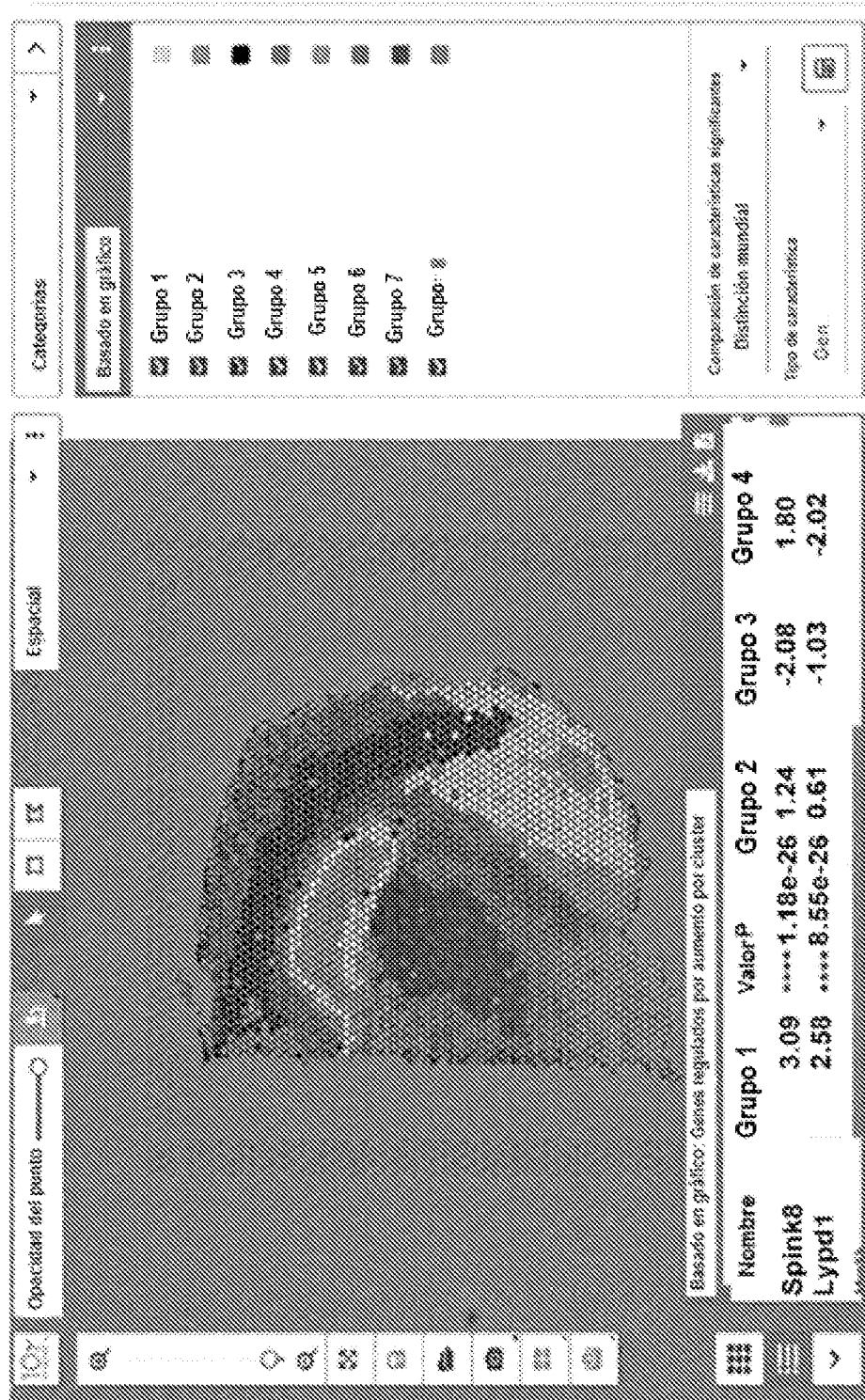


Figura 32

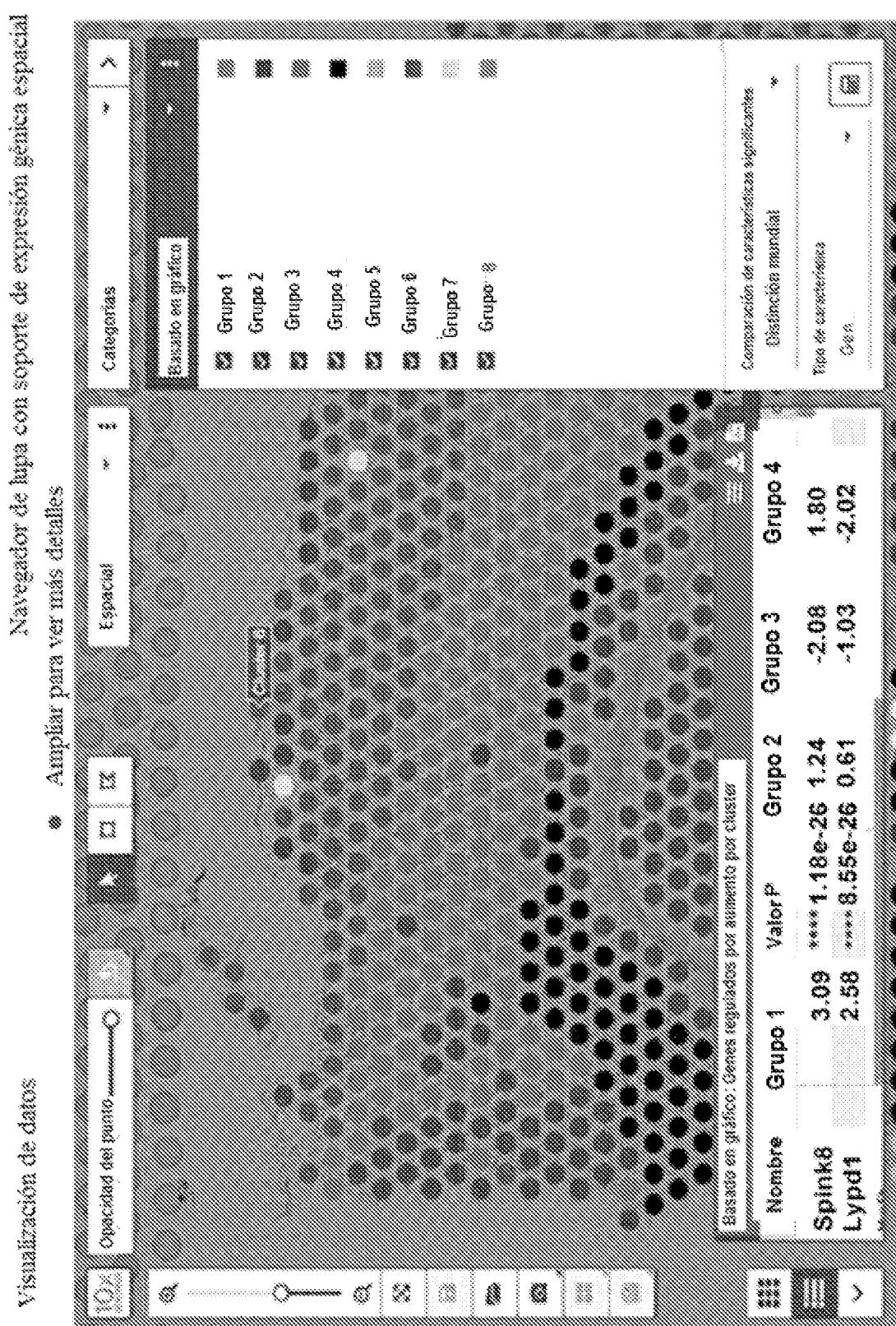


Figura 33

Visualización de datos

- Navegador de lupa con soporte de expresión génica espacial
 ● Crear categorías y clusters a medida para el análisis de expresión diferencial

