

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 960**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 21/77** (2006.01)

**G06F 19/00** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2000 E 07023438 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 1895289**

54 Título: **Sensor de autocodificación con microesferas**

30 Prioridad:

**06.04.1999 US 287573**

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

**23.05.2018**

73 Titular/es:

**TRUSTEES OF TUFTS COLLEGE (100.0%)  
136 HARRISON AVENUE  
BOSTON, MA 02111, US**

72 Inventor/es:

**WALT, DAVID R. y  
DICKINSON, TODD A.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 668 960 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

Sensor de autocodificación con microesferas

5 **Campo de la invención**

La presente invención generalmente se refiere a métodos que usan matrices de sensores para la detección de analitos de ácidos nucleicos. Más en particular, la invención está dirigida a sensores químicos ópticos y a la detección y evaluación de datos ópticos generados por unidades receptoras de detección.

10

**Antecedentes de la invención**

El uso de fibras ópticas y hebras de fibra óptica en combinación con colorantes absorbentes de la luz para determinaciones analíticas químicas ha experimentado un rápido desarrollo, particularmente en la última década. El uso de fibras ópticas para tales fines y técnicas es descrito por Milanovich et al., "Novel Optical Fiber Techniques For Medical Application", Actas del 28° Simposio Técnico Internacional Anual sobre Óptica y Electro-Óptica SPIE, Volumen 494, 1980; Seitz, W.R., "Chemical Sensors Based On Immobilized Indicators and Fiber Optics" en C.R.C. Critical Reviews In Analytical Chemistry, vol. 19, 1988, pp. 135-173; Wolfbeis, O.S., "Fiber Optical Fluorosensors In Analytical Chemistry" en Molecular Luminescence Spectroscopy, Methods and Applications (S. G. Schulman, editor), Wiley & Sons, Nueva York (1988); Angel, S.M., Spectroscopy 2 (4): 38 (1987); Walt, et al., "Chemical Sensors and Microinstrumentation", ACS Symposium Series, vol. 403, 1989, por ejemplo, 252, y Wolfbeis, O.S., Fiber Optic Chemical Sensors, Ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, Volumen II.

15

20

25

30

Cuando se utiliza una fibra óptica en un sensor *in vitro/in vivo*, uno o más colorantes que absorben la luz se ubican cerca de su extremo distal. Normalmente, se usa la luz de una fuente apropiada para iluminar los colorantes a través del extremo proximal de la fibra. La luz se propaga a lo largo de la longitud de la fibra óptica; y una porción de esta luz propagada sale del extremo distal y es absorbida por los colorantes. El colorante que absorbe la luz puede o puede no estar inmovilizado; puede o puede no estar directamente conectado a la propia fibra óptica; puede o puede no suspenderse en una muestra de fluido que contenga uno o más analitos de interés; y puede o puede no ser retenible para su uso posterior en una segunda determinación óptica.

35

Una vez que la luz ha sido absorbida por el colorante, vuelve parte de la luz de longitud de onda e intensidad variables, transmitida a través de la misma fibra o fibras de recolección a un sistema de detección donde se observa y se mide. Las interacciones entre la luz transportada por la fibra óptica y las propiedades del colorante que absorbe la luz proporcionan una base óptica para las determinaciones cualitativas y cuantitativas.

40

De las muchas clases diferentes de colorantes absorbentes de luz que convencionalmente se emplean con haces de fibras y fibras ópticas para diferentes fines analíticos, están aquellas composiciones más comunes que emiten luz después de la absorción denominadas "fluoróforos" y aquellas que absorben luz y convierten internamente la luz absorbida para calentar, en lugar de emitirla como luz, denominados "cromóforos".

45

50

55

La fluorescencia es un fenómeno físico basado en la capacidad de algunas moléculas para absorber luz (fotones) a longitudes de onda específicas y emitir luz de una longitud de onda más larga y a la energía de una torre. Las sustancias capaces de producir fluorescencia comparten varias características comunes: la capacidad de absorber energía de la luz a una longitud de onda; alcanzar un estado energético excitado; y posteriormente emitir luz a otra longitud de onda de luz. Los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia son individuales para cada fluoróforo y a menudo se representan gráficamente como dos curvas separadas que se superponen ligeramente. Generalmente se observa el mismo espectro de emisión de fluorescencia independientemente de la longitud de onda de la luz de excitación y, en consecuencia, la longitud de onda y la energía de luz de excitación pueden variarse dentro de unos límites; pero la luz emitida por el fluoróforo siempre proporcionará el mismo espectro de emisión. Por último, la intensidad de la señal de fluorescencia puede medirse como el rendimiento cuántico de la luz emitida. El rendimiento cuántico de fluorescencia es la relación entre el número de fotones emitidos en comparación con el número de fotones inicialmente absorbidos por el fluoróforo. Para obtener información más detallada sobre cada una de estas características, se recomiendan las siguientes referencias: Lakowicz, J. R., Principios de la espectroscopia de fluorescencia, Plenum Press, Nueva York, 1983; Freifelder, D., Bioquímica Física, segunda edición, W. H. Freeman and Company, Nueva York, 1982; "Métodos y aplicaciones de espectroscopia de luminiscencia molecular: Parte I" (S.G. Schulman, editor) en Chemical Analysis, vol. 77, Wiley & Sons, Inc., 1985; Teoría de la luminiscencia, Stepanov y Gribkovskii, Iliffe Books, Ltd., Londres, 1968.

60

65

Muchas de las mejoras recientes que emplean sensores de fibra óptica en determinaciones analíticas, tanto cualitativas, como cuantitativas se refieren a la conveniencia de depositar y/o inmovilizar diversos colorantes absorbentes de luz en el extremo distal de la fibra óptica. De esta manera, se han presentado diferentes sensores y métodos químicos de fibra óptica para determinaciones analíticas específicas y aplicaciones tales como medición de pH, detección de oxígeno y análisis de dióxido de carbono. Estos desarrollos están ejemplificados por las siguientes publicaciones: Freeman, et al., Anal Chem. 53:98 (1983); Lippitsch et al., Anal. Chem. Acta. 205: 1, (1988); Wolfbeis et al., Anal. Chem. 60: 2028 (1988); Jordan, et al., Anal. Chem. 59: 437 (1987); Lubbers et al., Sens. Actuators 1983;

Munkholm et al., *Talanta* 35: 109 (1988); Munkholm et al., *Anal. Chem.* 58: 1427 (1986); Seitz, W. R., *Anal. Chem.* 56: 16A-34A (1984); Peterson, et al., *Anal. Chem.* 52: 864 (1980); Saari, et al., *Anal. Chem.* 54: 821 (1982); Saari, et al., *Anal. Chem.* 55: 667 (1983); Zhujun et al., *Anal. Chem. Acta.* 160: 47 (1984); Schwab, et al., *Anal. Chem.* 56: 2199 (1984); Wolfbeis, O.S., "Fiber Optic Chemical Sensors", Ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, Volumen 2; y Pantano, P., Walt, D.R., *Anal. Chem.*, 481A-487A, vol. 67, (1995).

Más recientemente, se han construido sensores de fibra óptica que permiten el uso de múltiples colorantes con un único haz de fibra óptica discreta. Las patentes de Estados Unidos n.º 5.244.636 y 5.250.264 de Walt, et al. desvelan sistemas para fijar múltiples colorantes diferentes en el extremo distal del haz. Las configuraciones descritas permiten fibras ópticas separadas del haz para acceder ópticamente a colorantes individuales. Esto evita el problema de desconvolucionar las señales separadas en la luz de retorno de cada colorante, que surge cuando las señales de dos o más colorantes se combinan, cada colorante es sensible a un analito diferente, y hay una superposición significativa en los espectros de emisión de los colorantes.

Más recientemente, los sensores de fibra óptica se han empleado en matrices de sensores químicos semiselectivos y esquemas de reconocimiento de patrones para discriminar y cuantificar olores. Dichos enfoques han sido útiles para implementar los principios del olfato biológico en el diseño de dispositivos o sistemas sensores. En este campo de la biomimetria, se han aplicado diversas tecnologías al mecanismo de transducción del sensor. Por ejemplo, se han buscado matrices de sensores de onda acústica superficial, polímero conductor, transistor de efecto de campo con sensor de óxido de metal (MOSFET), piezoeléctricos, y de microbalanza de cristal de cuarzo.

Si bien dichas tecnologías proporcionan enfoques inventivos que utilizan diferentes fenómenos físicos y químicos para la detección de olores, hay una serie de limitaciones a estos métodos que restringen la eficacia de dichos dispositivos. En primer lugar, la reproducibilidad entre elementos, tanto dentro de una sola matriz como entre matrices de sensores, normalmente es insatisfactoria y, por lo tanto, requiere una recalibración y reentrenamiento de la red entre sensores. En segundo lugar, la mayoría de estos métodos tienen un tiempo de respuesta relativamente lento, que con frecuencia requiere varios minutos para responder a la presencia de un olor. En tercer lugar, dichos métodos tienen límites de detección relativamente altos y baja sensibilidad, normalmente no funcionan a niveles de olor por debajo de 10 ppm. En cuarto lugar, los dispositivos que incorporan dichas tecnologías normalmente requieren un tamaño inherente relativamente grande, restringiendo por ello la miniaturización de la matriz de sensores para su uso en aplicaciones de detección remota. Por último, la construcción de matrices multisensor mediante estos métodos es compleja e implica una costosa y tediosa preparación y ubicación de sensores individuales dentro de una matriz bien definida.

Más recientemente, muchas de estas deficiencias se han superado mediante la aplicación de matrices de sensores de fibra óptica en un sistema y dispositivo sensor de nariz artificial. Las patentes de Estados Unidos n.º 5.320.814 y 5.512.490 de Walt, et al., describen una matriz de fibra óptica formada por películas delgadas, semi-selectivas y heterogéneas que funcionan como unidades receptoras de detección y son capaces de detectar diferentes analitos y ligandos usando patrones de reconocimiento espectral. Esta tecnología se ha aplicado a un sistema de detección de vapor que utiliza matrices de combinaciones de polímero y colorante que recubren los extremos de fibras ópticas seleccionadas en un haz de fibra óptica. Estos desarrollos se describen adicionalmente en Dickinson, et al., *Nature* 382: 697 (1996) y White, et al., *Anal. Chem.* 68: 2191 (1996).

Una característica innovadora de las cuatro patentes anteriormente referenciadas de Walt, et al., fue la ubicación de múltiples funciones químicas al final de un solo sensor de haz de fibra óptica. Esta configuración produjo un sensor de química analítica que podría ser controlado remotamente a través del haz normalmente pequeño. El inconveniente, sin embargo, fue la dificultad de aplicar las diversas químicas asociadas con las funciones químicas en el extremo del sensor; las funciones se construyeron en el extremo del sensor de forma gradual. Este fue un proceso lento, y en la práctica, solo se podían aplicar decenas de funciones.

La solicitud de patente de Estados Unidos n.º 08/818.199 de Walt, et al. (Solicitud de prioridad para el documento WO18/407 26) describe el uso de microesferas poliméricas infiltradas con colorante como sustituto de capas de revestimiento de colorante polimérico en matriz de sensores de fibra óptica. Con este enfoque, un haz de fibra óptica sirve como sustrato para una matriz de microesferas de colorante-polímero que contiene diferentes sensores de microesferas de cuentas que tienen diferentes respuestas químicas y ópticas a la presencia de analitos diana. Una característica innovadora de esta invención es proporcionar un sistema de química analítica basado en cuentas en el que las cuentas o microesferas que llevan diferentes funciones químicas se pueden mezclar entre sí al tiempo que se conserva la capacidad de identificar la función de cada cuenta utilizando un esquema de codificación ópticamente interrogable. Adicionalmente, esta invención proporciona un sensor de haz de fibra óptica en el que las cuentas o microesferas separadas pueden acoplarse ópticamente a fibras discretas o grupos de fibras dentro del haz. Aunque las características innovadoras de esta invención tienen aplicaciones por separado, cuando se implementan juntas, la invención proporciona un sensor de fibra óptica que puede admitir grandes cantidades, miles o más, de elementos sensores químicos separados, que se pueden incorporar en una matriz de sensores químicos y sistema de análisis químico. Este enfoque proporciona una fabricación y montaje rápidos de sensores individuales y matrices de sensores complejos que contienen una multitud de tipos de sensores discretos. El método también proporciona un alto grado de reproducibilidad y conformidad dentro de un lote de sensores y matrices de sensores. Se obtienen

ventajas adicionales debido al tamaño ultrafino disponible en las microesferas. El tamaño total de la matriz de sensores puede reducirse sustancialmente a escala submilimétrica. Esta reducción de escala es particularmente ventajosa para matrices de detección remota.

5 Si bien el método de aplicación de elementos sensores de microesferas en matrices de sensores químicos como se enseña en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 08/818.199 de Walt, et al., tiene muchas características innovadoras, este método tiene ciertas limitaciones. El método requiere un proceso complejo de codificación de cuentas de múltiples pasos para identificar el tipo y la ubicación de las subpoblaciones de cuentas utilizadas en la matriz de sensores. Las cuentas se codifican empleando combinaciones de colorantes fluorescentes en proporción variable. La elección de los colorantes de codificación se limita a los colorantes que emiten luz a diferentes longitudes de onda tras la exposición a la energía de luz de excitación. Aunque las combinaciones de colorantes en diferentes proporciones proporcionan subpoblaciones de codificación de cuentas, el número de relaciones de colorantes disponibles para la codificación de cuentas con un par o una combinación de colorantes dados está significativamente limitado debido a la saturación del espectro de emisión del solapamiento máximo. Además, se necesita un colorante indicador separado para obtener una firma de respuesta óptica característica única para un analito diana. De este modo, la elección del colorante de codificación se limita adicionalmente mediante la selección de colorantes cuyas longitudes de onda de emisión no se superponen o interfieren con el colorante indicador que responde únicamente a la presencia de un analito.

20 Otra característica limitante de esta invención es que el proceso de codificación de cuentas requiere una serie de medidas que calibren y entrenen los sensores y la matriz de sensores. La codificación se realiza inicialmente iluminando primero las cuentas con energía de luz de excitación y controlando y registrando el tipo y la ubicación de la subpoblación de cuentas específica dentro de la matriz de sensores que tiene una relación de colorante de codificación determinada. A continuación, la matriz se expone a un analito mientras se ilumina la matriz con energía de luz de excitación en presencia de un colorante indicador. Aquellas cuentas que responden al analito en presencia del colorante indicador se controlan y mapean en la matriz de sensores. Además, la firma de respuesta óptica característica se almacena en una biblioteca. Este paso se repite para cada analito de interés en combinación con un colorante indicador. Una vez que todas las subpoblaciones de cuentas están codificadas y sus características de respuesta están controladas y registradas, la matriz de sensores completa debe descodificarse para cada analito indexando cada elemento sensor con la firma de respuesta óptica almacenada para cada analito. Este proceso de descodificación de subpoblaciones individuales de cuentas puede requerir pasos adicionales cuando se despliega una gran cantidad de subpoblaciones en la matriz, aumentando así el tiempo de entrenamiento requerido para cada matriz.

35 Otros enfoques alternativos para la codificación de cuentas, utilizando marcado molecular, cromatografía de gases capilares y detección de captura de electrones han sido desvelados por Still, et al., Acc. Chem. Res. 29: 155 (1996). Sin embargo, dichos métodos tienen un alcance limitado y se han aplicado solamente a una clase estrecha de materiales de cuentas que tienen una función química específica y etiquetas moleculares que son fácilmente analizables.

40

### Sumario de la invención

La presente solicitud proporciona un método para analizar datos de señales obtenidas a partir de una matriz para la unión de un analito diana, dicho método que comprende:

45

a) proporcionar una matriz que comprende una primera subpoblación y una segunda subpoblación de cuentas distribuidas sobre una superficie de un sustrato, dichas cuentas que comprenden sondas de ácido nucleico, en la que las cuentas en dicha primera subpoblación son diferentes de las cuentas en dicha segunda subpoblación, y en la que cada una de la primera y segunda subpoblación comprende una pluralidad de cuentas que comprenden sondas de ácido nucleico idénticas;

50

b) proporcionar a dicha matriz un analito diana, en el que dicho analito diana es un ácido nucleico y se une a la primera subpoblación de elementos sensores y/o a la segunda población de elementos sensores;

c) obtener señales de respuestas ópticas de una pluralidad de cuentas dentro de dicha primera subpoblación y/o dentro de dicha segunda subpoblación; y

55

d) analizar estadísticamente las señales de respuesta obtenidas a partir de dicha primera subpoblación de cuentas y/o dicha segunda subpoblación de cuentas, para hacer una estimación cuantitativa de la confianza acerca de los datos.

En una realización, las matrices son matrices de sensores químicos analíticas autocodificadoras que comprenden un sustrato con una superficie que comprende sitios discretos y una población de microesferas que comprende al menos una primera y una segunda subpoblación, en donde cada subpoblación comprende al menos un colorante indicador. El colorante indicador tiene una primera firma de respuesta óptica característica cuando se somete a energía de luz de excitación en presencia de un analito de referencia, y las microesferas se distribuyen en la superficie. Las cuentas comprenden además una sonda de ácido nucleico.

65

Los métodos pueden comprender además la identificación de la ubicación de cada agente bioactivo sobre dicho sustrato añadiendo el analito de referencia.

5 Los métodos pueden comprender aumentar la relación de señal/ruido en la firma de respuesta óptica característica de una matriz de sensores que tiene una subpoblación de elementos de la matriz. Los métodos comprenden descodificar la matriz para identificar la ubicación de cada elemento sensor dentro de cada subpoblación del sensor dentro de la matriz y medir la firma de respuesta óptica característica de cada elemento sensor en la matriz: la línea basal de la firma de respuesta óptica se ajusta entonces para cada elemento sensor en dicha matriz, y se suma la firma de respuesta óptica característica ajustada en la línea basal de todos los elementos sensores dentro de cada una de las subpoblaciones del sensor. A continuación se informa la firma de respuesta óptica característica de cada subpoblación del sensor como una suma de dichas firmas de respuesta óptica características ajustadas en la línea basal de todos los elementos sensores dentro de cada una de dichas subpoblaciones.

15 Los métodos pueden comprender amplificar la firma de respuesta óptica característica de una matriz de sensores que tiene subpoblaciones de elementos de matriz. Los métodos comprenden descodificar la matriz para identificar la ubicación de cada elemento sensor dentro de cada subpoblación del sensor dentro de la matriz y medir una firma de respuesta óptica característica de cada elemento sensor en la matriz. A continuación se ajusta la línea basal de la firma de respuesta óptica para cada elemento sensor en dicha matriz. La firma de respuesta óptica característica ajustada de la línea basal de todos los elementos del sensor dentro de cada subpoblación del sensor se suma y se informa la firma de respuesta óptica característica de cada subpoblación del sensor como suma de las firmas de respuesta óptica características ajustadas de la línea basal de todos los elementos del sensor dentro de cada una de las subpoblaciones.

25 NATURE GENETICS, vol. 21, enero de 1999, páginas 20-24, XP000865982, ISSN 1061-4036; LIPSHUTZ R J et al.: "High density synthetic oligonucleotide arrays" y NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 14, n.º 13, diciembre de 1996, páginas 1675-1680, XP002022521, ISSN 0733-222X; LOCKHART DJ et al.: "Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays" se refieren específicamente a la construcción de matrices de oligonucleótidos utilizando técnicas de fotolitografía. Las técnicas de fotolitografía permiten la síntesis química de oligómeros *in situ* sobre una superficie sólida. En LIPSCHUTZ, el uso de múltiples detectores independientes para la misma molécula mejora enormemente la relación de señal/ruido (debido al promedio sobre las intensidades de múltiples características de la matriz), mejora la precisión de la cuantificación del ARN (promediado y rechazo de valores atípicos), aumenta el rango dinámico, mitiga los efectos debidos a la hibridación cruzada y reduce drásticamente la tasa de falsos positivos y errores. En LOCKHART, las matrices de oligonucleótidos contienen colecciones de pares de sondas para cada uno de los ARN que se controlan. Cada sonda consta de un 20-mero que es perfectamente complementario (denominado como coincidencia perfecta o sonda de CP) a una subsecuencia de un mensaje particular, y una pareja que es idéntica, excepto por una única diferencia en una base en una posición central. La sonda no coincidente (NC) de cada par sirve como control interno para la especificidad de hibridación. El análisis de los pares de CP/NC permite reconocer de forma selectiva y precisa los patrones de hibridación de baja intensidad de ARN raros en presencia de señales de hibridación cruzada.

40 ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH, vol. 31, n.º 5, enero de 1998, páginas 267-278, XP002140931, ISSN 0001 4842; WALT DR: "Fiber Optic Imaging Sensors" describe matrices de imágenes ópticas usando microesferas (cuentas) pero solo en el contexto de sensores químicos y química analítica tales como inmunoensayos, análisis basados en enzima o indicadores fluorescentes convencionales. Hay múltiples copias de cada microesfera que permiten mediciones redundantes de múltiples sensores, lo que reduce la posibilidad de resultados falsos positivos y falsos negativos.

50 El documento WO 95/11454 A se refiere a un método para detectar ligando diana en una muestra de reacción por lo que el ligando diana es un ácido nucleico. El método comprende proporcionar un soporte sólido que incluye una pluralidad de sitios de captura duplicados y medios para generar en un área de la señal de dichos sitios replicados una señal detectable indicativa de la presencia o cantidad de analito, donde cada uno de dichos sitios replicados es específico para el mismo analito. Al calcular una representación digital para cada réplica, las áreas se pueden comparar con las de otros sitios replicados para el mismo analito. Si alguna de las repeticiones muestra resultados significativamente diferentes, los datos digitales de estos sitios pueden excluirse para mejorar el nivel de confianza de la determinación del resultado.

60 El documento WO 96/28538 A proporciona una matriz modelada de dominios de unión en una superficie que son específicos para una pluralidad de analitos, o PMAMS, para ensayos basados en ECL. Los dominios de unión incorporados en un PMAMS contienen reactivos de unión que son específicos para un analito convencional deseado y que se utilizan como patrón interno. Múltiples dominios de unión que contienen reactivos de unión específicos para el mismo analito o analitos permiten promediar estadísticamente los resultados analíticos. Los reactivos de unión pueden ser no solo específicos para el mismo analito, sino que pueden ser idénticos, reconociendo así el mismo resto de unión en el analito. De este modo, se puede preparar una pluralidad de dominios de unión (por ejemplo, dentro de un intervalo de 2 a 10 8) que se unen específicamente al mismo resto de unión, de modo que las lecturas de ECL pueden promediarse estadísticamente para controlar la variación y mejorar la precisión. En una realización, se fabrica una superficie de PMAMS transparente con una matriz multiespecífica modelada de sondas de ácido

nucleico monocatenarias unidas a la superficie. Estas y otras características de la invención que incluyen varios detalles novedosos de construcción y combinaciones de partes, y otras ventajas, se describirán ahora más en particular con referencia a los dibujos adjuntos y señalados en las reivindicaciones. Se entenderá que el método particular y el dispositivo que incorpora la invención se muestran a modo de ilustración y no como una limitación de la invención.

**Breve descripción de los dibujos**

En los dibujos adjuntos, los caracteres de referencia se refieren a las mismas partes a lo largo de las diferentes vistas. Los dibujos no son necesariamente a escala; se ha puesto énfasis en ilustrar los principios de la invención. De los dibujos:

La Figura 1 es un diagrama esquemático que ilustra el sensor de microesfera autocodificante que se puede usar en la presente invención;

La Figura 2 es un diagrama de flujo de proceso de la preparación, codificación e incorporación de microesferas que se pueden usar en una matriz de sensores de la presente invención;

Las Figuras 3A y 3B son un diagrama de proceso esquemático que ilustra la preparación y ubicación de subpoblaciones de microesferas autocodificadas en una matriz de sensores de fibra óptica que se puede usar en la presente invención;

La Figura 4 es un diagrama de flujo del proceso que ilustra la formación de micropocillos en el haz de fibra óptica y la ubicación de las microesferas en los micropocillos;

Las Figuras 5A y 5B son micrografías que ilustran los micropocillos formados en el extremo distal de un haz de fibra óptica y las microesferas insertadas en las cavidades de los micropocillos;

Las Figuras 6A y 6B son micrografías que muestran la disposición de las microesferas en sus correspondientes micropocillos antes y después de la agitación mediante extracción y un pulso de aire, que demuestra la unión electrostática de las microesferas en las cavidades de los micropocillos;

La Figura 7 es un diagrama esquemático de un sensor de fibra óptica y el sistema de instrumentación y control asociado;

La Figura 8 es un diagrama esquemático que ilustra el aparato experimental utilizado en las mediciones ópticas de los ejemplos 7 a 17;

La Figura 9 ilustra la firma de respuesta óptica característica de cuentas de sílice porosa infiltradas con colorante rojo Nilo tras la exposición a vapor de tolueno;

La Figura 10 ilustra la firma de respuesta óptica característica de cuentas de PMS infiltradas con colorante rojo Nilo tras la exposición al vapor de metanol;

Las Figuras 11A y 11B ilustran la firma de respuesta óptica característica de cuentas de sílice porosa revestidas con PS802 infiltradas con colorante rojo Nilo con la exposición a vapor de tolueno y metanol;

Las Figuras 12A y 12B ilustran la firma de respuesta óptica característica de cuentas de sílice porosa revestidas con PDPO infiltradas con colorante rojo Nilo con la exposición a vapor de tolueno y metanol;

La Figura 13 ilustra la firma de respuesta óptica característica de cuentas de sílice porosa infiltradas con colorante rojo Nilo tras la exposición a vapor de acetato de etilo.

La Figura 14 ilustra la innovación de la suma de señales de respuesta óptica para aumentar las relaciones de señal a ruido en las mediciones de subpoblación de cuentas de PMS infiltradas con rojo Nilo de vapor de metanol.

La Figura 15 ilustra la innovación de la suma de señales de respuesta óptica para la mejora de la señal en mediciones de subpoblación de cuentas PMS de vapor de metanol;

La Figura 16 compara las firmas de respuesta óptica características de dos cuentas de sílice porosa revestidas con PS802 infiltradas con colorante rojo Nilo con la exposición a vapor de tolueno y metanol;

La Figura 17 compara las firmas de respuesta óptica características con el vapor de metanol que se usan para descodificar subpoblaciones de cuentas de sílice porosa infiltradas con rojo Nilo y subpoblaciones de cuentas de PMS en una matriz de sensores de fibra óptica autocodificada;

La Figura 18 compara las firmas de respuesta óptica características de sílice porosa infiltrada con rojo Nilo y subpoblaciones de cuentas de PMS con vapor de n-propanal en una matriz de sensores de fibra óptica autocodificada;

5 La Figura 19 compara las firmas de respuesta óptica características de sílice porosa infiltrada con rojo Nilo y subpoblaciones de cuentas de PMS a vapor de tolueno en una matriz de sensores de fibra óptica autocodificada;

10 La Figura 20 compara las diferencias en la respuesta de hinchamiento de las cuentas de subpoblaciones de sílice porosa recubierta con PS802, poli metil estireno y polimetilestireno/divinil benceno tras la exposición a vapor de tolueno;

15 La Figura 21 representa secuencias usadas en la matriz (Tabla 1). Cada sonda tiene una función 5'-(NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-) para la activación del cloruro cianúrico y la unión a las microesferas. Cada diana complementaria tiene una etiqueta de 5'-fluoresceína;

20 La Figura 22 representa la Tabla 2, el código de microesferas y la identificación de la diana. La columna más a la izquierda enumera los nombres de las siete sondas. Las columnas del medio enumeran las concentraciones de colorante (mM) usadas para codificar las microesferas. Cada tipo de microesfera incorporó dos colorantes de codificación para la identificación de la sonda en la cuenta. La columna de la derecha muestra el porcentaje de cuentas que identificaron correctamente la solución diana.

25 La Figura 23 representa la Tabla 3, el código de microesferas y la identificación de la diana. La columna más a la izquierda lista los números de la Tabla 1 que identifican las sondas. Las columnas del medio enumeran las concentraciones de colorante (mM) usadas para codificar las microesferas. Cada tipo de microesfera incorporó al menos un colorante de codificación para la identificación de la sonda en la cuenta. La columna de la derecha muestra el porcentaje de cuentas que identificaron correctamente la solución diana;

30 La Figura 24 representa la Tabla 4, la sensibilidad de la matriz de microesferas. La sensibilidad del sistema usando una cámara CCD intensificada;

y La Figura 25 representa una serie de experimentos individuales y el coeficiente de varianzas.

### 35 Descripción detallada de las formas de realización preferidas

En algunas realizaciones, la presente invención hace uso de un sistema de química analítica que comprende una matriz de sensores autocodificante que comprende una población de cuentas o microesferas en ubicaciones discretas en la superficie de un sustrato. Dentro de la población de cuentas hay subpoblaciones de cuentas separadas, cada una de las cuales proporciona una firma de respuesta óptica característica cuando se ilumina mediante energía de luz de excitación en presencia de un analito de referencia, que en algunos casos puede ser el analito diana. Aunque las subpoblaciones se pueden mezclar juntas aleatoriamente, la identidad y la ubicación de cada cuenta se determinan mediante una firma de respuesta óptica característica cuando se ilumina mediante energía de luz de excitación en presencia de un analito de referencia.

45 Esto permite la descodificación de la matriz, es decir, la identificación de la ubicación de cada subpoblación de cuentas en una matriz, para proceder de manera muy simple. En una realización preferida, las cuentas se codifican con uno o más colorantes indicadores que exhiben una característica, es decir, una firma de respuesta óptica única a un analito de referencia, generalmente un fluido tal como un vapor. Por lo tanto, en esta realización, la exposición de la matriz completa a un analito de referencia permitirá la identificación de la ubicación de cada cuenta de cada subpoblación. Como resultado, al comparar la respuesta de toda la matriz de sensores a un analito conocido, los elementos sensores individuales de la matriz se descodifican convenientemente de forma simultánea en una medición simple. La característica autocodificante de la presente invención elimina la necesidad de un sistema de codificación de múltiples etapas más complejo.

55 La matriz de sensores se puede usar para detectar la presencia de analitos diana buscando cambios en la firma óptica de las cuentas tras la unión del analito diana, por ejemplo, un oligonucleótido marcado sustancialmente complementario, a una sonda de ácido nucleico en la cuenta. Como apreciarán los expertos en la materia, esto puede realizarse de varias formas, generalmente mediante el uso de un cambio en una señal óptica. Este cambio puede ocurrir a través de muchos mecanismos diferentes. Algunos ejemplos incluyen la unión de un analito marcado con colorante a la cuenta, la producción de una especie colorante sobre o cerca de las cuentas, la destrucción de una especie colorante existente, un cambio en la firma óptica tras la interacción del analito con el colorante sobre la cuenta, o cualquier otro evento óptico interrogable. Por lo tanto, una vez que se ha identificado la ubicación de cada especie de la sonda de oligonucleótido, la matriz se puede usar para detectar la presencia de incógnitas que se asociarán preferiblemente de manera específica con los agentes bioactivos en las cuentas.

65

En una realización preferida alternativa, cuando el analito diana no está marcado, la respuesta óptica de cada elemento en la matriz puede compararse con una biblioteca de firmas de respuesta óptica características para su tipo de subpoblación de cuentas correspondiente, donde la firma de respuesta óptica característica a varios analitos se ha medido y registrado previamente, y se puede determinar la identidad de la incógnita o se puede entrenar la matriz de sensores para asociar la respuesta medida con un analito particular que luego se añade a la biblioteca de firmas de respuesta.

