

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 901**

51 Int. Cl.:

B01J 19/00	(2006.01)
C12Q 1/6837	(2008.01)
G01N 33/543	(2006.01)
G01N 33/53	(2006.01)
G01N 33/538	(2006.01)
B01L 3/00	(2006.01)
C12Q 1/68	(2008.01)
G01N 1/34	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2012 PCT/US2012/033498**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12142397**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2012 E 12771527 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2697648**

54 Título: **Sistema de detección de muestras basado en micromatrices**

30 Prioridad:

13.04.2011 US 201161475107 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.02.2019

73 Titular/es:

**AKONNI BIOSYSTEMS, INC. (100.0%)
400 Sanger Avenue, Suite 300
Frederick, MD 21710, US**

72 Inventor/es:

**COONEY, CHRISTOPHER G.;
QU, PETER QIANG;
PEROV, ALEXANDER y
PARKER, JENNIFER**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 698 901 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

Sistema de detección de muestras basado en micromatrices

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de patente de los Estados Unidos No. 61/475,107, presentada el 13 de abril de 2011.

5 Campo

El campo técnico son los sistemas de microfluidos y, en particular, los sistemas microfluidos que tienen una micromatriz para la detección de muestras. Los documentos EP 1762300 A2 y US5922604 A divulgan conjuntos de micromatrices ubicados en sistemas de microfluidos.

Antecedentes

10 Las micromatrices son más frecuentes en los laboratorios de investigación como herramientas para perfilar los niveles de expresión génica, dado miles de sondas pueden interrogar una sola muestra. Su utilidad es menos ubicua como diagnóstico para aplicaciones clínicas, ambientales y agrícolas a pesar de su densidad de información, redundancia, controles integrados (positivos, negativos) y sensibilidad analítica. La barrera para la adopción de micromatrices como pruebas de diagnóstico se debe principalmente a su complejidad y costo operacionales (a menudo cientos de dólares por prueba), así como a los problemas técnicos asociados con los dispositivos microfluídicos que contienen una micromatriz, como el comportamiento impredecible del flujo de fluidos causado por burbujas de aire en los dispositivos microfluídicos. Por ejemplo, las burbujas pueden obstruir los canales, interferir con las reacciones bioquímicas (particularmente aquellas que requieren interacciones de la superficie), causar una dosificación incorrecta, interferir con las lecturas ópticas y producir un flujo impredecible. El flujo impredecible presenta un problema particularmente para los sistemas que se basan en la difusión constante de un analito a un ligando, como un oligonucleótido o un anticuerpo de captura. Por consiguiente, todavía existe la necesidad de contar con sistemas de detección de microfluidos basados en micromatrices que estén diseñados para proporcionar un flujo de fluido predecible y que puedan fabricarse a un bajo costo.

Compendio

25 En el presente documento se divulga un conjunto de micromatrices que comprende: una cámara de matrices con una entrada de muestra en un primer extremo, una salida de muestra en un segundo extremo, una superficie interior superior, una superficie interior inferior, paredes laterales y una micromatriz situada en la superficie interior inferior; y una cámara de desechos que está en comunicación fluida con la salida de la cámara de matrices, donde la cámara de matrices comprende una superficie interior hidrófila posicionada para facilitar el llenado completo de la cámara de matrices con un fluido a base de agua y el flujo continuo del fluido desde la entrada de muestra a la salida de muestra, y donde el área transversal en el primer extremo de la cámara de matrices es más grande que el área transversal en el segundo extremo de la cámara matrices.

35 Un aspecto de la presente solicitud se refiere a un sistema de micromatrices para la detección de una molécula objetivo en una muestra acuosa. El conjunto de micromatrices comprende: una cámara de matrices con una entrada de muestra, una salida de muestra, una superficie interior superior, una superficie interior inferior, paredes laterales y una micromatriz situada en la superficie interior inferior; una cámara de residuos que comprende una entrada de residuos y un material absorbente y una respiración; y un canal que tiene una sección de expansión con un primer extremo próximo a la salida de la cámara de matrices y un segundo extremo próximo a la entrada de la cámara de residuos, donde la cámara de residuos está en comunicación fluida con la cámara de matrices a través del canal, donde la superficie interior superior de la cámara de matrices es una superficie hidrófila que formaría un ángulo de contacto de 45° o menor con una gota de agua pura que descansa sobre dicha superficie, lo que facilita el llenado completo de la cámara de matrices con un fluido acuoso y donde el área transversal en el primer extremo de la sección de expansión del canal es más pequeña que el área transversal en el segundo extremo de la sección de expansión, donde la sección de expansión tiene un área transversal progresivamente creciente hacia la cámara de desechos, de modo que las burbujas de aire en la cámara de matrices, una vez que entran en el canal, queden atrapadas en las paredes laterales de la sección y no bloqueen el flujo de fluido en el canal, donde la pared lateral de la sección de expansión es hidrófoba y donde el canal comprende además una sección entre la sección de expansión y la entrada de la cámara de desechos que contiene dos vueltas en el canal, que forman una sección de canal en forma de S o Z.

50 En la presente también se divulga un conjunto de micromatrices que comprende: una cámara de matrices con una entrada de muestra en un primer extremo, una salida de muestra en un segundo extremo, una superficie interior superior, una superficie interior inferior, paredes laterales y una micromatriz situada en la superficie inferior; y una cámara de desechos que está en comunicación fluida con la salida de la cámara de matrices, donde la cámara de matrices comprende una superficie interior hidrófila posicionada para facilitar el llenado completo de la cámara de matrices con un fluido a base de agua y canales con áreas transversales rectangulares con texturas sobre la superficie interior inferior y/o las superficies interiores superiores para promover el secado.

En la presente también se divulga un método para controlar la calidad de la fabricación de elementos de matriz en una micromatriz. El método comprende las siguientes etapas: iluminar una micromatriz que tiene una pluralidad de puntos

5 de matrices con ondas de luz para producir fluorescencia desde cada punto de matriz; medir la intensidad de la fluorescencia para cada punto de matriz, donde la fluorescencia es producida por un fluoróforo de control de calidad interno; producir una imagen fluorescente de la micromatriz; determinar la información de cada punto de matrices en función de la imagen fluorescente; y codificar la información en un código de barras, dispositivo de memoria o etiqueta RFID, donde el código de barras, dispositivo de memoria o etiqueta RFID están asociados con la micromatriz.

10 En la presente también se divulga un método para hacer un sistema de micromatrices. El método comprende las siguientes etapas: desenrollar una película de sustrato mediante uno o más carretes de película de sustrato; imprimir micromatrices sobre la película de sustrato desenrollada; laminar una película espaciadora sobre la película de sustrato impresa, donde la película espaciadora está precortada para proporcionar espacio para una cámara de matrices antes de la etapa de colocación y se coloca sobre la película de sustrato impresa por uno o más carretes de película espaciadora; laminar una película de cubierta sobre la película espaciadora para formar una estructura de micromatrices en capas; y cortar la estructura de micromatrices en capas en sistemas de micromatrices individuales.

Breve descripción de las figuras

La descripción detallada se referirá a los siguientes dibujos:

15 – La Figura 1A es un esquema de un sistema de micromatrices que no forma parte de la invención, que contiene un depósito, una cámara de matrices de área transversal decreciente, una matriz de puntos, una cámara de residuos y un absorbente. La Figura 1B es una vista transversal del sistema de micromatrices de la Figura 1A.

– La Figura 2 es una vista en primer plano de la cámara de matrices que muestra una matriz lineal de puntos impresos en la parte inferior de la cámara, que tiene una sección transversal decreciente.

20 – La Figura 3 es un sistema de micromatrices con un canal de expansión que conecta la cámara de matrices a la cámara de desechos.

25 – La Figura 4A es un esquema que muestra una cámara de matrices con pequeños canales rectangulares que son perpendiculares a la dirección del flujo de líquido dentro de la cámara. La Figura 4B es un esquema que muestra una cámara de matrices con pequeños canales rectangulares que son paralelos a la dirección del flujo de líquido dentro de la cámara de reacción. La Figura 4C es un esquema que muestra una cámara de matrices con pequeños canales rectangulares que son perpendiculares o paralelos a la dirección del flujo de líquido dentro de la cámara de reacción. La Figura 4D es un esquema que muestra una cámara de matrices con pequeños canales rectangulares que forman un ángulo en la dirección del flujo de líquido dentro de la cámara de reacción.

30 – La Figura 5 muestra un esquema de una línea de montaje continua para la fabricación de películas para dispositivos de laboratorio.

– La Figura 6 muestra un mapa de matriz con una dilución en serie de puntos Cy5 y Cy3.

– La Figura 7 muestra una imagen de un cabezal de impresión de un cabezal de impresión con pines romos.

35 – La Figura 8 muestra imágenes de campo claro de matrices impresas en una película delgada de poliéster con el colector de vacío antes de la polimerización y después de la polimerización, así como una imagen de fluorescencia de una matriz Cy3.

– La Figura 9 muestra una imagen de un colector de vacío de película delgada para impresión con pines romos.

– La Figura 10 muestra una imagen de fluorescencia después de la PCR de materiales que se ensamblaron con materiales enrollables que incluyen una película de poliéster en la que se imprimió la matriz.

40 – La Figura 11 es un compuesto de imágenes que muestran una configuración de impresión de carrete a carrete con una impresora matricial de contacto Ultratron BioDot (panel superior) y cuadros de video de impresión sin contacto utilizando la impresora BioDot Ultra en una película en movimiento que no ha sido tratada o modificada químicamente (paneles inferiores).

– La Figura 12 muestra una imagen de fluorescencia de canal rojo de la matriz MRSA capturada durante el control de calidad de fábrica para extraer los parámetros de puntos.

45 – La Figura 13 muestra una imagen de fluorescencia de canal verde de una matriz hibridada procesada en un dispositivo de captura de imágenes usuario final. El software del dispositivo de captura de imágenes utilizó los datos de control de calidad de la matriz para colocar la cuadrícula y los círculos alrededor de cada punto individual.

– La Figura 14 muestra una imagen de fluorescencia de una matriz hibridada realizada por un equipo de usuario final sin el uso de datos de control de calidad, lo que hace que sea más difícil colocar la cuadrícula y los círculos alrededor

de cada punto individual.

Descripción detallada

Esta descripción debe leerse en relación con los dibujos adjuntos, que deben considerarse parte de la descripción escrita completa de la presente invención. Los dibujos de las figuras no están necesariamente a escala y ciertas características de la invención se pueden mostrar exageradas en escala o en forma algo esquemática para mayor claridad y concisión. En la descripción, se debe interpretar que los términos relativos como "frente", "atrás", "arriba", "abajo", "superior" e "inferior", así como sus derivados, se refieren a la orientación como se describe a continuación o como se muestra en el dibujo de la figura en cuestión. Estos términos relativos son para conveniencia de la descripción y normalmente no están destinados a requerir una orientación particular. Los términos relacionados con los accesorios, el acoplamiento y similares, como "conectado" y "unido", se refieren a una relación en la que las estructuras están aseguradas o unidas entre sí, ya sea directa o indirectamente a través de estructuras intermedias, así como a las uniones o relaciones móviles o rígidas, salvo que expresamente se indique lo contrario.