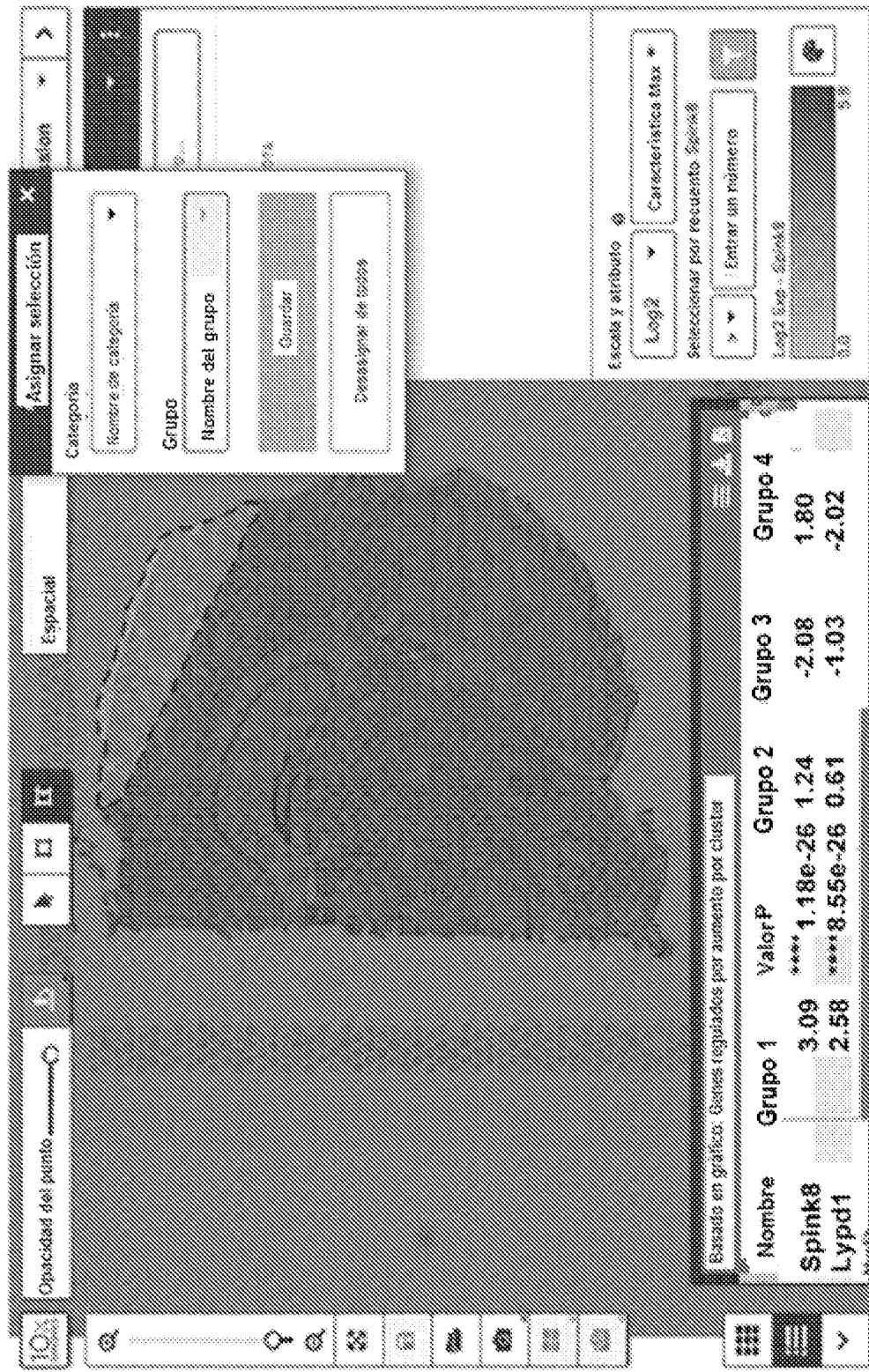


Figura 34

Visualización de datos Ver genes expresados en el contexto de la imagen del tejido