Las realizaciones de la presente invención superan ciertas limitaciones de la técnica actual incorporando la innovación de una matriz de sensores autocodificados en la que se produce una firma de respuesta óptica característica mediante la interacción de composiciones de una subpoblación de cuentas específicas con un colorante indicador. En la matriz de sensores autocodificados que se puede usar en la presente invención, la señal de respuesta a un analito diana sirve como firma de respuesta para el analito diana y como señal de codificación para toda la matriz de sensores y subpoblaciones dentro de la matriz. La descodificación de la matriz se realiza de este modo en un proceso de una etapa durante la medición de la respuesta de la matriz de un analito diana y utiliza la misma respuesta que se usa para identificar el analito diana. La codificación de cuentas se incorpora así a la matriz por la naturaleza de las respuestas de la subpoblación de cuentas a los analitos diana.

En algunas realizaciones de la presente invención, cada combinación de cuentas y colorantes de una subpoblación tiene una firma de respuesta óptica característica cuando se expone a un fluido dado, normalmente un vapor. El concepto de autocodificación es proporcionado por las características de respuesta únicas del colorante en combinación con un material de matriz de cuentas específico. Así, las subpoblaciones de cuentas que se dispersan aleatoriamente en una matriz de sensores pueden identificarse rápidamente y localizarse después de la ubicación en la matriz simplemente exponiendo la matriz de sensores a un fluido de prueba conocido y haciendo coincidir la firma de respuesta óptica resultante con las obtenidas para cada subpoblación de cuentas. Con este enfoque, las cuentas se autocodifican y las características de respuesta de toda la matriz de sensores se determinan rápidamente y se almacenan para la medición de un analito diana. El método es particularmente útil en aplicaciones de matrices de sensores que contienen miles de sensores que tienen características de firma de respuesta óptica distintivas.

Un beneficio adicional de este método es que permite que la síntesis de los agentes bioactivos (es decir, compuestos tales como ácidos nucleicos y anticuerpos) se separe de su ubicación en una matriz, es decir, los agentes bioactivos pueden sintetizarse en las cuentas, y a continuación las cuentas se distribuyen al azar en una superficie modelada. Dado que las cuentas están autocodificadas por tener colorantes presentes que tienen respuestas conocidas a un analito de referencia, esto significa que la matriz se puede "descodificar" posteriormente, es decir, después de que se forme la matriz, puede llevarse a cabo una correlación de la ubicación de un sitio individual sobre la matriz con la cuenta o el agente bioactivo en ese sitio particular. Esto significa que las cuentas pueden distribuirse aleatoriamente en la matriz, un proceso rápido y económico en comparación con la síntesis *in situ* o las técnicas de identificación de la técnica anterior. Una vez que la matriz se carga con las cuentas, la matriz se puede descodificar, o se puede usar, con la descodificación completa o parcial que se produce después de la prueba, como se describe más completamente a continuación.

En una realización preferida de la presente invención, se utilizan microcuentas o microesferas porosas ultrafinas como sensores individuales. La utilización de sensores porosos de escala micrométrica proporciona una mejor respuesta y sensibilidad del sensor. La reducción en las dimensiones del sensor reduce sustancialmente el grado y la duración de la difusión para la interacción del analito con los sensores individuales y acorta significativamente el tiempo de respuesta del sensor, a la vez que mejora la sensibilidad del sensor y reduce los límites de detección.

En otra realización preferida de la presente invención, la matriz de sensores está compuesta de subpoblaciones de cuentas o microesferas que están dispuestas en un extremo distal de un haz de fibras ópticas donde las cuentas o microesferas separadas pueden estar ópticamente acopladas a fibras o grupos de fibras discretos dentro del haz. Dado que normalmente, dichos haces de fibra óptica comprenden miles de fibras discretas, la presente invención proporciona así un sensor de fibra óptica que puede soportar un gran número, miles o más, de elementos de matriz de sensores de subpoblaciones distintas y variables cada una con una firma de respuesta óptica característica cuando se expone a un analito mientras está iluminado por la energía de luz de excitación.

En una realización preferida, el extremo distal de un sustrato de haz de fibra óptica se ataca químicamente para crear una cavidad o micropocillo en el extremo de una fibra discreta. En la realización preferida, cada una de las cuentas está situada dentro de micropocillos separados formados en los extremos terminales de las fibras ópticas del haz. Estos micropocillos están formados por ataque anisotrópico de los núcleos de las fibras ópticas con respecto al revestimiento. La cavidad grabada resultante está dimensionada para acomodar un sensor de microcuentas individual y para proporcionar un acoplamiento óptico del sensor de cuentas individual con la fibra óptica discreta en el haz de fibras. Como los haces de fibra óptica típicos contienen miles de fibras discretas, esta realización proporciona el acoplamiento óptico individual de miles de sensores en una matriz de sensores, proporcionando así un gran número de mediciones de sensor independientes para cada subpoblación de cuentas dentro de la matriz.

Debido tanto al gran número de subpoblaciones del sensor de cuentas disponibles como a la gran cantidad de elementos sensores dentro de cada subpoblación, una innovación significativa de la presente invención consiste en proporcionar miles de mediciones de respuesta del sensor independientes en una única matriz de sensores. Esto permite otra innovación significativa de la presente invención al proporcionar la suma y amplificación de las firmas de respuesta óptica características de múltiples mediciones independientes tomadas de cuentas de sensor dentro de cada subpoblación de cuentas de matriz de sensores. Este enfoque imita directamente el comportamiento real del olfato humano donde las señales combinadas de miles de células receptoras en cada una de las agrupaciones de casi un millar de diferentes tipos de células receptoras que se encuentran en la capa del epitelio, ninguna de las cuales son particularmente sensibles por sí mismas, conducen a una respuesta sensorial altamente amplificada a los olores [ver J.S. Kauer, Trends Neurosci. 14: 79-95 (1991)].

Por lo tanto, la presente invención incorpora el proceso evolutivo de amplificación de aromas encontrado en el sistema olfativo humano con el fin de permitir una mejora significativa de la sensibilidad de la matriz de sensores a los analitos sumando las respuestas de bajo nivel de un gran número de elementos de matriz de sensores. Al sumar las respuestas de varias cuentas a bajas concentraciones de vapor, se logra una mejora sustancial en la relación de señal/ruido, que excede un factor de diez o más. Esta innovación ha llevado a reducir el límite de detección de la matriz de sensores en un orden de magnitud. La mejora en la sensibilidad proporcionada por la matriz de sensores de la presente invención generalmente es conocida por ser directamente proporcional a la raíz cuadrada del número de respuestas de cuentas de sensor independientes disponibles para sumar. Con dichas mejoras, se pueden alcanzar límites de detección que se aproximan a partes por millardo.

En realizaciones preferidas, las cuentas de sensor se autocodifican usando un colorante indicador que preferiblemente se infiltra o queda atrapado dentro de las cuentas. El colorante indicador puede ser un cromóforo o fósforo pero preferiblemente es un colorante fluorescente, que debido a señales ópticas característicamente fuertes proporciona una buena relación de señal a ruido para la descodificación. Aunque no es necesario, la autocodificación también se puede llevar a cabo utilizando las relaciones de dos o más colorantes indicadores que tienen picos de emisión discretos y característicos y midiendo las relaciones de intensidad máxima tras la iluminación con energía de luz de excitación.

De acuerdo con otra realización, la invención también se refiere a una matriz de sensores químicos diseñada con una especificidad química predeterminada. En esta realización, se puede incorporar una función química adicional en cada subpoblación del sensor uniendo un resto deseado a las superficies de las cuentas. En otra realización, la matriz de sensores tiene una población de cuentas que llevan función química en, sobre o cerca de, un extremo distal del haz. La capacidad de controlar los cambios de firma óptica asociados con cuentas individuales o múltiples que interactúan con un analito diana se proporciona acoplado ópticamente esos cambios característicos en fibras ópticas o grupos de fibras de un haz de fibra óptica separados para su transmisión al extremo proximal donde se realiza el análisis, manualmente por el usuario, o automáticamente usando técnicas de procesamiento de imágenes.

Aunque cada sensor es diferente en la medida en que tiene una distribución diferente de las subpoblaciones de cuentas dentro de sus micropocillos, solo las cuentas que muestran una respuesta o una firma óptica positivas cambian a un analito diana de interés que se debe descodificar. Por lo tanto, la carga recae en el análisis y no en la fabricación del sensor. Además, dado que las cuentas y fibras en la matriz pueden ser monodispersas, las regiones fluorescentes que surgen de la generación de señal son extremadamente uniformes y pueden analizarse automáticamente usando el software de análisis de microscopía disponible en el mercado. Dicho software de procesamiento de imágenes es capaz de definir automáticamente diferentes regiones espectrales y contar el número de segmentos dentro de cada región en varios segundos.

Por consiguiente, la presente invención puede hacer uso de composiciones de matriz que comprenden al menos un primer sustrato con una superficie que comprende sitios individuales. Por "matriz" en este documento se entiende una pluralidad de agentes bioactivos en un formato de matriz; el tamaño de la matriz dependerá de la composición y el uso final de la matriz. Se pueden preparar matrices que contienen desde aproximadamente 2 agentes bioactivos diferentes (es decir, diferentes cuentas) hasta muchos millones, siendo posibles matrices de fibra óptica muy grandes. En general, la matriz comprenderá desde dos hasta tantos como mil millones o más, dependiendo del tamaño de las cuentas y el sustrato, así como el uso final de la matriz, por lo tanto, pueden hacerse matrices de muy alta densidad, de alta densidad, de densidad moderada, de baja densidad y de muy baja densidad. Los intervalos preferidos para matrices de muy alta densidad son de aproximadamente 10.000.000 a aproximadamente 2.000.000.000, prefiriéndose de aproximadamente 100.000.000 a aproximadamente 1.000.000.000. Las matrices de alta densidad varían de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 10.000.000, siendo particularmente preferidos de aproximadamente 1.000.000 a aproximadamente 5.000.000. Las matrices de densidad moderada que son particularmente preferidas oscilan de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 50.000, y son especialmente preferidas las de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 30.000. Las matrices de baja densidad generalmente son inferiores a 10.000, prefiriéndose de aproximadamente 1000 a aproximadamente 5000. Las matrices de muy baja densidad son inferiores a 1000, prefiriéndose de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000, y siendo particularmente preferidas las de aproximadamente 100 a aproximadamente 500. Además, en algunas matrices, se pueden usar múltiples sustratos, de composiciones diferentes o idénticas. Por lo tanto, por ejemplo, las matrices grandes pueden comprender una pluralidad de sustratos más pequeños.

Además, una ventaja de las presentes composiciones es que particularmente mediante el uso de la tecnología de fibra óptica, se pueden hacer matrices de densidad extremadamente alta. Así, por ejemplo, debido a que se pueden usar cuentas de 200 nm y se conocen fibras muy pequeñas, es posible tener hasta 250.000 fibras y cuentas diferentes en un haz de fibra óptica de 1 mm<sup>2</sup>, con densidades obtenibles de más de 15.000.000 cuentas y fibras individuales por 0,5 cm<sup>2</sup>.

Las composiciones comprenden un sustrato. Por "sustrato" o "soporte sólido" u otros equivalentes gramaticales en el presente documento se entiende cualquier material que pueda modificarse para contener sitios individuales discretos apropiados para la unión o asociación de cuentas y que se susceptible de al menos un método de detección. Como apreciarán los expertos en la materia, el número de posibles sustratos es muy grande e incluye, entre otros, vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluidos acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflon®, etc.), polisacáridos, nailon o nitrocelulosa, resinas, sílice o materiales a base de sílice, incluyendo silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, plásticos, haces de fibra óptica y diferentes otros polímeros. En general, los sustratos permiten la detección óptica y no generan una fluorescencia apreciable.

En general, el sustrato es plano o aplanado, aunque como apreciarán los expertos en la materia, también se pueden usar otras configuraciones de sustratos; por ejemplo, se pueden usar configuraciones tridimensionales, por ejemplo, incrustando las cuentas en un bloque de plástico poroso que permite el acceso de la muestra a las cuentas y usando un microscopio confocal para su detección. De forma similar, las cuentas pueden colocarse en la superficie interior de un tubo, para el análisis de muestras de flujo continuo para minimizar el volumen de la muestra. Los sustratos preferidos incluyen haces de fibras ópticas como se describe a continuación, y sustratos planos aplanados tales como vidrio, poliestireno y otros plásticos y acrílicos.

Se modifica al menos una superficie del sustrato para que contenga sitios discretos e individuales para la posterior asociación de microesferas. Estos sitios pueden comprender sitios físicamente alterados, es decir, configuraciones físicas tales como pocillos o pequeñas depresiones en el sustrato que pueden retener las microesferas, de modo que una microesfera puede descansar en el pocillo o el uso de otras fuerzas (magnéticas o compresivas) o sitios químicamente alterados o activos, tales como sitios químicamente funcionalizados, sitios alterados electrostáticamente, sitios funcionalizados hidrófoba/hidrófilamente, puntos adhesivos, etc.

Los sitios pueden ser un patrón, es decir, un diseño o configuración regular, o estar distribuidos aleatoriamente. Una realización preferida utiliza un patrón regular de sitios tales que los sitios pueden localizarse en el plano de coordenadas X-Y. "Patrón" en este sentido incluye una celda unidad repetitiva, preferiblemente una que permite una alta densidad de cuentas en el sustrato. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estos sitios pueden no ser sitios discretos. Es decir, es posible usar una superficie uniforme de adhesivo o funciones químicas, por ejemplo, que permita la unión de cuentas en cualquier posición. Es decir, la superficie del sustrato se modifica para permitir la unión de las microesferas en sitios individuales, independientemente de que dichos sitios sean contiguos o no contiguos con otros sitios. Por lo tanto, la superficie del sustrato puede modificarse de modo que se formen sitios discretos que solo pueden tener una única cuenta asociada, o como alternativa, la superficie del sustrato se modifica y las cuentas pueden descender a cualquier parte, pero terminan en sitios discretos.

En una realización preferida, la superficie del sustrato se modifica para contener pocillos, es decir, depresiones en la superficie del sustrato. Esto se puede hacer como se conoce generalmente en la técnica usando diferentes técnicas, que incluyen, pero no se limitan a, fotolitografía, técnicas de estampación, técnicas de moldeo y técnicas de microataque. Como apreciarán los expertos en la materia, la técnica utilizada dependerá de la composición y la forma del sustrato.

En una realización preferida, se realizan alteraciones físicas en una superficie del sustrato para producir los sitios. En una realización preferida, el sustrato es un haz de fibra óptica y la superficie del sustrato es un extremo terminal del haz de fibras. En esta realización, los pocillos se fabrican en un extremo terminal o distal de un haz de fibra óptica que comprende fibras individuales. En esta realización, los núcleos de las fibras individuales se atacan químicamente, con respecto al revestimiento, de manera que se forman pequeños pocillos o depresiones en un extremo de las fibras. La profundidad requerida de los pocillos dependerá del tamaño de las cuentas que se añadirán a los pocillos.

Generalmente en esta realización, las microesferas están asociadas no covalentemente en los pocillos, aunque los pocillos adicionalmente se pueden funcionalizar químicamente como se describe generalmente a continuación, se pueden usar agentes de entrecruzamiento, o se puede usar una barrera física, es decir, una película o membrana sobre las cuentas.

En una realización preferida, la superficie del sustrato se modifica para contener sitios químicamente modificados, que se pueden usar para unir, covalente o no covalentemente, las microesferas de la invención a los sitios o ubicaciones discretos en el sustrato. "Sitios químicamente modificados" en este contexto incluye, pero no se limita a, la adición de un patrón de grupos funcionales químicos que incluyen grupos amino, grupos carboxi, grupos oxo y grupos tiol, que se pueden usar para unir covalentemente microesferas, que generalmente también contienen

grupos funcionales reactivos correspondientes; la adición de un patrón adhesivo que se puede usar para unir las microesferas (mediante funcionalización química previa para la adición del adhesivo o la adición directa del adhesivo); la adición de un patrón de grupos cargados (similar a las funciones químicas) para la unión electrostática de las microesferas, es decir, cuando las microesferas comprenden grupos cargados opuestos a los sitios; la adición de un patrón de grupos funcionales químicos que hace que los sitios sean diferencialmente hidrófobos o hidrófilos, de modo que la adición de microesferas hidrófobas o hidrófilas similares en condiciones experimentales adecuadas dará como resultado la asociación de las microesferas a los sitios sobre la base de la hidroafinidad. Por ejemplo, el uso de sitios hidrófobos con cuentas hidrófobas, en un sistema acuoso, impulsa la asociación de las cuentas preferentemente sobre los sitios. Como se ha indicado anteriormente, "patrón" en este sentido incluye el uso de un tratamiento uniforme de la superficie para permitir la unión de las cuentas en sitios discretos, así como el tratamiento de la superficie que da lugar a sitios discretos. Como apreciarán los expertos en la materia, esto puede lograrse de varias formas.

Las composiciones de la invención comprenden además una población de microesferas. Por "población" en el presente documento se entiende una pluralidad de cuentas como se describe anteriormente para las matrices. Dentro de la población hay subpoblaciones separadas, que comprenden una pluralidad de cuentas que comprenden sondas de ácidos nucleicos idénticas. Es decir, la matriz utiliza una pluralidad de cuentas de cada tipo.

Por "microesferas" o "cuentas" o "partículas" o equivalentes gramaticales se entiende en el presente documento pequeñas partículas discretas. La composición de las cuentas variará, dependiendo de la clase de agente bioactivo y el método de síntesis. Las composiciones de cuentas adecuadas incluyen las utilizadas en la síntesis de péptidos, ácidos nucleicos y restos orgánicos, que incluyen, entre otros, plásticos, cerámicas, vidrio, poliestireno, metilestireno, polímeros acrílicos, materiales paramagnéticos, sol de óxido de torio, carbono grafitado, dióxido de titanio, látex o se pueden usar dextranos reticulados tales como Sepharose, celulosa, nailon, micelas reticuladas y teflón.

Las cuentas sintéticas pueden fabricarse polimerizando o copolimerizando diferentes monómeros precursores de condensación o vinilo o mediante síntesis combinatoria de polímeros. Dichos polímeros pueden modificarse adicionalmente mediante la adición de plastificantes, tales como fosfato de tritolilo (TTP), fosfato de trifenilo (TTP) o ftalato de dibutilo (DBP). Los candidatos de cuentas de codificación de colorante particularmente útiles para usar en subpoblaciones de matriz de sensores son materiales de polímero y copolímero que exhiben un hinchamiento característico al exponerse a diversos analitos de vapor, una diferencia de polaridad característica debido a su estructura química o una respuesta de adsorción química característica con varios analitos de vapor. Al preseleccionar los polímeros candidatos como materiales de cuentas y evaluar los candidatos en función de las características deseables de hinchamiento, polaridad y adsorción, son particularmente útiles dos referencias: R.A. McGill, et al., Chemtech, 24 de septiembre de 1996, p27-37 y J.W. Grate, et al., Anal. Chem. 68: 913-7 (1996).

Se pueden utilizar diferentes químicas de cuentas para fabricar una gran diversidad de subpoblaciones de cuentas de sensor. Por ejemplo, se ha encontrado que las siguientes composiciones son particularmente útiles como materiales de cuentas candidatas: sílice, poli (etilenglicol), policaprolactona, poli (adipato de 1,4-butileno), PDPO (poli (2,6-dimetil-1,4-fenilenoóxido)), PS078.5 [polibutadieno modificado con trietoxisililo (50 % en tolueno)], PS078.8 [polibutadieno modificado con dietoximetilsililo en tolueno], CPS2067 [acriloxipropilmetil-ciclosiloxano], PS802 [copolímero de (80-85 %) dimetilo-(15-20 %) (acriloxipropil) metilsiloxano], PS901.5 poli (acriloxipropil-metil siloxano), PS851 [copolímero de (97-98 %) dimetil-(2-3 %) (metacriloxipropil) metilsiloxano], PABS [poli (acrilonitrilo-butadieno-estireno)], poli (metacrilato de metilo), poli(estireno-acrilonitrilo 75:25), copolímero de acriloxipropilmetilsiloxano-dimetilsiloxano, metilestireno, poliestireno, polímeros acrílicos y poli (metilestireno/divinilbenceno). Otros adsorbentes, tales como cuentas de sílice disponibles en el mercado adaptadas con diferentes fases unidas para su uso en columnas de fenomenex, tales como cuentas que comprenden C8, C18 y fenilhexilo, son útiles como matrices de cuentas de sensor. También se pueden utilizar materiales inorgánicos tales como alúmina y zeolitas. Otros polímeros y copolímeros que tienen un comportamiento de hinchamiento, una polaridad y unas características de adsorción química distinguibles y adecuados también se anticipan como posibles materiales candidatos a cuentas. Los materiales candidatos a cuentas particularmente útiles incluyen los polímeros, copolímeros y monómeros polimerizados enumerados en la Tabla 7, Tabla 8 y Tabla 10 de la Patente de Estados Unidos n.º 5.512.490 de Walt, et al. En realizaciones alternativas, cualquier material de cuentas sintetizado o disponible en el mercado puede modificarse adicionalmente aplicando un tratamiento superficial o recubrimiento para modificar la firma de respuesta óptica característica. Por ejemplo, cuando se utilizan cuentas de sílice porosa, se puede aplicar N-octadeciltrióxosilano o 3-(trimetoxisilil) propil metacrilato como tratamiento de silanización. En general, la "Microsphere Detection Guide" de Bangs Laboratories, Fishers IN es una guía útil.

La elección de las subpoblaciones utilizadas para formar los elementos de la matriz de sensores en una matriz de sensores particular se determina principalmente en función de los objetivos analíticos del sensor y los analitos específicos que se pretende detectar. Normalmente, las subpoblaciones de cuentas se seleccionan basándose en diferencias distinguibles en sus firmas de respuesta óptica características cuando se iluminan mediante energía de luz de excitación en presencia de un analito diana. En la fabricación de matrices de sensores autocodificados, se seleccionan subpoblaciones de cuentas que tienen firmas de respuesta óptica características cuando se infiltran con un colorante indicador y se iluminan mediante energía de luz de excitación en presencia tanto de un analito de referencia como de un analito diana. Por lo tanto, los materiales de cuentas preferidos para la matriz de sensores se

preseleccionan basándose en diferencias físicas o químicas en las subpoblaciones de cuentas que producen una firma de respuesta óptica característica en presencia del analito cuando se ilumina mediante energía de luz de excitación.

- 5 Características tales como la polaridad del material de la cuenta, la estructura química, la función química, el área específica de la cuenta, el tamaño de los poros, las características de hinchamiento de la cuenta o el comportamiento de adsorción química, por separado o en combinación, contribuyen a la firma de respuesta óptica característica de una subpoblación de cuentas dada. En una realización, se prefieren materiales de cuentas que sean permeables o semipermeables a fluidos que incluyen vapores y analitos líquidos. En otra realización, se  
10 prefieren los materiales de cuenta que se hinchan al contacto con fluidos tales como vapor o analitos líquidos. En general, los materiales de cuentas que tienen características únicas de polaridad, estructura, tamaño de poro, superficie específica, capacidad de penetración o adsorción son particularmente útiles para las matrices de cuentas de sensor de la presente invención.
- 15 En ciertas realizaciones, las microesferas comprenden un colorante indicador que, en combinación con el material de matriz de cuentas característico, proporciona una firma de respuesta óptica que se puede usar para identificar la cuenta y, por lo tanto, el agente bioactivo unido, al exponerlo a un analito de referencia. Es decir, cada subpoblación de microesferas (es decir, cada elemento sensor) comprende una firma única de respuesta óptica o etiqueta óptica, que se puede usar para identificar el agente bioactivo único de esa subpoblación de microesferas; una cuenta que  
20 comprende la firma única de respuesta óptica puede distinguirse de las cuentas en otras ubicaciones con diferentes firmas de respuesta óptica. Como se describe en el presente documento, cada agente bioactivo tendrá una firma de respuesta óptica única asociada de manera que cualquier microesfera que comprenda ese agente bioactivo sea identificable sobre la base de la firma tras la exposición a un analito o fluido de referencia. Como se describe más completamente a continuación, es posible reutilizar o duplicar las firmas de respuesta óptica dentro de una matriz,  
25 por ejemplo, cuando se usa otro nivel de identificación, por ejemplo, cuando se usan cuentas de diferentes tamaños o cuando la matriz se carga secuencialmente con diferentes lotes de cuentas.

La selección de indicadores de colorante químico es igualmente importante para el diseño de un sistema de matriz de sensores de fibra óptica de la presente invención. En la realización preferida, se incorpora al menos un colorante  
30 11 en la microesfera 10. En la realización preferida, este colorante 11 actúa como colorante de codificación, para identificar la ubicación de la subpoblación de la cuenta en la matriz de sensores, y un colorante indicador, para detectar un analito diana de interés. En una realización alternativa, se pueden utilizar dos o más colorantes como colorantes indicadores de codificación. En una realización preferida, se usa únicamente al menos un colorante como colorante de codificación y se añade un colorante separado durante el análisis como colorante indicador. En una  
35 realización, cuando se usan dos o más colorantes de codificación, se puede usar la relación de intensidades máximas para pares de colorantes para codificar la subpoblación de cuentas y se puede añadir un colorante indicador separado durante el análisis. En una realización alternativa, se pueden utilizar colorantes conjugados, tales como acrilil fluoresceína y otros, cuando sea deseable incorporar el colorante directamente en un polímero sintetizado o material de cuentas de copolímero.

40 Si bien el colorante indicador 11 puede ser de tipo cromóforo o fluoróforo, se prefiere un colorante fluorescente porque la intensidad de la señal fluorescente proporciona una mejor relación de señal/ruido cuando se descodifica. En la realización más preferida, se utilizan colorantes sensibles a la polaridad o colorantes solvatocrómicos. Los colorantes solvatocrómicos son colorantes cuyos espectros de absorción o emisión son sensibles y están alterados  
45 por la polaridad de su entorno. Normalmente, estos colorantes exhiben un cambio en la longitud de onda de emisión máxima debido a un cambio en la polaridad local. Los cambios de polaridad que causan dichos cambios de longitud de onda pueden ser introducidos por la matriz de cuentas utilizada para una subpoblación de cuentas de sensor particular o, la presencia de un analito diana. El cambio en la polaridad crea una firma de respuesta óptica característica que es útil tanto para codificar subpoblaciones de tipos de cuentas como para detectar analitos diana  
50 específicos. Un colorante solvatocrómico preferido, El rojo Nilo (Eastman Kodak, Rochester, NY), exhibe grandes cambios en su pico de longitud de onda de emisión con cambios en la polaridad del entorno local. Además, el rojo Nilo es soluble en una amplia gama de disolventes, es fotoquímicamente estable y tiene un pico de fluorescencia relativamente fuerte. Los colorantes adicionales que se conocen convencionalmente en la técnica y se pueden usar como colorantes en la presente invención son los que se encuentran en la patente de Estados Unidos 5.512.490 de  
55 Walt et al., particularmente en la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 5, la Tabla 6 y la Tabla 11.

Se pueden fabricar diferentes subpoblaciones de elementos sensores de cuentas para la matriz de sensores útil en la presente invención inmovilizando rojo Nilo en matrices poliméricas de composición variable. Al incorporar rojo Nilo en subpoblaciones de cuentas hechas de diferentes matrices poliméricas de polaridad, hidrofobicidad, tamaño de  
60 poro, flexibilidad e hinchazón variables, se producen subpoblaciones únicas de cuentas de sensor que reaccionan de manera diferente con las moléculas de fluidos individuales, dando lugar a diferentes respuestas de fluorescencia cuando se exponen a fluidos orgánicos. Esto da como resultado que cada subpoblación de cuentas tenga una firma de respuesta óptica característica cuando se expone a diferentes analitos.

65 En una realización preferida, los colorantes están unidos covalentemente a la superficie de las cuentas. Esto se puede hacer como se describe en general a continuación para la unión de los agentes bioactivos, utilizando grupos

funcionales en la superficie de las cuentas. Como apreciarán los expertos en la materia, estas uniones se realizan para minimizar el efecto sobre el colorante.

5 En una realización preferida, los colorantes están asociados de forma no covalente con las cuentas, generalmente atrapando los colorantes en la matriz de cuentas o los poros de las cuentas.

En una realización, los colorantes se añaden al agente bioactivo, en lugar de las cuentas, aunque esto generalmente no se prefiere.

10 La Figura 2 es un diagrama de proceso que ilustra la preparación de las subpoblaciones de cuentas de sensor y la matriz de cuentas de sensor. En la etapa 50, las suspensiones de las diversas subpoblaciones de cuentas se preparan individualmente a partir de materiales de cuentas comerciales o materiales de cuentas sintetizadas que se han fabricado a partir de materiales poliméricos preferidos. En esta etapa, las cuentas pueden prelavarse, tratarse superficialmente con un agente de acoplamiento, tal como una solución de silanización como se usa en el Ejemplo 2  
15 y el Ejemplo 3, o tratarse con un plastificante, tal como TTP, TPP o DBP como se usa en el Ejemplo 6. Al preparar las subpoblaciones de cuentas, cada grupo de cuentas normalmente se dispersa en un disolvente apropiado que puede comprender adiciones de tensioactivos o dispersantes para mejorar la dispersión. Por ejemplo, se ha encontrado que Tween 20 (J.T. Baker, Cleveland, OH), un monolaurato de polioxietilensorbitan, es particularmente útil como agente tensioactivo.

20 Se prepara una solución de colorante 51 para etiquetar o codificar cada una de las subpoblaciones de cuentas para la posterior identificación e indexación de las subpoblaciones en la matriz de sensores en una etapa posterior de descodificación. En la realización más preferida, un único colorante sirve tanto como colorante que codifica una subpoblación de cuentas de sensor como colorante informador del analito que se usa para detectar la presencia de  
25 un analito diana. En otra realización, el colorante sirve únicamente para codificar la subpoblación de cuentas de sensor y se usa un colorante adicional como colorante indicador para la detección de un analito diana. En una realización, se pueden incorporar dos o más colorantes en la subpoblación de cuentas y las relaciones de intensidad máxima de los pares de colorantes se pueden usar para codificar la subpoblación de cuentas de sensor. Normalmente, se usa un colorante solvatocrómico único como colorante de codificación y colorante indicador. En  
30 una realización preferida, se usa colorante rojo Nilo (Aldrich, Milwaukee, WI). Para incorporar colorante en cada subpoblación de cuentas, las suspensiones de las cuentas preparadas en la etapa 50 se mezclan en la etapa 52 con soluciones de colorante preparadas en la etapa 51. Preferiblemente, en la etapa 52, las cuentas o microesferas se ponen en una solución de colorante que comprende colorante disuelto en un disolvente orgánico que hinchará las microesferas. En la etapa 54, las cuentas se lavan, se centrifugan o se filtran para eliminar el exceso de colorante.  
35 Las microesferas se lavan normalmente en agua, metanol o cualquier disolvente adecuado que no hinche las microesferas, pero en el que los colorantes todavía son solubles. Esto permite que el colorante residual se enjuague sin aclarar el colorante de las microesferas. En una realización alternativa, se puede unir un resto químico o grupo funcional a la superficie de la cuenta después de la eliminación del exceso de colorante.

40 Las cuentas no tienen por qué ser esféricas; se pueden utilizar partículas irregulares. Aunque se pueden utilizar cuentas porosas y no porosas, se prefieren las cuentas porosas para infiltrar el colorante indicador y mejorar la capacidad de respuesta y la sensibilidad del sensor de microesferas debido a un aumento en el área específica para la fijación del colorante indicador, agentes bioactivos, etc. Los tamaños de cuenta varían desde nanómetros, es decir, 100 nm, hasta milímetros, es decir, 1 mm, prefiriéndose cuentas de aproximadamente 0,2 micrómetros a  
45 aproximadamente 200 micrómetros, y siendo particularmente preferidas cuentas de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 micrómetros, aunque en algunas realizaciones se pueden usar cuentas más pequeñas. La Figura 1 ilustra la construcción de un sensor 10 típico de cuentas o microesferas que comprende un colorante informador 11 atrapado dentro de los poros 12 de las cuentas.