El término "micromatriz", como se usa en la presente, se refiere a una matriz ordenada de puntos presentados para unirse a ligandos de interés. Una micromatriz consta de al menos dos puntos. Los ligandos de interés incluyen, a modo no taxativo ácidos nucleicos (por ejemplo, balizas moleculares, aptámeros, ácidos nucleicos bloqueados, ácidos nucleicos peptídicos), proteínas, péptidos, polisacáridos, anticuerpos, antígenos, virus y bacterias.

El término "superficie hidrófila", como se usa en la presente, se refiere a una superficie que formaría un ángulo de contacto de 45° o menor con una gota de agua pura que descansa sobre dicha superficie. El término "superficie hidrófoba", como se usa en la presente, se refiere a una superficie que formaría un ángulo de contacto mayor que 45° con una gota de agua pura que descansa sobre dicha superficie. Los ángulos de contacto se pueden medir utilizando un goniómetro de ángulo de contacto.

El término "cámara de matrices", como se usa en la presente, se refiere a un espacio cerrado alrededor de una micromatriz que tiene comunicación fluida con una entrada y una salida directa o indirectamente. La cámara de matrices, cuando se llena con una muestra líquida, permite que la micromatriz se sumerja en la muestra líquida, de modo que las moléculas objetivo en la muestra líquida puedan mantener un contacto íntimo con las sondas de la micromatriz.

Sistema de micromatrices designado para facilitar el flujo de fluido dentro del sistema

La presente divulga un sistema de detección basado en micromatrices que comprende un sistema de micromatrices que comprende una cámara de matrices con una entrada de muestra, una salida de muestra y una micromatriz situada en su interior, y una cámara de residuos que está en comunicación fluida con la cámara de matrices. La cámara de matrices tiene una superficie hidrófila colocada para facilitar el llenado completo de la cámara de matrices y el flujo de fluido desde la cámara de matrices a la cámara de residuos. La superficie hidrófila entra en contacto con un líquido cuando entra en la cámara de matrices desde la entrada de muestra y permite el llenado completo de la cámara de matrices. La cámara de matrices puede tener la forma de un canal alargado de ancho variable y está conectada directamente a la cámara de desechos. La cámara de matrices se puede conectar a la cámara de residuos a través de un canal de residuos.

La tensión superficial de una muestra líquida o una mezcla de reacción a menudo evita que la muestra líquida o la mezcla de reacción llenen completamente un espacio pequeño, como la cámara de matrices de un sistema de micromatrices. La tensión superficial es el resultado de la atracción entre las moléculas de la muestra líquida por distintas fuerzas intermoleculares. En la mayor parte de la muestra líquida, cada molécula es empujada igualmente en todas direcciones por moléculas líquidas vecinas, lo que produce una fuerza neta de cero. En la superficie de la muestra líquida, las moléculas son empujadas hacia el interior por otras moléculas más profundas dentro del líquido y no son atraídas tan intensamente por las moléculas en el medio vecino (ya sea vacío, aire u otro fluido). Por lo tanto, todas las moléculas en la superficie están sujetas a una fuerza interna de atracción molecular, que solo puede ser equilibrada por la resistencia de la muestra líquida a la compresión. Este empuje hacia el interior tiende a disminuir el área de la superficie y, por lo tanto, una superficie líquida se parece a una membrana elástica estirada. En consecuencia, el líquido se comprime a sí mismo hasta alcanzar el área de superficie localmente más baja posible. El resultado neto es que la muestra líquida puede mantener una forma casi esférica dentro del espacio pequeño y no llena las esquinas, especialmente las esquinas cuadradas del espacio pequeño. El pequeño espacio típico que separa la cubierta de la superficie de la micromatriz en una cámara de matrices a menudo comprime el líquido en una forma cilíndrica.

En el caso del presente sistema de micromatrices, el líquido que llena la cámara de matrices es una solución acuosa, como un tampón de hibridación o un buffer de lavado. La tensión superficial de la solución acuosa se supera recubriendo al menos una porción de la superficie interior de la cámara de la matriz con un material hidrófilo. La micromatriz está ubicada en la superficie inferior de la cámara de matrices y la superficie superior, o al menos una porción de la superficie superior, de la cámara de matrices está recubierta con un recubrimiento hidrófilo.

Algunos ejemplos de material hidrófilo incluyen, a modo no taxativo, polímeros hidrófilos como polietilenglicoles,

metacrilatos de polihidroxiethyl, bionita, poli(N-vinil lactamas), poli(vinilpirrolidona), poli(óxido de etileno), poli(óxido de propileno), poli(acrilamidas, celulósicas, metilcelulosa, polianhídridos, ácidos poli(acrílicos, alcoholes polivinílicos, éteres de polivinilo, etoxilatos de alquifenol, monoésteres de poliol complejos, éteres de polioxiethyleno de ácido oleico, éteres de polioxiethyleno sorbitano de ácido oleico y éteres de sorbitano de ácidos grasos; materiales hidrófilos inorgánicos como óxido inorgánico, oro, zeolita y carbono tipo diamante y surfactantes como Triton X-100, Tween, Dodecilsulfato de sodio (SDS), Laurilsulfato de amonio, sales de alquilsulfato, Lauril éter sulfato de sodio (SLES), alquilbencenosulfonato, jabones, sales de ácidos grasos, bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB), también conocido como bromuro de hexadecil trimetil amonio, sales de alquiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio (CPC), amina de sebo polietoxilada (POEA), cloruro de benzalconio (BAC), cloruro de benzetonio (BZT), dodecil betaína, óxido de dodecil dimetilamina, cocamidopropil betaína, coco-anfo-glicinato alquil poli(óxido de etileno), copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) (comercialmente denominados Poloxamers o Poloxamines), alquilpoliglucósidos, alcoholes grasos, cocoamida MEA, cocoamida DEA, cocoamida TEA.

En algunas realizaciones, uno o más tensioactivos se mezclan con polímeros de reacción, como poliuretanos y epoxis, para servir como recubrimiento hidrófilo. En otras realizaciones, la superficie superior o la superficie inferior de la cámara de matrices se hacen hidrófilas por tratamiento de superficie, como tratamiento con plasma atmosférico, tratamiento de corona o tratamiento de corona de gas.

Entre los ejemplos de cinta hidrófila se incluyen, a modo no taxativo, cinta de Adhesives Research (AR) 90128, cinta de AR 90469, cinta de AR 90368, cinta de AR 90119, cinta de AR 92276 y cinta de AR 90741 (Adhesives Research, Inc., Glen Rock, PA). Algunos ejemplos de películas hidrófilas incluyen, a modo no taxativo, las películas Vistex® y Visguard® (Film Specialties Inc., Hillsborough, NJ) y Lexan HPFAF (GE Plastics, Pittsfield, MA). Surmodics, Inc. (Eden Prairie, MN), Biocoat Inc. (Horsham, PA), Advanced Surface Technology (Billerica, MA) e Hydromer, Inc. (Branchburg, NJ) ofrecen otras superficies hidrófilas.

En algunas realizaciones, la cinta o película hidrófila tiene suficiente transparencia para permitir la interrogación óptica de la micromatriz desde la parte superior de la cámara de matrices.

La micromatriz puede ser cualquier tipo de micromatriz, incluidas, entre otros, micromatrices de oligonucleótidos y micromatrices de proteínas. En una realización, la micromatriz es una matriz de anticuerpos y el sistema de micromatriz se usa para capturar y marcar antígenos diana. En una realización, la micromatriz se forma utilizando el método de puntos de gel de impresión descrito, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. No. 5,741,700, 5,770,721, 5,981,734, 6,656,725 y en las solicitudes de patente de EE.UU. No. 10/068,474, 11/425,667 y 60/793,176. En ciertas realizaciones, la micromatriz comprende una pluralidad de puntos de matriz impresos en un sustrato de matriz que forma el fondo de la cámara de matrices. En algunas realizaciones, el sustrato de matriz es vidrio o plástico.

En ciertas realizaciones, los puntos de la matriz contienen un fluoróforo de control interno, que tiene un espectro de emisión que es diferente de los fluoróforos asociados con las moléculas objetivo (es decir, las moléculas objetivo se marcarán con fluoróforos que tienen espectros de emisión que son diferentes del espectro de emisión del fluoróforo de control interno). Este control interno se puede analizar en el campo o durante la fabricación para mejorar la calidad. El control interno proporcionaría un medio cuantitativo para evaluar la intensidad de fluorescencia (por ejemplo, promedio, media o integral) del punto, que puede variar debido al diámetro, la morfología, la porosidad de la gota o cualquier otro factor que pueda cambiar la reproducibilidad de un punto a otro. Entre los factores que afectan estas propiedades se incluyen la dosificación UV, la temperatura, las propiedades de la superficie, la síntesis, la viscosidad, la condensación, el lavado (es decir, debido a los efectos causados por las diferencias de temperatura, viscosidad, caudal, astringencia o cualquier otra que pueda influir en la eliminación o distorsión de puntos), la profundidad de inmersión de los pines en la solución de polímeros para tecnologías de impresión de pines o cualquier propiedad que pueda influir en la morfología de los elementos de gel o la concentración de las sondas. La obtención de imágenes en el campo también daría cuenta de lo siguiente: uso indebido por parte del usuario, destrucción de los elementos de gel debido a un manejo inadecuado, lavado de los elementos de gel, aumento del brillo debido a la presencia de sales, termociclado, condiciones de alta temperatura que disminuyen el rendimiento de fluorescencia, condiciones de baja temperatura que aumentan el rendimiento de fluorescencia, la degradación de la vida útil y/o cualquier situación que contribuya al cambio en la señal de fluorescencia después del Aseguramiento de Calidad/Control de Calidad inicial durante la fabricación de las matrices.

Entre los ejemplos de fluoróforos se incluyen, a modo no taxativo, pireno, 7-metoxicoumarina, azul en cascada, 6-MI, 3-MI, 7-aminocoumarina-X (AMCA-X), 6-MAP, azul pacífico, azul marino, dimetilaminocoumarina, BODIPY 493/503, BODIPY-FI-X, DTAF (5-DTAF), 6-FAM (fluoresceína), dansil-X, Oregon green 500, Oregon green 488 (5 isómeros), rodol verde, Oregon green 514, rodamina verde-X, NBD-X, TET, 2'4'5'7'-tetrabromosulfonafluoresceína, BODIPY-FI BR2, BODIPY-R6G, 6-JOE, BODIPY 530/550, HEX, carboxirodamina 6G, BODIPY 558/568, BODIPY 558/568, BODIPY -TMR-X, PyMPO, BODIPY 564/570, Cy3, TAMRA-X, rodamina roja-X, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, Texas Red-X, Cy3.5, ROX, BODIPY-TR, Syto- 81, Cy5, naftofluoresceína, Cy5.5, VIC, SYBR verde I y SYBR verde II.