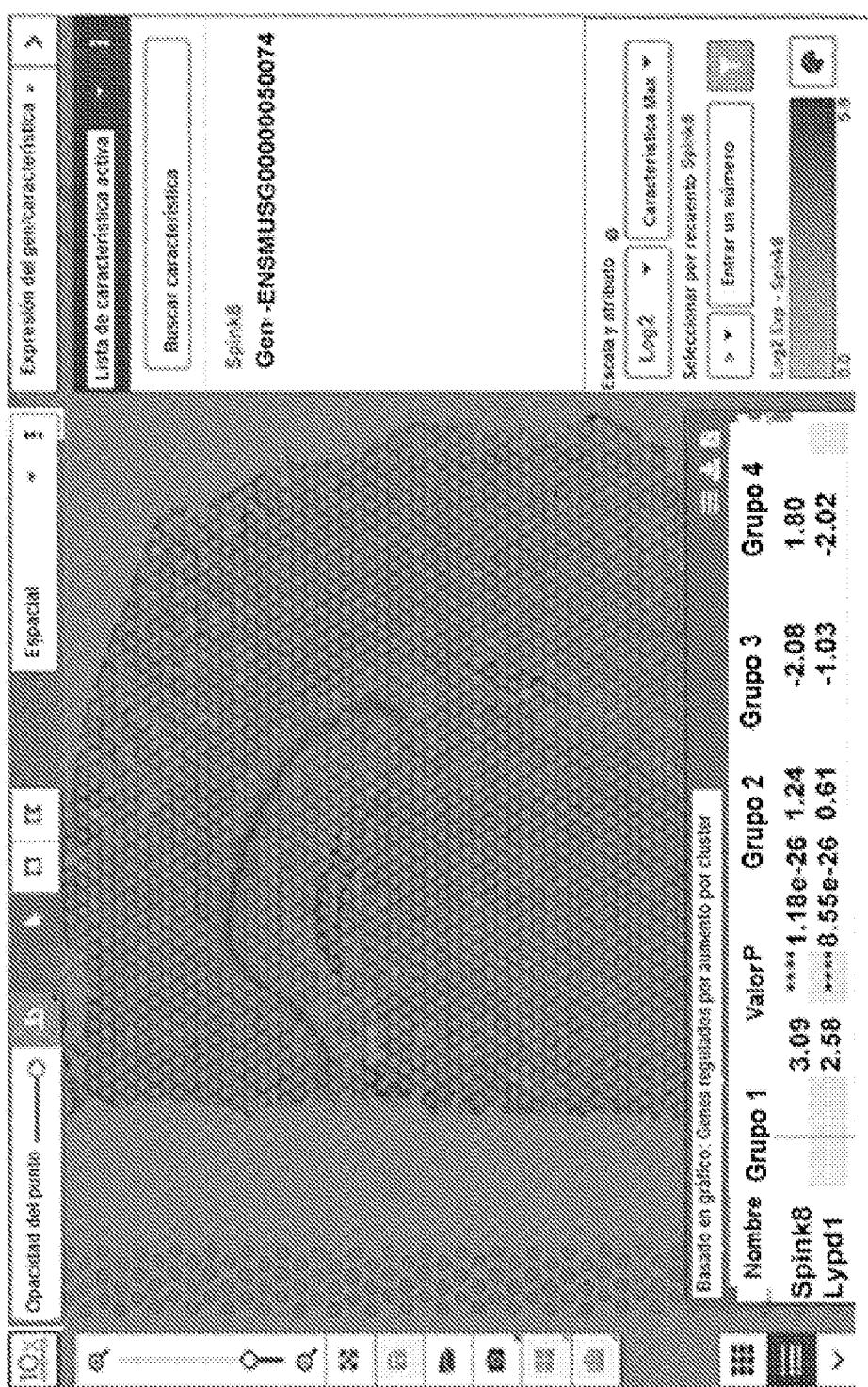
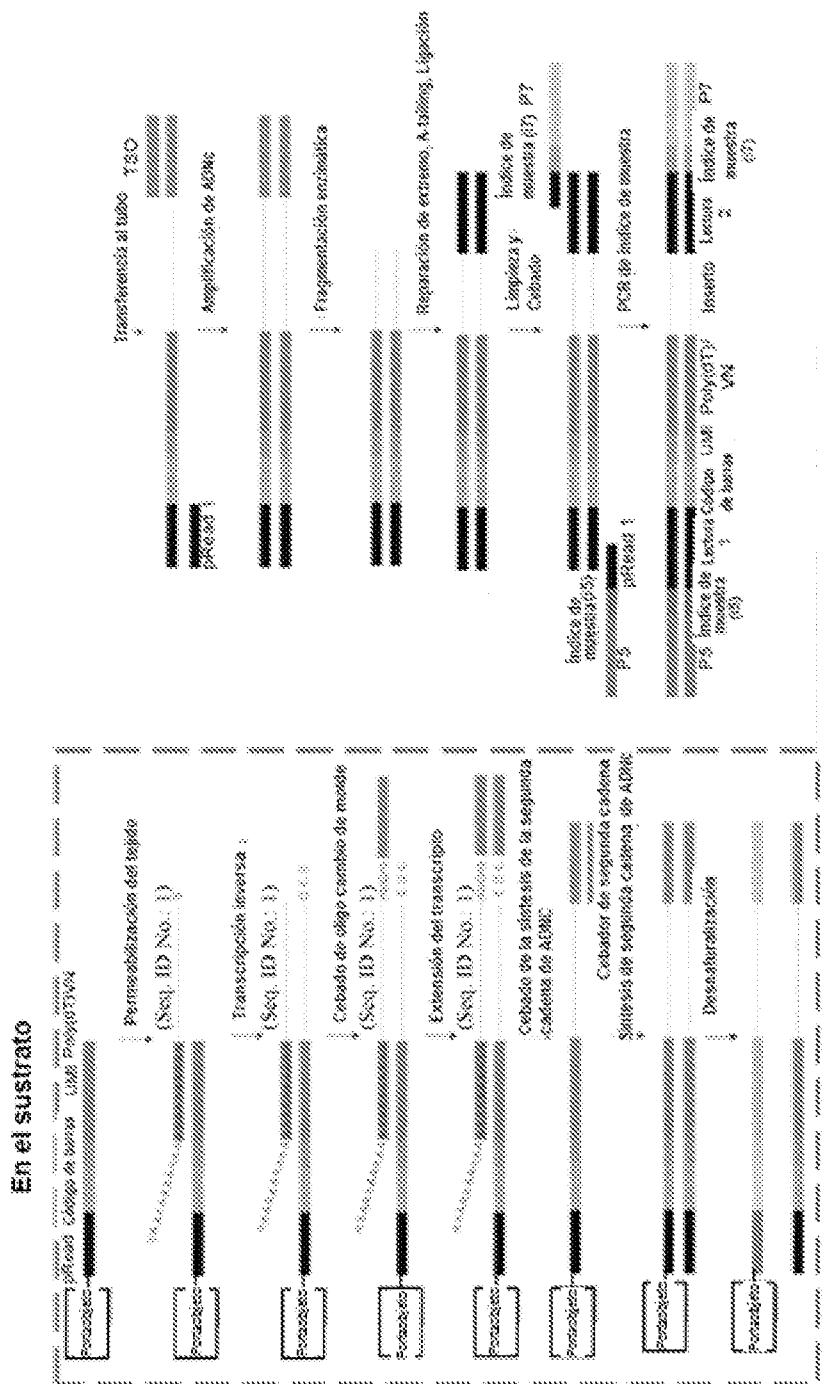