50 Debe observarse que un componente clave de la invención es el uso de un emparejamiento sustrato/cuenta que permite la asociación o unión de las cuentas en sitios discretos en la superficie del sustrato, de modo que las cuentas no se muevan durante el transcurso del ensayo.

55 En ciertas realizaciones, la presente invención incorpora un sistema de química analítica basado en cuentas en el que las cuentas o microesferas se fabrican a partir de diversos materiales inorgánicos u orgánicos en el que cada material puede identificarse mediante una firma de respuesta óptica temporal característica que permite verificar tanto la identidad como la ubicación de una cuenta particular dentro de una matriz de sensores después de la exposición a un analito de referencia mientras se ilumina con energía de luz de excitación. La invención proporciona la utilización de cualquier fuente de energía de luz de excitación y no se limita a una longitud de onda específica. El  
60 requisito principal de la luz de excitación es que produce luz emitida de una longitud de onda característica con la iluminación de un colorante indicador asociado con una composición de cuentas dada.

Las microesferas de acuerdo con la presente invención comprenden un agente bioactivo, específicamente, sondas de ácido nucleico. Debe entenderse que las composiciones de la invención tienen dos usos principales. En una  
65 realización preferida, como se describe más completamente a continuación, las composiciones se usan para detectar la presencia de un analito diana particular; por ejemplo, la presencia o ausencia de una secuencia de

nucleótidos particular o una proteína particular, tal como una enzima, un anticuerpo o un antígeno. En una realización preferida alternativa, las composiciones se usan para seleccionar agentes bioactivos, es decir, candidatos a fármacos, para unirse a un analito diana particular.

5 Los agentes bioactivos se pueden obtener a partir de una amplia variedad de fuentes que incluyen bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, se dispone de numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluida la expresión de oligonucleótidos aleatorizados. Como alternativa, están disponibles o se producen fácilmente bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. Adicionalmente, las bibliotecas y compuestos  
10 producidos de manera natural o sintética se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales. Los agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación y/o amidación para producir análogos estructurales.

En una realización preferida, se usa una biblioteca de agentes bioactivos. La biblioteca debería proporcionar una población suficientemente diversa estructuralmente de agentes bioactivos para efectuar un intervalo probabilísticamente suficiente de unión a analitos diana. En consecuencia, una biblioteca de interacción debe ser lo suficientemente grande para que al menos uno de sus miembros tenga una estructura que le otorgue afinidad por el analito diana. Aunque es difícil medir el tamaño absoluto requerido de una biblioteca de interacción, la naturaleza proporciona una pista de la respuesta inmunitaria: diversos  $10^7$ - $10^8$  anticuerpos diferentes proporciona al menos una combinación con suficiente afinidad para interactuar con la mayoría de los antígenos potenciales a los que se enfrenta un organismo. Las técnicas de selección *in vitro* publicadas también han demostrado que un tamaño de biblioteca de  $10^7$  a  $10^8$  es suficiente para encontrar estructuras con afinidad por la diana. Por lo tanto, en una realización preferida, al menos  $10^6$ , preferiblemente al menos  $10^7$ , más preferiblemente al menos  $10^8$  y lo más preferiblemente al menos  $10^9$  agentes bioactivos diferentes se analizan simultáneamente en los métodos objeto. Los métodos preferidos maximizan el tamaño y la diversidad de la biblioteca.  
15  
20  
25

En una realización, la biblioteca está completamente aleatorizada, sin preferencias de secuencia o constantes en ninguna posición. En una realización preferida, la biblioteca está polarizada. Es decir, algunas posiciones dentro de la secuencia se mantienen constantes o se seleccionan entre un número limitado de posibilidades. Por ejemplo, en una realización preferida, los nucleótidos se aleatorizan dentro de una clase definida, por ejemplo, purinas, etc.  
30

Por "ácido nucleico" u "oligonucleótido" o equivalentes gramaticales en la presente memoria se entiende al menos dos nucleótidos unidos covalentemente entre sí. Un ácido nucleico útil en la presente invención generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, como se describe a continuación, se incluyen análogos de ácido nucleico que pueden tener cadenas principales alternativas, que comprenden, por ejemplo, fosforamida (Beaucage, et al., Tetrahedron, 49 (10): 1925 (1993) y sus referencias; Letsinger, J. Org. Chem., 35: 3800 (1970); Sprinzl, et al., Eur. J. Biochem., 81: 579 (1977); Letsinger, et al., Nucl. Acids Res., 14: 3487 (1986); Sawai, et al., Chem. Lett., 805 (1984); Letsinger, et al., J. Am. Chem. Soc., 110: 4470 (1988), y Pauwels, et al., Chemica Scripta, 26: 141 (1986)), fosforotioato (Mag, et al., Nucleic Acids Res., 19: 1437 (1991), y patente de los Estados Unidos n.º 5.644.048), fosforditioato (Briu, et al., J. Am. Chem. Soc., 111: 2321 (1989)), enlaces de O-metilforamidita (véase Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press) y cadenas y enlaces de péptido y ácidos nucleicos (ver Egholm, J. Am. Chem. Soc., 114: 1895 (1992); Meier, et al., Chem. Int. Ed. Engl., 31: 1008 (1992); Nielsen, Nature, 365: 566 (1993); Carlsson, et al., Nature, 380: 207 (1996), todos ellos que se incorporan por referencia)). Otros análogos de ácidos nucleicos incluyen aquellos con cadenas positivas (Denpcy, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 6097 (1995)); cadenas no iónicas (Patentes de Estados Unidos n.º 5.386.023; 5.637.684; 5.602.240; 5.216.141; y 4.469.863; Kiedrowski, et al., Angew. Chem. Intl. Ed. English, 30: 423 (1991); Letsinger, et al., J. Am. Chem. Soc., 110: 4470 (1988); Letsinger, et al., Nucleosides & Nucleotides, 13: 1597 (1994); Capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, Modificaciones de carbohidratos en Antisense Research, Ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook, Mesmaeker, et al., Bioorganic & Medicinal Chem. Lett., 4: 395 (1994); Jeffs, et al., J. Biomolecular NMR, 34:17 (1994); Tetrahedron Lett., 37: 743 (1996)) y cadenas no de ribosa, que incluyen las descritas en las patentes de Estados Unidos n.º 5.235.033 y 5.034.506, y capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580. Modificaciones de carbohidratos en Antisense Research, ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también se incluyen dentro de la definición de ácidos nucleicos (véase Jenkins, et al., Chem. Soc. Rev., (1995) pp. 169-176). Varios análogos de ácidos nucleicos se describen en Rawls, C & E News, 2 de junio de 1997, página 35. Estas modificaciones de la cadena principal de ribosa-fosfato pueden realizarse para facilitar la adición de restos adicionales tales como etiquetas, o para aumentar la estabilidad y la semivida de dichas moléculas en ambientes fisiológicos. Además, se pueden preparar mezclas de análogos de ácidos nucleicos y ácidos nucleicos naturales. Como alternativa, se pueden preparar mezclas de diferentes análogos de ácidos nucleicos y mezclas de ácidos nucleicos y análogos de origen natural. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, como se especifica, o pueden contener porciones de secuencia de cadena doble o cadena sencilla. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como de ADNc, ARN o un híbrido, donde el ácido nucleico contiene cualquier combinación de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, y cualquier combinación de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantantina, hipoxantantina, isocitosina, isoguanina y análogos de pares de bases tales como nitropirrol y nitroindol, etc.  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Los agentes bioactivos de ácido nucleico pueden ser ácidos nucleicos naturales, ácidos nucleicos aleatorios o ácidos nucleicos aleatorios "sesgados". Por ejemplo, se pueden usar digestiones de genomas procarióticos o eucarióticos.

5 En general, las sondas útiles en la presente invención están diseñadas para ser complementarias a una secuencia diana (ya sea la secuencia del analito diana de la muestra o a otras secuencias de la sonda, como se describe en el presente documento), de tal forma que se produzca la hibridación de la diana y las sondas de la presente invención. Esta complementariedad no tiene por qué ser perfecta; puede haber cualquier número de emparejamientos incorrectos de pares de bases que interferirán con la hibridación entre la secuencia diana y los ácidos nucleicos monocatenarios de la presente invención. Sin embargo, si el número de mutaciones es tan grande que no puede producirse hibridación, incluso en las condiciones de hibridación menos rigurosas, la secuencia no es una secuencia diana complementaria. Por lo tanto, por "sustancialmente complementario" en este documento se entiende que las sondas son suficientemente complementarias a las secuencias diana para hibridarse en las condiciones de reacción seleccionadas. Se conocen en la técnica condiciones de alta rigurosidad; véase, por ejemplo, Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, 1989, y Short Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel, et al. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen. Técnicas en Bioquímica y Biología Molecular-Hibridación con Sondas de Ácidos Nucleicos, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10 °C más bajas que el punto de fusión térmico (Tm) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definido. La Tm es la temperatura (bajo una fuerza iónica, un pH y una concentración de ácido nucleico definidos) a la cual el 50 % de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio (ya que las secuencias diana están presentes en exceso, a Tm, el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es inferior a aproximadamente 1,0 M de iones de sodio, normalmente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de iones de sodio (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, más de 50 nucleótidos). También se pueden lograr condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizadores tales como formamida. En otra realización, se usan condiciones de hibridación menos rigurosas; por ejemplo, se pueden usar condiciones de rigurosidad moderada o baja, como se conoce en la técnica; ver Maniatis y Ausubel, supra, y Tijssen, supra.

El término "secuencia diana" o equivalentes gramaticales en el presente documento significa una secuencia de ácidos nucleicos en una única cadena de ácido nucleico. La secuencia diana puede ser una porción de un gen, una secuencia reguladora, ADN genómico, ADNc, ARN que incluye ARNm y ARNr, u otros. Puede ser de cualquier longitud, con el entendimiento de que las secuencias más largas son más específicas. Como apreciarán los expertos en la materia, la secuencia diana complementaria puede adoptar muchas formas. Por ejemplo, puede estar contenida dentro de una secuencia de ácidos nucleicos más grande, es decir, la totalidad o parte de un gen o ARNm, un fragmento de restricción de un ADN plasmídico o genómico, entre otros. Como se describe con más detalle a continuación, las sondas se hibridan con secuencias diana para determinar la presencia o ausencia de la secuencia diana en una muestra. En términos generales, los expertos en la materia entenderán este término.

En una realización preferida, cada cuenta comprende un único tipo de agente bioactivo, aunque preferiblemente están unidos una pluralidad de agentes bioactivos individuales a cada cuenta. La presente invención utiliza más de una microesfera que contiene un agente bioactivo único; es decir, hay redundancia integrada en el sistema mediante el uso de subpoblaciones de microesferas, con cada microesfera en la subpoblación que contiene el mismo agente bioactivo.

Como apreciarán los expertos en la materia, los agentes bioactivos pueden sintetizarse directamente sobre las cuentas, o se pueden preparar y a continuación unirse después de la síntesis. En una realización preferida, se usan enlazadores para unir los agentes bioactivos a las cuentas, para permitir una buena unión, suficiente flexibilidad para permitir una buena interacción con la molécula diana, y para evitar reacciones de unión indeseables.

En una realización preferida, los agentes bioactivos se sintetizan directamente sobre las cuentas. Como se conoce en la técnica, muchas clases de compuestos químicos se sintetizan actualmente sobre soportes sólidos, tales como péptidos, restos orgánicos y ácidos nucleicos. El ajuste de las técnicas sintéticas actuales para usar cuentas es una cuestión relativamente sencilla.

En una realización preferida, los agentes bioactivos se sintetizan primero, y a continuación se unen covalentemente a las cuentas. Como apreciarán los expertos en la materia, esto se hará dependiendo de la composición de los agentes bioactivos y las cuentas. La funcionalización de superficies de soporte sólidas tales como ciertos polímeros con grupos químicamente reactivos como tioles, aminas, carboxilos, etc. generalmente es conocida en la técnica. Por consiguiente, se pueden usar microesferas "en blanco" que tienen químicas superficiales que facilitan la fijación de la función deseada por parte del usuario. Algunos ejemplos de estas químicas superficiales para microesferas en blanco se enumeran en la Tabla I.

Tabla I

Química superficial	Nombre:
NH <sub>2</sub>	Amina
COOH	Ácido carboxílico
CHO	Aldehído
CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	Amina alifática
CO NH <sub>2</sub>	Amida
CH <sub>2</sub> -C1	Clorometilo
CONH-NH <sub>2</sub>	Hidrazida
OH	Hidroxilo
SO <sub>4</sub>	Sulfato
SO <sub>3</sub>	Sulfonato
ArNH <sub>2</sub>	Amina aromática

En general, estos grupos funcionales se pueden usar para añadir cualquier número de diferentes agentes bioactivos a las cuentas, generalmente usando químicas conocidas. Por ejemplo, los agentes bioactivos que contienen carbohidratos se pueden unir a un soporte funcionalizado con amino; el aldehído del hidrato de carbono se prepara usando técnicas convencionales, y a continuación el aldehído se hace reaccionar con un grupo amino en la superficie. En una realización alternativa, se puede usar un enlazador de sulfhidrilo. Hay una serie de enlazadores reactivos con sulfhidrilo conocidos en la técnica tales como SPDP, maleimidias, haloacetilos y disulfuros de piridilo (véase, por ejemplo, el catálogo de Pierce Chemical Company de 1994, sección técnica sobre reticuladores, páginas 155-200, incorporado en el presente documento por referencia) que se pueden usar para unir agentes proteínicos que contienen cisteína al soporte. Como alternativa, se puede usar un grupo amino en el agente bioactivo para unirse a un grupo amino en la superficie. Por ejemplo, un gran número de grupos bifuncionales estables son bien conocidos en la técnica, incluyendo enlazadores homobifuncionales y heterobifuncionales (véase el Catálogo y manual de Pierce, páginas 155-200). En una realización adicional, los grupos carboxilo (ya sea de la superficie o del agente bioactivo) pueden derivarse usando enlazadores bien conocidos (véase el catálogo de Pierce). Por ejemplo, las carbodiimidias activan grupos carboxilo para el ataque de buenos nucleófilos tales como aminas (véase Torchilin et al., *Critical Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems*, 7 (4): 275-308 (1991), incorporados expresamente en la presente memoria). Los agentes bioactivos proteínicos también se pueden unir usando otras técnicas conocidas en la materia, por ejemplo para la unión de anticuerpos a polímeros; ver Slinkin et al., *Bioconj. Chem.* 2: 342-348 (1991); Torchilin et al., *Supra*; Trubetskoy et al., *Bioconj. Chem.* 3: 323-327 (1992); King et al., *Cancer Res.* 54: 6176-6185 (1994); y Wilbur et al., *Bioconjugate Chem.* 5: 220-235 (1994). Debe entenderse que los agentes bioactivos se pueden unir de varias maneras, incluidas las enumeradas anteriormente. Lo que es importante es que la forma de fijación no altere significativamente la función del agente bioactivo; es decir, el agente bioactivo debe unirse de una manera tan flexible que permita su interacción con una diana.

En la técnica anterior se conocen técnicas específicas para inmovilizar enzimas en microesferas. En un caso, se usan microesferas de química de superficie NH<sub>2</sub>. La activación de la superficie se consigue con un glutaraldehído al 2,5 % en solución salina tamponada con fosfato (10 mM) proporcionando un pH de 6,9. (NaCl 138 mM, KCl 2,7 mM). Esto se agita en un lecho de agitación durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. Las microesferas se enjuagan luego con agua ultrapura más Tween 20 al 0,01 %-0,02 % (agente tensioactivo) y se vuelven a enjuagar con PBS a pH 7,7 más Tween 20 al 0,01 %. Por último, la enzima se añade a la solución, preferiblemente después de filtrarse usando un filtro micropure amicon de 0,45m.

Después de preparar el número deseado de subpoblaciones de cuentas mediante el método de las etapas 50 a 54, las subpoblaciones se combinan normalmente en la etapa 55 para proporcionar una mezcla aleatoria de subpoblaciones para usar como elementos de matriz de sensores antes de dispersar la subpoblación mezcla en el sustrato de matriz en la etapa 56. En una realización preferida, la Figura 3 muestra un diagrama de proceso esquemático que ilustra la preparación y ubicación de subpoblaciones de cuentas de sensor autocodificadas en una matriz de sensores de haces de fibra óptica. En una realización alternativa, la etapa 55 puede omitirse y cada una de las subpoblaciones de cuentas de sensor puede colocarse por separado y secuencialmente sobre el sustrato de la matriz en ubicaciones predeterminadas.

Por lo tanto, una vez que se consigue que las microesferas comprendan al menos un agente bioactivo y un colorante indicador autocodificado, las microesferas se añaden a sitios discretos en la superficie del sustrato. Esto se puede hacer de varias maneras, pero generalmente comprende añadir las cuentas a la superficie en condiciones que permitirán la asociación de las microesferas sobre o en los sitios discretos. La asociación de las cuentas en la superficie puede comprender un enlace covalente de la cuenta a la superficie, por ejemplo cuando se añaden sitios de unión química tanto al sustrato como a la cuenta; una electroforesis o hidroafinidad, cuando se usa carga,

hidrofobicidad o hidrofiliidad como base de la unión; una unión física pero no covalente tal como el uso de un adhesivo; o una fijación espacial, por ejemplo, la localización de una cuenta dentro de un pocillo. En algunas realizaciones, puede ser preferible efectuar una unión más permanente después de la localización inicial, por ejemplo mediante el uso de agentes de reticulación, una película o membrana sobre la matriz.

5 El sistema de microesferas se puede unir al extremo distal del haz de fibras ópticas usando diferentes procesos compatibles como se describe a continuación. Es importante que las microesferas estén ubicadas cerca del extremo del haz. Esto asegura que la luz que regresa en cada fibra óptica proviene predominantemente de una sola microesfera. Esta característica es necesaria para permitir la interrogación de la firma de respuesta óptica de  
10 microesferas individuales para identificar reacciones que implican la función de la microesfera y también para descodificar los grupos de colorante/cuenta contenidos en esas microesferas. La técnica de adhesión o fijación, sin embargo, no debe aislar químicamente las microesferas del analito.

15 La Figura 7 es un diagrama de bloques esquemático que muestra el sensor de fibra óptica inventivo 200 y el sistema de control asociado 210. El sensor de fibra óptica 200 comprende un haz de fibra óptica 202 (Galileo Electro-Optics, Sturbridge, MA), que normalmente se construye a partir de muchos miles de fibras discretas revestidas por separado, cada una de unas pocas micras de diámetro, por lo que la luz no se mezcla entre las fibras individuales. Se puede emplear cualquier haz 202 de fibra óptica adecuado que tenga un intervalo en el número de fibras individuales o un intervalo de diámetros de fibra individuales. La matriz 100 de sensores de microesferas o cuentas  
20 está unida al extremo distal 212 del haz, con el extremo proximal 214 que es recibido por una etapa 216 de un microscopio de traslación z convencional, para el posicionamiento vertical de la matriz 100 para el enfoque, y un microposicionador x-y 218 (Burleigh Instruments, Fishers, NY), para la alineación horizontal de la matriz 100 con el tren óptico. Estos dos componentes actúan en concierto para posicionar apropiadamente el extremo proximal 214 del haz 202 para una lente del objetivo de microscopio 220. La luz recogida por la lente del objetivo 220 se pasa a una fijación de fluorescencia de luz reflejada con una rueda de cubo dicrométrica de cuatro posiciones 222. La fijación 222 permite la inserción de luz desde una lámpara de arco de xenón de 75 vatios 224 a través de la lente del objetivo 220 para acoplarse en el haz de fibras 202. La luz de la fuente 224 se condensa por la lente condensadora 226, y a continuación se filtra y/o se obtura con un filtro y el obturador rueda 228.

30 La luz que regresa del extremo distal 212 del haz 202 pasa por la fijación 222 y a continuación se obtura y se filtra mediante una segunda rueda 234. La imagen se capta a continuación en una cámara 236 del dispositivo de carga acoplada (CCD). Un ordenador 238 convencional ejecuta el software de procesamiento de imágenes para procesar la información de la cámara CCD 236 y también opcionalmente para controlar el primer y segundo obturador y ruedas de filtro 228, 234. Se puede utilizar un Macintosh o, como alternativa, un ordenador personal compatible con  
35 IBM para controlar la instrumentación y la adquisición de datos. La instrumentación y el aparato óptico desplegados en el extremo proximal 214 del sensor de fibra óptica 200, exclusivo del sensor de fibra óptica 200, se describen más completamente por Bronk, et al., Anal. Chem. 67 (17): 2750-2752 (1995) y Bronk, et al., Anal. Chem. 66: 3519 (1994).

40 La matriz de sensores de cuentas 100 puede estar unida al extremo distal del haz de fibras ópticas 202 usando diferentes procesos compatibles. Es importante que las microesferas 10 estén ubicadas cerca del extremo del haz. Esto asegura que la luz que retorna en cada fibra óptica discreta provenga predominantemente de una sola microesfera. Esta característica es necesaria para descodificar las subpoblaciones de cuentas autocodificadas con el fin de identificar tanto el tipo de cuentas como su ubicación, para permitir la interrogación de la firma óptica de  
45 microesferas individuales dentro de una subpoblación de cuentas, y para proporcionar la suma de las respuestas de cuentas individuales dentro de cada subpoblación para aumentar la relación de señal a ruido y mejorar el aumento de la señal. Sin embargo, la técnica de adhesión o fijación de cuentas no debe aislar químicamente las microesferas del analito ni interferir con la medición óptica.

50 Las Figuras 5A y 5B son micrografías que ilustran el método preferido para unir cuentas a un sustrato de matriz de sensores. Los micropocillos 250 se forman en el extremo distal 212 de un haz de fibra óptica 202 y las microesferas 10 se insertan en las cavidades de los micropocillos 250. Los micropocillos 250 se forman en el centro de cada fibra óptica 252 del haz de fibra óptica 202. Como se muestra en la Figura 5B, el tamaño de los micropocillos 250 está coordinado con el tamaño de las microesferas 10, de modo que las microesferas 10 pueden colocarse dentro de los  
55 micropocillos 250. Por lo tanto, cada fibra óptica 252 del haz 202 transmite luz desde la única microesfera 10 contenida en su pocillo. Por consiguiente, al formar imágenes del extremo del haz 202 en la matriz 236 de CCD, las firmas ópticas de las microesferas 10 son interrogables individualmente.

60 La Figura 4 ilustra cómo se forman los micropocillos 250 y las microesferas 10 colocadas en los micropocillos. En una realización, se empleó un haz de fibras de formación de imágenes 202 de 1 mm empaquetadas hexagonalmente que comprende aproximadamente 20.600 fibras ópticas individuales que tienen núcleos de aproximadamente 3,7 m de ancho (Parte n.º ET26 de Galileo Fibers, Sturbridge, MA). Normalmente, los núcleos de cada fibra tienen forma hexagonal como resultado de la dureza del vidrio y el estiramiento durante la fabricación de la fibra. Sin embargo, en algunos casos, la forma puede ser circular.

65

En la etapa 270, tanto el extremo proximal 214 como el extremo distal 212 del haz de fibras 202 se pulimentan sucesivamente sobre películas solapadas de 12 m, 9 m, 3 m, 1 m y 0,3 m. Posteriormente, los extremos pueden inspeccionarse en busca de arañazos en un microscopio de fuerza atómica convencional. En la etapa 272, se realiza el ataque en el extremo distal 212 del haz 202. Se puede usar una solución de 0,2 gramos de  $\text{NH}_4\text{F}$  (fluoruro de amonio) con 600 l de  $\text{dH}_2\text{O}$  y 100 l de HF (ácido fluorhídrico), solución madre al 50 %. El extremo distal 212 se ataca en esta solución durante un tiempo específico, preferiblemente aproximadamente 80 segundos.

Tras la eliminación de esta solución, el extremo del haz se pone inmediatamente en agua desionizada para detener cualquier ataque químico adicional en la etapa 274. La fibra se enjuaga con agua del grifo. En esta etapa, la sonicación se realiza preferiblemente durante varios minutos para eliminar cualquier producto salino de la reacción. La fibra se deja secar al aire.

Como se ilustra en las Figuras 5A y 5B, el procedimiento anterior produce micropocillos mediante el ataque anisotrópico de los núcleos de fibra 254 favorablemente con respecto al revestimiento 256 para cada fibra del haz 202. Los micropocillos tienen aproximadamente el diámetro de los núcleos 254, 3,7 m. Este diámetro se selecciona para que sea ligeramente mayor que los diámetros de las microesferas utilizadas, 3,1 m, en el ejemplo. El ataque preferencial ocurre porque la sílice pura de los núcleos 254 se ataca más rápido en presencia de ácido fluorhídrico que los revestimientos de sílice dopado con germanio 256.

Las microesferas se ponen luego en los micropocillos 250 en la etapa 276 según varias técnicas diferentes. La ubicación de las microesferas puede realizarse goteando una solución que contiene las subpoblaciones de microesferas mezcladas aleatoriamente deseadas sobre el extremo distal 212, sonicando el haz para sedimentar las microesferas en los micropocillos, y permitiendo que el disolvente de la microesfera se evapore. Como alternativa, las subpoblaciones podrían añadirse en serie al extremo del haz. Las microesferas 10 se pueden fijar luego en los micropocillos 250 usando una solución diluida de Nafion sulfonado que se gotea sobre el extremo. Tras la evaporación del disolvente, se formó una fina película de Nafion sobre las microesferas que las mantiene en su lugar. Este enfoque es compatible para fijar microesferas para la indicación de pH que llevan la función FITC. La matriz resultante de microesferas fijas conserva su sensibilidad al pH debido a la permeabilidad del Nafion sulfonado a iones de hidrógeno. Sin embargo, este enfoque no puede emplearse genéricamente ya que Nafion es impermeable a la mayoría de las especies solubles en agua. Se puede emplear un enfoque similar con diferentes polímeros. Por ejemplo, se pueden usar soluciones de polietilenglicol, poli(acrilamida) o polihidroximetil metacrilato (poliHEMA) en lugar de Nafion, proporcionando la permeabilidad requerida a las especies acuosas.

En otra realización, un enfoque de fijación alternativo emplea el hinchamiento de microesferas para atrapar cada microesfera 10 en su correspondiente micropocillo 250. En este enfoque, las microesferas se distribuyen primero en los micropocillos 250 sonicando las microesferas suspendidas en un disolvente no hinchable en presencia de la matriz de micropocillos en el extremo distal 212. Después de la ubicación en los micropocillos, las microesferas se exponen posteriormente a un tampón acuoso en el que se hinchan, y de este modo las atrapa físicamente en los micropocillos. A modo de ejemplo de esta realización particular, un material de microesfera comúnmente conocido es tentagel, un copolímero de estireno-polietilenglicol. Estas microesferas pueden no hincharse en solventes no polares tales como hexano y se pueden hinchar aproximadamente un 20-40 % en volumen después de la exposición a un medio más polar o acuoso. En ciertas realizaciones, este enfoque de fijación puede ser deseable ya que no compromete significativamente las propiedades de difusión o permeabilidad de las propias microesferas.

Las Figuras 6A y 6B muestran las microesferas típicas 10 en micropocillos 250 después de su ubicación inicial y a continuación después del golpeteo y la exposición a pulsos de aire. Las Figuras 7A y 7B ilustran que no existe una pérdida apreciable de microesferas desde los micropocillos debido a la agitación mecánica incluso sin una técnica de fijación específica. Este efecto probablemente es debido a las fuerzas electrostáticas entre las microesferas y las fibras ópticas. Estas fuerzas tienden a unir las microesferas dentro de los micropocillos. Por lo tanto, en la mayoría de los entornos, puede ser innecesario utilizar cualquier fijación química o mecánica para las microesferas.

Cabe señalar que no todos los sitios de una matriz pueden comprender una cuenta; es decir, puede haber algunos sitios en la superficie del sustrato que estén vacíos. Además, puede haber algunos sitios que contengan más de una cuenta, aunque esto no se prefiere.

En algunas realizaciones, por ejemplo cuando se realiza la unión química, es posible unir las cuentas de una manera no aleatoria u ordenada. Por ejemplo, usando enlazadores de unión fotoactivables o adhesivos o máscaras fotoactivables, los sitios seleccionados en la matriz pueden hacerse secuencialmente adecuados para la unión, de modo que se establecen poblaciones definidas de cuentas.

Además, dado que el tamaño de la matriz estará fijado por el número de firmas únicas de respuesta óptica, es posible "reutilizar" un conjunto de firmas únicas de respuesta óptica para permitir un mayor número de sitios de prueba. Esto puede hacerse de varias maneras; por ejemplo, usando un esquema de codificación posicional dentro de una matriz; diferentes subhaces pueden reutilizar el conjunto de firmas de respuesta óptica. De forma similar, una realización utiliza el tamaño de la cuenta como modalidad de codificación, permitiendo así la reutilización de la matriz de firmas únicas de respuesta óptica para cada tamaño de cuenta. Como alternativa, la carga parcial

secuencial de las matrices con cuentas también puede permitir la reutilización de las firmas de respuesta óptica.

En una realización preferida, se realiza un sistema de codificación espacial o posicional. En esta realización, hay subhaces o submatrices (es decir, porciones de la matriz total) que se utilizan. Por analogía con el sistema telefónico, cada submatriz es un "código de área", que puede tener las mismas etiquetas (es decir, números de teléfono) de otras submatrices, que están separadas en virtud de la ubicación de la submatriz. Por lo tanto, por ejemplo, se pueden reutilizar las mismas combinaciones únicas de colorante/cuenta de un haz a otro. Por tanto, el uso de 50 etiquetas únicas en combinación con 100 submatrices diferentes puede formar una matriz de 5000 agentes bioactivos diferentes. En esta realización, es importante poder identificar un haz de otro; en general, esto se hace manualmente o mediante el uso de cuentas marcadoras, es decir, cuentas que contienen etiquetas únicas para cada submatriz.

En realizaciones alternativas, se pueden añadir parámetros de codificación adicionales, tales como el tamaño de las microesferas. Por ejemplo, el uso de cuentas de diferentes tamaños también puede permitir la reutilización de conjuntos de firmas de respuesta óptica; es decir, es posible usar microesferas de diferentes tamaños para expandir las dimensiones de codificación de las microesferas. Las matrices de fibra óptica pueden fabricarse con píxeles con diferentes diámetros o secciones transversales de fibra; como alternativa, se pueden añadir dos o más haces de fibra óptica, cada uno con diferentes secciones transversales de las fibras individuales, para formar un haz más grande; o bien, se pueden usar haces de fibra óptica con fibra de secciones transversales del mismo tamaño, pero solo con cuentas de diferentes tamaños. Con diferentes diámetros, los pocillos más grandes se pueden llenar con las microesferas más grandes y a continuación moverse hacia microesferas progresivamente más pequeñas en los pocillos más pequeños hasta que se llenen los pocillos de todos los tamaños. De esta manera, se podrían usar las mismas combinaciones de colorante/cuenta para codificar microesferas de diferentes tamaños, expandiendo así el número de diferentes secuencias de oligonucleótidos o funciones químicas presentes en la matriz. Aunque se describe para sustratos de fibra óptica, se pueden utilizar este y otros métodos descritos en este documento con otros sustratos y también con otras modalidades de fijación.