En otras realizaciones, el control interno es un cambio de señal colorimétrico, que es distinto de un punto a otro. En otras realizaciones, el control interno es un cambio de señal de quimioluminiscencia, que es distinto de un punto a otro. En otras realizaciones, el control interno es un cambio de señal electroquímica, que es distinto de un punto a otro.

En ciertas realizaciones, los puntos de la matriz son puntos de gel que contienen un primer fluoróforo (por ejemplo, Cy5). Las dianas en la muestra se marcan con un segundo fluoróforo (por ejemplo, Cy3) durante la PCR y posteriormente se hibridan con sondas que se unen covalentemente al polímero de la gota de gel. El primer fluoróforo tiene un pico de emisión diferente al segundo fluoróforo. En este contexto, el primer fluoróforo (por ejemplo, Cy5) sirve para permitir la ubicación exacta de los puntos de gel con un sistema de imágenes que puede detectar tanto el primer como el segundo fluoróforo (por ejemplo, Cy3 y Cy5).

En algunas realizaciones, el sistema de imágenes es un componente del sistema de detección de muestras basado en micromatrices. En otras realizaciones, el sistema de imágenes es parte de un sistema de visión artificial utilizado durante la fabricación del sistema de micromatrices, de manera que las coordenadas de cada punto pueden determinarse con precisión durante la inspección. Estas coordenadas se cargan en un código de barras o etiqueta RFID, que se adjunta al sistema de micromatrices para su análisis futuro. Para que este enfoque sea efectivo, las coordenadas del primer fluoróforo (es decir, el fluoróforo de control interno) requieren que los fiduciales de referencia del segundo fluoróforo (es decir, el fluoróforo objetivo) se incluyan como parte del mapa del sistema, para que se pueda colocar la cuadrícula. Sin embargo, a diferencia del esquema convencional que intenta colocar una cuadrícula en base a puntos espaciados con precisión o requiere imágenes de fluorescencia de dos colores, el esquema descrito utiliza las coordenadas del código de barras para colocar círculos fijos para la detección de puntos. La ubicación de los primeros puntos de fluoróforo (es decir, el fluoróforo de control interno) se puede usar con un algoritmo de umbral para encontrar los centros, que luego se usan para la colocación de círculos fijos.

Un beneficio del uso de la visión artificial para identificar los puntos es que el mismo sistema se puede usar para rechazar los puntos sin rechazar toda la micromatriz, lo que aumentaría el rendimiento. Los puntos se pueden rechazar en función de una serie de criterios, como los valores de intensidad de fluorescencia del control interno que están fuera de los límites, la asimetría y el diámetro. Por lo tanto, la presente también divulga un método para controlar la calidad de la fabricación de elementos de matriz en una micromatriz. Que comprende las siguientes etapas: iluminar una micromatriz que tiene una pluralidad de puntos de matrices con ondas de luz para producir fluorescencia desde cada punto de matriz; medir la intensidad de la fluorescencia para cada punto de matriz, donde la fluorescencia es producida por un fluoróforo de control de calidad interno; producir una imagen fluorescente de la micromatriz; determinar la información de cada punto de matrices en función de la imagen fluorescente; y codificar la información en un código de barras, dispositivo de memoria o etiqueta RFID, donde el código de barras, dispositivo de memoria o etiqueta RFID están asociados con la micromatriz. La información para cada punto de la matriz puede comprender la ubicación de cada punto, la intensidad de fluorescencia de cada punto, el diámetro de cada punto y la morfología de cada punto. Se puede realizar un análisis de imagen de la micromatriz colocando círculos fijos para cada punto de la micromatriz en la imagen de una micromatriz a partir de la información de ubicación del punto determinada en función de la fluorescencia del control interno.

En la presente también se divulga un método de análisis de imagen de micromatrices. El método comprende las siguientes etapas: obtener una imagen de una micromatriz, colocando un círculo de borde de punto fijo alrededor de cada punto de la micromatriz en la imagen de la micromatriz en base a la información de ubicación de punto de matriz obtenida a través del control interno de fluorescencia en los puntos de matriz como se describió anteriormente; medir una intensidad de fluorescencia objetivo dentro del círculo de borde de punto fijo para cada punto de matriz y determinar la cantidad de una molécula objetivo en una muestra basándose en la relación de la intensidad de fluorescencia objetivo y la intensidad de fluorescencia interna en cada punto de matriz.

En la presente también se divulga un método de análisis de imagen de micromatrices, que incluye las siguientes etapas: determinar una intensidad de fluorescencia objetivo para un punto objetivo en una micromatriz; determinar una intensidad de fluorescencia interna para el punto objetivo en la micromatriz; determinar una intensidad de señal para el punto objetivo en la micromatriz, donde la intensidad de la señal es una relación entre la intensidad de fluorescencia objetivo y la intensidad de fluorescencia interna y donde la intensidad de fluorescencia interna para el punto objetivo en la micromatriz se determina como se describió anteriormente.

En la presente también se divulga un método para la obtención de imágenes de elementos de matriz en una micromatriz. El método incluye las siguientes etapas: iluminar una micromatriz que tiene una pluralidad de puntos de matriz con ondas de luz de una primera longitud de onda para producir fluorescencia a partir de un fluoróforo de control interno; determinar la ubicación de los puntos de matriz de la micromatriz en función de la fluorescencia producida por el fluoróforo de control interno (fluorescencia de control); iluminar la micromatriz con ondas de luz de una segunda longitud de onda para producir fluorescencia a partir de un fluoróforo objetivo que está asociado, directa o indirectamente, a una molécula objetivo que se une a un punto de matriz; medir la fluorescencia producida por el fluoróforo objetivo (fluorescencia objetivo) y determinar la cantidad de la molécula objetivo en la muestra basándose en la relación de intensidad de fluorescencia de control de intensidad de fluorescencia objetivo en puntos relevantes de la matriz.

La cámara de residuos puede tener cualquier forma y, típicamente, tiene un volumen que es mayor que el volumen de la cámara de matrices. En una realización, la cámara de residuos se forma en una cinta de junta, que luego se une al sustrato en el que se imprime la micromatriz. En otra realización, el sustrato tiene un recorte en su superficie superior. El recorte tiene un tamaño y una posición que coinciden con el tamaño y la posición de la cámara de residuos en la junta, de modo que la cámara de residuos, una vez formada entre el sustrato y la junta, tendría un espesor mayor que

el espesor de la cámara de matrices. En otra realización, el sustrato está hecho de un material plástico para que se pueda hacer un recorte fácilmente sobre el sustrato. En otra realización, tanto la cámara de matrices como la cámara de residuos se forman en el sustrato sin usar la junta. Sin embargo, la cámara de residuos puede tener una profundidad mayor que la profundidad de la cámara de matrices.

- 5 En una realización, la cámara de desechos contiene un absorbente que, una vez en contacto con el líquido en la cámara de matrices, expulsa el líquido de la cámara de matrices, por lo que permite que la micromatriz se lea en estado seco.

El absorbente puede ser cualquier material capaz de retener un volumen relativamente grande de líquido. En una realización, el absorbente está hecho de un agregado de fibras. En otra realización, el absorbente es una tela no tejida producida en un proceso de unión por aire. Las fibras constituyentes de la tela no tejida pueden ser fibras sintéticas hidrófilas, fibras de celulosa natural de pulpa o similares o fibras de celulosa regeneradas. Las fibras pueden estar recubiertas o infiltradas con un surfactante o un aceite hidrofílico para mejorar la absorbancia del líquido. Sin limitarse al proceso de unión por aire, la tela no tejida para su uso en la presente se puede producir en cualquier otro proceso, como un proceso de unión por hilatura, un proceso de capas de aire, un proceso de hilatura, etc. En una realización, el absorbente es un papel de celulosa (C048) de Millipore (Billerica, MA).

La cámara de residuos se ventila a través de una ventilación. En una realización, la ventilación se crea simplemente perforando un agujero en la cubierta de la cámara de residuos.

En otra realización, el líquido en la cámara de matrices se elimina forzando el líquido dentro del depósito dentro de la cámara de matrices y estableciendo un contacto entre el líquido en la cámara de matrices y el absorbente en la cámara de residuos. El contacto se puede establecer aplicando una presión al líquido en la cámara de matrices para empujar el líquido fuera de la cámara de matrices o aplicando succión en un orificio de ventilación de la cámara de desechos para extraer el líquido de la cámara de matrices. Se puede generar una presión sobre el líquido en la cámara de matrices al aplicar una presión a través de una válvula de retención (por ejemplo, por medio de una pipeta o una jeringa). Si la cámara de matrices está cubierta solo con una cinta hidrófila o una película hidrófila, se puede generar una presión sobre el líquido dentro de la cámara de matrices presionando simplemente la cinta o película hidrófila que forma la superficie superior de la cámara de matrices. Alternativamente, el contacto entre el líquido en la cámara de matrices y el absorbente puede establecerse colocando el absorbente cerca de la cámara de matrices, de manera que el absorbente toque el líquido dentro del canal.

Una vez que se establece el contacto, el líquido en la cámara de matrices se introduce en el absorbente en la cámara de residuos a través de la cámara matrices. El caudal del líquido está determinada por el tamaño de la cámara de matrices, la tensión superficial y la viscosidad del líquido y la velocidad de absorción del absorbente. Además, el caudal disminuye a medida que el absorbente se vuelve más saturado.

En otra realización, el sistema de micromatrices contiene además una válvula de vía única para introducir un líquido (por ejemplo, una muestra, un tampón de PCR con objetivo, un tampón de hibridación o un tampón de lavado) en la cámara de matrices. La muestra se introduce en la cámara de matrices a través de la válvula de vía única para evitar la contaminación ambiental, lo cual es una preocupación importante en ciertas aplicaciones como la detección de agentes de guerra biológica. La válvula de vía única puede ser una válvula de retención, una válvula de cúpula o una válvula de pico de pato que se coloca en la entrada de la cámara de matrices. Existen válvulas de cúpula de varios tamaños disponibles comercialmente, por ejemplo, las válvulas de Minivalve International (Yellow Springs, OH).

En algunas realizaciones, las paredes laterales de la cámara de matrices son hidrófobas para atrapar burbujas. En otras realizaciones, la cámara de matrices tiene una cubierta hidrófila que está configurada de manera que se crea una región hidrófila cerca de la salida de la cámara de matrices. En una realización relacionada, la región hidrófila se crea con elementos de gel hidrófilos.

En otra realización, la entrada de la cámara de la matriz contiene una membrana/cinta perforable o una válvula de cúpula, una válvula de retención o una válvula de pico de pato para permitir que se produzca un lavado sin hacer que el contenido dentro de la cámara de la matriz se libere del conjunto de micromatrices.