Figura 35



三六

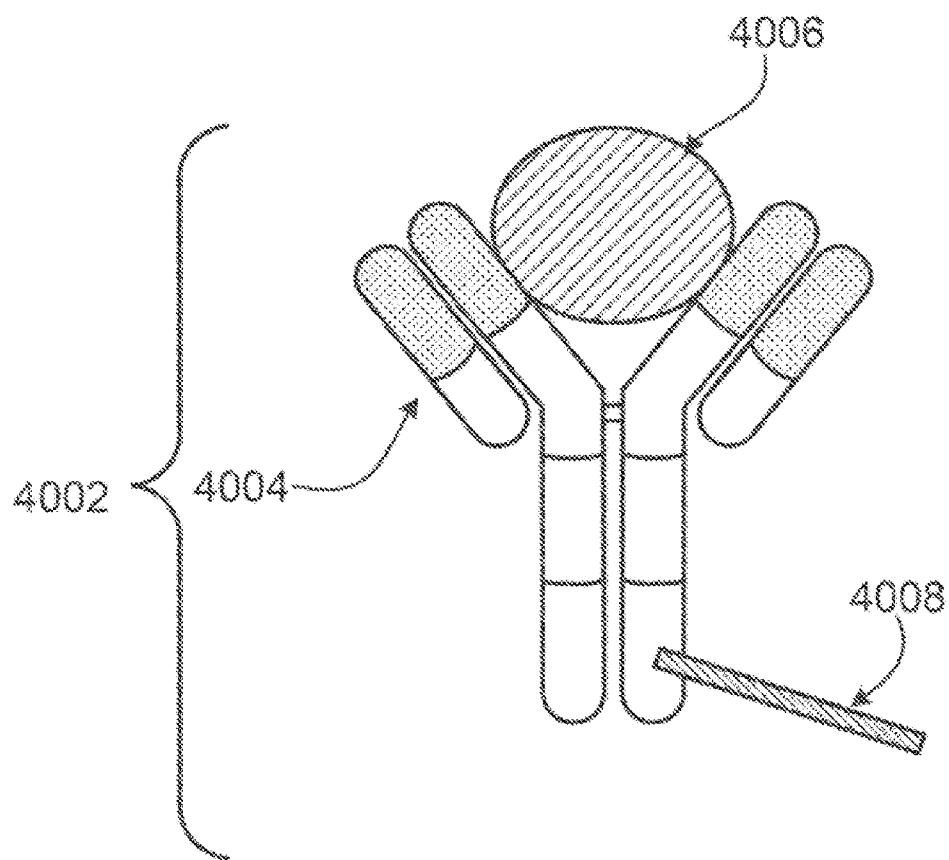


Figura 37

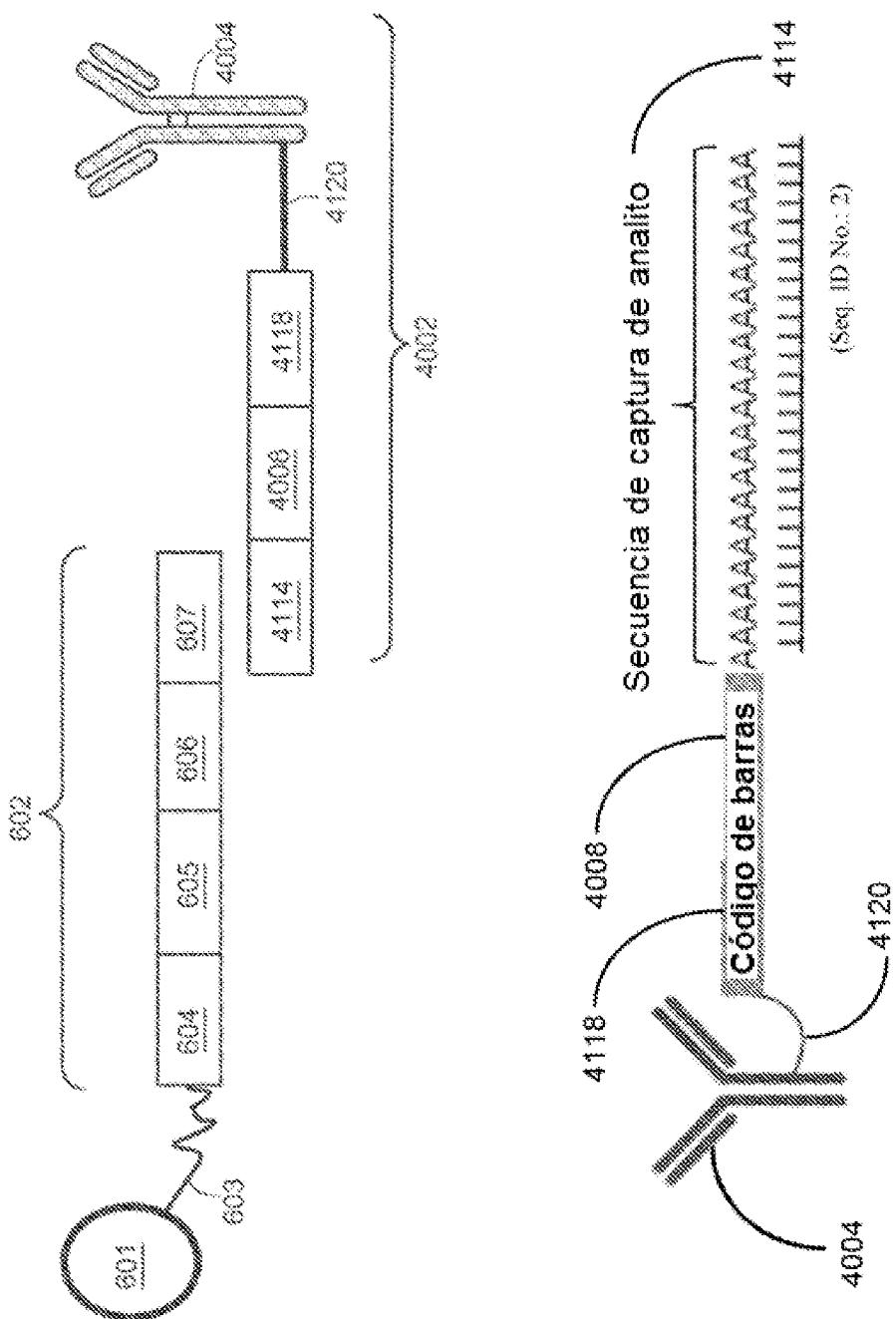