En una realización preferida, la codificación y decodificación se lleva a cabo mediante la carga secuencial de las microesferas en la matriz. Como se describe anteriormente para la codificación espacial, en esta realización, las firmas de respuesta óptica pueden "reutilizarse". En esta realización, la biblioteca de microesferas que comprende cada una un agente bioactivo diferente (o las subpoblaciones comprenden cada una un agente bioactivo diferente), se divide en una pluralidad de sub-bibliotecas; por ejemplo, dependiendo del tamaño de la matriz deseada y del número de etiquetas únicas, se pueden hacer 10 sub-bibliotecas, cada una de las cuales comprende aproximadamente el 10 % de la biblioteca total, cada sub-biblioteca que comprende aproximadamente las mismas etiquetas únicas. A continuación, la primera sub-biblioteca se añade al haz de fibra óptica que comprende los pocillos, y se determina la ubicación de cada agente bioactivo, usando su firma de respuesta óptica. A continuación se añade la segunda sub-biblioteca y nuevamente se determina la ubicación de cada firma de respuesta óptica. La señal en este caso comprenderá la "primera" firma de respuesta óptica y la "segunda" firma de respuesta óptica; comparando las dos matrices, se puede determinar la ubicación de cada cuenta en cada sub-biblioteca. De manera similar, añadir secuencialmente las tercera, cuarta, etc. sub-bibliotecas permitirá que la matriz se llene.

Por lo tanto, las matrices están hechas de un amplio espectro de funciones químicas que utilizan las composiciones descritas anteriormente que comprenden microesferas y sustratos con sitios discretos sobre una superficie.

En particular, se pueden preparar genosensores de microesferas. Estos se construyen normalmente uniendo una secuencia de sonda a la química de la superficie de la microesfera, normalmente a través de un grupo NH<sub>2</sub>. Una molécula de colorante fluorescente, por ejemplo, fluoresceína, está unida a la secuencia diana, que está en solución. El cambio de señal ópticamente interrogable se produce con la unión de las secuencias diana a la microesfera. Esto produce una mayor concentración de colorante que rodea la microesfera que en la solución en general. A continuación se enumeran unas pocas secuencias de sonda y diana demostradas, ver Ferguson, J'.A. et al. Nature Biotechnology, vol. 14 de diciembre de 1996, en la Tabla V.

Tabla V

SECUENCIAS DE Sonda	SECUENCIAS OBJETIVO
B-glo (+) (segmento de B-globina humana) 5'-NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -TT TTT TTT TCA ACT TCA TCC ACG TTC ACC-3'	B-glo (+) – CF 5'-Fluoresceína-TC AAC GTG GAT GAA GTT C-3'
IFNG (interferón gamma 1) 5'-NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -T <sub>12</sub> -TGG CTT CTC TTG GCT GTT ACT-3'	IFNG-CF 5'-Fluoresceína-AG TAA CAG CCA AGA GAA CCC AAA-3'
IL2 (interleucina-2) 5'-NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -T <sub>12</sub> -TA ACC GAA TCC CAA ACT CAC CAG-3'	IL2-CF 5'-Fluoresceína-CT GGT GAG TTT GGG ATT CTT GTA-3'

IL4 (interleucina-4) 5'-NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -T <sub>12</sub> -CC AAC TGC TTC CCC CTC TGT-3'	IL4-CF 5'-Fluoresceína AC AGA GGG GGA AGC AGT TGG-3'
IL6 (interleucina-6) 5'-NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -T <sub>12</sub> -GT TGG GTC AGG GGT GGT TAT T-3'	IL-6-CF 5'-Fluoresceína-AA TAA CCA CCC CTG ACC CAA C-3'

5 Cabe señalar además que los genosensores pueden basarse en el uso de indicadores de hibridación como etiquetas. Los indicadores de hibridación se asocian preferentemente con el ácido nucleico bicatenario, por lo general de manera reversible. Los indicadores de hibridación incluyen intercaladores y restos de unión al surco menor y/o mayor. En una realización preferida, se pueden usar intercaladores; dado que la intercalación generalmente solo ocurre en presencia de ácido nucleico bicatenario, la etiqueta solo se encenderá en presencia de hibridación diana.

10 Además de las cuentas y el sustrato, las composiciones usadas en la invención pueden incluir otros componentes, tales como fuentes de luz, componentes ópticos tales como lentes y filtros, detectores, componentes de ordenador para análisis de datos, etc.

15 En algunas realizaciones, las matrices de la presente invención se construyen de manera que la información sobre la identidad del agente bioactivo se integre en la matriz, de forma que la deposición aleatoria de las cuentas en la superficie del sustrato se pueda "descodificar" para permitir la identificación del agente bioactivo en todas las posiciones. Esto puede hacerse de varias formas.

20 En una realización preferida, las cuentas se cargan sobre el sustrato y a continuación se descodifica la matriz, antes de realizar el ensayo. Esto se hace mediante la detección de la firma de respuesta óptica asociada con la cuenta en cada sitio de la matriz al exponerlo a un analito de referencia. Esto puede hacerse de una sola vez, si se utilizan firmas ópticas únicas, o secuencialmente, como se describe en general anteriormente para la "reutilización" de conjuntos de firmas ópticas. Como alternativa, puede producirse una descodificación total o parcial después de realizar el ensayo.

25 Una vez hecho y descodificado si es necesario, las composiciones son útiles en una serie de aplicaciones. Como cuestión preliminar, las composiciones son útiles en métodos para aumentar la relación de señal/ruido en la firma de respuesta óptica característica de una matriz de sensores que tiene una subpoblación de elementos de la matriz. Los métodos comprenden a) descodificar la matriz para identificar la ubicación de cada elemento sensor dentro de cada subpoblación del sensor dentro de la matriz; b) medir la firma de respuesta óptica característica de cada elemento sensor en la matriz; c) ajustar la línea basal de la firma de respuesta óptica para cada elemento sensor en la matriz; d) sumar la firma de respuesta óptica característica ajustada a la línea basal de todos los elementos del sensor dentro de cada una de las subpoblaciones del sensor; y e) reportar la firma de respuesta óptica característica de cada subpoblación del sensor como una suma de las firmas de respuesta óptica características ajustadas a la línea basal de todos los elementos sensores dentro de cada una de las subpoblaciones. Esto puede dar como resultado un aumento en la relación de señal/ruido en un factor de al menos aproximadamente diez, prefiriéndose al menos aproximadamente 100.

40 De manera similar, las composiciones son útiles en métodos para amplificar la firma de respuesta óptica característica de una matriz de sensores que tiene subpoblaciones de elementos de matriz, que comprende: a) descodificar la matriz para identificar la ubicación de cada elemento sensor dentro de cada subpoblación del sensor dentro de la matriz; b) medir una firma de respuesta óptica característica de cada elemento sensor en la matriz; c) ajustar opcionalmente la línea basal de la firma de respuesta óptica para cada elemento sensor en la matriz; d) sumar la firma de respuesta óptica característica ajustada a la línea basal de todos los elementos del sensor dentro de cada una de las subpoblaciones del sensor; y e) reportar la firma de respuesta óptica característica de cada subpoblación del sensor como una suma de las firmas de respuesta óptica características ajustadas a la línea basal de todos los elementos sensores dentro de cada una de las subpoblaciones. En una realización preferida, la señal se amplifica en un factor de al menos aproximadamente cincuenta y el límite de detección del analito se reduce en un factor de al menos aproximadamente 100. Generalmente, se añade una muestra que contiene un analito diana (ya sea para detección del analito diana o la detección de parejas de unión del analito diana) a la matriz, en condiciones adecuadas para la unión del analito diana a al menos uno de los agentes bioactivos, es decir, condiciones fisiológicas en general. La presencia o ausencia del analito diana se detecta posteriormente. Como apreciarán los expertos en la materia, esto puede realizarse de varias formas, generalmente mediante el uso de un cambio en una señal óptica. Este cambio puede ocurrir a través de muchos mecanismos diferentes. Algunos ejemplos incluyen la unión de un analito marcado con colorante a la cuenta, la producción de una especie colorante sobre o cerca de las cuentas, la destrucción de una especie colorante existente, un cambio en la firma óptica tras la interacción del analito con el colorante sobre la cuenta, o cualquier otro evento óptico interrogable.

55 En una realización preferida, el cambio en la señal óptica se produce como resultado de la unión de un analito diana que está marcado, directa o indirectamente, con una etiqueta detectable, preferiblemente una etiqueta óptica tal

como un fluorocromo. Los ácidos nucleicos se marcan fácilmente con fluorocromos, por ejemplo durante la amplificación por PCR como se conoce en la técnica. Como alternativa, tras la unión de las secuencias diana, puede añadirse posteriormente un colorante intercalante (por ejemplo, bromuro de etidio) para señalar la presencia de la diana unida a la secuencia de la sonda. Tras la unión del analito diana a un agente bioactivo, hay una nueva señal óptica generada en ese sitio, que luego puede detectarse.

Como apreciarán los expertos en la materia, en algunas realizaciones, la presencia o ausencia del analito diana puede realizarse usando cambios en otras señales ópticas, que incluyen, pero no se limitan a, espectroscopía Raman mejorada en su superficie, resonancia de plasmón superficial, etc.

Los ensayos pueden realizarse en diferentes condiciones experimentales, como apreciarán los expertos en la materia. Se pueden incluir diferentes reactivos adicionales en los ensayos de selección. Estos incluyen reactivos como sales, proteínas neutras, por ejemplo, albúmina, detergentes, etc. que se pueden usar para facilitar la unión óptima proteína-proteína y/o reducir las interacciones no específicas o de fondo. También se pueden usar reactivos que de otro modo mejoran la eficacia del ensayo, tales como inhibidores de proteasas, inhibidores de nucleasas, agentes antimicrobianos, etc. La mezcla de componentes se puede añadir en cualquier orden que proporcione la unión requerida. Se pueden utilizar diversas etapas de bloqueo y lavado como se conoce en la técnica.

En una realización preferida, las composiciones se usan para sondear una solución de muestra para la presencia o ausencia de un analito diana. Por "analito diana" o "analito" o equivalentes gramaticales en el presente documento se entiende cualquier átomo, molécula, ion, ion molecular, compuesto o partícula que debe detectarse o evaluarse para las parejas de unión.

En la presente invención, el analito diana es un ácido nucleico. Estos ensayos son útiles en una amplia variedad de aplicaciones.

En una realización preferida, las sondas se utilizan en el diagnóstico genético. Por ejemplo, pueden prepararse sondas usando las técnicas descritas en este documento para detectar secuencias diana tales como el gen para el cáncer de colon no poliposo, el gen de cáncer de mama BRCA1, P53, que es un gen asociado con diferentes cánceres, el gen Apo E4 que indica un mayor riesgo de enfermedad de Alzheimer, que permite un examen presintomático fácil de los pacientes, mutaciones en el gen de la fibrosis quística o cualquiera de los otros bien conocidos en la técnica.

En una realización adicional, se realiza la detección viral y bacteriana. En esta realización, las sondas están diseñadas para detectar secuencias diana de diferentes bacterias y virus. Por ejemplo, las técnicas de detección de sangre actuales se basan en la detección de anticuerpos anti-VIH. Los métodos descritos en la presente memoria permiten el cribado directo de muestras clínicas para detectar secuencias de ácidos nucleicos del VIH, particularmente secuencias del VIH altamente conservadas. Además, esto permite el control directo del virus circulante dentro de un paciente como método mejorado para evaluar la eficacia de las terapias antivirales. Del mismo modo, se pueden detectar de esta manera los virus asociados con la leucemia, HTLV-I y HTLV-II. También se pueden detectar infecciones bacterianas como tuberculosis, clamidia y otras enfermedades de transmisión sexual.

En una realización preferida, los ácidos nucleicos de la invención son útiles como sondas para bacterias tóxicas en el cribado de muestras de agua y alimentos. Por ejemplo, las muestras pueden tratarse para lisar las bacterias y liberar su ácido nucleico, y a continuación sondas diseñadas para reconocer cepas bacterianas, que incluyen, entre otras, cepas patógenas como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae*, *Leishmania*, cepas enterotóxicas de *E. coli* y bacterias de la enfermedad del legionario. De forma similar, las estrategias de biorremediación pueden evaluarse usando las composiciones de la invención.

En una realización adicional, las sondas se usan para la "toma de huellas dactilares de ADN" forense para emparejar el ADN de la escena de un crimen con las muestras tomadas de víctimas y sospechosos.

En una realización adicional, se usan sondas en una matriz para la secuenciación por hibridación.

La presente invención también es útil como metodología para la detección de mutaciones o emparejamientos no coincidentes en secuencias de ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, el enfoque reciente se ha centrado en el análisis de la relación entre la variación genética y el fenotipo haciendo uso de marcadores de ADN polimórficos. El trabajo previo utilizó repeticiones cortas en tándem (STR) como marcadores posicionales polimórficos; sin embargo, el foco reciente se produce en el uso de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), que ocurren a una frecuencia promedio de más de 1 por kilobase en el ADN genómico humano. Algunos SNP, particularmente los que están en y en torno a las secuencias codificantes, son probablemente la causa directa de las variantes fenotípicas terapéuticamente relevantes. Hay una serie de polimorfismos bien conocidos que causan fenotipos clínicamente importantes; por ejemplo, las variantes apoE2/3/4 están asociadas con diferentes riesgos relativos de Alzheimer y otras enfermedades (véase Cordor et al., Science 261 (1993). Se ha demostrado que la amplificación por PCR multiplex de los loci de SNP con posterior hibridación con matrices de oligonucleótidos es un método preciso y confiable para

genotipar simultáneamente al menos cientos de SNP; véase Wang et al., Science, 280: 1077 (1998); véase también Schafer et al., Nature Biotechnology 16: 33-39 (1998). Las composiciones descritas en el presente documento pueden sustituirse fácilmente por las matrices de la técnica anterior.

5 En una realización preferida, las composiciones se usan para seleccionar agentes bioactivos para encontrar un agente que se una a, y preferiblemente modifique la función de, una molécula diana. Como anteriormente, se pueden realizar una amplia variedad de formatos de ensayo diferentes, como apreciarán los expertos en la materia. Generalmente, el analito diana para el que se desea una pareja de unión está marcado; la unión del analito diana por el agente bioactivo da como resultado el reclutamiento de la etiqueta en la cuenta, con su posterior detección.

10 En una realización preferida, la unión del agente bioactivo y el analito diana es específica; es decir, el agente bioactivo se une específicamente al analito diana. Por "unirse específicamente" en este documento se entiende que el agente se une al analito, con especificidad suficiente para diferenciar entre el analito y otros componentes o contaminantes de la muestra de prueba. Sin embargo, como apreciarán los expertos en la materia, será posible detectar analitos utilizando una unión que no sea muy específica; por ejemplo, los sistemas pueden usar diferentes ligandos de unión, por ejemplo una matriz de diferentes ligandos, y la detección de cualquier analito particular se produce mediante su "firma" de unión a un panel de ligandos de unión, similar a la manera en que funcionan las "narices electrónicas". Esto es útil particular en la detección de analitos químicos. La unión debería ser suficiente para permanecer unida en las condiciones del ensayo, incluidas las etapas de lavado para eliminar la unión no específica, aunque en algunas realizaciones, no se desean etapas de lavado; es decir, para detectar parejas de unión de baja afinidad. En algunas realizaciones, por ejemplo, en la detección de ciertas biomoléculas, las constantes de disociación del analito al ligando de unión serán menores que aproximadamente  $10^4$ - $10^6$   $M^{-1}$ , siendo preferido con menos de aproximadamente  $10^5$  a  $10^9$   $M^{-1}$  y siendo particularmente preferido de aproximadamente  $10^7$  a  $10^9$   $M^{-1}$ .

25 Los siguientes ejemplos sirven para describir más completamente la manera de usar la invención descrita anteriormente, así como para exponer los mejores modos contemplados para llevar a cabo diversos aspectos de la invención. Se entiende que estos ejemplos de ninguna manera sirven para limitar el verdadero alcance de esta invención, sino que se presentan con fines ilustrativos.

### 30 Ejemplos

Las mediciones de los datos de respuesta óptica temporal característica de la cuenta del sensor y la respuesta de la matriz de sensores a analitos de vapor específicos y energía de luz de excitación se realizaron de acuerdo con el método e instrumentación establecidos descritos por White, et al., Anal. Chem. 68: 2191-2202 (1996). En la Figura 8, un diagrama esquemático ilustra el aparato experimental y la instrumentación usados para las medidas de datos presentadas en los ejemplos 7 a 17.

40 En una medición típica, el extremo proximal 214 de un haz de fibra óptica 202 se puso en un mandril de fibra 300 y se aseguró para su visualización con un sistema de formación de imágenes basado en un microscopio Olympus. En otras realizaciones, se usó una plataforma deslizante de microscopio Olympus convencional y una abrazadera deslizante para posicionar sustratos alternativos de matriz de sensores, tales como cubreobjetos de vidrio. Se utilizó un microscopio Olympus 320 equipado con un epi-iluminador para mediciones ópticas. El microscopio 320 estaba equipado con los objetivos Olympus 20x y 40x y Zeiss 100x. Se usó un espejo dicróico DCRP Omega 560 330 para dirigir la energía de la luz de excitación filtrada desde una lámpara 340 de arco de Xenon de 75W a la matriz de sensores 100 y para permitir que la energía de la luz emitida, debido a la firma de respuesta óptica característica que proviene de cada una de las cuentas de sensor 10 en la matriz de sensores 100, se registrase por una cámara de transferencia de fotogramas CCD 310. La energía de la luz de excitación que emana de la lámpara de arco 340 se filtró con un filtro/obturador de luz de excitación integrado Omega 535 BP40 350. La energía de la luz de emisión emitida por las cuentas de sensor 10 de la matriz de sensores 100 se filtró con un filtro/obturador de luz emitida 360 Omega 640 BP20 antes de la cámara de transferencia de fotogramas CCD 310.

55 Los experimentos generalmente consisten en recopilar fotogramas de la cámara de vídeo de imágenes de respuesta de fluorescencia de las firmas de respuesta óptica características de cuentas de sensor individuales en la matriz de sensores 100 transportada por el haz de fibras ópticas 202 a su extremo proximal 214. Las imágenes de cuentas y matrices se registran con una cámara de transferencia de fotogramas CCD 310 (Modelo TE512EFT de Princeton Instruments, Trenton, NJ). Se captura un número preseleccionado de fotogramas y se envía a un sistema informático 400, que comprende una tarjeta de interfaz de cámara NUBus de Princeton Instruments instalada en un Macintosh PC Power 8100AV. La tasa de fotogramas de la cámara se puede fijar a cualquier valor deseado y, por lo general, oscila entre 80 y 250 ms/fotograma. La siguiente es una lista de las tasas de fotogramas (tiempo entre puntos de datos) usadas para obtener los datos mostrados en las Figura 9-16. La tasa de fotogramas especificada corresponde a un intervalo de tiempo específico entre los puntos de datos.

Figura	Velocidad (ms/fotograma)	Número total de fotogramas
Figura 9	135	30

Figura 10	183,3	60
Figura 11	103,3	60
Figura 12	190,6	60
Figura 13	133	60
Figura 14	155	60
Figura 15	155	60
Figura 16	124	60

Se utilizó un olfatómetro de dilución de aire convencional y un sistema 500 de administración de vapor controlado por vacío, como se conoce habitualmente y se usa en investigación olfativa y se describe en Kauer, et al., J. Physiol. 272: 495-516 (1977), para aplicar impulsos controlados de vapor de analito y gas portador de aire a un sustrato de cuentas de sensor o al extremo distal 212 de una matriz de sensores de fibra óptica 100 que contiene una matriz de cuentas de sensor 10 inmovilizadas en micropocillos 250.

Para producir una muestra de vapor saturado, generalmente, se hace pasar una corriente de gas portador de aire a través de un cartucho de 5 ml que contiene papel de filtro saturado con el analito. Las diluciones del analito se producen ajustando las velocidades de flujo relativas del vapor saturado y las corrientes del gas portador limpias. Normalmente, se usa un caudal de 100 ml/minutos para el flujo de gas combinado a la matriz de sensores. A este caudal, un pulso de 2 segundos liberaría aproximadamente 3,3 ml de vapor de analito con gas portador. En general, dependiendo de la presión de vapor del analito y del factor de dilución, los pulsos de vapor contienen entre  $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  moles de analito.

El pulso de vapor se solía administrar durante el 11° al 30° fotograma, comenzando en el 11° fotograma. La duración del pulso de vapor varió con la velocidad de fotogramas específica utilizada y, por lo general, varió entre 2 y 3 segundos. Las mediciones de control de la línea basal se realizaron con aire de alta pureza de grado Ultra Zero. Las mediciones del pulso de aire se realizaron para tener en cuenta las respuestas de las cuentas debido al gas portador de vapor.

**Procesamiento de los datos:** Después de la recopilación de una serie temporal de imágenes de cuentas de sensores o de matrices de sensores, se dibujan segmentos utilizando el software de procesamiento de imágenes IPLab (Signal Analytics, Vienna, VA) sobre cada píxel que corresponde a una fibra individual donde la fibra está acoplada a una cuenta de sensor en su extremo distal. La intensidad de fluorescencia media se midió para cada uno de estos segmentos en cada fotograma en la secuencia. Esto se hace tanto para las respuestas de pulso de vapor como para las respuestas de pulso de aire de la línea basal. Se pueden realizar promedios de múltiples carreras de cada una para mejorar la calidad de los datos cuando sea necesario. Los datos del pulso de aire se restan de los datos del pulso de vapor para restar el fondo debido solo al aire. Los datos resultantes se pueden representar para proporcionar respuestas de intensidad temporal para todas las cuentas de interés. En una realización preferida, los datos de la matriz de sensores se usan en un análisis de red neuronal según el método descrito en White, et al., Anal. Chem. 68: 2193-2202 (1996).

La manipulación de todos los datos se realiza dentro del entorno del programa IPLab utilizando *scripts* de operador simples que invocan imágenes estandarizadas o rutinas de procesamiento de datos incluidas con el software. Estas secuencias de comandos y rutinas consisten en una parte de recopilación de datos y una parte de análisis de datos.

En la parte de recopilación de datos, hay tres segmentos o bucles de la siguiente manera:

**Bucle 1.** Esto establece la fluorescencia de referencia de cada sensor. Este bucle puede acortarse o extenderse para ajustarse a tiempos de respuesta más lentos o más rápidos de cuentas de sensor o matrices de sensores específicos para ciertos analitos. Para los ejemplos 7 a 17, este bucle se estableció entre 5 y 10 fotogramas.

**Bucle 2.** Este es el bucle de exposición al vapor. Se aplica un pulso de vapor justo antes de que comience este bucle mediante un comando de *script* que envía un pulso de 5 voltios a una válvula solenoide conectada que desconecta una línea de vacío, permitiendo así que una muestra de vapor emita desde el extremo de una boquilla. Normalmente, este bucle tiene una duración de 20 fotogramas. En el Ejemplo 7, se utilizó una duración de 10 fotogramas.

**Bucle 3.** Este es un bucle de recuperación del sensor. Se envía otro pulso de activación de 5 voltios a un solenoide que vuelve a su posición inicial, lo que hace que el sistema de vacío reanude la recolección del vapor de disolvente y lo transporte para su deposición. Por lo general, este bucle tiene una duración de 30 fotogramas. En el Ejemplo 7, se utilizó una duración de 15 fotogramas.

**Análisis de datos:** En la parte del análisis de datos, los segmentos preseleccionados tomados de una imagen de "enfoco" recopilada previamente se transfieren a la secuencia de imágenes recopiladas. Estos segmentos, dibujados por el usuario, permiten medir la intensidad media del píxel en regiones particulares en todo el campo de

la imagen. Normalmente, se dibujan sobre píxeles individuales de una matriz de sensores de fibra óptica, cada uno de los cuales contiene una cuenta. A continuación el *script* introduce un bucle que recorre cada fotograma, midiendo la intensidad media del píxel dentro de cada segmento y poniendo los valores en las columnas de datos. Las columnas resultantes se pueden representar gráficamente para obtener la respuesta temporal de cada cuenta de interés. Sin embargo, antes de representarlas, las respuestas se "estandarizan" al dividir los datos para cada respuesta de la cuenta por su primer punto. Por lo tanto, todas las respuestas se pueden normalizar para comenzar con un valor de 1,0.

**Redundancia:** Como se muestra en los ejemplos, la presente invención muestra que la integración de redundancia en una matriz proporciona varias ventajas significativas, incluida la capacidad de realizar estimaciones cuantitativas de confianza sobre los datos y un aumento significativo de la sensibilidad. Por lo tanto, la presente invención utiliza redundancia de matriz. Como apreciarán los expertos en la materia, existen al menos dos tipos de redundancia que pueden integrarse en una matriz: el uso de múltiples elementos sensores idénticos (denominados en este documento "redundancia del sensor") y el uso de múltiples elementos sensores dirigidos al mismo analito diana, pero que comprenden diferentes funciones químicas (denominado en este documento "redundancia de la diana"). Por ejemplo, para la detección de ácidos nucleicos, la redundancia del sensor utiliza una pluralidad de elementos sensores tales como cuentas que comprenden ligandos de unión idénticos tales como sondas. La redundancia de la diana utiliza elementos sensores con diferentes sondas para la misma diana: una sonda puede abarcar las primeras 25 bases de la diana, una segunda sonda puede abarcar las otras 25 bases de la diana, etc. Al integrar al menos la redundancia del sensor y opcionalmente estos dos tipos de redundancia en una matriz, se obtienen beneficios significativos. Por ejemplo, se puede hacer diferentes análisis matemáticos estadísticos.

**Resumen de respuesta de cuentas:** En la presente invención, se usa redundancia del sensor. Se usa una pluralidad de cuentas, que comprenden agentes bioactivos idénticos. Es decir, cada subpoblación comprende una pluralidad de cuentas que comprenden agentes bioactivos idénticos (por ejemplo, ligandos de unión). Mediante el uso de varios elementos sensores idénticos para una matriz dada, la señal óptica de cada elemento sensor se puede combinar y ejecutar cualquier número de análisis estadísticos, como se describe a continuación. Esto se puede hacer por diferentes razones. Por ejemplo, en mediciones que varían en el tiempo, la redundancia puede reducir significativamente el ruido en el sistema. Para mediciones que no se basan en el tiempo, la redundancia puede aumentar significativamente la confianza de los datos.

Como apreciarán los expertos en la materia, el número de elementos sensores idénticos variará con la aplicación y el uso de la matriz de sensores. En general, se pueden usar de 2 a 100, prefiriéndose de 2 a 100, siendo particularmente preferidos de 2 a 50 y especialmente preferidos de 5 a 20. En general, los resultados preliminares indican que aproximadamente 10 cuentas proporcionan una ventaja suficiente, aunque para algunas aplicaciones, se pueden usar elementos sensores más idénticos.

Una vez obtenidas, las señales de respuesta óptica de una pluralidad de cuentas de sensor dentro de cada subpoblación se pueden manipular y analizar en una amplia variedad de formas, incluyendo ajuste de la línea basal, promedio, análisis de desviación típica, distribución y análisis de grupos, análisis del intervalo de confianza, pruebas de la media, etc.

En una realización preferida, la primera manipulación de las señales de respuesta óptica es un ajuste opcional de la línea basal. En un procedimiento típico, las respuestas ópticas estandarizadas se ajustan para que comiencen en un valor de 0,0 restando el número entero 1,0 de todos los puntos de datos. Hacer esto permite que los datos de la línea basal permanezcan a cero incluso cuando se suman y se cancela el ruido de la señal de respuesta aleatoria. Sin embargo, cuando la muestra es un vapor, la región temporal del bucle del pulso de vapor frecuentemente presenta un cambio característico de respuesta, ya sea positivo, negativo o neutro, antes del pulso de vapor y a menudo requiere un ajuste de la línea basal para superar el ruido asociado con la deriva en los primeros puntos de datos debido a la acumulación de carga en la cámara CCD. Si no hay deriva, la línea basal desde el primer punto de datos para cada sensor de cuenta se resta de todos los datos de respuesta para la misma cuenta. Si se observa deriva, la línea basal media de los diez primeros puntos de datos para cada sensor de cuenta se resta de todos los datos de respuesta para la misma cuenta. Al aplicar este ajuste de la línea basal, cuando se suman múltiples cuentas, se pueden amplificar mientras que la línea basal permanece en cero. Como todas las cuentas responden al mismo tiempo a la muestra (por ejemplo, el pulso de vapor), todas ven el pulso exactamente al mismo tiempo y no es necesario registrar o ajustar para superponer sus respuestas. Además, se pueden realizar otros tipos de ajuste de la línea basal, según los requisitos y la producción del sistema utilizado.

Una vez que se ha ajustado la línea basal, se pueden ejecutar varios análisis estadísticos posibles para generar parámetros estadísticos conocidos. Los análisis basados en la redundancia son conocidos y generalmente se describen en textos como Freund y Walpole, *Mathematical Statistics*, Prentice Hall, Inc. New Jersey, 1980.

7

Además, en una realización preferida, la suma de señales se realiza simplemente sumando los valores de intensidad de todas las respuestas en cada punto de tiempo, generando una nueva respuesta temporal que comprende la suma de todas las respuestas de las cuentas. Estos valores pueden estar ajustados a la línea basal o en bruto. Como para todos los análisis descritos en este documento, la suma de señales se puede realizar en tiempo real o

durante la reducción y el análisis de datos después de la adquisición de datos. En una realización, la suma de señales se realiza con un programa de hoja de cálculo comercial (Excel, Microsoft, Redmond, WA) después de recopilar los datos de respuesta óptica.

5 En una realización preferida, los datos de respuesta acumulativa se generan simplemente sumando todos los puntos de los datos en intervalos de tiempo sucesivos. Esta columna final, compuesta por la suma de todos los puntos de datos en un intervalo de tiempo particular, puede compararse o representarse con las respuestas individuales de la cuenta para determinar el grado de mejora de la señal o la mejora de la relación de señal/ruido como se muestra en las Figuras 14 y 15.

10 En una realización preferida, la media de la subpoblación (es decir, la pluralidad de cuentas idénticas) se determina usando la bien conocida Ecuación 1:

$$\mu = \sum \frac{x_i}{n}$$

15 Ecuación 1

En algunas realizaciones, la subpoblación puede redefinirse para excluir algunas cuentas si es necesario (por ejemplo, para valores atípicos obvios, como se analiza a continuación).

20 En una realización preferida, se puede determinar la desviación típica de la subpoblación, generalmente usando la Ecuación 2 (para toda la subpoblación) y la Ecuación 3 (para menos que toda la subpoblación):

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \mu)^2}{n}}$$

Ecuación 2

25

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Ecuación 3

30 En cuanto a la media, la subpoblación puede redefinirse para excluir algunas cuentas si es necesario (por ejemplo, para valores atípicos obvios, como se explica más adelante).

35 En una realización preferida, se realizan análisis estadísticos para evaluar si un punto de los datos particular tiene validez estadística dentro de una subpoblación usando técnicas que incluyen, pero no se limitan a, distribución t y análisis de agrupamiento. Esto se puede hacer para descartar estadísticamente los valores atípicos que de lo contrario pueden sesgar el resultado y aumentar la relación de señal/ruido de cualquier experimento en particular. Esto se puede hacer usando la Ecuación 4:

Ecuación 4

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{s / \sqrt{n}}$$

40 En una realización preferida, la calidad de los datos se evalúa usando intervalos de confianza, como se conoce en la técnica. Los intervalos de confianza se pueden usar para facilitar un procesamiento de datos más completo para medir la validez estadística de un resultado.

45 En una realización preferida, se usan los parámetros estadísticos de una subpoblación de cuentas para realizar pruebas de hipótesis. Una aplicación son las pruebas relativas a las medias, también llamadas pruebas de la media. En esta aplicación, se realiza la evaluación estadística para determinar si dos subpoblaciones son diferentes. Por ejemplo, una muestra podría compararse con otra muestra para cada subpoblación dentro de una matriz para determinar si la variación es estadísticamente significativa.