En otra realización, el sistema de micromatrices contiene además un depósito para introducir un líquido en la cámara de matrices. En una realización relacionada, el depósito está flojamente unido al dispositivo, de modo que se puede separar y extraer para obtener imágenes en micromatrices convencionales o lectores colorimétricos. En otra realización, la cámara de matrices está conectada a múltiples cámaras de desechos para garantizar que la absorción se produce en el intervalo apropiado.

En el caso de que se introduzca una burbuja de aire en la cámara de matrices, la burbuja de aire puede alojarse en la cámara de matrices y bloquear parcial o completamente el flujo de líquido en la cámara de matrices. La burbuja de aire también puede detener la acción de absorción del absorbente si la burbuja de aire se encuentra justo en la interfaz del líquido y el absorbente. En algunas realizaciones, la cámara de matrices del sistema de micromatrices está conformada para facilitar el movimiento de burbujas dentro de la cámara de matrices. En algunas realizaciones, la cámara de matrices tiene un área transversal que disminuye continuamente, o de manera gradual, desde un extremo

de la cámara hasta el otro extremo de la cámara para facilitar el movimiento del líquido, así como el movimiento de la burbuja, desde la entrada de la cámara de matrices a la salida de la cámara de matrices.

La **Figura 1A** muestra un sistema de micromatrices 100 diseñado para facilitar la eliminación de burbujas de aire en la cámara de matrices. El sistema de micromatrices 100 comprende una cámara de matrices en forma de embudo 110 que se extiende desde una entrada de muestra 112 a una salida 114, que se abre a una cámara de desechos 120 que tiene un absorbente 122. La cámara de micromatrices 110 contiene varios puntos de micromatrices 130 que se colocan sobre un sustrato 150 (véase Figura 1C), que también forma la parte inferior de la cámara de matrices 110. La cámara de matrices 110 puede estar conectada a un depósito 140. La cámara de matrices 110 tiene un área transversal que disminuye progresivamente hacia la cámara de residuos 120, por lo que la presión capilar aumenta continuamente a medida que el líquido en la cámara de matrices 110 se acerca a la cámara de residuos 120. La diferencia de presión produce un movimiento del líquido hacia el absorbente 122 en la cámara de desechos 120. En otras palabras, la forma de la cámara de matrices 110 permite la absorción continua de un líquido en la cámara de matrices 110 en la dirección de la cámara de residuos 120 hasta que el líquido alcanza el absorbente 122 en la cámara de residuos 120. El área transversal en el extremo de entrada de la cámara de matrices 110 puede ser al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces más grande que el área transversal en el extremo de salida de la cámara de matrices 110.

La cámara de matrices 110 puede tener una forma trapezoidal con dimensiones que se extienden desde 0,5 a 20 mm en el extremo de entrada y desde 0,1 a 5 mm en el extremo de salida. La cámara de matrices 110 puede comprender una serie de pasos que tienen un área transversal progresivamente menor desde el extremo de entrada hasta el extremo de salida. Estas características están diseñadas para tener un pequeño radio de curvatura en el frente de avance en comparación con el frente de retroceso, de modo que las burbujas de aire en la cámara de matrices 110 avancen hacia la cámara de desechos 120, y se eviten así los problemas mencionados anteriormente asociados con las burbujas.

La **Figura 1B** es una vista transversal del sistema de micromatrices 100 a lo largo de la línea AA que se muestra en la Figura 1A. El sistema de micromatrices 100 comprende la capa de sustrato 150, la capa espaciadora 160 y la capa de cubierta 170 de matrices. La capa espaciadora puede ser una cinta doble faz, como una cinta de junta interior, con un grosor de 0,25 mm (disponible de 3M, Pieza n.º 9087). La capa de sustrato 150 puede ser plástico moldeado por inyección con características que crean las paredes de la cámara de matrices 110 y un bolsillo para la cámara de desechos 120; no hay una capa espaciadora 160 en estas disposiciones.

Una película hidrófila puede laminarse sobre un sustrato de matriz plástica 150 con calor y/o presión para formar una superficie hidrófila en la que se imprime la micromatriz. La laminación se puede realizar con soldadura láser o soldadura ultrasónica.

La **Figura 2** proporciona una vista en primer plano de la cámara de matrices en forma de embudo 110 de la **Figura 1A**. Como se muestra en la **Figura 2**, el ancho de la cámara decreciente o la forma de "cuña" de la cámara de matrices permite aumentar la presión capilar en el lado de la cámara de desechos 120. Esta configuración deja que las burbujas fluyan a través de la cámara de matrices y evita la obstrucción de la cámara de matrices 110 por las burbujas de aire. Esta cámara estrecha con forma de embudo 110 también facilita la difusión de las moléculas objetivo en una muestra hacia los puntos de matrices 130. La muestra se puede cargar en el depósito 140 y fluye continuamente a través de la cámara de matrices 110 y en la cámara de desechos 120.

Los puntos de micromatrices 130 pueden disponerse en forma de múltiples tiras (por ejemplo, matriz de tiras de proteínas) que son perpendiculares al flujo en la cámara de matrices 110 para mejorar la interacción entre la molécula objetivo en la muestra y los elementos de la matriz. Se puede imprimir una matriz de proteínas o una matriz de tiras de proteínas dentro de la cámara de matrices 110. Las proteínas extraídas de una muestra se cargan en el depósito 140 y fluyen a través del punto 130 o la tira 130 de matrices de manera continua para entrar en la cámara de desechos 120.

Un entendido en la técnica puede saber que el sistema de micromatrices 100 puede tener muchas variaciones. Por ejemplo, todo el conjunto de micromatrices 100 puede moldearse en dos mitades, lo que crearía una línea de separación que abarca la línea central del depósito 140, el sustrato 150 y la cámara de residuos 120. La línea de separación puede tomar un camino contorneado para permitir un fácil acceso para el tratamiento de superficie hidrófila del lado superior de la cámara de matrices 110, y/o imprimir los puntos de matrices 130 en la superficie superior del sustrato 150. La mitad superior del sistema de matrices se puede tratar para que sea hidrófila, como con un tratamiento con plasma, un surfactante o cualquiera de las técnicas descritas anteriormente, y se puede unir en su lugar con una soldadura ultrasónica, soldadura láser, diseño de ajuste a presión, pegamento, cinta o cualquier método de unión. El tamaño de la capa de cubierta 170 puede cubrir solo las áreas de cámara pero no la superficie superior completa del sistema de micromatrices 100.

La **Figura 3** muestra una realización de un sistema de micromatrices 100 diseñado para facilitar la eliminación de burbujas de aire en la cámara de matrices 110, así como para mantener la muestra dentro de la cámara de matrices 110 durante la exposición prolongada a temperaturas extremas (hasta 95°C). En esta realización, el sistema de micromatrices 100 comprende una cámara de matrices 110 que tiene una entrada de muestra 112, una salida de muestra 114 y varios puntos de micromatrices 130 colocados en la parte superior del sustrato 150, una cámara de

desechos 120 que tiene un absorbente 122, una entrada 116 y una ventilación 124 y un canal 118 que conecta la salida de muestra 114 de la cámara de matrices 110 a la entrada 116 de la cámara de residuos 120. En esta realización, el canal 118 tiene una sección de expansión 118A y una sección de zigzag 118B. La sección de expansión 118A tiene un área transversal progresivamente creciente hacia la cámara de desechos 120, de modo que las burbujas de aire en la cámara de matrices 110, una vez que entran en el canal 118, queden atrapadas en las paredes laterales de la sección 118A y no bloqueen el flujo de fluido en el canal 118. La sección de expansión 118A ayuda a fijar la línea de contacto del líquido en las esquinas convexas de la sección durante la expansión de la muestra cuando la cámara de matrices 110 está expuesta a altas temperaturas. La pared lateral del canal 118A es hidrofóbica para atrapar burbujas. En algunas realizaciones, el área transversal en el extremo de la cámara de desechos del canal 118A es al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces más grande que el área transversal en el extremo de la cámara de matrices del canal 118A. La sección de zigzag 118B tiene dos vueltas para formar una sección de canal en forma de S o en forma de Z. En una realización, las dos vueltas son vueltas de 90°.

En otras realizaciones, la cámara de matrices 110 se fabrica con pequeños canales rectangulares 180 (es decir, canales con áreas transversales rectangulares) que son perpendiculares a la dirección del flujo para proporcionar un medio de secado de la matriz (véase **Figura 4A**). Estos canales 180 tienen esquinas afiladas producen un pequeño radio de curvatura de la interfaz líquido-aire y, por lo tanto, proporcionan altas presiones capilares que hacen avanzar los líquidos a lo largo de las paredes laterales y hacia la cámara de desechos 120. En otra realización, los canales rectangulares 180 son paralelos a la trayectoria del flujo de líquido (véase **Figura 4B**). En otra realización, los canales rectangulares 180 son paralelos y perpendiculares a la trayectoria del flujo de líquido (véase **Figura 4C**). En otra realización, los canales rectangulares 180 intersectan la trayectoria del flujo de líquido en ángulos que varían de 30 a 120 grados (véase **Figura 4D**). En otra realización, la superficie superior del sustrato 150 es rugosa para proporcionar la misma acción de absorción a lo largo de las grietas de la superficie.

La superficie superior también podría ser rugosa de modo que haya microcanales cuadrados paralelos, perpendiculares o cruzados o tengan alguna o todas estas características. El ángulo de contacto en las esquinas debe ser inferior a 90 grados para que el líquido avance a lo largo de estos canales hacia la cámara de desechos (absorbente). Este enfoque es similar al de las traqueidas (capilares cuadrados) en los árboles de coníferas, que permiten que el líquido avance hacia arriba en los árboles y así superar los efectos de la presión hidrostática.

Detección de moléculas objetivo con el sistema de micromatrices

En el presente documento también se divulga un método para usar el sistema de micromatrices descrito anteriormente para detectar una molécula objetivo en una muestra. La muestra puede ser cualquier muestra biológica, como un hisopo, aspirado nasofaríngeo o muestra de sangre entera. Los ácidos nucleicos totales pueden aislarse con técnicas conocidas para un entendido en la técnica. Los ácidos nucleicos totales pueden aislarse con reactivos o kits de aislamiento de ácidos nucleicos disponibles en el mercado, como los reactivos de Qiagen. Los ácidos nucleicos totales pueden aislarse con un dispositivo de preparación de muestras desarrollado por Akonni Biosystems. La secuencia generalizada de eventos para los métodos de preparación de muestras de Akonni incluye desnaturalización de la muestra en un tampón de lisis; perfusión continua de la muestra lisada sobre el dispositivo de preparación de la muestra; lavado y elución de los ácidos nucleicos del dispositivo de preparación de muestras.