Figura 38A

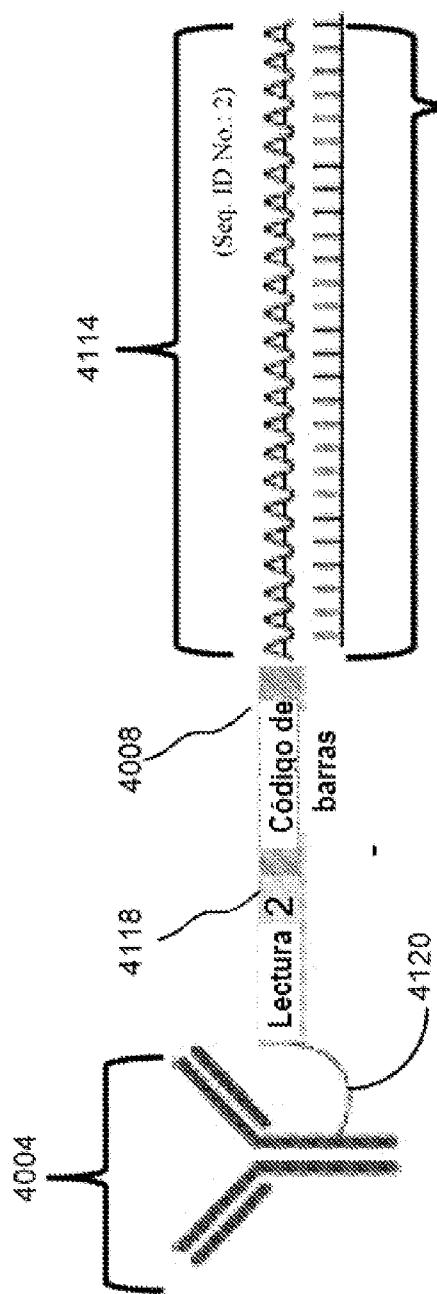


Figura 38B