50 Además, las pruebas de la media también se pueden usar para diferenciar dos ensayos diferentes que comparten el mismo código. Si los dos ensayos arrojan resultados que son estadísticamente distintos entre sí, entonces las

subpoblaciones que comparten un código común se pueden distinguir entre sí sobre la base del ensayo y la prueba de la media, que se muestra a continuación en la ecuación 5:

$$z = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$$

Ecuación 5

Además, se puede analizar la distribución de miembros individuales de una subpoblación de elementos sensores. Por ejemplo, se puede evaluar una distribución de subpoblación para determinar si la distribución es binomial, de Poisson, hipergeométrica, etc.

**Redundancia de la diana:** Además de la redundancia del sensor, una realización preferida utiliza una pluralidad de elementos sensores que están dirigidos a un único analito diana pero que aun así no son idénticos. Por ejemplo, un único analito de ácido nucleico diana puede tener dos o más elementos sensores que comprenden cada uno una sonda diferente. Esto añade un nivel de confianza ya que las interacciones de unión no específicas se pueden minimizar estadísticamente. Cuando se van a evaluar analitos diana de ácido nucleico, las sondas de ácido nucleico redundantes pueden estar superpuestas, adyacentes o espacialmente separadas. Sin embargo, se prefiere que dos sondas no compitan por un único sitio de unión, por lo que se prefieren las sondas adyacentes o separadas. De forma similar, cuando se van a evaluar analitos diana proteínicos, las realizaciones preferidas utilizan agentes de unión de agentes bioactivos que se unen a diferentes partes de la diana. Por ejemplo, cuando se usan anticuerpos (o fragmentos de anticuerpos) como agentes bioactivos para la unión de proteínas diana, las realizaciones preferidas utilizan anticuerpos para diferentes epítotos.

En esta realización, se puede usar una pluralidad de diferentes elementos sensores, prefiriéndose de aproximadamente 2 a aproximadamente 20, y siendo especialmente preferido de aproximadamente 2 a aproximadamente 10, y siendo particularmente preferido de 2 a aproximadamente 5, incluidos 2, 3, 4 o 5. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, también se pueden usar más, dependiendo de la aplicación.

Como se ha indicado anteriormente, se puede ejecutar cualquier cantidad de análisis estadísticos en los datos de los sensores redundantes objetivo.

Uno de los beneficios de la suma del elemento del sensor (al que se hace referencia en este documento como "suma de cuentas" cuando se usan cuentas), es el aumento en la sensibilidad que se puede producir. Como se muestra en el Ejemplo 19, se pueden observar los límites de detección en el rango del zeptomoles.

### Ejemplos de referencia

#### Ejemplo de referencia 1

**Preparación de cuentas de sílice porosa/rojo Nilo:** Se extrajeron aproximadamente 0,5 cm<sup>3</sup> de cuentas de sílice porosa comerciales de un diámetro nominal de 3,2 micrómetros de una columna LUNA (Phenomenex, Torrance, CA). Se colocaron muestras de cuentas sobre un papel de filtro y, usando filtración a vacío, se vertieron 0,5 ml de solución de rojo Nilo (Eastman Kodak, Rochester, NY) (1 mg/ml en tolueno) sobre cuentas. El rojo Nilo fue absorbido inmediatamente por las cuentas de sílice, que se tornaron de un color púrpura intenso. Las cuentas se lavaron repetidamente con tolueno para eliminar cualquier exceso de rojo Nilo no adsorbido. Las cuentas se secaron sobre un cristal de reloj durante toda la noche. Las cuentas se pusieron entonces en micropocillos formados por ataque químico de un haz de fibra óptica de acuerdo con el método de la presente invención.

#### Ejemplo de referencia 2

**Preparación de cuentas de sílice porosa recubiertas con polímero PDPO:** Se preparó una solución silanzante a partir de 20 µl de N-octadecil-trietoxisilano en 980 µl de etanol/agua (etanol al 95 %, agua ultrapura al 5 % con pH ajustado a 4,9 con ácido acético). Las cuentas de sílice porosa LUNA del Ejemplo 1 se dispersaron en un exceso de solución de silanización durante aproximadamente 10 minutos, agitando en vórtex continuamente. Las partículas se enjuagaron tres veces con etanol y se secaron en un horno a 120 °C, durante toda la noche durante aproximadamente 12 horas.

Se preparó una solución madre de PDPO, poli (óxido de 2,6-dimetil-1,4-fenileno), (Aldrich, Milwaukee, WI) y rojo Nilo a partir de 0,09 g de PDPO y 1,0 ml de cloroformo. Después de la disolución completa del polímero, se añadió una alícuota de 100 µl de 1 mg/ml de rojo Nilo en cloroformo. La solución resultante se agitó en vórtex continuamente para una dispersión uniforme.

Se añadió exceso de PDPO/rojo Nilo a una pequeña fracción de las cuentas porosas silanizadas, aproximadamente 100 µl de solución de polímero/colorante a aproximadamente 1 mg de cuentas. La muestra se sometió a agitación en vórtex durante aproximadamente 3 horas y a continuación se lavó. Se retiró el exceso de colorante polimérico y a continuación las cuentas se lavaron repetidamente con cloruro de metileno, de dos a tres veces, seguido de un lavado con el 0,01 % de monolaurato de polioxietilen-sorbitán, Tween 20 (J. T. Baker, Cleveland, OH), en agua. Las cuentas lavadas se recogieron en una solución de Tween 20 al 0,01 %/agua ultrapura. Se puso una sola gota pequeña en el cubreobjetos de un microscopio y se dejó secar protegida de la luz.

Ejemplo de referencia 3

**Preparación de cuentas de sílice no porosa/rojo Nilo recubiertas con polímero de polisiloxano:** Cuentas de sílice no porosa de 3,1 µm disponibles en el mercado (Bangs Laboratory, Fishers, IN) se silanizaron primero en solución silanizante en exceso, una solución al 10 % en volumen de 3-(trimetoxisilil) propil metacrilato (Aldrich, Milwaukee, WI) en acetona, durante toda la noche. El exceso de solución de silanización se decantó y las cuentas se enjuagaron repetidamente, dos o tres veces, con acetona ultrapura, agitando en vórtex y centrifugando entre lavados. Las cuentas se remojaron en una solución en exceso de rojo Nilo (1 mg/ml en tolueno) durante aproximadamente 3 horas mientras se agitaba en vórtex para saturar completamente la superficie. La solución de cuentas se centrifugó y el exceso de solución de colorante se decantó. Luego se añadieron a las cuentas una mezcla de 7,9 mg de benzoin etil éter (Polysciences Inc., Warrington, PA), 250 microlitros de rojo Nilo en tolueno y 250 microlitros (copolímero de (15-20 % de acriloxipropilmetilsiloxano)-80-85 % de dimetilsiloxano (Gelest Inc., Tullytown PA). La suspensión de cuentas se agitó en vórtex para revestir uniformemente las partículas. La mezcla en suspensión resultante se añadió gota a gota a aproximadamente 100 ml de Tween 20 al 0,1 % en agua ultrapura con agitación a aproximadamente 350 rpm. La polimerización se realizó por excitación ultravioleta durante 10 segundos de duración para una exposición total de 30 segundos. La solución de muestra se agitó durante toda la noche. La suspensión se pasó a través de un tamiz de 230 micras, seguido de un tamiz de 5 µm. El filtrado se centrifugó a 3000 rpm durante aproximadamente 5 minutos y las cuentas se recogieron en tubos de centrifuga y se lavaron con Tween 20 al 0,01 % en agua ultrapura. Se puso una sola gota pequeña en el cubreobjetos de un microscopio y se dejó secar protegido de la luz.

Ejemplo de referencia 4

**Preparación de cuentas de copolímero de (15-20 % de acriloxipropilmetilsiloxano)-80-85 % de dimetilsiloxano con rojo Nilo:** Se pusieron aproximadamente 25 ml de agua ultrapura más 25 ml de etanol en un matraz de fondo redondo de 100 ml y se agitaron con una varilla de agitación a aproximadamente 350 rpm. Se preparó una mezcla de 500 µl copolímero de (15-20 % de acriloxipropilmetilsiloxano)-80-85 % de dimetilsiloxano, 200 µl de solución de rojo Nilo (1 mg/ml en clorofórmico) y 250 µl de cloruro de metileno y se añadió gota a gota a la solución agitada de agua/etanol. Se añadió una solución de 5,5 mg de AIBN, N,N=azobis-isobutil nitrilo (2,2=azobis-2-metilproprionitrilo) (Phaltz & Bauer, Inc.) en cloruro de metileno a la dispersión en agitación. La mezcla se desgasificó con argón durante aproximadamente una hora y a continuación se calentó a aproximadamente 70 grados centígrados. Después de aproximadamente tres horas de calentamiento, se añadieron a la mezcla 20 ml de Tween 20 al 0,01 % en agua ultrapura. El calentamiento y la agitación se continuaron durante aproximadamente 12 horas. La mezcla se pasó a través de un tamiz de 230 micras, y a continuación se recogieron los sólidos de la centrifugación hasta 5000 rpm. Los sólidos se lavaron dos veces con metanol y a continuación se lavaron con Tween 20 al 0,01 % en agua ultrapura. Las cuentas resultantes se recogieron en una solución de Tween 20 al 0,01 % en agua ultrapura. Se puso una sola gota de la suspensión de cuentas en el cubreobjetos de un microscopio y se dejó secar protegido de la luz.

Ejemplo de referencia 5

**Cuentas de poli (metilestireno/divinilbenceno) teñidas de rojo Nilo:** Se lavó aproximadamente 1 mg de cuentas de polímero de 3,15 µm disponibles en el mercado, 87 % de metilestireno, y 13 % de divinilbenceno con la superficie funcionalizada con amina (Bangs Laboratories, Fishers, IN) en 1 ml de metanol mediante agitación en vórtex, centrifugando a aproximadamente 3000 rpm y decantando el disolvente. Las cuentas se transfirieron a un vial marrón y se añadieron aproximadamente 100 µl de solución de rojo Nilo (1 mg/ml en tolueno). La muestra se agitó en vórtex y se puso en un agitador de muñeca para agitar durante toda la noche. La suspensión se transfirió a un tubo de microcentrifuga y se lavó con metanol hasta que el disolvente decantado fue transparente. Las cuentas se recogieron en aproximadamente 0,5 ml de una solución de Tween 20 al 0,01 % en agua ultrapura. Se puso una sola gota en el cubreobjetos de un microscopio y se deja secar protegido de la luz.

Ejemplo de referencia 6

**Cuentas de poli (metilestireno/divinilbenceno) modificadas con plastificante con rojo Nilo incorporado:** Se enjuagaron aproximadamente 1 mg de cuentas de polímero de 3,15 µm disponibles en el mercado, 87 % de metilestireno, y 13 % de divinilbenceno con su superficie funcionalizada con amina (Bangs Laboratories, Fishers, IN) con metanol según el Ejemplo 5 y se transfirieron a un vial marrón. Se añadieron aproximadamente el 2-40 % en peso de plastificante a soluciones poliméricas de plastificantes, fosfato de tritolilo (TTP), fosfato de trifenoilo (TPP) y

ftalato de dibutilo (DBP) (Aldrich, Milwaukee, WI), con solución de rojo Nilo (1 mg/ml en tolueno) a muestras de cuentas, se cubrieron, se agitaron en vórtex y a continuación se agitaron en agitador de muñeca durante aproximadamente 12 horas. Las cuentas se transfirieron a tubos de microcentrífuga y se lavaron con rojo Nilo en metanol, y a continuación repetidamente con metanol hasta que el disolvente decantado se volvió transparente. Las

5 cuentas se recogieron en una solución de Tween 20 al 0,01 % en agua ultrapura. Se puso una sola gota de la suspensión en el cubreobjetos de un microscopio y se dejó secar protegido de la luz.

Ejemplo de referencia 7

10 Las cuentas de sílice porosa preparadas por el método del Ejemplo 1 se evaluaron para determinar su firma de respuesta óptica característica al vapor de tolueno siguiendo el método experimental descrito anteriormente. Los resultados se presentan en la Figura 9, donde se muestra la respuesta óptica temporal de 62 sensores de cuentas individuales a un pulso de vapor de tolueno.

15 Ejemplo de referencia 8

Las cuentas de poli (metilestireno/divinilbenceno) preparadas por el método del Ejemplo 5 se evaluaron para determinar su firma de respuesta óptica característica al vapor de metanol. Los resultados se presentan en la Figura 10, donde se muestra la respuesta óptica temporal de 39 sensores de cuentas individuales a un pulso de vapor de

20 metanol.

Ejemplo de referencia 9

Las cuentas de copolímero de (15-20 % de acriloxipropilmetilsiloxano)-80-85 % de dimetilsiloxano preparadas por el método del Ejemplo 4 se evaluaron para determinar su firma de respuesta óptica característica para vapor de tolueno y metanol. Los resultados se presentan en la Figura 11 donde se muestran las respuestas ópticas temporales de un sensor de cuentas individual a un pulso de tolueno y a un pulso de vapor de metanol.

25

Ejemplo de referencia 10

Las cuentas de sílice porosa recubiertas con polímero de PDPO preparadas por el método del Ejemplo 2 se evaluaron para determinar su firma de respuesta óptica característica para vapor de tolueno y metanol. Los resultados se presentan en la Figura 12, donde se muestran las respuestas ópticas temporales de un sensor de cuentas individual a un pulso de tolueno y a un pulso de vapor de metanol.

30

Ejemplo de referencia 11

Se incorporaron cuentas de sílice porosa preparadas por el método del Ejemplo 1 en micropocillos atacados químicamente en el extremo distal de un haz de fibra óptica de acuerdo con el método descrito anteriormente. La matriz de sensores resultante se evaluó para determinar la firma de respuesta óptica característica de la subpoblación de cuentas a vapor de acetato de etilo. Los resultados se presentan en la Figura 13 donde se muestra la respuesta óptica temporal de 218 sensores de cuentas individuales a un pulso de vapor de acetato de etilo.

40

Ejemplo de referencia 12

La suma de señales se evaluó al analizar las mediciones experimentales realizadas en cuentas de poli (metilestireno/divinilbenceno) preparadas mediante el método del Ejemplo 5 y se analizaron mediante el método del Ejemplo 8. Los resultados se muestran en la Figura 14 donde la respuesta óptica temporal normalizada para una única cuenta de sensor, la Cuenta n.º 1, se compara con las respuestas sumadas de las 39 cuentas analizadas.

45

Como se muestra en la Figura 14, el método de suma de señales reduce significativamente el ruido experimental encontrado en una sola medición de la cuenta de sensor y proporciona una mejora sustancial, diez veces mayor, en la relación de señal/ruido de las mediciones analíticas.

50

Ejemplo de referencia 13

El método de suma de señales se evaluó al analizar las mediciones experimentales realizadas en cuentas de poli (metilestireno/divinilbenceno) preparadas por el método del Ejemplo 5 y se analizaron mediante el método del Ejemplo 8. Los resultados se muestran en la Figura 15 donde las intensidades relativas reales de la respuesta óptica temporal para cada una de las 39 cuentas de sensor se comparan con la intensidad relativa de la respuesta óptica temporal obtenida a partir de la suma de señales. Como se muestra en la Figura 15, se obtiene una mejora sustancial de la señal sumando la señal con una mejora correspondientemente significativa, hasta cien veces, en el límite de detección para analitos diana.

60

65

## Ejemplo de referencia 14

Las cuentas de sílice porosa revestidas con polisiloxano preparadas por el método del Ejemplo 3 se evaluaron para determinar su firma de respuesta óptica característica para vapor de tolueno y metanol. Los resultados se presentan en la Figura 16 donde se muestran las respuestas ópticas temporales de dos sensores de cuentas para tolueno y metanol. Los resultados mostrados en la Figura 16 demuestran la capacidad de esta subpoblación de sensores de cuentas para distinguir entre dos analitos de interés utilizando las firmas de respuesta óptica características de los sensores de cuentas para analitos específicos.

## Ejemplo de referencia 15

Una mezcla 50/50 de cuentas de sílice porosa preparadas mediante el método del Ejemplo 1 y cuentas de poli (metilestireno/divinilbenceno) preparadas por el método del Ejemplo 5 se dispersaron aleatoriamente y se incorporaron en micropocillos atacados químicamente en el extremo distal de un haz de fibra óptica como se ha descrito anteriormente. La matriz de sensores resultante se evaluó para determinar la firma de respuesta óptica característica de la subpoblación de cuentas al vapor de metanol. Se utilizó un filtro de excitación de 535 nm y un filtro de emisión de 600 nm en este experimento. Los resultados se presentan en la Figura 17, donde se muestra la respuesta óptica temporal normalizada de 3 sensores de cuentas de sílice porosa y 6 sensores de cuentas de PMS a un pulso de vapor de metanol. En este ejemplo, las formas del pico de luz emitidas características de las subpoblaciones de cuentas proporcionan una firma de respuesta característica distinguible para cada subpoblación. La Figura 17 demuestra la característica innovadora autocodificante de algunas realizaciones de la presente invención en la que la identidad y la ubicación de las cuentas se determinan en una sola medición de un analito de vapor de referencia.

## Ejemplo de referencia 16

La matriz de sensores de fibra óptica autocodificada producida por el método del Ejemplo 15 se evaluó midiendo la firma de respuesta óptica temporal característica de la sílice porosa y las subpoblaciones de cuentas del sensor PMS de la matriz en respuesta a un pulso de vapor de n-propanol. Los resultados se presentan en la Figura 18 donde se muestra la respuesta óptica temporal de 3 sensores de cuentas de sílice porosa y 6 sensores de cuentas de PMS a un pulso de vapor de n-propanol. En este ejemplo, las intensidades de luz emitidas características de las subpoblaciones de cuentas proporcionan una firma de respuesta característica distinguible para cada subpoblación. La Figura 18 demuestra las ventajas de usar la firma de respuesta óptica temporal distintiva característica de diferentes subpoblaciones de cuentas para detectar un analito específico de interés. Obsérvese que la identidad y ubicación de los sensores de cuenta en la matriz de sensores se descodificó mediante el método del Ejemplo 15. Mediante la combinación de autocodificación de la matriz de sensores por el método del Ejemplo 15 y la medición de la matriz de sensores realizada por el método del Ejemplo 16 actual, la matriz de sensores se entrenó para detectar y distinguir metanol de n-propanol.

## Ejemplo de referencia 17

La matriz de sensores de fibra óptica autocodificada producida por el método del Ejemplo 15 se evaluó midiendo la firma de respuesta óptica temporal característica de la sílice porosa y las subpoblaciones de cuentas del sensor PMS de la matriz en respuesta a un pulso de vapor de tolueno. Los resultados se presentan en la Figura 19 donde se muestra la respuesta óptica temporal de 3 sensores de cuentas de sílice porosa y 6 sensores de cuentas de PMS a un pulso de vapor de tolueno. La Figura 19 demuestra las ventajas de usar la firma de respuesta óptica temporal característica de diferentes subpoblaciones de cuentas para detectar un analito específico de interés. Obsérvese que la identidad y ubicación de los sensores de cuenta en la matriz de sensores se descodificaron mediante el método del Ejemplo 15. Mediante la combinación de descodificación de la autocodificación de la matriz de sensores por el método del Ejemplo 15, la medición de la matriz de sensores realizada por el método del Ejemplo 16, y la medición de la matriz de sensores realizada por el método del Ejemplo 17 actual, se entrenó la matriz de sensores para detectar y distinguir entre el grupo de analitos diana que comprenden metanol, n-propanol y tolueno.

## Ejemplo de referencia 18

Las muestras de sensores de cuentas PS802 producidas por el método del Ejemplo 4, sensores de cuentas de polimetilestireno/2 % de divinilbenceno producidas por el método del Ejemplo 5, y cuentas de polimetilestireno disponibles en el mercado (Bangs Laboratory, Fishers, IN) se dispersaron sobre un sustrato del cubreobjetos de un microscopio. Después del equilibrado de cada subpoblación de cuentas al aire, cada subpoblación se expuso a un pulso de vapor de tolueno saturado mientras se iluminaban las cuentas con energía de luz de excitación. Los cambios en la dimensión de la cuenta debido a la respuesta de hinchamiento de cada tipo de polímero al vapor de tolueno se controlaron usando el aparato de la Figura 7. La respuesta de la cuenta se registró filmando la imagen de fluorescencia variable en el tiempo de las cuentas y capturando los cambios en la imagen de las dimensiones de la cuenta con una cámara CCD. La Figura 20 ilustra las diferencias en la respuesta de hinchamiento de las tres subpoblaciones de cuentas comparando la imagen de fluorescencia inicial de cada tipo de cuentas en aire con la imagen posterior de cada tipo de cuentas después de la exposición a vapor de tolueno. Dichas medidas de las

características de respuesta de hinchamiento de diversos materiales candidatos a polímero son útiles en la detección previa de materiales del sensor de cuenta para su uso como elementos sensores de cuenta en la matriz de sensores autocodificados de la presente invención.

## 5 Ejemplo 19

Uso de la suma de cuentas para detección sensible. Se preparó una matriz que contenía 25 sondas de oligonucleótidos unidas a microesferas codificadas.

10 Antes de unir oligonucleótidos a las microesferas, se creó una familia de microesferas codificadas con colorante. Se usaron colorantes fluorescentes para codificar las microesferas. Para esta demostración se seleccionaron tenoitrifluoro-acetonato de europio (III)-3H<sub>2</sub>O ( $_{ex/em} = 365/615$ ) (colorante de Eu), Cy5 ( $_{ex/em} = 620/700$ ) y succinimidil éster de 5- (y -6)-carboxitetrametil-rodamina, ( $_{ex/em} = 535/580$ ) (TAM-RA, SE). Los colorantes se incorporaron explotando las propiedades químicas de las microesferas de poliestireno modificadas con amino de la siguiente manera. Se filtraron alícuotas de 200 l de la solución madre (1 ml de cuentas madre contiene  $5,8 \times 10^9$  cuentas en mertiolato al 0,01 % en agua) de microesferas de poli (metilestireno) divinilbenceno modificadas con amina de 3,1 m de diámetro (Bangs Laboratories, Inc. Carmel, IN) y se lavaron con THF seco y a continuación se pusieron en un tubo de microcentrífuga. Se añadieron 200 l de colorante tenoitrifluoroacetato de europio (III)-3H<sub>2</sub>O [colorante de Eu (Acros)] en THF a las cuentas. Se usaron concentraciones de colorante de Eu de 0, 0,001, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,5 y 1 M. La suspensión de microesferas/colorante se agitó (VWR Vortex Genie II) durante 2 horas. Las suspensiones se filtraron por separado (tipo Millipore HVLP) y se lavaron exhaustivamente con MeOH. Las cuentas se almacenaron en Tween al 0,01 % (esencial para la preparación y el almacenamiento para evitar que las cuentas se agreguen) en agua ultrapura hasta su uso.

25 Como alternativa, se realizó una codificación externa. Se enjuagaron 10 l de cuentas madre (todos los procedimientos de enjuague suponían poner el tubo de centrifuga que contenía las cuentas y la solución en una microcentrífuga a 8000 rpm durante 3 min, y el líquido sobre las cuentas se retiró usando una pipeta) con tampón BT (ácido bórico 0,1 M), NaOH 0,1 M, NaHCO<sub>3</sub> 0,13 M, Tween al 0,01 %, pH 9). Las cuentas se suspendieron en 100 l de tampón BT y a continuación se añadieron 5 l de solución de colorante [Cy5 (Amersham) o TAMRA (Molecular Probes)] en DMF. Se usaron concentraciones de Cy5 de 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,3 mM y concentraciones de TAMRA de 0,01, 0,4 y 3 mM. Las cuentas se agitaron durante 2 h, luego se enjuagaron tres veces con tampón BT y a continuación tres veces con tampón PBST (solución salina tamponada con fosfato 0,01 M, Tween al 0,01 %, pH 7,4).

35 Las microesferas de poliestireno se hinchan en tetrahidrofurano (THF) permitiendo que un colorante penetre en la microesfera y quede atrapado cuando la microesfera se contrae. Los espectros de absorción y emisión de los colorantes no se ven comprometidos dentro del entorno de la microesfera y su concentración permanece constante a lo largo del tiempo. Se prepararon ocho familias de microesferas distinguibles atrapando concentraciones variables de colorante de Eu dentro de las microesferas. Además del atrapamiento interno, la superficie modificada con amina de las microesferas permitió el acoplamiento a colorantes reactivos con aminas. A continuación, se unieron diferentes concentraciones de Cy5 y TAMRA a los grupos amina de la superficie de las ocho cuentas de colorante de Eu. Se preparó una biblioteca de 100 tipos de microesferas distinguibles espectroscópicamente usando varias combinaciones de los tres colorantes. La codificación de las microesferas se llevó a cabo antes de la unión del oligonucleótido debido a que la reacción con los colorantes reactivos con aminas después de la unión de la sonda afectó a la reacción de hibridación. Por otro lado, las sondas de oligonucleótidos en la superficie de las microesferas no se ven afectadas por la codificación interna posterior con colorante de Eu.

50 **Unión de ADN.** Después de que la biblioteca de microesferas codificadas estuviera disponible, funcionalizamos cada microesfera codificada con una sonda de ADN monocatenario diferente. Las secuencias de cada sonda se muestran en la Tabla 1. Se modificó un protocolo utilizado previamente para crear una matriz de ADN de fibra óptica de un solo núcleo para preparar los sensores de microesferas de ADN.

Las sondas de ADN se sintetizaron con un modificador 5'-amino-C6 (Glen Research) en el Departamento de Fisiología de Tufts usando un sintetizador ABI. Se disolvieron 20 nmol de la sonda de oligonucleótidos 5'-amino-terminal en 180 l de tampón de borato de sodio 0,1 M (SBB pH 8,3). La activación de oligonucleótidos se inició mediante la adición de 40 nmol de cloruro cianúrico en 40 l de acetonitrilo. Después de 1 h, el cloruro cianúrico que no había reaccionado se eliminó mediante tres ciclos de ultrafiltración centrífuga (Microcon 3, Amicon) y se recuperó en 200 l de SBB 0,1 M.

60 **Funcionalización del ADN.** Se enjuagaron 5 l de cuentas madre con tampón de fosfato 0,02 M (pH 7). Se añadieron 150 l de glutaraldehído al 5 % en tampón de fosfato a las cuentas. Las cuentas se agitaron durante 1 h y a continuación se enjuagaron tres veces con tampón de fosfato. A continuación, se añadieron 150 l de polietilenimina (PEI) al 5 % a las cuentas. Las cuentas se agitaron durante 1 h, entonces se enjuagaron tres veces con tampón de fosfato y a continuación tres veces con SBB 0,1 M (tampón de borato sódico, pH 8,3). Se añadieron 100 l de sonda de oligonucleótido activado con cloruro cianúrico 150 M en tampón SBB a las cuentas y se agitaron durante toda la noche. La solución de la sonda se retiró y se guardó para su reutilización. Las cuentas se enjuagaron tres veces con tampón SBB. Los grupos amina restantes se protegieron terminalmente con anhídrido succínico para evitar la unión

no específica. Se añadieron 100 l de anhídrido succínico 0,1 M en el 90 % de DMSO y el 10 % de SBB a las cuentas. Las cuentas se agitaron durante 1 h, entonces se enjuagaron tres veces con tampón SBB y a continuación tres veces con tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, EDTA 1 mM, NaCl 0,1 M, SDS al 0,1 %).

5 Cuando las sondas activadas con cloruro cianúrico se unieron directamente a las microesferas de poliestireno modificadas con amina, se generaron señales fluorescentes detectables mediante dianas marcadas hibridadas. Sin embargo, al modificar primero las microesferas con polietilenimina (PEI) antes de la funcionalización del ADN, la señal aumentó diez veces debido a que se amplificó el número de sitios de fijación disponibles (datos no mostrados).  
10 La unión no específica de la diana a la superficie de la microesfera funcionalizada con amina se previno protegiendo terminalmente las aminas sin reaccionar con anhídrido succínico. Las microesferas funcionalizadas con sonda codificadas resultantes pueden almacenarse durante meses y mezclarse en cualquier combinación deseada para crear o alterar la matriz de sensores de ADN.

**Sensores de fibra óptica basados en microesferas.** Recientemente, informamos de una matriz que consiste en  
15 sensores de cuentas micrométricas direccionables independientemente y distribuidos al azar, que utilizan un sustrato de fibra óptica de formación de imágenes. Este sistema empleaba fibras de formación de imágenes consistentes en seis mil fibras revestidas individualmente que se fundieron y se unieron para formar un haz coherente de 500 m de diámetro. La diferencia de composición entre el núcleo y el revestimiento de cada fibra permite que los núcleos se ataquen selectivamente, proporcionando la formación simultánea de seis mil pocillos de  
20 3,5 m de diámetro en la superficie de la punta de la fibra en cuestión de segundos. Ver Michael et al., Anal. Chem 70: 1242 (1998); Bronk et al., Anal. Chem. 67: 2750 (1995) y Pantano et al., Chem. Materiales 8: 2832 (1996).

**Formación de micropocillos.** Los haces de fibras de formación de imágenes de 500 m de diámetro que contenían  
25  $6 \times 10^4$  fibras individuales se atacaron químicamente de acuerdo con un procedimiento previamente detallado; ver Pantano et al. Chem. Materials 8: 2832 (1996).

**Formación de matriz.** Se almacenaron 5 l de cuentas funcionalizadas con sonda en 40 l de tampón TE. Después de seleccionar las microesferas funcionalizadas con sonda deseadas, se puso 1 l de cada solución de cuentas en un tubo de microcentrífuga y se agitó en vórtice. Se pusieron 0,05 l de esta mezcla en la cara distal de la fibra de  
30 formación de imágenes que contiene los micropocillos. Después de la evaporación del disolvente (aproximadamente 3 min), la punta distal de la fibra se limpia con un hisopo antiestático para eliminar el exceso de cuentas. Cuando se desea un nuevo sensor, la sonicación de la punta de la fibra durante 3 minutos regenerará el sustrato. Las cuentas individuales se depositan espontáneamente en los pocillos a medida que la gota de agua se evapora para producir una serie de miles de sensores de microesferas distribuida aleatoriamente. El exceso de microesferas se elimina de la punta de la fibra mientras que la interacción electrostática entre las cuentas y los pocillos mantiene  
35 cada microesfera en su lugar.

**Control de la formación de la matriz.** Una de las principales ventajas de este sistema es la capacidad de alterar los tipos de microesferas contenidas en una matriz. Cada mililitro de solución madre contiene aproximadamente  $6 \times 10^9$  microesferas que permiten la funcionalización de miles de millones de cuentas a la vez. Incluso después de una  
40 dilución 20x, un volumen de 1 l de solución de microesferas contiene suficientes cuentas para producir cientos de matrices diferentes. La densidad de microesferas en solución puede controlar la cantidad de pocillos ocupados. Con las soluciones diluidas, los pocillos vacíos permanecen después de la producción de la matriz inicial. Se pueden añadir microesferas adicionales con diferentes sondas a los sitios desocupados o a la solución original en cualquier momento para crear una matriz más diversa. Si se desea una selección diferente de cuentas, la sonicación de la  
45 punta de la fibra elimina todas las cuentas de los pocillos, lo que permite que se forme una nueva matriz de sensores en el mismo sustrato.