Los ácidos nucleicos aislados se cargan en el sistema de micromatrices y se amplifican dentro del sistema de micromatrices mediante métodos bien conocidos por los entendidos en la técnica. Después de la amplificación, el sistema de micromatrices se incuba durante un determinado tiempo a una temperatura deseada (por ejemplo, 10-60 min a 50-65°C) para permitir que los amplicones se hibriden con la micromatriz. Después de la incubación, el sistema de micromatrices se lava (por ejemplo, con agua) y se toma una imagen en un lector de micromatrices (por ejemplo, el lector portátil de micromatrices de Akonni). El sistema de micromatrices se puede secar antes de obtener imágenes. El procedimiento de secado se puede llevar a cabo con la introducción de acetona en la cámara de matrices y/o calentando la cámara de matrices. La amplificación de los ácidos nucleicos aislados y el marcado de los productos de amplificación pueden ocurrir en una mezcla maestra de PCR asimétrica que contiene cebadores "inversos" marcados con fluorescencia en gran exceso (por ejemplo, 5-20 veces el exceso) sobre cebadores "hacia adelante" no marcados. Esta estrategia genera objetivos predominantemente de cadena simple con un solo marcador en su extremo 5'.

La prueba de matriz se puede realizar con muchas variaciones. El producto amplificado puede permanecer en la cámara de reacción después de la hibridación y no se lava antes de la obtención de imágenes de la micromatriz. El producto amplificado puede permanecer en la cámara de matrices y se pueden visualizar los puntos de matrices en tiempo real durante la hibridación para mostrar curvas de crecimiento, como describe Khodakov et al., 2008. La cámara de matrices puede soportar una serie de pasos de incubación y lavado para ensayos de varios pasos, como ELISA. La etapa de incubación se puede realizar bajo vibración periódica o continua para mejorar la interacción entre los elementos de la matriz y las proteínas objetivo.

Fabricación del sistema de micromatrices

En el presente documento también se divulga un método para fabricar sistemas de micromatrices que tienen una capa de sustrato, una capa espaciadora y una capa de cubierta que usa materiales de película delgada enrollable y un equipo carrete a carrete («reel-to-reel»). Se utilizan materiales de película enrollable para la capa de sustrato, la capa

espaciadora y la capa de cubierta del sistema de micromatrices. Las películas se colocan en capas una encima de la otra al desenrollar varios carretes, lo que crea un sándwich de componentes deseados, que se cortan al final de la línea de fabricación. Específicamente, una película de sustrato enrollable avanza hacia una plataforma de fabricación. Los puntos de matrices se imprimen en la película, formando matrices con un intervalo fijo entre matrices. La película de sustrato impresa luego se lamina con una cinta espaciadora enrollable, precortada con un método de fabricación de carrete a carrete separado para crear espacio para la cámara de matrices. Luego se lamina una película de cubierta enrollable sobre la película espaciadora para sellar la cámara de matrices. La cinta espaciadora enrollable puede precortarse para crear espacio para la cámara de matrices y una o más cámaras de residuos. Se coloca un absorbente en cada cámara de residuos antes de laminar la película de cubierta a la película espaciadora. La virtud de este método de fabricación es que un alto volumen de producción puede ser muy rentable, ya que con un equipo de producción estándar se puede automatizar completamente el ensamblaje de sistemas de micromatrices a velocidades muy altas.

La película de sustrato puede ser cualquier película delgada que tenga una superficie que cuente con átomos de carbono con doble enlace. Preferiblemente, la película de sustrato tiene una superficie hidrófoba. Los ejemplos de la película de sustrato incluyen, a modo no taxativo, películas de poliéster, películas de mezcla de poliéster/policarbonato, politetrafluoroetileno, polietileno, polieterimida, poliéter éter cetona y poliestireno. La película de sustrato puede tener un grosor en el intervalo de 20 a 200 micrones, preferiblemente de 50 a 125 micrones.

La película espaciadora puede ser cualquier cinta de doble faz con el grosor deseado. La película espaciadora puede estar hecha de un material hidrófobo y tiene un espesor en el rango de 20-500 micrones, preferiblemente 100-300 micrones. Los ejemplos de la película espaciadora incluyen, a modo no taxativo, películas de poliéster, películas de mezcla de poliéster/policarbonato, polipropileno, policarbonato, acetal, poli (metacrilato de metilo), cinta 256M de Adchem y politetrafluoroetileno. La película de cubierta puede ser cualquier película delgada con una superficie hidrófila. Los ejemplos de películas hidrófilas incluyen, a modo no taxativo, las películas Vistex® y Visguard® (Film Specialties Inc., Hillsborough, NJ) y Lexan HPFAF (GE Plastics, Pittsfield, MA). Surmodics, Inc. (Eden Prairie, MN), Biocoat Inc. (Horsham, PA), Advanced Surface Technology (Billerica, MA) e Hydromer, Inc. (Branchburg, NJ) ofrecen otras superficies hidrófilas.

La película de cobertura puede tener un grosor en el intervalo de 25-250 micrones, preferiblemente de 50-125 micrones.

La micromatriz puede ser una micromatriz de punto de gel impresa en la película de sustrato con una impresora de micromatrices sin contacto (por ejemplo, una impresora piezoeléctrica) que permite imprimir en una película en movimiento. Los puntos de gel pueden comprender sondas, como sondas de proteínas o sondas de nucleótidos que están reticuladas de manera covalente con el esqueleto del polímero mediante copolimerización inducida por UV.

La Figura 5 muestra una línea de montaje carrete a carrete para la fabricación del dispositivo de micromatrices de la presente solicitud. Concretamente, el carrete de película de sustrato 512 coloca una película de sustrato 510 sobre la línea de montaje 500. Una impresora de puntos de gel 514 imprime puntos de matrices en la película de sustrato 510. Las sondas en los puntos de gel se reticulan de forma covalente con el esqueleto del polímero mediante iluminación UV. La reticulación se puede realizar a través de un proceso de copolimerización inducida por UV en una sola etapa, en atmósfera de argón, en una cámara de UV 516. Las películas delgadas se pueden mantener en su lugar por la tensión inherente entre los carretes del sistema. Esto mejora la uniformidad de la iluminación UV en la superficie de la película delgada al mantener las películas planas en las cámaras de UV durante la polimerización. La micromatriz reticulada se lava en la estación de lavado 518, se seca con cuchillas de aire 520 y se examina con la cámara de control de calidad (QC) 522. Las matrices defectuosas pueden marcarse con un marcador de rechazo 524 y se lamina una película espaciadora 526 sobre la película de sustrato 510 mediante el carrete de cinta espaciadora 528. La película espaciadora puede precortarse antes de la laminación para crear espacio para la cámara de matrices y una o más cámaras de residuos. Los absorbentes 530 se agregan luego a las cámaras de desechos; las piezas de absorbente precortadas con un dorso adhesivo se colocan en la cámara de desechos abierta a través del carrete absorbente 532. El carrete de película de cubierta 536 lamina luego una película de cubierta 534 sobre la estructura de la capa de sustrato/espaciadora. La guillotina 538 corta la estructura de la capa ensamblada para producir sistemas de micromatrices individuales.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Método para compensar las variaciones de impresión de micromatrices

Las micromatrices de gota de gel con fluoróforos Cy3 y Cy5 se imprimieron en diez portaobjetos separados de conformidad con el siguiente plano de montaje. Los siguientes pasos se utilizan para imprimir la micromatriz: (1) prepare la mezcla apropiada de oligo Cy3/Cy5 y séquela en un CentriVap, (2) prepare una solución de copolímero (monómero + reticulante + glicerol + tampón), (3) disuelva el oligo seco en solución de copolímero, (4) coloque la solución en una placa fuente, y (5) use la placa fuente para impresión/polimerización/lavado de matrices.

Plano de montaje

ES 2 698 901 T3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	10
1	Cy3: Cy5 (1:1)										
2	Cy3: Cy5 (1:1)										
3	Cy3: Cy5 (1:1)										
4	Cy3: Cy5 (1:1)										
5	Cy3: Cy5 (1:1)										
6	Cy3: Cy5 (1:1)										
7	Cy3: Cy5 (1:1)										
8	Cy3: Cy5 (1:1)										
9	Cy3: Cy5 (1:1)										
10	Cy3: Cy5 (1:1)										
11	Cy3: Cy5 (1:1)										
12	Cy3: Cy5 (1:1)										
13	Cy3: Cy5 (1:1)										
14	Cy3: Cy5 (1:1)										
15	Cy3: Cy5 (1:1)										
16	Cy3: Cy5 (1:1)										
17	Cy3: Cy5 (1:1)										
18	Cy3: Cy5 (1:1)										

Para el análisis se utilizó un GenePix 4000B con la siguiente configuración: potencia del láser 100% para ambos colores, aumento de 500 para el canal rojo y aumento de 375 para el ajuste de voltaje del tubo fotomultiplicador de canal verde, resolución de 5 µm y círculos de 175 µm de diámetro. Las intensidades integradas se calcularon con el software GenePix para cada punto y se calcularon las desviaciones estándar relativas (RSD) para los 198 puntos Cy5, 198 puntos Cy3 y la relación de puntos Cy3/Cy5. Como se ve en la Tabla 1, el coeficiente de variación (CV) es más bajo para las 10 diapositivas cuando se utiliza una relación de la intensidad integrada Cy3/Cy5 en comparación con la intensidad de las señales Cy3 o Cy5, en algunos casos, por un factor tan alto como 3. Estos datos sustentan la

5 implementación de un control de fluorescencia interno, como un colorante Cy5, que se escanea o se toma una imagen como parte del control de calidad de la fabricación para compensar la variabilidad como resultado de la dosificación UV, la temperatura, las propiedades de la superficie, la síntesis, la viscosidad, la condensación, el lavado (es decir, debido a los efectos causados por las diferencias de temperatura, viscosidad, caudal, astringencia o cualquier otra que pueda influir en la eliminación o distorsión de puntos), la profundidad de inmersión de los pines en la solución de polímeros para tecnologías de impresión de pines o cualquier propiedad que pueda influir en la morfología y/o concentración de las sondas dentro de un punto dado.

Tabla 1

Portaobjetos	Cy5 RSD	Cy3 RSD	Cy3/Cy5 RSD
1	17,5%	12,1%	7,6%
2	14,3%	10,0%	5,5%
3	10,8%	8,5%	3,1%
4	5,5%	3,7%	3,0%
5	7,5%	6,0%	2,5%
6	5,1%	5,0%	1,4%
7	8,5%	6,0%	4,1%
8	11,7%	7,8%	5,1%
9	6,6%	5,0%	3,6%
10	4,6%	4,5%	3,5%

Ejemplo 2

10 Método de análisis de imágenes

El control de fluorescencia interno se ha implementado en las micromatrices de MRSA de Akonni y ha demostrado ser efectivo para compensar la variabilidad en la intensidad de la fluorescencia. La Tabla 2 muestra los datos de fluorescencia de un conjunto de 4 gotas de gel en micromatrices de MRSA dopadas con fluoróforos Cy5 y sondas de MecA. Se tabularon las intensidades de señales integrales para las 4 gotas replicadas tomadas durante el control de calidad de fábrica (canal rojo) y la hibridación posterior (canal verde). Debido al daño físico en la réplica 3, tanto el canal rojo como el canal verde mostraron intensidades de señales integrales significativamente reducidas para la réplica 3. Como resultado de la intensidad de la señal reducida de la réplica 3, la desviación relativa es de 23,8% y 29,5% para los canales rojo y verde, respectivamente. Cuando los datos del canal verde y del canal rojo se calculan como una relación, la desviación relativa se reduce al 12,2%. Esto demuestra que los datos de control de fluorescencia interna (canal rojo) se pueden usar para reducir la variabilidad de la imagen de la micromatrices y/o la producción de micromatrices.