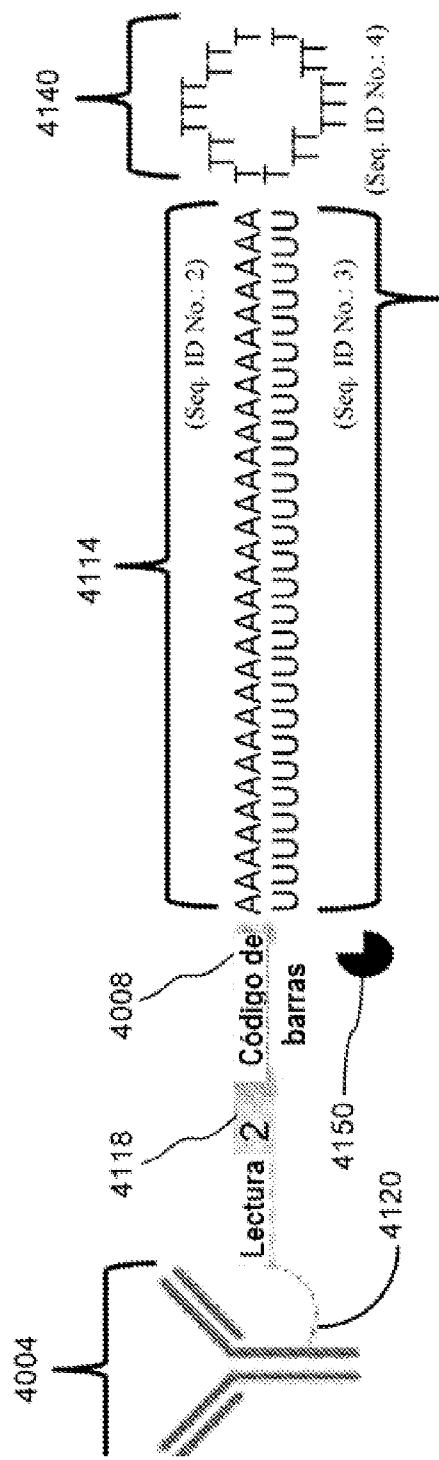


Figura 38C

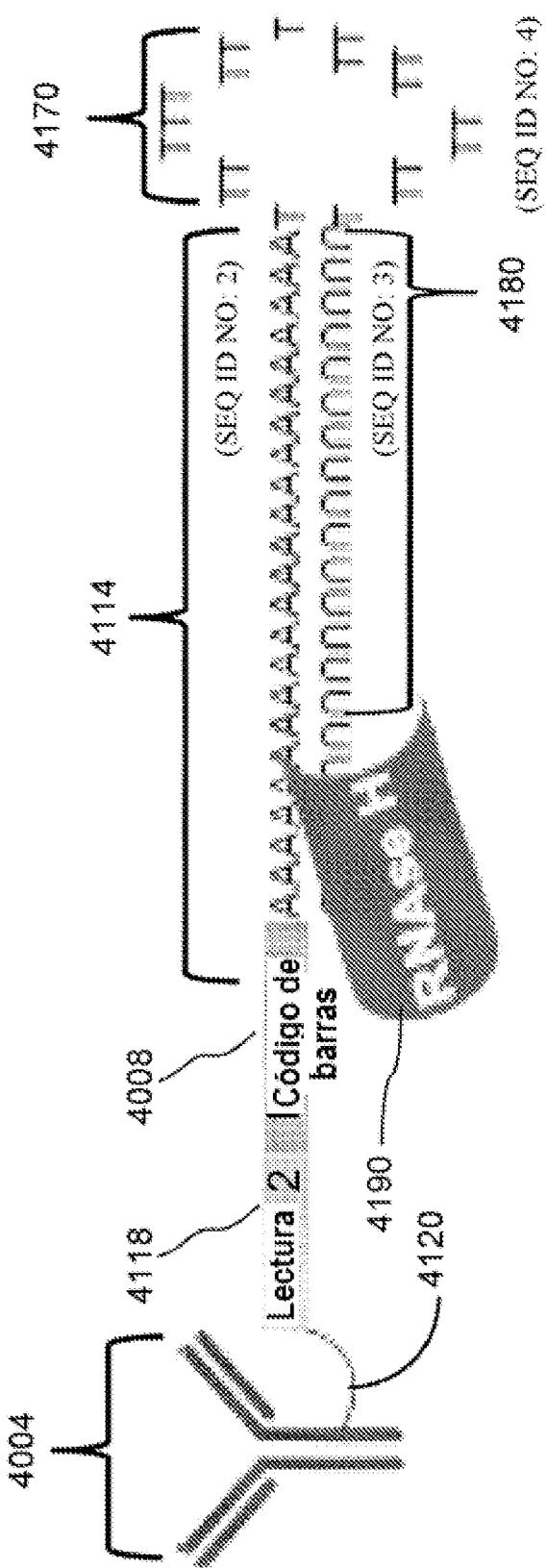


Figura 38D