**Sistema de imagen óptica y análisis.** El acoplamiento del haz de fibras de formación de imágenes a un sistema de detección con una cámara CCD nos permite resolver cada fibra de forma independiente y, por lo tanto, la  
50 microesfera que reside en el pocillo en cada punta de la fibra, mientras se visualiza simultáneamente toda la matriz. La hibridación se visualizó usando dianas complementarias marcadas con fluorescencia. Se seleccionan las microesferas que llevan una señal fluorescente debido a una diana hibridada y se determina la identidad de la sonda en cada cuenta mediante la firma espectroscópica de las microesferas.

**Configuración del análisis y protocolo.** El sistema de formación de imágenes, descrito anteriormente, consiste en una fuente de luz, un microscopio invertido y un microscopio de epifluorescencia Olympus/cámara de dispositivo de  
55 carga acoplada (Photometrics PXL). Un mandril de fibra mantiene la fibra óptica en una posición fija, mientras que las ruedas de filtro controladas electrónicamente cambian entre la longitud de onda analítica y de codificación, lo que permite el análisis completo y la identificación de las microesferas en cuestión de minutos. Se envió luz de excitación a la punta proximal de la fibra de formación de imágenes y se capturó la emisión de las moléculas fluorescentes y se  
60 dirigió al detector de la cámara CCD. Las mediciones de fluorescencia se registraron y analizaron usando el software IPLab disponible en el mercado (Signal Analytics).

La fibra no se eliminó del sistema de imágenes durante las etapas de prueba, enjuague o regeneración. La punta proximal de la fibra se aseguró en el mandril de fibra del sistema de formación de imágenes y todas las soluciones se llevaron a la punta distal de la fibra que alojaba los sensores de microcuentas. Las imágenes obtenidas

inmediatamente antes de cada prueba mientras la punta de la fibra estaba en tampón se restaron de las imágenes de respuesta. Las señales de fondo de los pocillos vacíos se restaron de las señales generadas durante cada prueba.

- 5 **Hibridación en tiempo real.** La posición fija de cada microesfera hizo posible un estudio de hibridación en tiempo real. Una matriz de ADN que contiene cuentas idénticas se puso en el sistema de formación de imágenes. La punta distal de la fibra que lleva los sensores de la microesfera se puso en una solución diana marcada. La emisión de la diana marcada hibridante se capturó cada minuto durante varios minutos. En la pequeña región de la fibra de formación de imágenes seleccionada para este estudio, 70 microesferas mantuvieron la sonda complementaria a la diana en solución. Cada microesfera se controló de forma independiente y simultánea. Las señales de 40 cuentas se promediaron para proporcionar datos cinéticos. A concentraciones relativamente altas de la diana, la hibridación podría detectarse inmediatamente, como se ve por la pendiente pronunciada de los datos. Mientras el sensor permaneció en el sistema de imágenes, se regeneró sumergiendo la punta de la fibra en una solución de formamida a temperatura ambiente. Las mismas microesferas se analizaron varias veces colocando la fibra regenerada en la solución diana y repitiendo el experimento. Estudios consecutivos muestran que el mismo sensor se puede usar para múltiples pruebas.

- 20 Se adquirió una imagen de fluorescencia de fondo a longitudes de onda específicas de fluoresceína (excitación a 490 nm, emisión a 530 nm) con la punta distal de la fibra en tampón. La punta distal de la fibra se puso luego en 4 l de solución diana marcada con fluoresceína y se obtuvo una imagen cada minuto durante 10 minutos. Posteriormente, la fibra se sumergió en formamida al 90 % en tampón TE a temperatura ambiente (ta) para regenerar el sensor y se tomó una imagen de fondo con la fibra en tampón. La fibra se puso nuevamente en la solución diana donde se obtuvieron las imágenes durante otro intervalo de 10 minutos.

- 25 **Reproducibilidad y regenerabilidad.** La señal de las microesferas vuelve al fondo y el sensor se puede usar para múltiples análisis con resultados comparables. Se realizaron 100 ensayos del mismo sensor de matriz de ADN durante varios días. Se realizó el promedio de señales fluorescentes obtenidas después de la hibridación con una matriz que contenía dos tipos de cuentas. La baja desviación típica ejemplifica la naturaleza robusta de las microesferas de ADN. A intervalos periódicos durante la prueba de 100 ensayos, se probaron microesferas que portaban la segunda sonda en la misma matriz para ver si la regeneración afectaba su respuesta. Ambos tipos de sonda no mostraron compromiso en la respuesta durante las pruebas. Cada matriz se puede usar para múltiples pruebas, ya que se regenera rápida y fácilmente. La capacidad de reutilizar una única matriz cientos de veces aumenta significativamente el rendimiento y disminuye el coste de cada matriz.

- 35 La punta distal de la fibra se puso en 4 l de solución marcada como diana durante 5 minutos, se enjuagó con tampón TE y se obtuvo una imagen de fluorescencia durante 5 s. La punta de la fibra se sumergió luego en formamida al 90 % en TE (ta) para eliminar cualquier diana hibridada y regenerar el sensor. Este procedimiento se repitió 100 veces usando la diana IL2 y 5 veces (de forma intermitente durante las pruebas IL2) usando la diana IL6.

- 40 **Estudio cinético.** La punta de la fibra se puso en la solución diana durante un tiempo dado, se enjuagó con TE y se obtuvo una imagen de fluorescencia con el sensor en tampón. Después de la adquisición de datos, la fibra se volvió a poner en la solución diana durante un tiempo determinado, se enjuagó y se analizó en tampón. El sensor se controló a tiempos transcurridos de 10 s, 20 s, 30 s, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min y 10 min. Después de alcanzar una meseta, el sensor se regeneró sumergiéndolo en una solución de formamida al 90 % en TE (ta) y la prueba se repitió usando una concentración diferente de solución diana.

- 50 **Sensibilidad a las microesferas.** La punta distal de la fibra se puso en 4 l de la solución diana hasta que la relación de señal de hibridación a ruido fue de tres. La señal se controló después de enjuagar la punta de la fibra con tampón TE y obtener una imagen de fluorescencia durante 5 s mientras la punta de la fibra estaba en tampón. Para los ensayos de una hora, se llenó y tapó un tubo de centrífuga de 0,6 ml. Se taladró un orificio en el tapón para permitir que la punta de la fibra se ponga en la solución diana mientras se evita la evaporación.

- 55 **Sensibilidad con una cámara CCD intensificada.** Para este estudio se usaron la sonda de oligonucleótidos de fibrosis quística de 21 monómeros y el complemento con la mutación F508C (5'-TAT CAT CTG TGG TGT TTC CTA-3'). La sonda de oligonucleótidos 5'-amino-terminal se activó con un exceso de 100 veces de cloruro cianúrico. Las microesferas se incubaron con oligonucleótido activado con cloruro cianúrico 400 M. La diana marcada con fluoresceína se disolvió en tampón de fosfato sódico salino EDTA 6X (SSPE) que contenía SDS al 0,1 %. La punta distal de la fibra se puso en 10 l de solución diana durante la hibridación con agitación ocasional. La punta distal se lavó luego con 6X SSPE y se obtuvo una imagen de fluorescencia con una cámara Pentamax ICCD (Princeton Instruments) durante 1 s, mientras que la punta de la fibra estaba en 120 l de 6X SSPE.

- 65 **Preparación de ADNss de 10 a 125 pb.** Cien g de ADN de esperma (587 a 831 pares de bases) se incubaron con nucleasa S1 [3,96 U/l (Gibco-BRL)] a 37 °C durante 1 h en tampón de acetato de sodio 30 mM (pH 4,6) con cloruro de sodio 30 mM y acetato de zinc 1 mM. Después de la reacción, la enzima se eliminó de la preparación de ADN mediante extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, equilibrado a pH 8,0). Se recuperó el ADN entre los pares de bases 10 y 125 por ultrafiltración con Microcon 3 (corte de 10 pb) y Microcon 50 (corte de 125 pb).

El ADN se cuantificó con el reactivo de cuantificación de ADN monocatenario OligoGreen (Molecular Probes).

**Análisis multiplexado.** Las imágenes se obtuvieron durante 1 s y 0,5 s a longitudes de onda específicas para cada colorante de codificación. Se usaron un filtro de excitación de 365 nm y un filtro de emisión de paso largo de 600 nm para el colorante de Eu. Se usaron un filtro de excitación de 620 nm y un filtro de emisión de 670 nm para el colorante Cy5. Se utilizó un filtro de excitación de 530 nm y un filtro de emisión de 580 nm para el TAMRA. Las imágenes obtenidas en los tres pares de longitudes de onda se usaron para registrar posicionalmente cada sensor de microesferas.

La punta distal de la fibra se puso en una solución diana durante 5 minutos, se enjuagó con tampón TE, y las imágenes de fluorescencia se obtuvieron durante 5 s mientras la fibra estaba en tampón. Se dibujaron segmentos de superposición para seleccionar las cuentas que llevan una señal de hibridación usando el software IPLab. Estos segmentos de superposición se copiaron y pegaron en cada una de las imágenes de codificación y se determinó la identidad de las cuentas seleccionadas. El sensor se regeneró como se ha descrito anteriormente y este procedimiento se repitió para cada una de las soluciones diana.

**Especificidad de hibridación en un ensayo múltiple.** Para demostrar este sistema de matriz de microesferas, primero seleccionamos siete sondas usadas en trabajos previos (secuencias 1-7 de la Tabla 1, ver Figura 22). Las secuencias de ADN elegidas para la matriz se diseñaron para que fueran completamente específicas a temperatura ambiente. Las señales en dos de las tres longitudes de onda de codificación se usan para registrar posicionalmente las microesferas. Después del registro en las longitudes de onda de codificación, la matriz está lista para su uso. La punta de la fibra se sumerge en una solución diana marcada con fluorescencia. Después de un tiempo específico, la punta de la fibra se retira de la solución diana, se enjuaga con tampón y se pone en solución tampón. Las microesferas que llevan una sonda complementaria muestran una señal fluorescente debido a la diana marcada hibridada. Se observaron hibridaciones completamente específicas para siete dianas diferentes en una matriz. Las réplicas de cada tipo de cuenta ubicadas aleatoriamente dentro de la matriz producen información redundante que contribuye a la fiabilidad de la matriz. La Tabla 2 (Figura 23) muestra la precisión del sistema para identificar correctamente la diana.

También hemos demostrado la diferenciación de emparejamiento no coincidente de una sola base mediante la realización de la hibridación a 53 °C (datos no presentados). Se generan señales similares a partir de la diana marcada con fluorescencia complementaria hibridada a temperatura ambiente y a temperatura elevada. La diana marcada con fluorescencia de emparejamiento no coincidente de base única hibridada produjo un 50 % menos de señal que la diana complementaria a temperatura ambiente. A la temperatura elevada, la señal de la diana de emparejamiento no coincidente de base única hibridada estaba al nivel de fondo.

Después de la demostración inicial, se seleccionaron 25 secuencias de genes relacionados con enfermedad (oncogenes y fibrosis quística) y estados de enfermedad (expresión de linfocitos y citoquinas) que son completamente específicos a temperatura ambiente (Tabla 1). Se creó un sensor de matriz con las 25 sondas diferentes, cada una conectada a una microesfera codificada diferente. Después del registro, la matriz fue interrogada con cada una de las 25 soluciones diana como se ha descrito anteriormente con la regeneración del sensor entre cada prueba. Se ocuparon aproximadamente el 20 % (1295 de 6000) de los pocillos con un promedio de 50 repeticiones de cada tipo de cuentas en la matriz. Los datos resultantes (Tabla 3) permitieron la identificación correcta de cada solución diana.

**Hibridación a temperatura elevada.** Se creó una matriz con una fibra de 450 mm de longitud. El extremo proximal de la fibra se conectó al sistema de formación de imágenes y el extremo distal se mantuvo en un microposicionador vertical. Las temperaturas del tampón y de la diana se controlaron mediante un baño de agua. La prueba se realizó como se ha descrito anteriormente.

**Sensibilidad de las microesferas.** La sensibilidad tiene tres aspectos: volumen de muestra, concentración diana y número absoluto de moléculas diana. Cuanto menor sea el volumen requerido, menor será la necesidad de amplificar una muestra para su detección, ya que el mismo número de moléculas diana absolutas en un volumen más pequeño genera una concentración local más alta. Con este sistema se requieren volúmenes de muestra tan pequeños como 4 l dado que solo la punta de la fibra de 500 m de diámetro se sumerge en la solución. Normalmente, utilizamos volúmenes de 10 l para un manejo más fácil y para evitar la evaporación.

Con el fin de evaluar la sensibilidad de concentración de la matriz, se utilizó una cámara CCD intensificada (ICCD). La cámara está equipada con un intensificador de imagen de placa de microcanales que está acoplado ópticamente a una matriz de CCD. Al emplear la cámara ICCD, el tiempo necesario para analizar las concentraciones más bajas se redujo significativamente en relación con una cámara no intensificada. Para comparación, a 100 fM, una cámara no intensificada requirió 4 h para detectar una señal. Para determinar la sensibilidad para una diana dada, se preparó una matriz que consistía en 500 cuentas idénticas. Pensamos que la sensibilidad obtenida al observar múltiples cuentas en la matriz nos proporcionaría una ventaja de señal a fondo. Para nuestra satisfacción, esta ventaja se confirmó.

Los experimentos de sensibilidad se llevaron a cabo de la siguiente manera: la matriz se hibridó en soluciones de 10 l que contenían concentraciones progresivamente decrecientes de diana marcada. La concentración más baja evaluada fue 1 fM. En varios momentos, la matriz se extrajo de la solución de hibridación, se enjuagó y se recogió una imagen de fluorescencia. La matriz se volvió a poner en el tampón de hibridación. Después de la hibridación, la matriz se deshibridó con formamida y se tomaron cinco medidas de fondo en 6X SSPE. Los ROI de 10 o 100 cuentas en las cinco imágenes se promediaron para proporcionar el fondo promedio. Los valores de fondo promedio se restaron de las intensidades de fluorescencia de los diversos números de cuentas. Las cuentas individuales mostraron una variabilidad significativa de modo que no fue posible determinar si una señal estaba presente o no. Por otro lado, las señales de suma de múltiples cuentas proporcionan señales detectables. La señal promedio de diez cuentas dio un 7 % de CV, mientras que 100 cuentas proporcionaron valores promedio más precisos con un 3 % de CV. Los resultados de tres grupos representativos de diez cuentas para la diana complementaria y dos dianas no complementarias se presentan en la Tabla 5. El tiempo de hibridación se determinó cuando la señal era más de tres veces la desviación típica de las señales de fondo ( $> 3dt$ ). Utilizando este criterio, el sistema de microesfera-fibra óptica es capaz de detectar una solución diana de 1 fM usando un volumen de 10 l en 1 hora.

Se seleccionaron y controlaron 10 y 100 cuentas de un total de 500 cuentas en la matriz. En una solución diana 1 fM, 10 l contienen aproximadamente 6000 moléculas de ADN. Con 500 cuentas idénticas en la matriz que proporcionan una señal, se esperaría que cada cuenta contenga, en promedio, aproximadamente 12 moléculas diana marcadas en su superficie. Para certificar con confianza la generación de la señal, se necesitaba una señal promedio de al menos diez cuentas. Por lo tanto, este sistema puede dar señal suficiente con solo 120 moléculas.

La Tabla 4 muestra la especificidad de la matriz de oligonucleótidos F508C a concentraciones diana de 1 fM. Cada diana se analizó tres veces. La señal de unión no específica siempre fue menos de tres veces la dt del fondo. La hibridación de la solución diana 1 fM también se controló usando microesferas preparadas con 4 veces el oligonucleótido activado con cloruro cianúrico diluido. En este caso, no se obtuvo señal después de 1 h, lo que demuestra que la cantidad de sonda en la superficie de las microesferas juega un papel importante en la sensibilidad.

Los análisis se realizaron en presencia de ADN de esperma de salmón monocatenario [587 a 831 pares de bases (Sigma)]. Con hasta 10 ng de ADN espermático, no hubo inhibición observable en la hibridación diana. Los análisis también se realizaron con 10 ng de ADN de esperma de longitudes más cortas (10 a 125 pares de bases). En este caso, se inhibió la hibridación de solución diana 1 y 10 fM. Sin embargo, se pudo observar la misma señal ( $> 3dt$ ) con un tiempo de incubación adicional de 30 minutos más que los valores dados en la Tabla 3.

Dado que se usó fluoresceína para marcar los dianas de ADN, se seleccionaron colorantes de codificación con propiedades espectrales que no se superpusieran con el espectro de la fluoresceína. La unión covalente de estos colorantes a la superficie de las microesferas funcionalizadas con aminas produjo señales estables y reproducibles. Desafortunadamente, dicha codificación de superficie reduce la cantidad de aminas disponibles para la sonda de oligonucleótido activada por cloruro cianúrico. Por lo tanto, las concentraciones de los colorantes se optimizaron para permitir señales suficientes tanto de los colorantes de codificación como de la diana hibridada. El número finito de grupos amino de superficie reduce el rango y el número de combinaciones de colorante que se pueden generar con un esquema de etiquetado externo. Para aumentar el número de microesferas codificadas, los colorantes también pueden quedar atrapados dentro de la cuenta. Los colorantes de lantánidos son adecuados para dicha codificación interna. Los espectros de los colorantes no se ven comprometidos y su intensidad permanece constante una vez dentro de la microesfera.

Las secuencias de ADN empleadas en este trabajo desempeñan un papel importante en el sistema inmunitario. No solo es importante la detección de estas secuencias, sino que la cuantificación de su expresión puede proporcionar pistas relevantes en el patrón de expresión durante diferentes estados de enfermedad. La competencia entre las diana marcadas y no marcadas y las tasas cinéticas de hibridación son métodos utilizados para cuantificar analitos de interés. Los emparejamientos no coincidentes de base única también son un área importante en la investigación genómica. La matriz de fibra óptica de microesferas discrimina por completo entre emparejamientos no coincidentes de pares de bases únicos a temperaturas elevadas.

Esta micromatriz tiene el tiempo de ensayo total más corto en comparación con otros sistemas de análisis de ADN de alta densidad y puede controlar la hibridación directamente en la solución diana. La alta densidad de las sondas en cada cuenta y el pequeño tamaño de la cuenta contribuyen al corto tiempo de análisis y la sensibilidad del sistema (Tabla 1). Las muestras de ADN actualmente requieren amplificación por PCR para su análisis. La PCR convencional comienza con  $10^2$  a  $10^5$  copias de molde. La matriz de microcuentas de ADN es capaz de detectar 6000 moléculas diana. Este resultado muestra que la detección de ADN puede realizarse sin amplificación por PCR. Al principio, este resultado parece desafiar la lógica; se emplean una fuente de luz blanca convencional, una cámara y aparatos ópticos. Este nivel de sensibilidad generalmente requiere láser, óptica confocal y fotodiodos de avalancha. Sin embargo, si consideramos que 12 moléculas confinadas a un volumen de pocillo (cuenta y líquido) de aproximadamente 30 fl proporcionan una concentración local de 1 nM, es fácil entender por qué somos capaces de detectar un número tan pequeño de moléculas. Pueden detectarse fácilmente concentraciones nanomolares de fluorescencia con el sistema óptico. Por lo tanto, confinar un pequeño número de moléculas a un pequeño volumen

5 reduce la incertidumbre de encontrar dichos bajos números absolutos de moléculas al proporcionar una concentración local relativamente alta. Las repeticiones de cuentas mejoran aún más el nivel de confianza. Las hebras más largas de ADN que normalmente están en el ADN molde no afectaron la sensibilidad del sistema. Se puede concluir que se puede determinar la presencia de una secuencia diana en una solución de ADN genómico sin amplificación por PCR.

10 La micromatriz de ADN presentada en este documento tiene tamaños de características más pequeños y densidades de empaquetamiento más altas en comparación con otras matrices de ADN. Hemos demostrado la micromatriz de fibra óptica utilizando una fibra de formación de imágenes de 500 m de diámetro con un diámetro de pocillo de 3,5 m. Las fibras también se han reducido gradualmente para producir pocillos de escala nanométrica que sirven como hospedadores para cuentas de diámetro nanométrico. Usando fibras más largas, se puede llevar la punta del sensor de micromatrices a la muestra y se puede usar para probar secuencialmente múltiples soluciones. Utilizando las capacidades de detección remota de la fibra de formación de imágenes, potencialmente se pueden utilizar matrices con dimensiones de nanómetros para el análisis intracelular directo.

15 Las ventajas de esta matriz de ADN de alta resolución basada en microesferas de alta densidad y tamaño micrométrico distribuida aleatoriamente incluyen la producción rentable de la matriz de microcuentas en segundos, análisis de alto rendimiento, fácil reemplazo o adición con otras microesferas cuando se desean diferentes pruebas y la fácil regeneración del sensor y el sustrato. Además, la matriz se puede llevar a la solución de muestra en lugar de llevar la solución a la matriz. Actualmente estamos trabajando en mejorar la sensibilidad del sistema para reducir

20 aún más los requisitos de amplificación. Con las modificaciones apropiadas, este enfoque general puede aplicarse a la fabricación de bibliotecas que contienen péptidos combinatorios, anticuerpos y otras moléculas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para analizar datos de señal obtenidos a partir de una matriz para la unión de un analito diana, comprendiendo dicho método:
- 5
- a) proporcionar una matriz que comprende una primera subpoblación y una segunda subpoblación de cuentas distribuidas sobre una superficie de un sustrato, comprendiendo dichas cuentas sondas de ácido nucleico, en donde las cuentas en dicha primera subpoblación son diferentes de las cuentas en dicha segunda subpoblación y en donde cada una de la primera y la segunda subpoblaciones comprende una pluralidad de cuentas que comprenden sondas de ácido nucleico idénticas;
- 10
- b) proporcionar a dicha matriz un analito diana, en donde dicho analito diana es un ácido nucleico y se une a la primera subpoblación de elementos sensores y/o a la segunda población de elementos sensores;
- c) obtener señales de respuestas ópticas de una pluralidad de cuentas dentro de dicha primera subpoblación y/o dentro de dicha segunda subpoblación; y
- 15
- d) analizar estadísticamente las señales de respuesta obtenidas a partir de dicha primera subpoblación de cuentas y/o de dicha segunda subpoblación de cuentas, para hacer una estimación cuantitativa de la confianza acerca de los datos.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el analito diana se une tanto a la primera subpoblación de cuentas como a la segunda subpoblación de cuentas.
- 20
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además realizar un ajuste de la línea basal en dichas señales de respuesta óptica.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de analizar estadísticamente comprende generar un intervalo de confianza.
- 25
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además determinar cuentas de valores atípicos y excluir dichas cuentas de valores atípicos de dicho análisis.
- 30
6. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el sitio de unión para las sondas de ácido nucleico de dicha primera subpoblación en dicho analito diana se solapa con el sitio de unión para las sondas de ácido nucleico de dicha segunda subpoblación.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el sitio de unión para las sondas de ácido nucleico de dicha primera subpoblación en dicho analito diana es adyacente al sitio de unión para las sondas de ácido nucleico de dicha segunda subpoblación.
- 35
8. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el sitio de unión para las sondas de ácido nucleico de dicha primera subpoblación en dicho analito diana está espacialmente separado del sitio de unión para las sondas de ácido nucleico de dicha segunda subpoblación.
- 40
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicha primera subpoblación y dicha segunda subpoblación de elementos sensores están distribuidos aleatoriamente en dicha superficie de la matriz, y en donde el método comprende identificar la ubicación de las cuentas en la matriz.
- 45