Tabla 2

Integral de Intensidades de Señal

	Réplicas: 1	Réplicas: 2	Réplicas: 3	Réplicas: 4	Promedio	Desviación estándar	%RSD
Canal rojo	1031897	1095959	613676	1063218	951187	226522	23,8%
Canal verde	2812769	3707689	1909522	3874995	3076244	906896	29,5%
Relación verde/rojo	2,725823	3,383054	3,111613	3,644591	3,21627	0,392754	12,2%

25 **Ejemplo 3**

Algoritmos para la generación de imágenes

Algoritmo 1

Este algoritmo toma una imagen de QC Cy5 prehibridación de la matriz y genera un archivo de datos que contiene los parámetros de QC de la matriz.

- 5 1. Lea la imagen de QC Cy5 y cree dos copias locales, una es el original sin modificar (CY5_Original) y la otra se transformará en una imagen binaria (Cy5_Processed) en los pasos 2 y 3.
2. Tome la imagen Cy5_Processed, aplique el filtro digital y la operación de píxeles para generar una imagen con un segundo plano uniforme y de valor cero.
3. Establezca el umbral de la imagen en una imagen binaria y guárdela como Cy5_Processed.
- 10 4. Aplique el análisis de partículas a la imagen binaria (Cy5_Processed), a los objetos identificados y filtrados en función del tamaño. Mida y registre los parámetros de los objetos: centro de masa, recuadro de selección, área de partículas y elipticidad.
5. Verifique si la cantidad de objetos identificados en el paso 4 cumple con el requisito mínimo; de lo contrario, rechace el portaobjetos.
- 15 6. Encuentre la cuadrícula.
 - a. Seleccione un objeto y suponga que su centro de masa es el origen de la cuadrícula.
 - b. Forme la cuadrícula y calcule la ubicación de píxeles de cada celda de cuadrícula.
 - c. Aplique todos los objetos a la cuadrícula y verifique si al menos el 80% de la celda de la cuadrícula que debe contener una gota Cy3 tiene objetos dentro. En caso afirmativo, se ha encontrado la cuadrícula y continúe con el paso
- 20 7. Caso contrario, repita 6A a 6C con el centro de masa de un objeto diferente como origen de la cuadrícula.
7. Gire la imagen para que el ángulo formado por las gotas de Cy3 esté a menos de 0,2 grados del eje horizontal.
8. Ajuste la cuadrícula. Debido a que en el paso 6, el origen de la cuadrícula está determinado por el centro de masa de un objeto en la imagen binaria, el centro de masa podría desviarse ligeramente del verdadero centro del objeto.
 - a. Mueva el origen de la cuadrícula en (0,1), es decir, reste 0 píxeles de la coordenada X y 1 píxel de la coordenada Y.
 - b. Para cada gota de Cy3, calcule lo siguiente:
 - i. Desviación X: Distancia en la coordenada X entre el centro de la gota Cy3 y el centro de su celda de cuadrícula.
 - ii. Desviación Y: Distancia en la coordenada Y entre el centro de la gota Cy3 y el centro de su celda de cuadrícula.
- 30 c. Resuma las desviaciones para todas las gotas de Cy3 mediante $score = \text{Sum}(\text{abs}(\text{DeviationX}) + \text{abs}(\text{DeviationY}))$. Una puntuación más baja significa una mejor colocación de la cuadrícula.
- d. Repita los pasos 8A a 8C para 24 combinaciones, que se muestran en la siguiente tabla.
- e.

-2,2	-1,2	0,2	1,2	2,2
-2,1	-1,1	0,1	1,1	2,1
-2,0	-1,0		-1,0	2,0
-2,-1	-1,-1	0,-1	1,-1	2,-1
-2,-2	-1,-2	0,-2	1,-2	2,-2

- 35 f. Elija el centro de cuadrícula para que su puntuación sea la menor.
9. Calcule la información de QC para cada punto.
 - a. Desviación X: Coordenada X del centro de la gota MENOS Coordenada X del centro de la celda de la cuadrícula.
 - b. Desviación Y: Coordenada Y del centro de la gota MENOS Coordenada Y del centro de la celda de la cuadrícula.
 - c. Indicador de rechazo: Rechace un punto en función del diámetro, la elipticidad, etc.

ES 2 698 901 T3

d. Intensidad del punto

e. Diámetro

10. Escriba los datos de QC en un archivo de texto, consulte la Tabla 3.

Tabla 3.

5 Ejemplo de datos de QC de la matriz.

Fila de cuadrícula	Columna de cuadrícula	Tipo de punto	¿Rechazar ?	Centro X de la cuadrícula	Centro Y de la cuadrícula	Desviación X	Desviación Y	Intensidad del punto	Diámetro
1	1	Cy3	FALSO	105	88	3	1	2143818	8,85
1	2	Vacío	FALSO	135	88	0	0	261	0,00
1	3	Vacío	FALSO	166	88	0	0	568	0,00
1	4	Vacío	FALSO	196	88	0	0	-87	0,00
1	5	Vacío	FALSO	226	88	0	0	228	0,00
1	6	Cy3	FALSO	257	88	0	3	1612600	9,72
1	7	Cy3	FALSO	287	88	1	3	1567664	9,02
1	8	Vacío	FALSO	318	88	0	0	506	0,00
1	9	Vacío	FALSO	348	88	0	0	1426	0,00
1	10	Vacío	FALSO	378	88	0	0	3420	0,00
1	11	Vacío	FALSO	409	88	0	0	991	0,00
1	12	Cy3	FALSO	439	88	-1	3	2216029	9,65
2	1	Vacío	FALSO	105	119	0	0	-319	0,00
2	2	Vacío	FALSO	135	119	0	0	334	0,00
2	3	Sonda 31	FALSO	166	119	5	0	1618379	10,12
2	4	Vacío	FALSO	196	119	0	0	486	0,00
2	5	Vacío	FALSO	226	119	0	0	83	0,00
2	6	H	FALSO	257	119	-1	-1	1750396	8,99
2	7	Vacío	FALSO	287	119	0	0	40709	0,00
2	8	Vacío	FALSO	318	119	0	0	-162	0,00
2	9	Sonda 31	FALSO	348	119	0	3	2061064	10,61
2	10	Vacío	FALSO	378	119	0	0	127	0,00
2	11	Vacío	FALSO	409	119	0	0	289	0,00,
2	12	H	FALSO	439	119	-1	3	2030635	9,19
3	1	Vacío	FALSO	105	149	0	0	1143	0,00
3	2	Sonda 14	FALSO	135	149	4	1	2222565	9,43

ES 2 698 901 T3

3	3	Sonda 35	FALSO	166	149	2	1	2088478	9,16
3	4	Vacío	FALSO	196	149	0	0	3938	0,00
3	5	Vacío	FALSO	226	149	0	0	-96	0,00
3	6	Vacío	FALSO	257	149	0	0	-33	0,00
3	7	Vacío	FALSO	287	149	0	0	582	0,00
3	8	Sonda 14	FALSO	318	149	0	1	2073261	9,90
3	9	Sonda 35	FALSO	348	149	2	1	1651170	8,86
3	10	Vacío	FALSO	378	149	0	0	837	0,00
3	11	Vacío	FALSO	409	149	0	0	370	0,00
3	12	Vacío	FALSO	439	149	0	0	315	0,00
4	1	Vacío	FALSO	105	180	0	0	162	0,00
4	2	Vacío	FALSO	135	180	0	0	-179	0,00
4	3	Sonda 36	FALSO	166	180	3	2	1782715	8,49
4	4	Vacío	FALSO	196	180	0	0	633	0,00
4	5	Sonda 29	FALSO	226	180	3	0	1715205	9,51
4	6	Vacío	FALSO	257	180	0	0	274	0,00
4	7	Vacío	FALSO	287	180	0	0	242	0,00
4	8	Vacío	FALSO	318	180	0	0	329	0,00
4	9	Sonda 36	FALSO	348	180	-1	-1	1666545	9,66
4	10	Vacío	FALSO	378	180	0	0	12157	0,00
4	11	Sonda 29	FALSO	409	180	-1	1	1706590	10,47
4	12	Vacío	FALSO	439	180	0	0	1180	0,00
5	1	Vacío	FALSO	105	210	0	0	308	0,00
5	2	Vacío	FALSO	135	210	0	0	180	0,00
5	3	Sonda 37	FALSO	166	210	2	1	1537455	9,70
5	4	dN20	FALSO	196	210	1	0	1854849	10,35
5	5	Vacío	FALSO	226	210	0	0	486	0,00
5	6	Sonda 90	FALSO	257	210	2	1	1697651	9,01
5	7	Vacío	FALSO	287	210	0	0	-115	0,00
5	8	Vacío	FALSO	318	210	0	0	-382	0,00

ES 2 698 901 T3

5	9	Sond a 37	FALSO	348	210	1	2	2009715	9,84
5	10	dN20	FALSO	378	210	0	1	2187695	10,80
5	11	Vacío	FALSO	409	210	0	0	1099	0,00
5	12	Sond a 90	FALSO	439	210	0	0	2007504	10,03
6	1	Cy3	FALSO	105	240	5	0	1264671	8,35
6	2	Vacío	FALSO	135	240	0	0	-203	0,00
6	3	Vacío	FALSO	166	240	0	0	476	0,00
6	4	Vacío	FALSO	196	240	0	0	214	0,00
6	5	Vacío	FALSO	226	240	0	0	695	0,00
6	6	Vacío	FALSO	257	240	0	0	218	0,00
6	7	Cy3	FALSO	287	240	1	3	1125959	9,57
6	8	Vacío	FALSO	318	240	0	0	107	0,00
6	9	Vacío	FALSO	348	240	0	0	874	0,00
6	10	Vacío	FALSO	378	240	0	0	617	0,00
6	11	Vacío	FALSO	409	240	0	0	528	0,00
6	12	Vacío	FALSO	439	240	0	0	580	0,00
7	1	Cy3	FALSO	105	271	1	-1	1734877	9,71
7	2	Vacío	FALSO	135	271	0	0	-634	0,00
7	3	Vacío	FALSO	166	271	0	0	-69	0,00
7	4	Vacío	FALSO	196	271	0	0	276	0,00
7	5	Vacío	FALSO	226	271	0	0	-199	0,00
7	6	Cy3	FALSO	257	271	0	-2	1581737	10,49
7	7	Cy3	FALSO	287	271	0	0	1522026	9,37
7	8	Vacío	FALSO	318	271	0	0	-748	0,00
7	9	Vacío	FALSO	348	271	0	0	2635	0,00
7	10	Vacío	FALSO	378	271	0	0	747	0,00
7	11	Vacío	FALSO	409	271	0	0	246	0,00
7	12	Cy3	FALSO	439	271	-1	0	1640104	10,37
8	1	Vacío	FALSO	105	301	0	0	586	0,00
8	2	Vacío	FALSO	135	301	0	0	439	0,00
8	3	Sond a 31	FALSO	166	301	1	-1	2008843	10,06
8	4	Vacío	FALSO	196	301	0	0	247	0,00
8	5	Vacío	FALSO	226	301	0	0	319	0,00