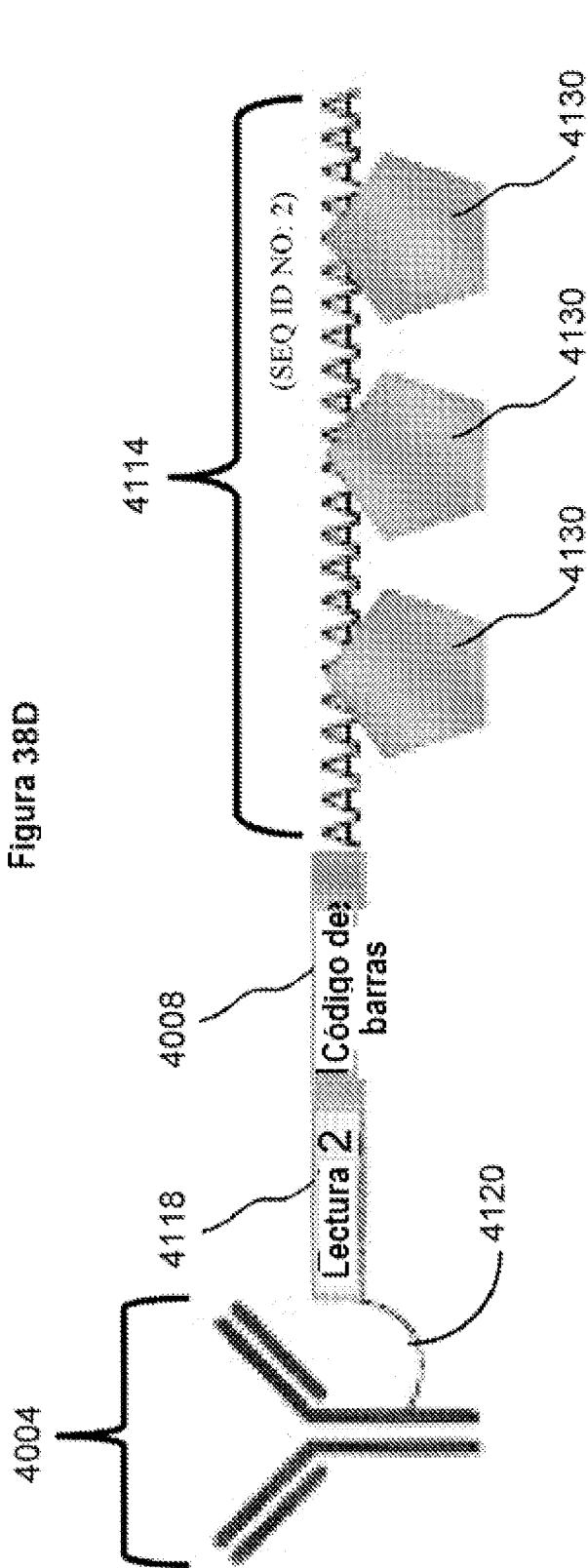


Figura 38E

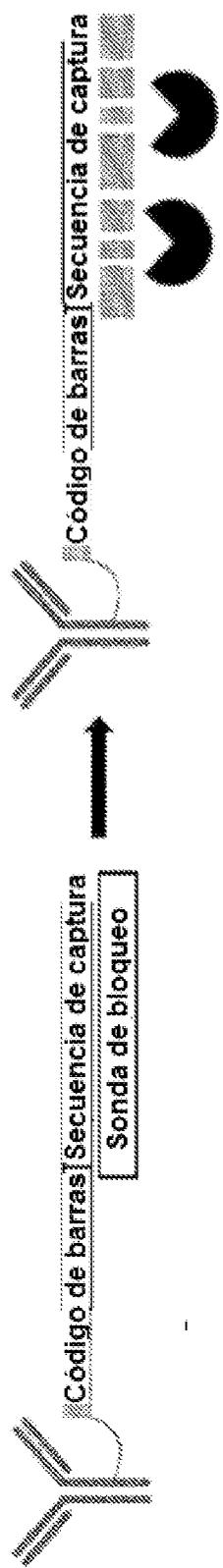


Figura 3.9