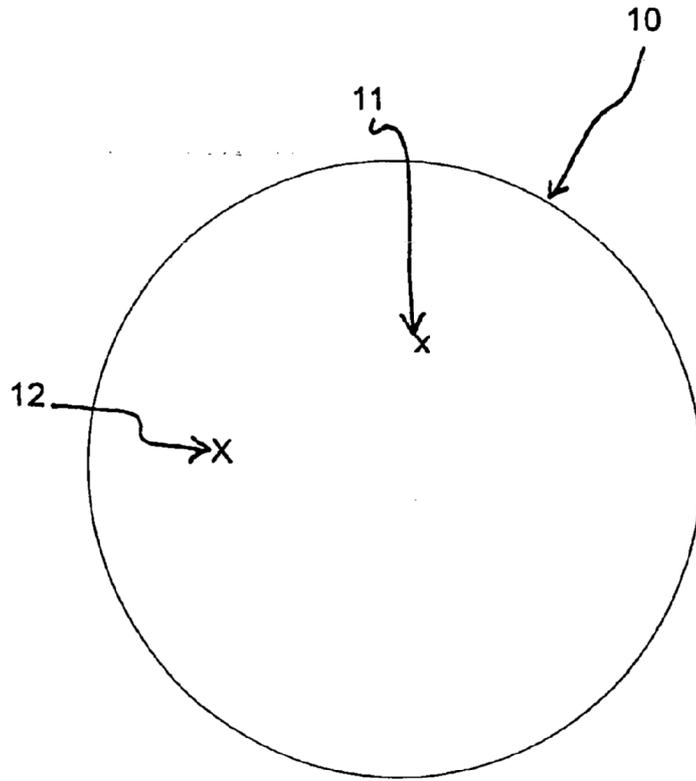


Fig. 1

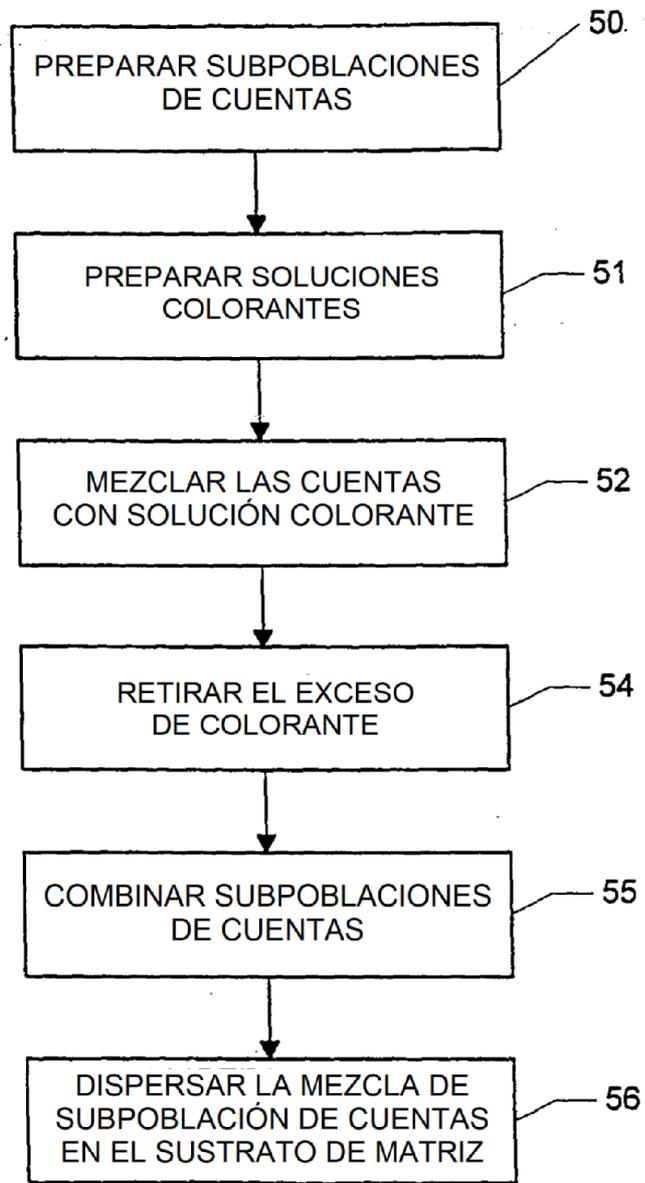


Fig. 2

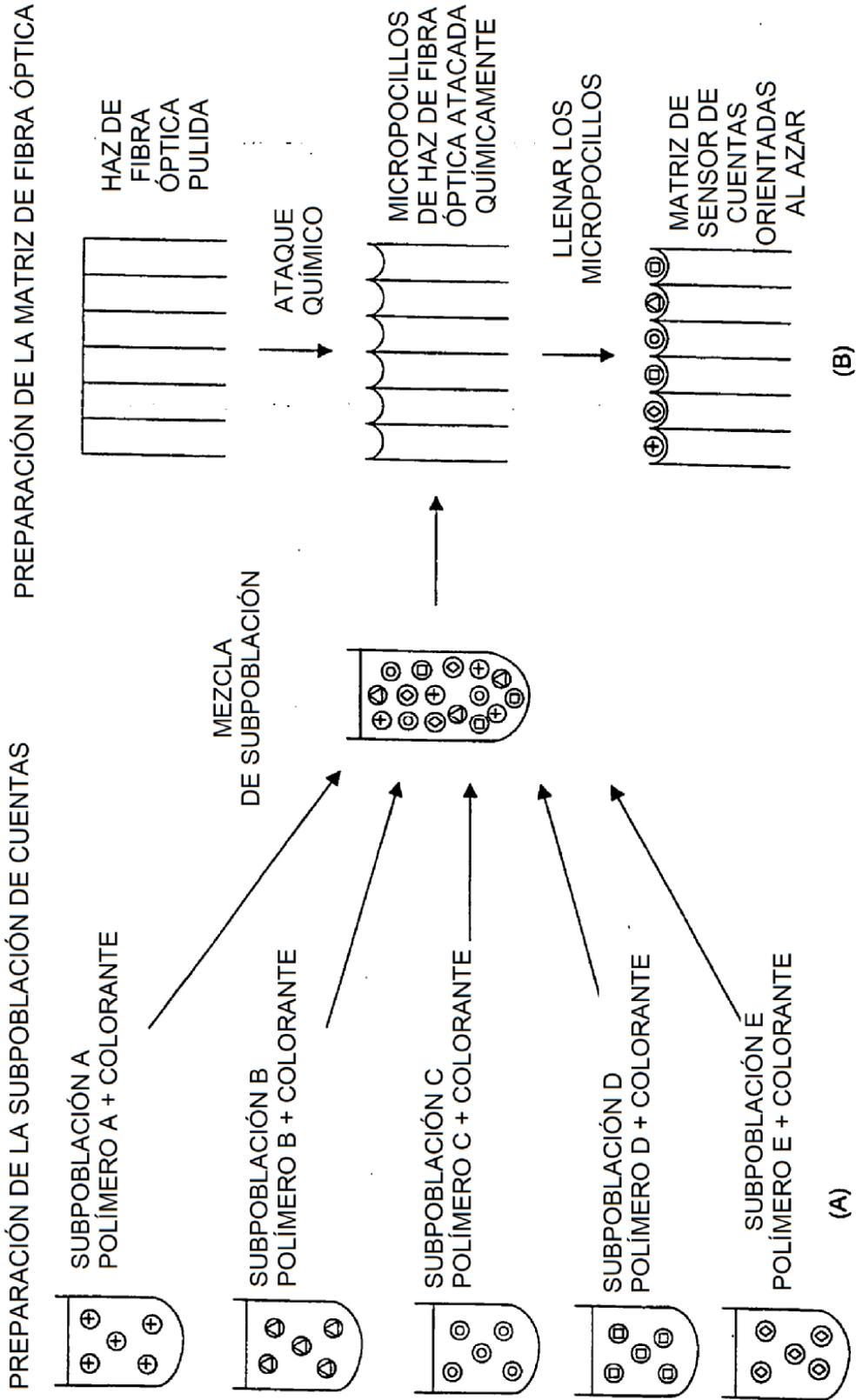


Fig. 3

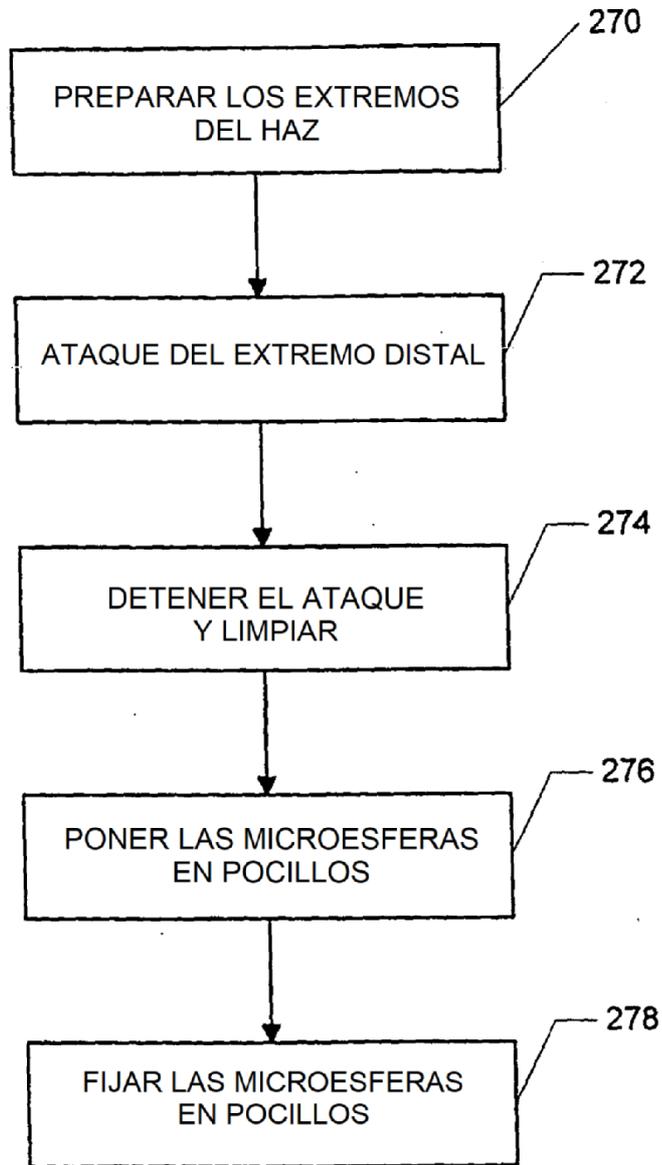
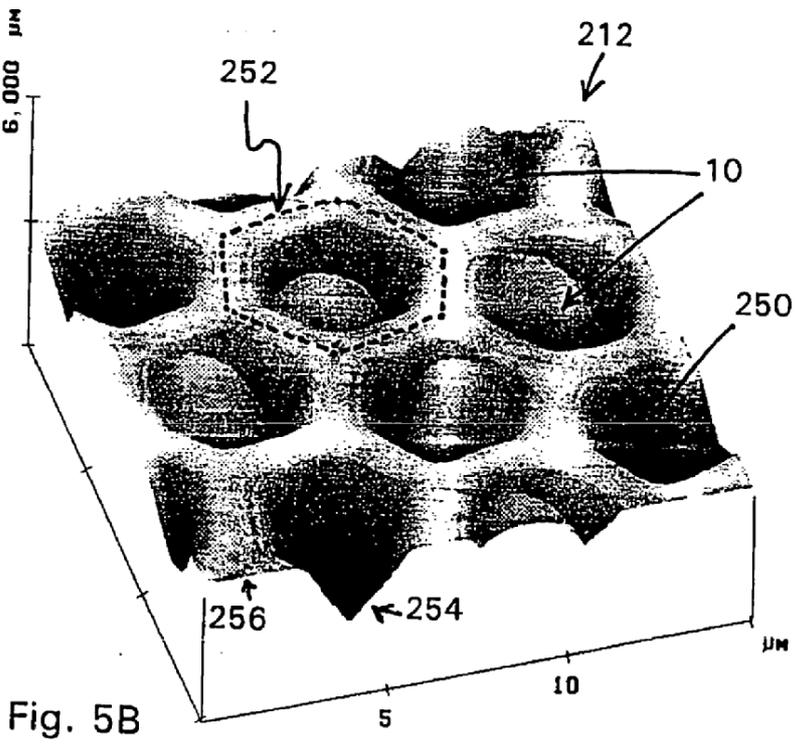
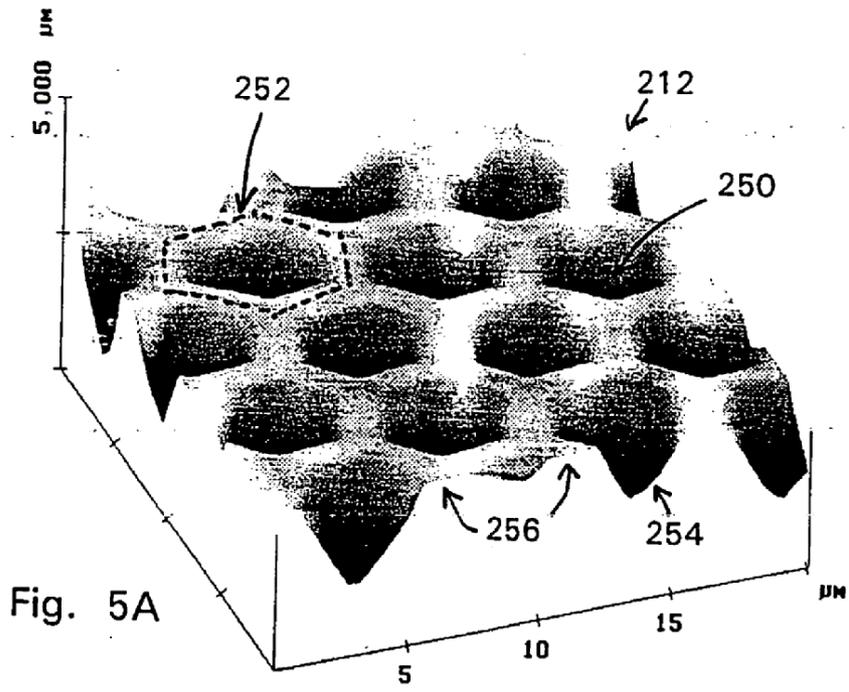