ES 2 698 901 T3

8	6	H	FALSO	257	301	-1	0	1534132	10,46
8	7	Vacío	FALSO	287	301	0	0	-477	0,00
8	8	Vacío	FALSO	318	301	0	0	13815	0,00
8	9	Sond a 31	FALSO	348	301	-1	-1	1704828	10,04
8	10	Vacío	FALSO	378	301	0	0	260	0,00
8	11	Vacío	FALSO	409	301	0	0	2993	0,00
8	12	H	FALSO	439	301	0	2	1569671	9,96
9	1	Vacío	FALSO	105	332	0	0	148	0,00
9	2	Sond a 14	FALSO	135	332	2	-3	1969286	9,77
9	3	Sond a 35	FALSO	166	332	3	-1	1636381	9,53
9	4	Vacío	FALSO	196	332	0	0	792	0,00
9	5	Vacío	FALSO	226	332	0	0	-377	0,00
9	6	Vacío	FALSO	257	332	0	0	594	0,00
9	7	Vacío	FALSO	287	332	0	0	570	0,00
9	8	Sond a 14	FALSO	318	332	1	-3	1812677	10,36
9	9	Sond a 35	FALSO	348	332	0	-2	1881764	9,97
9	10	Vacío	FALSO	378	332	0	0	444	0,00
9	11	Vacío	FALSO	409	332	0	0	-423	0,00
9	12	Vacío	FALSO	439	332	0	0	287	0,00
10	1	Vacío	FALSO	105	362	0	0	426	0,00
10	2	Vacío	FALSO	135	362	0	0	-23	0,00
10	3	Sond a 36	FALSO	166	362	1	-4	1582212	9,85
10	4	Vacío	FALSO	196	362	0	0	1518	0,00
10	5	Sond a 29	FALSO	226	362	1	-1	1629291	11,09
10	6	Vacío	FALSO	257	362	0	0	4511	0,00
10	7	Vacío	FALSO	287	362	0	0	201	0,00
10	8	Vacío	FALSO	318	362	0	0	-397	0,00
10	9	Sond a 36	FALSO	348	362	-1	1	1683589	9,69
10	10	Vacío	FALSO	378	362	0	0	75	0,00
10	11	Sond a 29	FALSO	409	362	0	1	1763951	10,31

ES 2 698 901 T3

10	12	Vacío	FALSO	439	362	0	0	607	0,00
11	1	Vacío	FALSO	105	392	0	0	-321	0,00
11	2	Vacío	FALSO	135	392	0	0	437	0,00
11	3	Sonda 37	FALSO	166	392	0	-4	1782130	9,95
11	4	dN20	FALSO	196	392	3	-2	1886735	10,28
11	5	Vacío	FALSO	226	392	0	0	293	0,00
11	6	Sonda 90	FALSO	257	392	0	-4	1569567	10,77
11	7	Vacío	FALSO	287	392	0	0	1805	0,00
11	8	Vacío	FALSO	318	392	0	0	-262	0,00
11	9	Sonda 37	FALSO	348	392	-1	-3	1872819	9,83
11	10	dN20	FALSO	378	392	1	-4	2034194	10,21
11	11	Vacío	FALSO	409	392	0	0	-258	0,00
11	12	Sonda 90	FALSO	439	392	0	0	1693534	10,95
12	1	Cy3	FALSO	105	423	3	-1	1658433	8,06
12	2	Vacío	FALSO	135	423	0	0	521	0,00
12	3	Vacío	FALSO	166	423	0	0	285	0,00
12	4	Vacío	FALSO	196	423	0	0	-447	0,00
12	5	Vacío	FALSO	226	423	0	0	-436	0,00
12	6	Vacío	FALSO	257	423	0	0	-129	0,00
12	7	Cy3	FALSO	287	423	1	0	1392853	8,72
12	8	Vacío	FALSO	318	423	0	0	257	0,00
12	9	Vacío	FALSO	348	423	0	0	649	0,00
12	10	Vacío	FALSO	378	423	0	0	-108	0,00
12	11	Vacío	FALSO	409	423	0	0	64	0,00
12	12	Vacío	FALSO	439	423	0	0	-84	0,00

Algoritmo 2

Este proceso toma dos imágenes de la matriz posterior a la hibridación: una con exposición normal (Image_NormalExposure) y otra con alta exposición para enfatizar la señal de baliza Cy3 (Image_HighExposure).

- 5
 1. Lea Image_HighExposure e Image_NormalExposure en la memoria.
 2. Leer del archivo de texto de QC.
 3. Opere en Image_HighExposure Image para encontrar la cuadrícula.
 - a. Tome la imagen Cy5_Processed, aplique el filtro digital y la operación de píxeles para generar una imagen con un segundo plano uniforme y de valor cero.

- b. Establezca el umbral de la imagen en una imagen binaria.
- c. Aplique el análisis de partículas a la imagen binaria, a los objetos identificados y filtrados en función del tamaño. Mida y registre los parámetros de los objetos: centro de masa, recuadro de selección, área de partículas y elipticidad.
- 5 d. Verifique si la cantidad de objetos identificados en el paso 4 cumple con el requisito mínimo; de lo contrario, rechace el portaobjetos.
- e. Encuentre la cuadrícula, similar al paso 6 en el Algoritmo 1.
- f. Gire la imagen para que el ángulo formado por las gotas de Cy3 esté a menos de 0,2 grados del eje horizontal.
- g. Ajuste la cuadrícula, similar al paso 8 en el Algoritmo 1.
- 4. Aplique la cuadrícula que se encuentra en Image_HighExposure a la Image_NormalExposure.
- 10 5. Utilice la desviación X, la desviación Y, el diámetro y el indicador de rechazo del archivo de QC para determinar los parámetros de punto relevantes.
 - a. Si el Indicador de Rechazo es verdadero, excluya el punto del análisis.
 - b. Punto coordenada X: Coordenada X del centro de la cuadrícula MÁS Desviación X.
 - c. Punto coordenada X: Coordenada Y del centro de la cuadrícula MÁS Desviación Y.
 - 15 d. Diámetro del punto: Diámetro del punto de la información de QC.
- 6. Calcule la intensidad del punto y el segundo plano.
- 7. Realice el cálculo final para determinar resultados analíticos.

Ejemplo 4

20 Se construye un sistema de micromatrices de proteínas con elementos de gota de gel que contienen anticuerpos. Los portaobjetos de vidrio con micromatrices de elementos de gel impresos se bloquean con PBS que contiene 1% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Los portaobjetos se enjuagan con agua desionizada y se dejan secar al aire en un ambiente libre de polvo. Luego se ensambla el sistema de micromatrices con el portaobjetos de vidrio bloqueado, la cinta de 256 M cortada con láser de Adchem, la película Lexan hidrófila y un depósito. Se miden en pipeta aproximadamente 0,5 ml de SEB (1 µg/ml en PBS con Tween-20 al 0,05% y BSA al 1%) en el depósito del sistema de micromatrices y se embeben continuamente a través de la cámara de matrices a temperatura ambiente.

25 Posteriormente se miden en pipeta 0,2 ml de dilución de anticuerpo monoclonal anti-SEB en PBST con BSA al 1% en el depósito del sistema de micromatrices, que se embebe continuamente a través de la cámara de matrices y en la cámara de residuos. Luego se miden en pipeta 0,2 ml de PBST en el depósito del sistema de micromatrices, que se embebe continuamente a través de la cámara de matrices y en el absorbente de la cámara de residuos. Seguidamente se miden en pipeta 0,1 ml de anticuerpo anti-ratón marcado con Alexa 568 a 0,2 µg/ml en PBST con BSA al 1% en el depósito del sistema de micromatrices, que se embebe continuamente a través de la cámara de matrices y en el absorbente de la cámara de residuos. Se miden en pipeta 0,2 ml adicionales de lavado de PBST en el depósito del sistema de micromatrices, que se embebe continuamente a través de la cámara de matrices y en el absorbente de la cámara de residuos. Luego se toma una imagen del sistema de micromatrices con un láser verde (532 nm) mediante un filtro de 605 nm en Aurora PortArray 5000.

35

Ejemplo 5

Las mezclas de oligonucleótidos se sintetizan para MRSA de conformidad con el plano de la matriz que se muestra en la **Figura 9**. Cada sonda se sintetiza junto con la sonda de control interno Cy5. Las sondas de control Cy3 adicionales, unidas a la misma secuencia de oligonucleótidos, también se mezclan con las sondas de control Cy5.

40 Con el fin de establecer una curva de calibración, los puntos Cy3/Cy5 se imprimen en 1 log de cambios de concentración en concentraciones que varían entre 0,1 nM y 10 µM. Un sistema de imágenes consta de dos trenes ópticos. Ambos trenes ópticos consisten en un LED y una cámara CCD no refrigerada. Un tren óptico servirá para detectar puntos Cy3 (550 nm de excitación y 570 nm de emisión) y el otro tren óptico servirá para detectar puntos Cy5 (650 nm de excitación y 670 nm de emisión). Los trenes ópticos se fijan en el espacio en relación con el instrumento.