Fig. 4



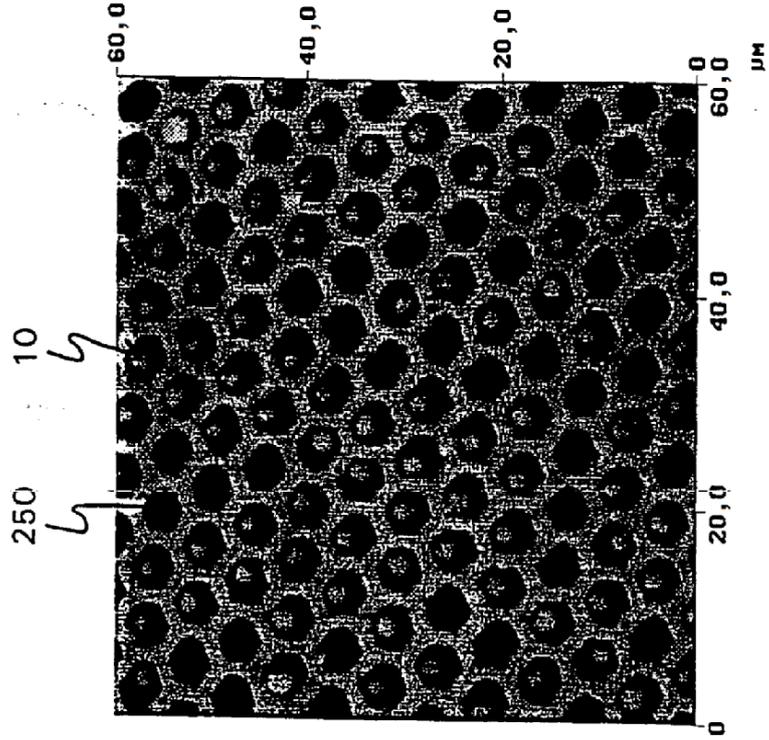


Fig. 6B

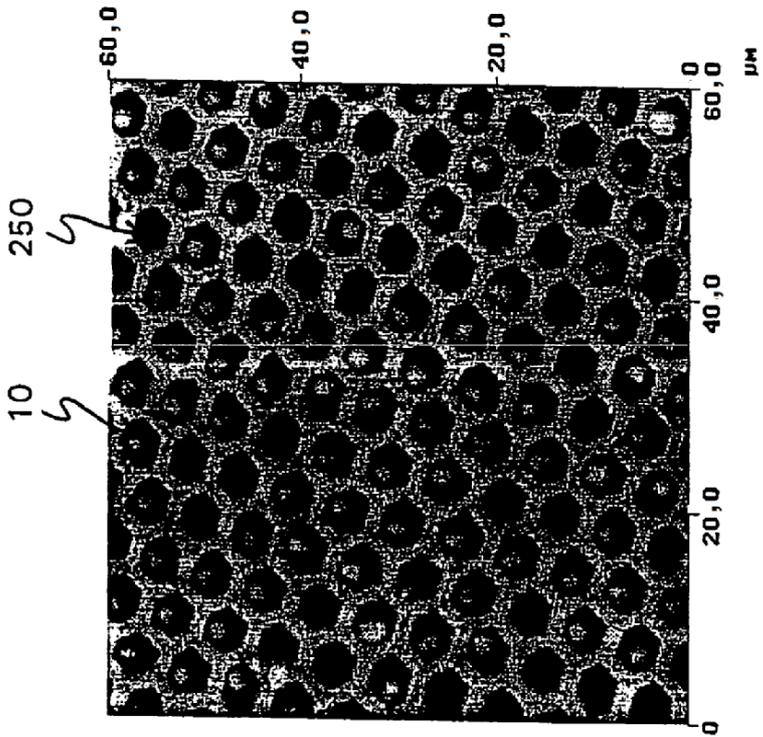


Fig. 6A

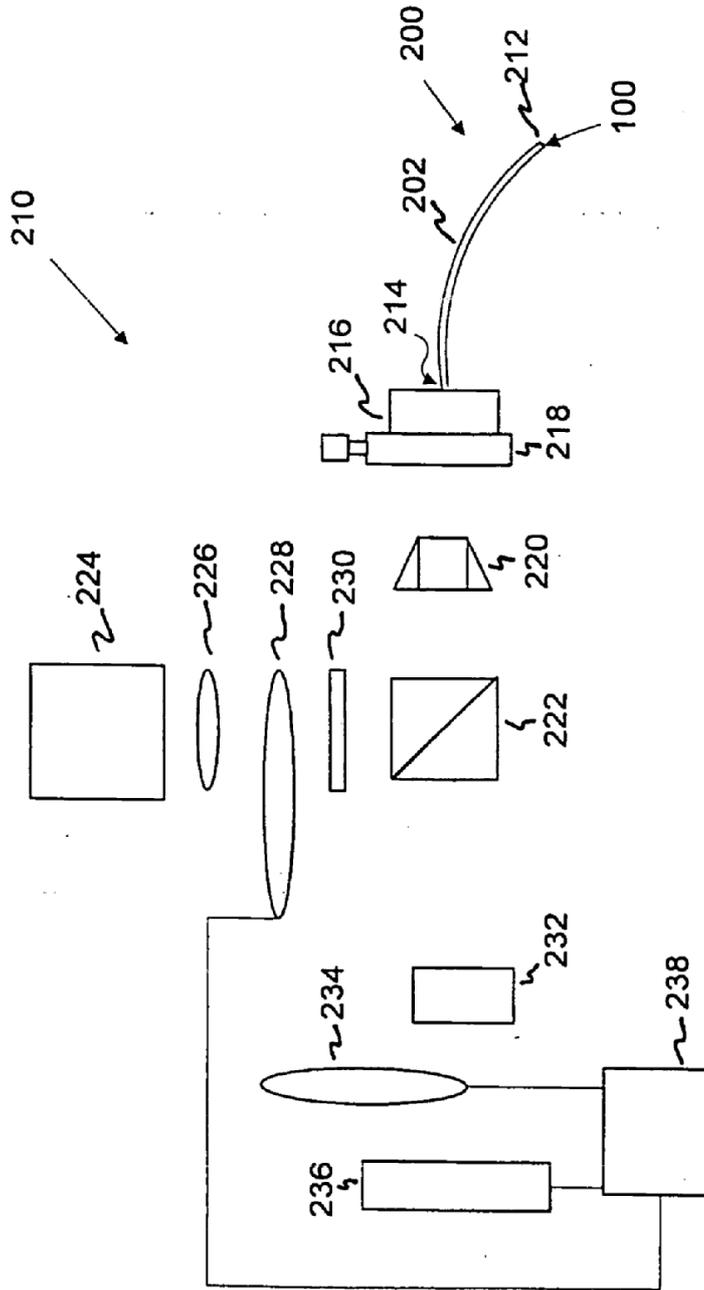


Fig. 7

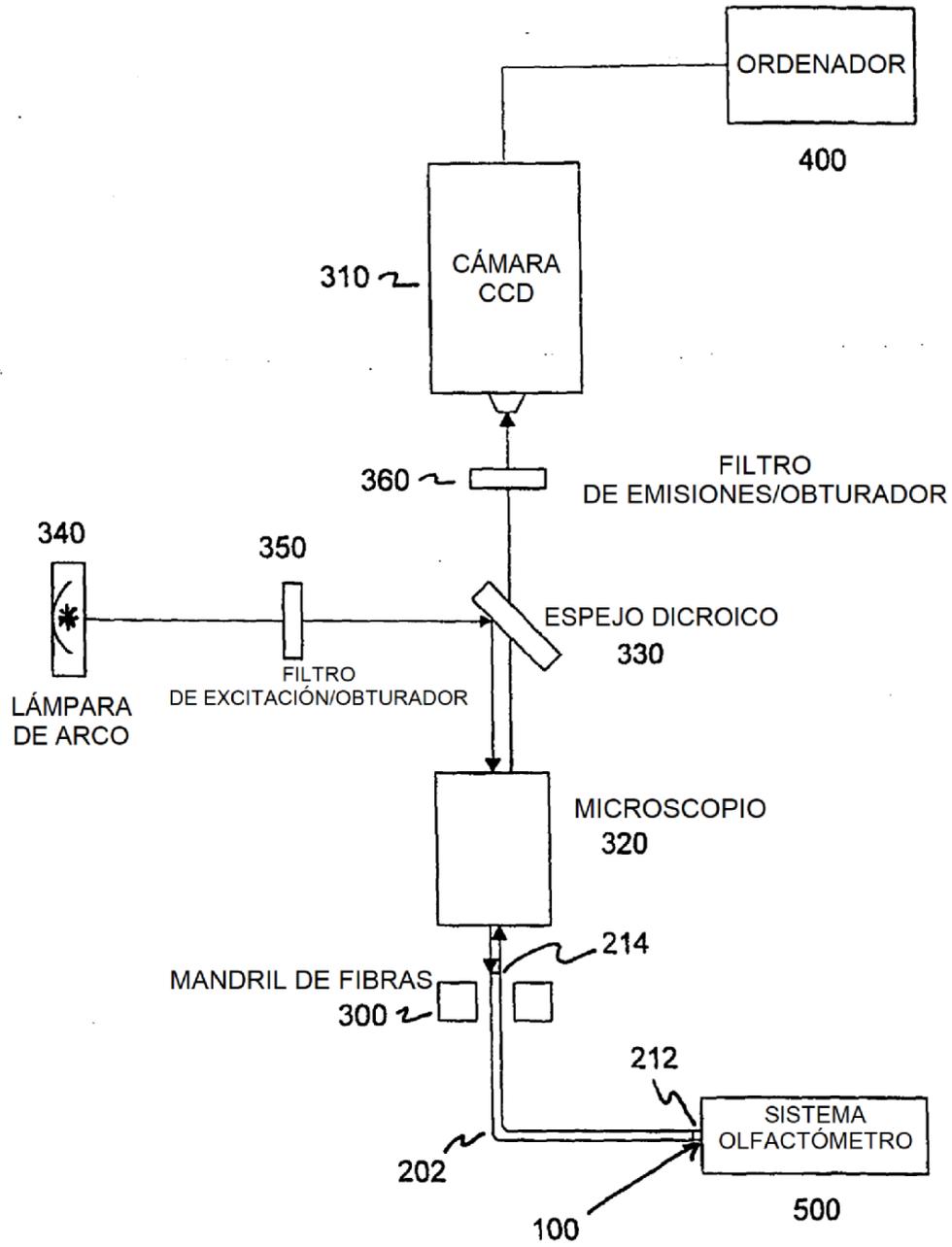


Fig. 8

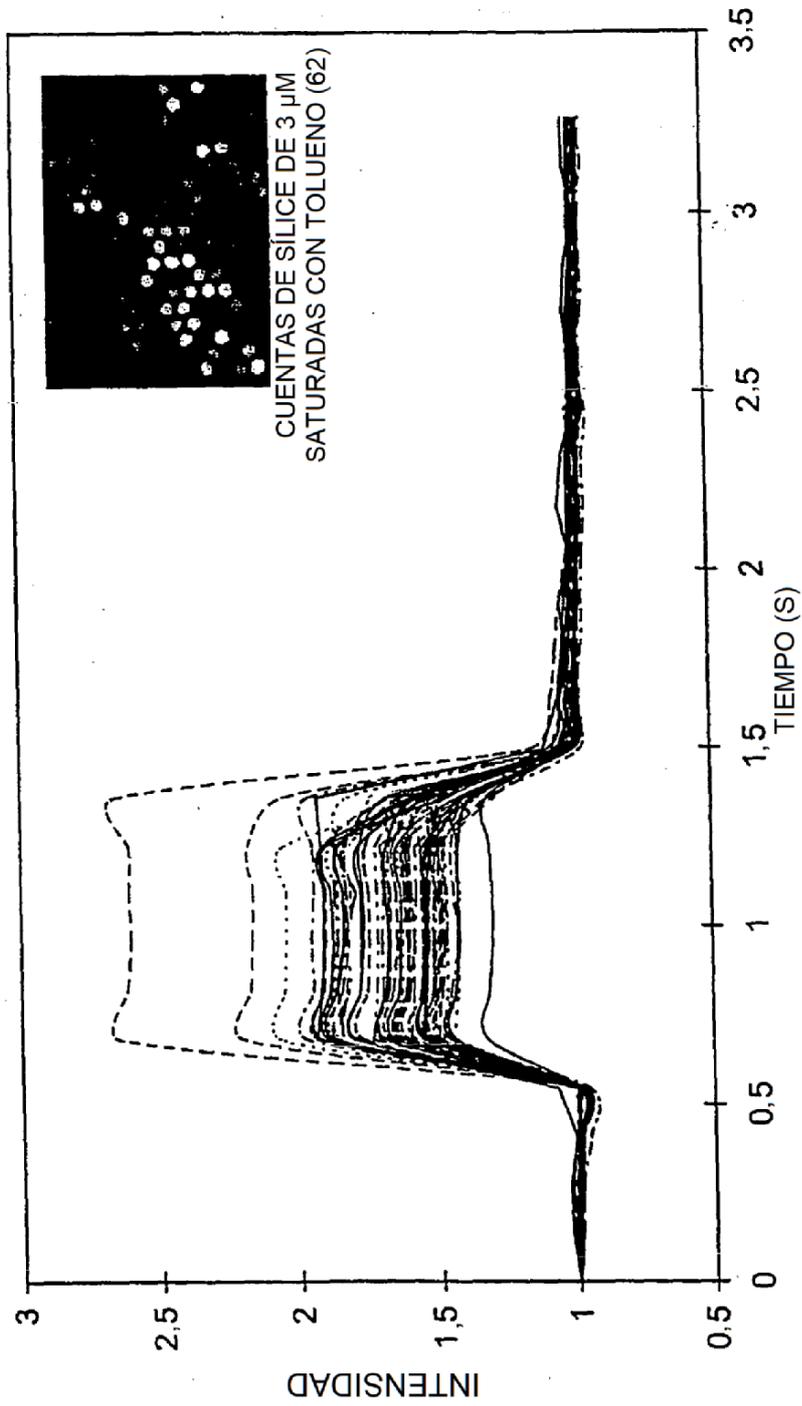


Fig. 9

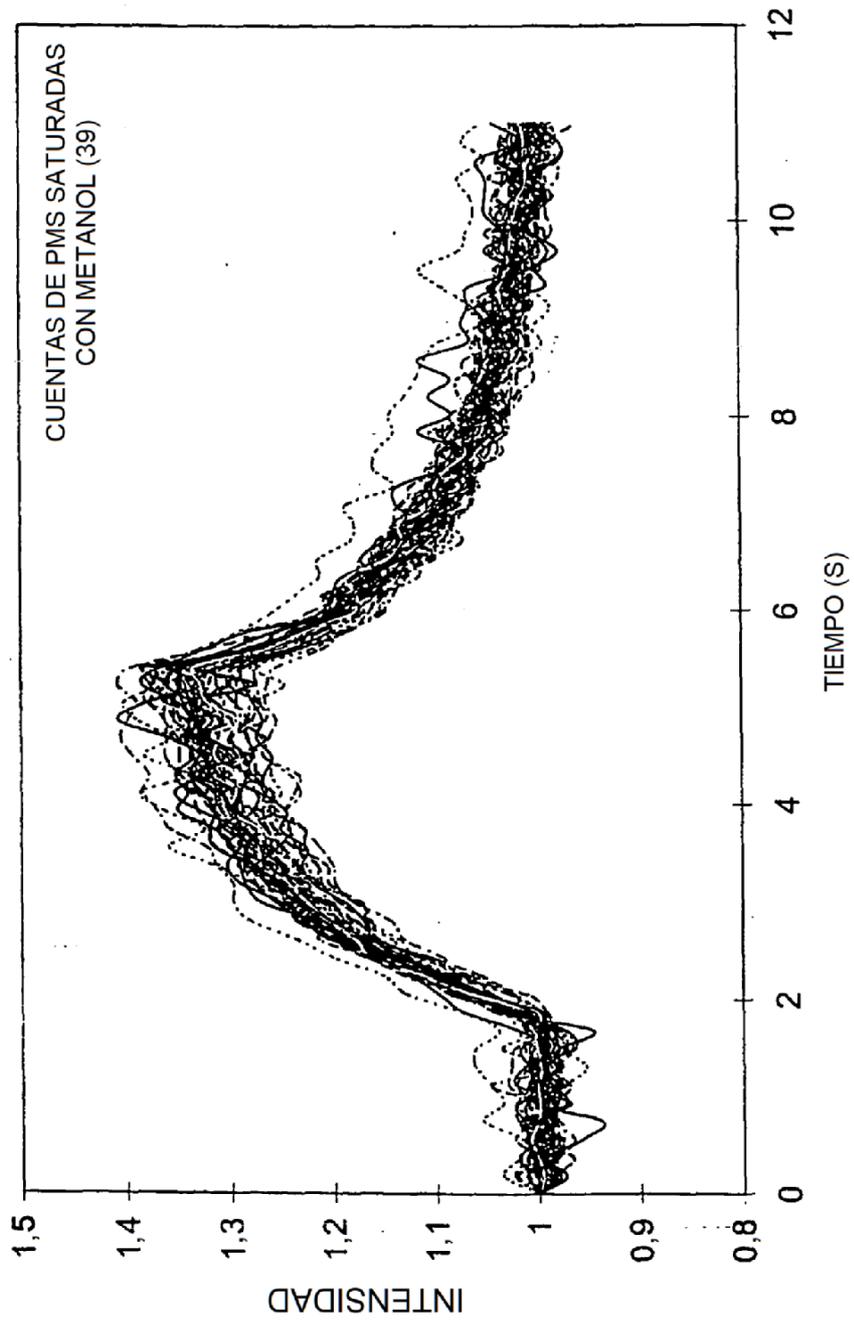


Fig. 10

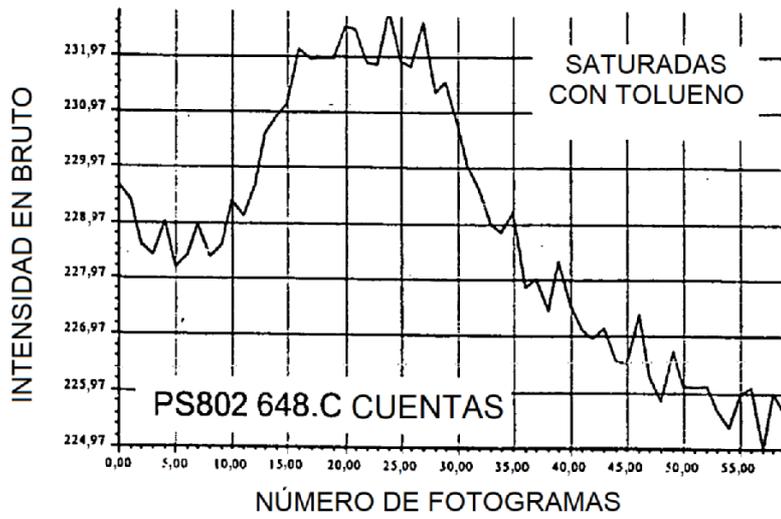


Fig. 11A

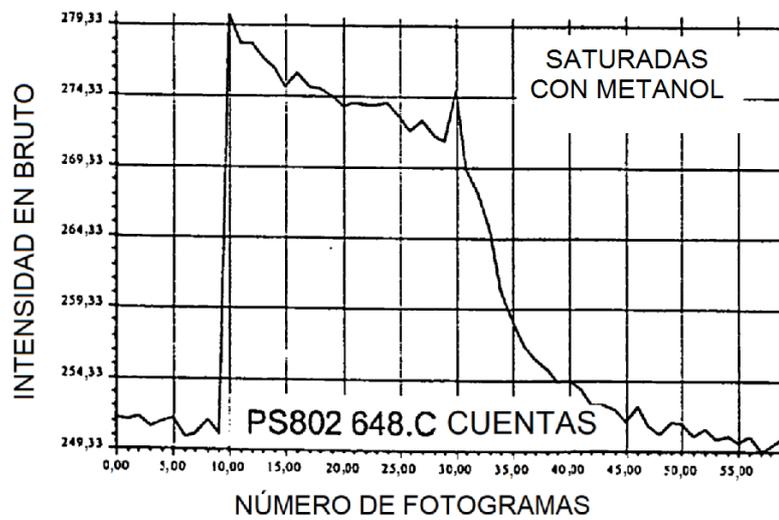


Fig. 11B

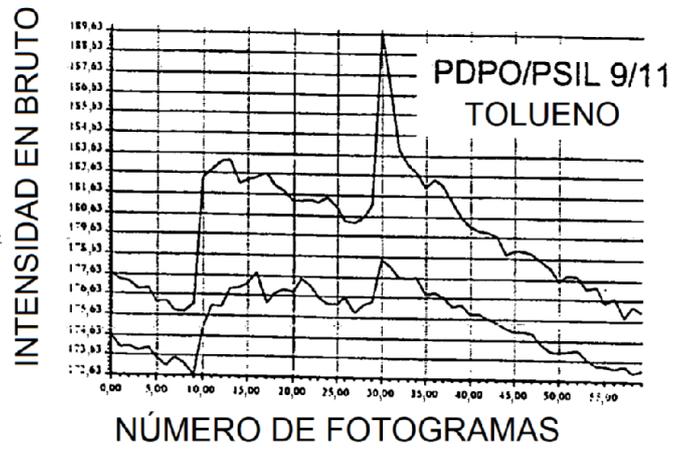


Fig. 12A

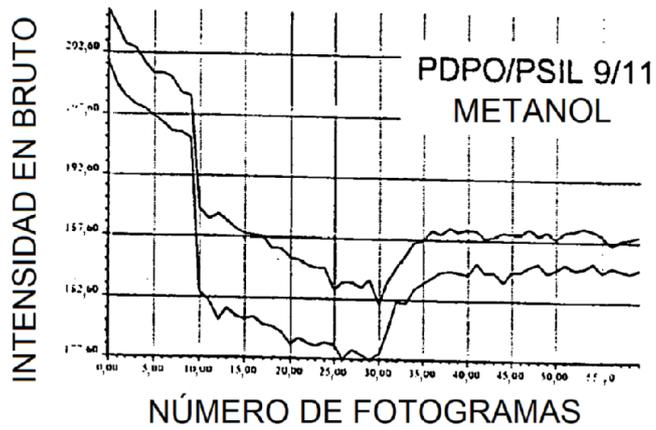


Fig. 12B

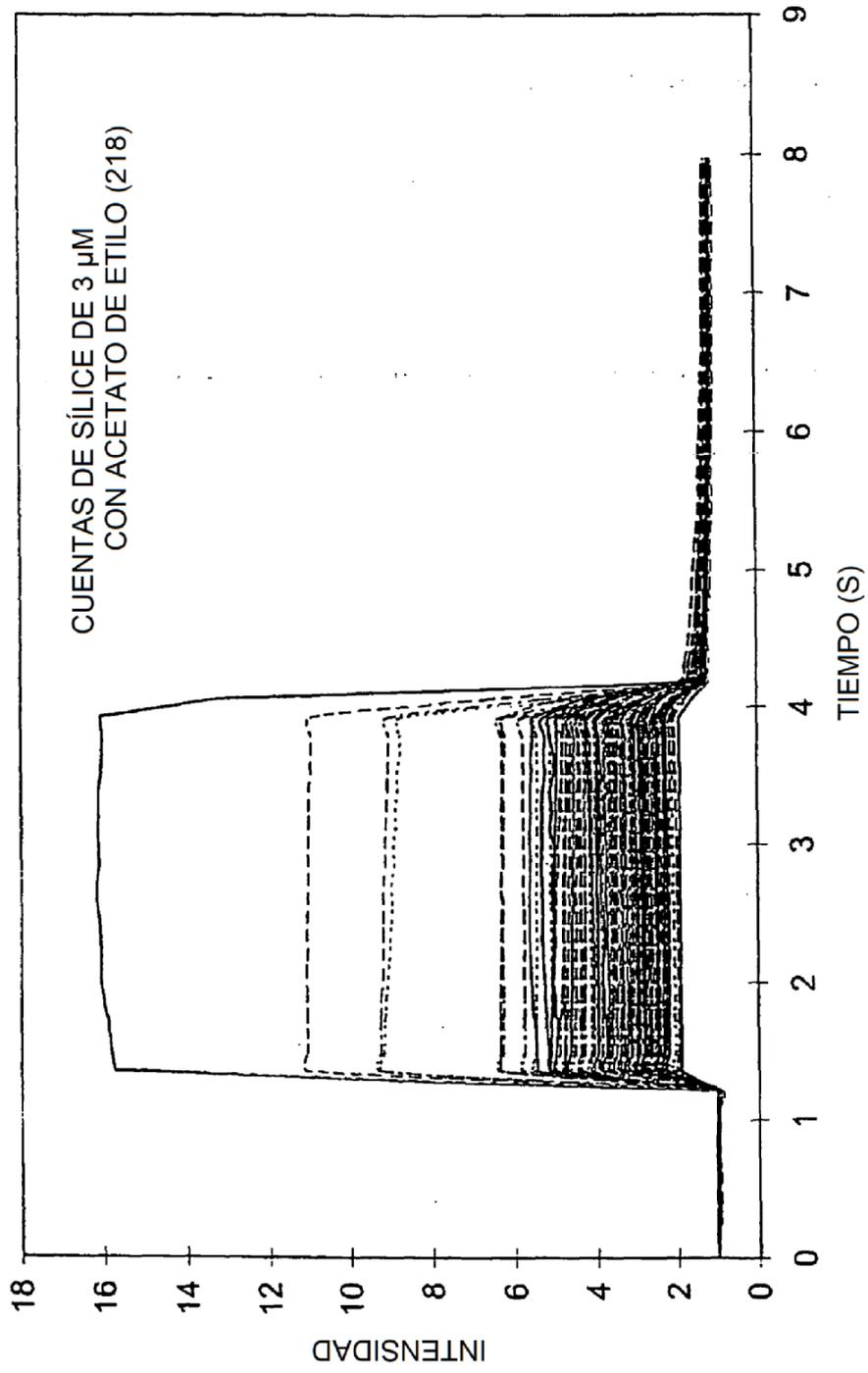


Fig. 13

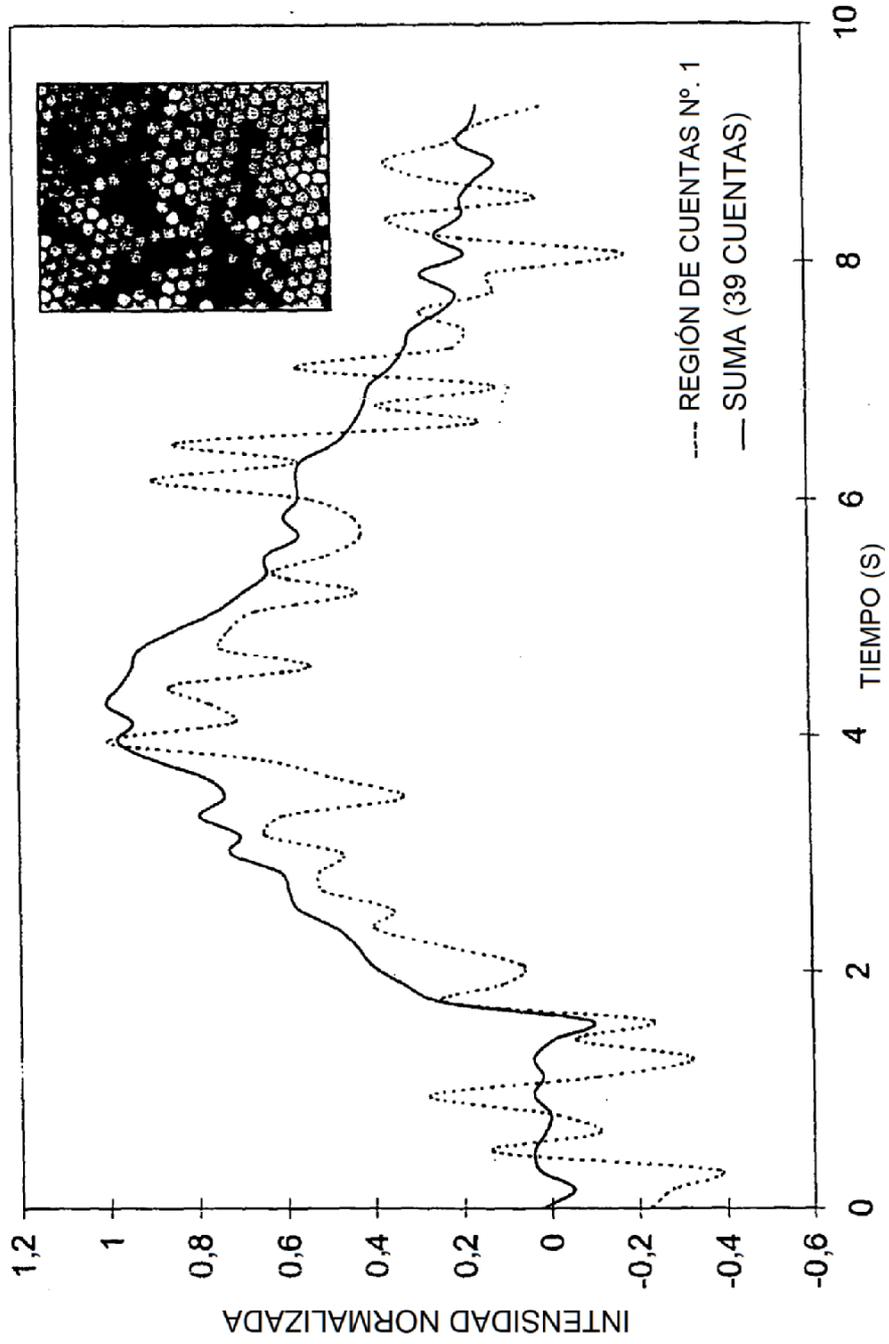


Fig. 14

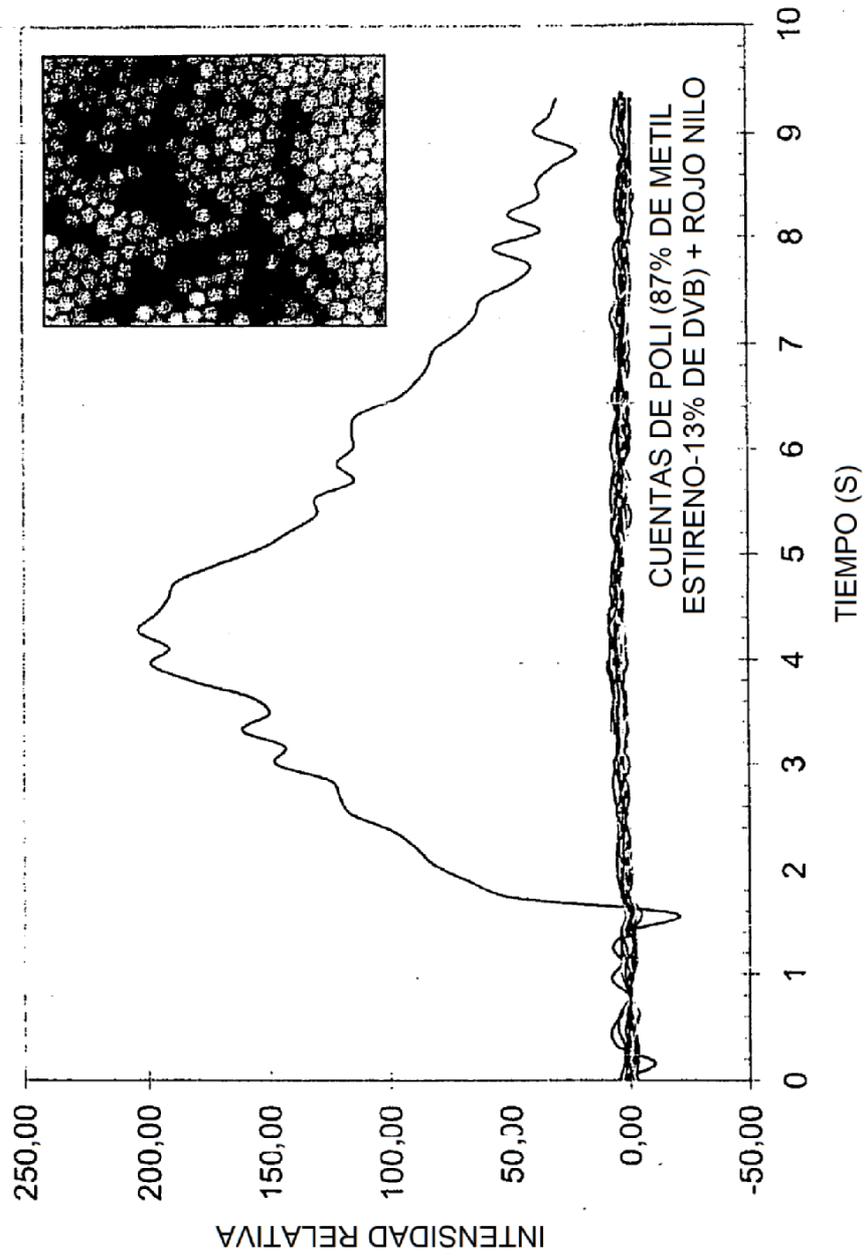


Fig. 15

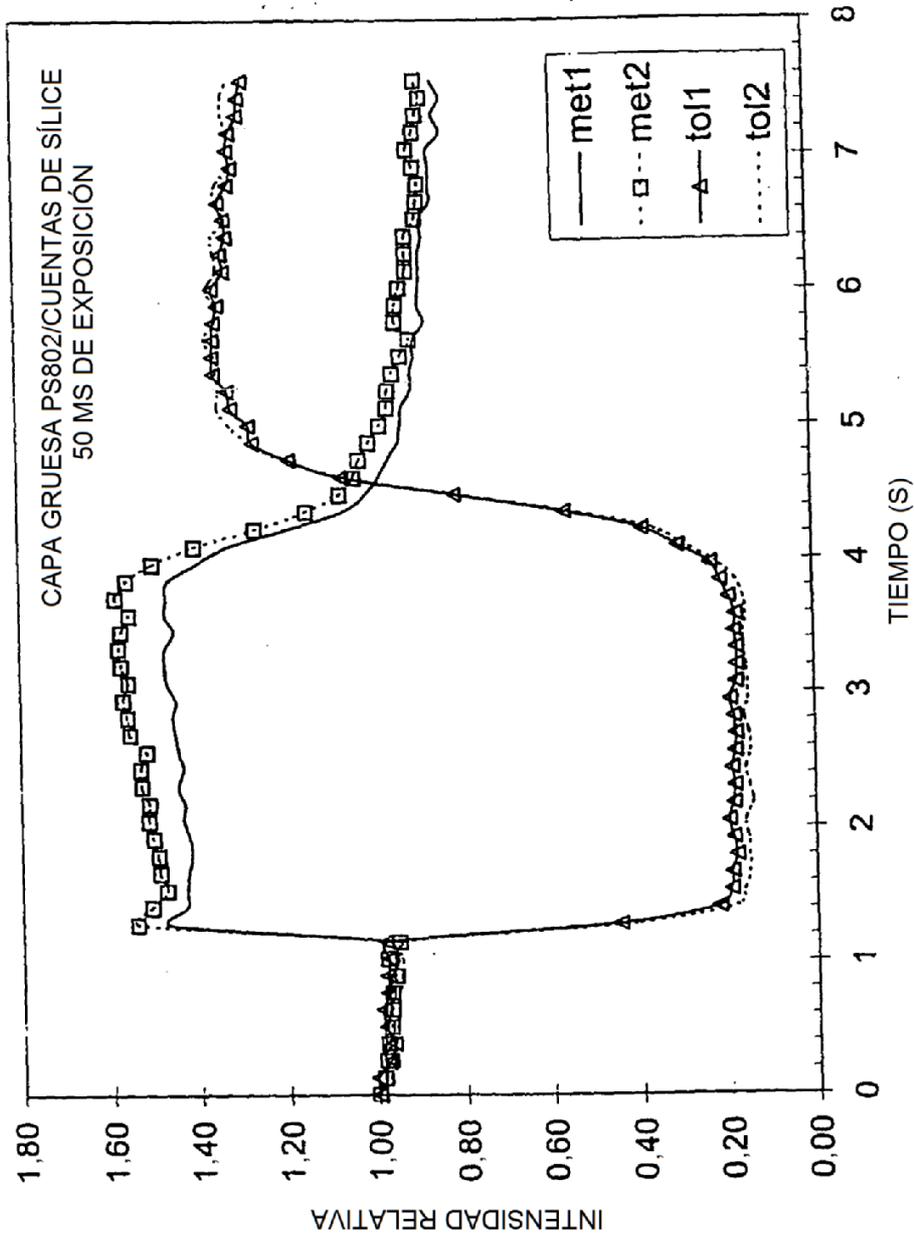


Fig. 16

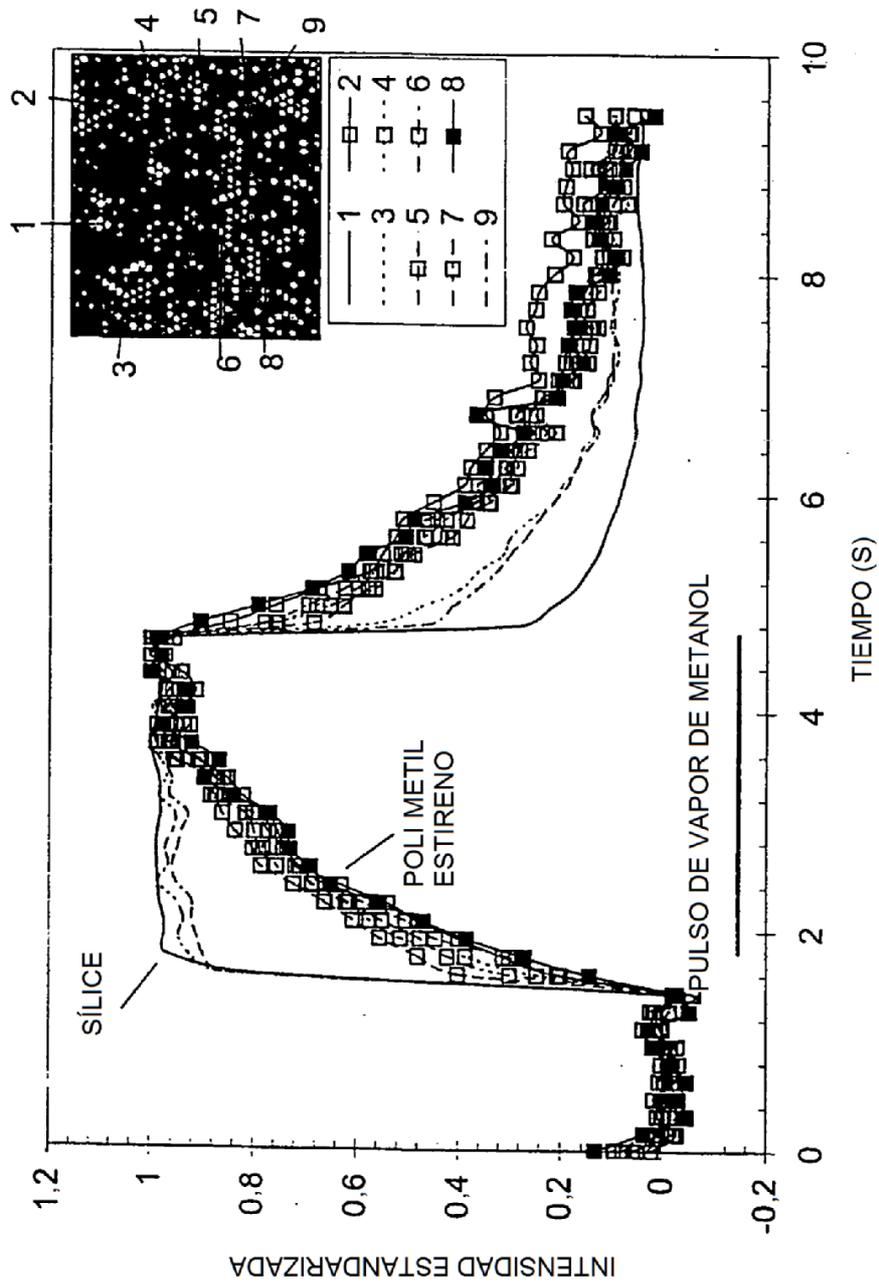


Fig. 17

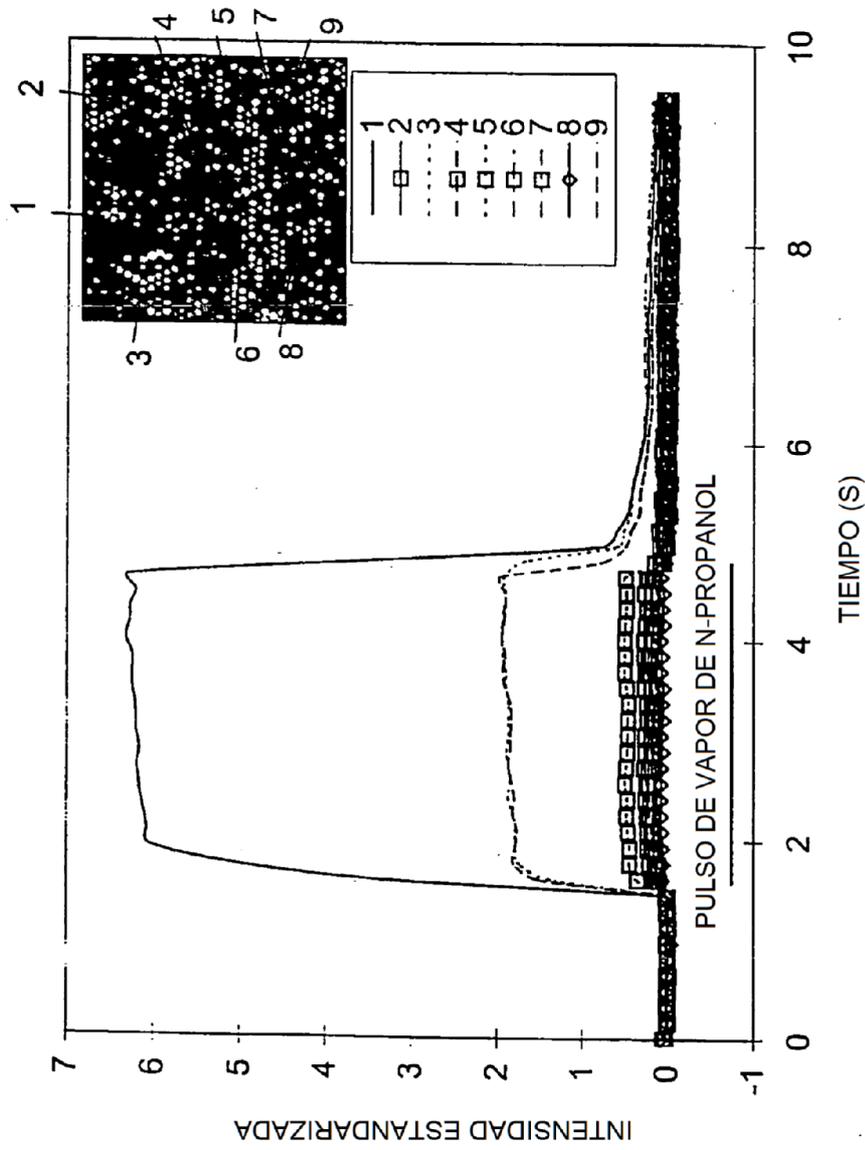


Fig. 18

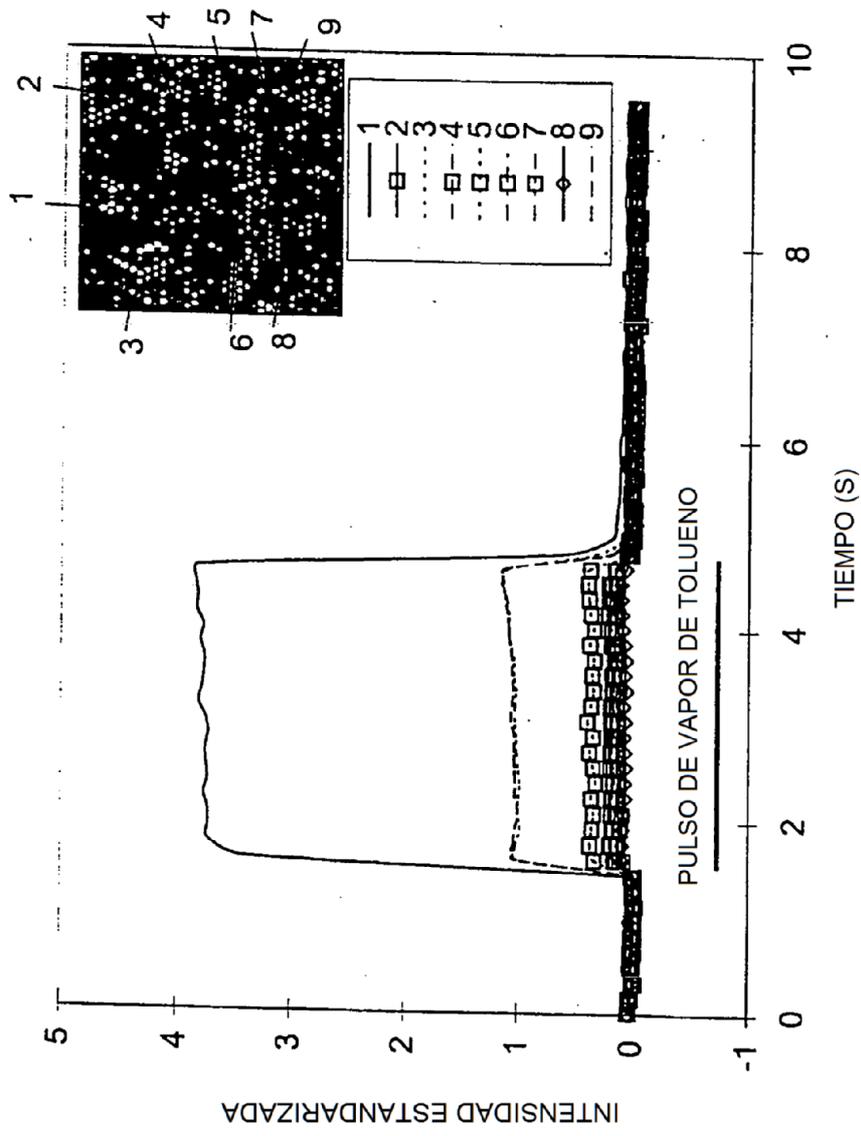
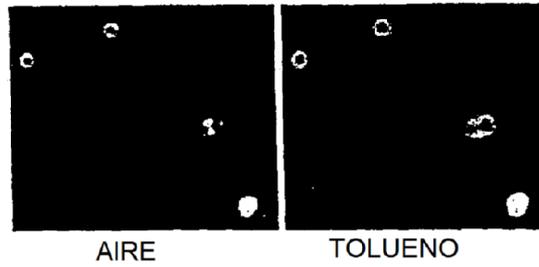
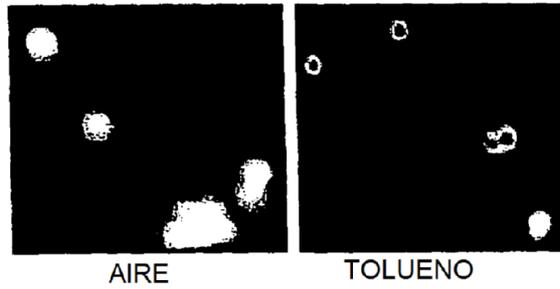


Fig. 19

PS802 648.C



POLI METIL ESTIRENO/2% DE DIVINIL BENCENO



POLI METIL ESTIRENO

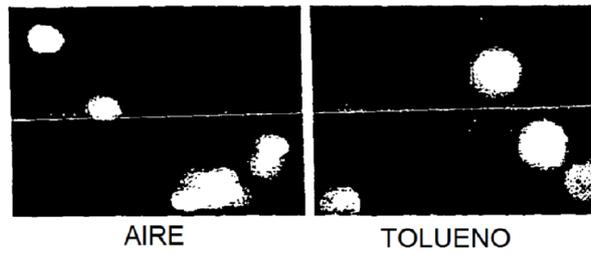


Fig. 20

Fig 21

Sonda	[Cy5]	[Tamra]	[colorante de Eu]	Identificación de la diana correcta
<b>HWt</b>	1		0,1	93%
<b>Bglo</b>	0,5		0,05	88%
<b>KWt</b>	0,5		0,005	91%
<b>IL6</b>	0,1		0,1	96%
<b>IL4</b>	0,1		0,005	95%
<b>IFNG</b>		0,4	0,005	95%
<b>IL2</b>		0,04	0,05	98%

Fig 22

- 1)  $\beta$ -glo (segmento de la  $\beta$ -globina humana)  
**TCA ACT TCA TCC ACG TTC ACC**
- 2) IFNG (interferón gama 1)  
**IFNG TGG GTT CTC TTG GCT GGT ACT**
- 3) IL2 (interleucina-2)  
**TA CAA GAM TCC CAA ACT CAC CAG**
- 4) IL4 (interleucina-4)  
**CC AAC TGC TTC CCG CTC TGT**
- 5) IL6 (interleucina-6)  
**GT TGG GTC AGG GGT GGT TAT T**
- 6) K-18 WT<sup>27</sup>  
**GGA GCT GGT GGC GTA**
- 7) H-18 WT<sup>27</sup>  
**CCG GCC GTG T**
- 8) CFTR (exón de la fibrosis quística 11)<sup>11</sup>  
**CAT TAT ACT TGT AGA G**
- 9) R553 (exón de la fibrosis quística 10)<sup>13</sup>  
**TGT AGA ATT ATC TTC**
- 10) PANI32<sup>10</sup> (linfocito periférico humano)  
**OCT CTA TAC TTT AAC GTC AAG**
- 11) Esquema-2<sup>16</sup>  
**AAG TTT AAC CTA TAC CCT GTC**
- 12) Hskals-1<sup>28</sup>  
**OCT ATG ATG AAT ATA G**
- 13) Hskals-2<sup>28</sup>  
**AAT ATG ATA ATG GCG T**
- 14) complemento a la sonda 1  
**TG AAC GTG GAT GAA GTT G**
- 15) complemento a la sonda 2  
**AG TAA CAG CCA AGA GAA CCC AAA**
- 16) complemento a la sonda 3  
**CT GGT GAG TTT GGG ATT CTT GTA**
- 17) complemento a la sonda 4  
**AC AGA GGG GGA AGC AGT TGG**
- 18) complemento a la sonda 5  
**AA TAA CCA CCC CTG ACC CAA C**
- 19) complemento a la sonda 6  
**TAC GGC ACC AGC TCC**
- 20) complemento a la sonda 7  
**ACA CCC CCG G**
- 21) complemento a la sonda 8  
**CTC TAC AAG TAT AAT G**
- 22) complemento a la sonda 9  
**GAA GAT GTT AAA GTA TAG AAG**
- 23) complemento a la sonda 10  
**CTA GAC GTT AAA GTA TAG AGG**
- 24) complemento a la sonda 12  
**CTA TAT TCA TCA TAG G**
- 25) complemento a la sonda 13  
**AGG CCA TTA TCA TAT T**

Fig 23

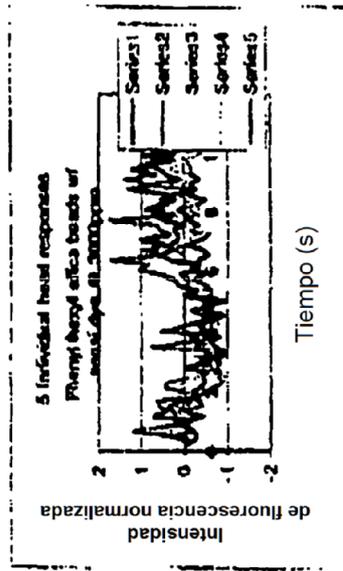
Identidad de la diana	Número de cuentas en la sección de análisis	[Cy S]	[Tamra]	[Colorante de EU]	Identificación de la diana correcta
2	19		3	0.5	89%
4	15	0.01	0.1	0.1	87%
5	13		0.1	0.1	100%
9	5	0.01			100%
10	14			0.001	86%
11	12		0.1		92%
15	8	0.01	0.1		100%
16	24	0.1			92%
21	21	0.1	3		95%
24	16	0.3	3		94%

Fig 24

Secuencias	Número de microesferas	Fondo promedio $\pm$ dt	Fluorescencia después de la hibridación	Señal
Diana complementaria	10	997,01 $\pm$ 4,62	1036,94	39,93
	10	1003,46 $\pm$ 6,06	1035,83	32,37
	10	957,44 $\pm$ 5,59	985,25	27,81
	100	977,88 $\pm$ 3,21	1010,74	32,86
Poli A	10	1213,79 $\pm$ 6,33	1221,61	(7,81)
	10	1185,25 $\pm$ 9,39	1194,74	(9,49)
	10	1190,20 $\pm$ 4,85	1198,35	(8,15)
	100	1190,67 $\pm$ 4,05	1199,81	(9,14)
IL2	10	1090,58 $\pm$ 4,97	1096,11	(5,53)
	10	1120,62 $\pm$ 3,09	1113,88	(-6,74)
	10	1101,82 $\pm$ 5,51	1091,28	(-10,55)
	100	1104,36 $\pm$ 1,40	1103,06	(-1,30)

Fig. 2

CV = 12.7%



CV = coeficiente de la varianza

$$CV = \frac{\text{desviación típica}}{\text{media}}$$

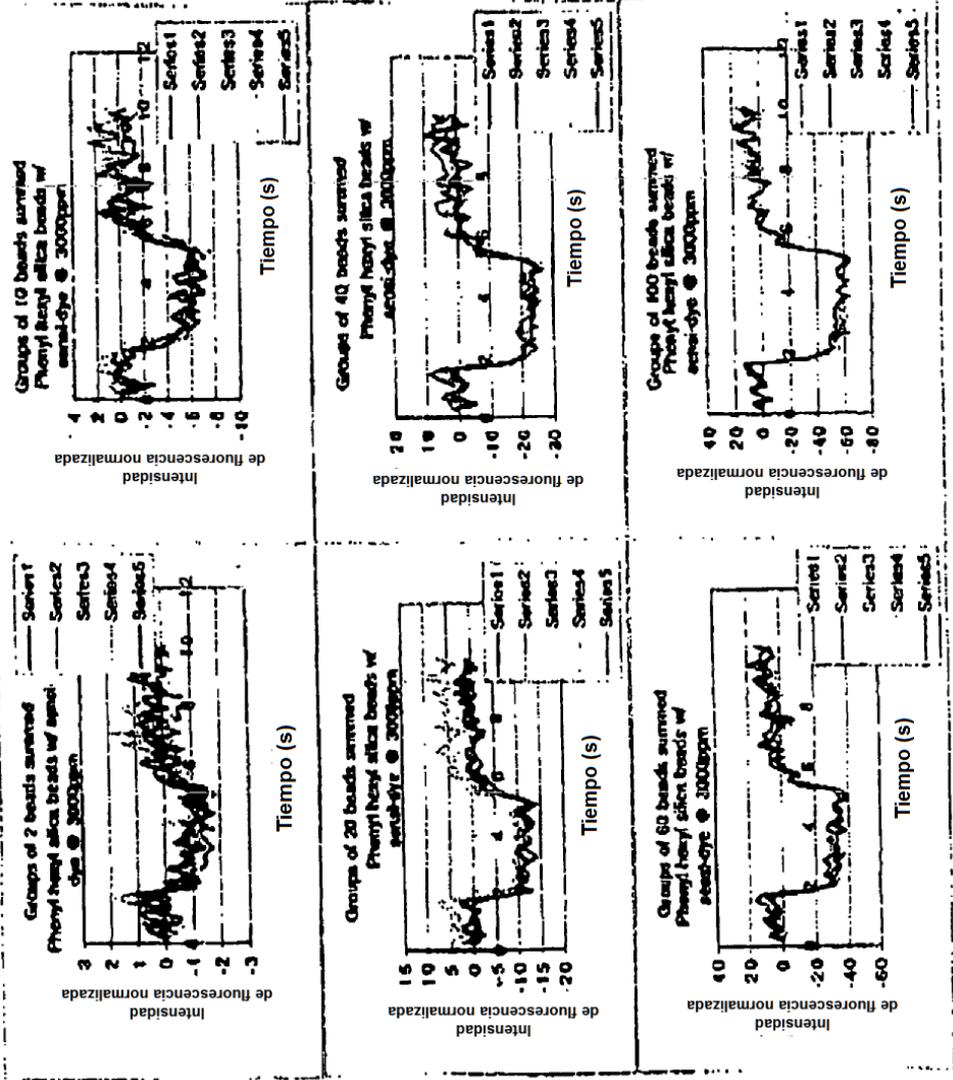
La idea básica es que el CV se reduce a medida que se suman más respuestas de cuentas

CV = 0,1200  
 %CV = 12%

%CV = 6,3%

%CV = 4,8%

Fig 25  
 (Cont.)



CV = 0,1200  
 %CV = 12%

CV = 0,1200  
 %CV = 12%

CV = 0,1200  
 %CV = 12%