45 Una plataforma móvil mueve la matriz al canal verde y se adquieren 10 imágenes para mejorar el rango dinámico; la adquisición de imágenes múltiples en tiempos de exposición cortos evita la saturación que puede ocurrir como resultado del uso de materiales con alta autofluorescencia y, al mismo tiempo, permite que el promedio de la señal reduzca el efecto del ruido aleatorio. La plataforma mueve la matriz al canal rojo y se obtienen 10 imágenes. El proceso se repite 5 veces para explicar una posible desalineación debido a precisiones de posicionamiento, tiempo de exposición inadecuado, puntos fuera de foco y/o cualquier otra anomalía que pueda comprometer la toma correcta de imágenes. Se traza una curva de calibración con respecto a la dilución de concentraciones de Cy3/Cy5, como se muestra en el límite exterior de la matriz en el plano de montaje que se incluye seguidamente. La curva de calibración,

50

derivada de este gradiente de concentración, busca corregir los factores que afectan a todo el sistema, como la degradación de la vida útil de las sondas, la temperatura, los cambios en la dosis de UV, las variaciones de síntesis o cualquier artefacto sistémico que pueda provocar un comportamiento irreproducible. La curva de calibración para Cy5 se traza durante el análisis con la curva de calibración para Cy3.

$$5 \quad I_{\text{rojo}} = m_{\text{rojo}} \times \text{moles}(\text{Cy5}) + b_{\text{rojo}}$$

$$I_{\text{verde}} = m_{\text{verde}} \times \text{moles}(\text{Cy3}) + b_{\text{verde}}$$

10 donde I_{rojo} e I_{verde} son intensidades integrales de supresión de segundo plano. Las pendientes, m_{rojo} y m_{verde} , y las intersecciones, b_{rojo} y b_{verde} , se calculan a partir de estas curvas de calibración. Se trazan los promedios de las curvas de calibración y se rechazan los valores atípicos. A fin de tener en cuenta la irreproducibilidad de punto a punto, de sistema a sistema y de lote a lote, se calcula el valor de la intensidad integral de supresión de segundo plano Cy5 para cada punto. Durante la síntesis, las concentraciones de la sonda (14, 31, 35, 36, 37, 29, 90, H o dN20) para cada punto tienen una concentración equimolar de sonda de oligonucleótidos y fluoróforos Cy5 para cada punto. Así, la siguiente relación tiene:

Concentración Cy3 \approx Concentración Cy5.

De este modo,

$$I_{\text{verde, saturación}} \approx m_{\text{verde}} \times \text{moles}(\text{Cy5}) + b_{\text{verde}}$$

20 donde $I_{\text{verde, saturación}}$ representa la situación hipotética en la que todas las sondas en el elemento de gel están unidas a moléculas Cy3 marcadas. Nótese que $\text{moles}(\text{Cy5})$ reemplaza a $\text{moles}(\text{Cy3})$ por la equivalencia equimolar en la ecuación anterior. La intensidad integral corregida en segundo plano de las sondas para los puntos que determinan la presencia de MRSA se mide en los puntos representativos y se calcula. Si esta intensidad cumple con el siguiente criterio:

$$25 \quad I_{\text{verde, meas}}/I_{\text{verde, saturación}} > 0,001$$

el valor se considera positivo. Es decir, más del 0,1% de las posibles moléculas de sonda han unido el objetivo con marcadores Cy3. Este método también se puede utilizar para la cuantificación.

Ejemplo 6

30 Los carretes de cinta de medio corte (*kiss-cut*) se fabrican para el carrete de la cinta espaciadora, que contiene el recorte del espaciador, y el carrete de la cubierta se perfora previamente con los orificios de entrada y de ventilación. Como se muestra en la **Figura 5**, durante la producción, el carrete de película de sustrato se desenrolla y el protector antiadherente se recoge en el carrete superior. La impresora de elementos de gel imprime los elementos de gel en la película de sustrato. Luego, la película se expone a UV en una atmósfera inerte (por ejemplo, gas argón). La presión positiva de argón se agrega lentamente a la cámara de argón y, como su densidad es mayor que la del

35 aire, se asienta en el fondo de la cámara donde se encuentra el sustrato. Esto permite un bajo caudal de argón en la cámara y, por lo tanto, requiere una demanda mínima de aire de reposición de la habitación. Para garantizar que no quede ningún polímero no polimerizado sobre el sustrato, el sustrato se desplaza a través de una estación de lavado, que se coloca de manera que se elimine cualquier salpicadura en la cámara de polimerización. Las matrices lavadas se secan con un sistema de cuchillas de aire convencional. Una cámara de QC garantiza que los elementos se impriman de conformidad con las especificaciones y un marcador de rechazo alerta al operador para que descarte los sistemas que no las cumplan. La cinta espaciadora de doble faz, que define la cámara de micromatrices, se desenrolla y se une al sustrato. Las aberturas en la cinta espaciadora están diseñadas para permitir tolerancias bastante sueltas durante la laminación de la cinta espaciadora al sustrato, lo que permite la fabricación de matrices de elementos de gel de geometría y complejidad variables sin modificar la línea de montaje. Un absorbente enrollable se desenrolla y

45 se monta en la cámara de desechos del sistema, donde se sella en su lugar con una cinta adhesiva o de doble faz. Una estrategia alternativa para incluir el absorbente consiste en usar un robot *pick-and-place* para insertar el absorbente en una cámara de desechos. El diseño actual de la celda de flujo utiliza una capa espaciadora adicional para acomodar un absorbente que es dos veces más gruesa que la cámara de reacción. Finalmente, se aplica la película de cubierta, que tiene orificios de llenado. Los orificios de llenado pueden ser considerablemente más grandes o más pequeños que los orificios del espaciador, lo que permite tolerancias sueltas durante la alineación. Una guillotina corta la cinta en el tamaño apropiado.

Los robots de impresión de pines normalmente cuentan con un cabezal de impresión que se rellena con pines mecanizados con precisión. El cabezal de impresión está conectado a un brazo de control de eje xyz de precisión

(Figura 7). El brazo de control mueve el cabezal de impresión con una precisión de micras entre la placa fuente de la solución de impresión (por ejemplo, una placa de microtitulación de 384 pocillos), la estación de impresión del sustrato (la platina) y una estación de lavado (para limpiar los pines entre la deposición de soluciones únicas). Alternativamente, un cabezal de impresión sin contacto de alto rendimiento deposita múltiples soluciones simultáneamente dentro de la cámara de reacción de PCR-micromatrices.

Toda la micromatriz puede imprimirse de una sola vez. El Mecanizado por Descarga Eléctrica (EDM) se puede utilizar para crear cabezales de impresión con pines de 125 micrones (diámetro de los pines utilizados actualmente) y centros de 300 micrones utilizados actualmente. Además, Parallel Synthesis Designs ofrece placas de 24576 pocillos, que tienen pocillos con centros de 560 micrones. Esto se traduce en aproximadamente 350 puntos por cm cuadrado. Si bien esta cantidad de puntos es lo suficientemente adecuada para la mayoría de las aplicaciones de diagnóstico, se pueden realizar pruebas que requieren puntos adicionales si se acomodan varias impresoras en serie en la línea de montaje y de este modo aumenta el tiempo de impresión solo por el traslado de una impresora a la siguiente. Otra forma de imprimir en una película en movimiento incluye el uso de una impresora sin contacto, que implementa un cristal piezoeléctrico y un capilar que aspira la solución de impresión de micromatrices y dispensa gotas de picolitros a nanolitros sobre el sustrato. El cabezal de impresión puede incluir múltiples capilares para imprimir simultáneamente una serie de puntos únicos de micromatrices con distintas sondas. Además, este cabezal de impresión puede ser una matriz de alta densidad de capilares para aumentar la cantidad de puntos únicos de micromatrices. Alternativamente, el cabezal de impresión puede rasterizar a lo largo y arriba y abajo de la película del sustrato para imprimir los puntos replicados o se puede usar el método de rasterizado del cabezal de impresión para aspirar una suspensión de sonda de polímero separada para imprimir múltiples puntos únicos con el mismo cabezal de impresión. Otra opción es hacer que la película de sustrato se vuelva a cargar en el sistema de carrete a carrete después de una primera pasada de impresión, para volver a imprimir puntos adicionales (únicos) para cada micromatriz en el rollo de película de sustrato. Este enfoque de reimpresión puede incluir fiduciales para alinear correctamente la película cuando se imprime en la segunda, tercera o enésima pasada. Un ejemplo de fiducial importante es el uso de bordes perforados, como los que se usan para películas de 35 mm. Otra opción de impresión incluye la expulsión acústica, un método sin contacto disponible de Labcyte, en el que las ondas de sonido de alta frecuencia expulsan gotas de nL desde una placa fuente a una placa de destino.

Ejemplo 7

La Figura 8 muestra el resultado de la impresión de elementos de gel Cy3 en una película de poliéster de 0,005» que se compró en McMaster-Carr (Santa Fe Springs, CA) en formato de rollo. La película se colocó en el mandril de vacío que se muestra en la Figura 9 y se imprimió. Se tomaron imágenes mediante iluminación de campo brillante antes y después de la polimerización. También se tomó una imagen de esta matriz con un generador de imágenes Akonni que consta de un LED y una cámara no refrigerada. Con posterioridad a esta impresión, se imprimió una matriz de MRSA, descrita anteriormente, en la película de poliéster y se expuso a un Qiagen MasterMix con 300 pg de ADN de MRSA purificado. El termociclado se realizó en un termociclador de bloque resbaladizo Quanta Bioscience. El resultado cuando se utiliza una película enrollable para las superficies superior e inferior, así como la cinta espaciadora, se muestra en la Figura 10, que presenta una identificación positiva de MRSA. La Figura 11 muestra una configuración de impresión de carrete a carrete con una impresora de matriz de contacto Ultratron de BioDot (panel superior) y cuadros de video de impresión sin contacto utilizando BioDot Ultra en una película en movimiento que no ha sido tratada ni modificada químicamente (paneles inferiores). Estos resultados demuestran la viabilidad de imprimir micromatrices en una película en movimiento con una impresora de matriz sin contacto, lo que permite una alta velocidad y bajo costo de producción de sistemas de micromatrices de la presente solicitud.

Ejemplo 8

Las Figuras 12-14 muestran el proceso de análisis de imágenes de matrices. La Figura 12 es una imagen de una matriz tomada en el QC de fábrica con un generador de imágenes de canal rojo para extraer datos de QC de la matriz. El algoritmo del software de QC encuentra automáticamente cada punto en la matriz y asocia cada punto a su ubicación de perspectiva en la cuadrícula de la matriz. El software muestra la cuadrícula de 12 por 12 y dibuja un círculo alrededor de cada gota. El software de QC calcula la ubicación relativa (Desviación X, Desviación Y) de cada círculo dentro de su cuadro de la cuadrícula y almacena la información como parte de los datos de QC para ayudar en el análisis de la imagen posterior a la hibridación.

La Figura 13 es una imagen de la matriz que se toma después de la hibridación con el generador de imágenes de canal verde del usuario final. El software de análisis de imágenes localiza la cuadrícula de la matriz en función de las señales de baliza fluorescentes Cy3 y dibuja la cuadrícula de 12 por 12. Luego, el análisis de la imagen utiliza la ubicación relativa del punto (Desviación X y Desviación Y del archivo de QC de la matriz) para ubicar cada punto y dibuja un círculo alrededor del punto como indicación visual. Nótese que con la ayuda de los datos de QC de la matriz, el software pudo ubicar cada punto en las matrices y dibujar círculos que encierran completamente cada punto.

La Figura 14 es una imagen de la matriz que se toma después de la hibridación con el generador de imágenes de canal verde del usuario final. El software de análisis de imágenes localiza la cuadrícula de la matriz en función de las señales de baliza fluorescentes Cy3 y dibuja la cuadrícula de 12 por 12. Para esta imagen, el software de análisis de imágenes no tiene acceso a la información sobre la ubicación relativa del punto desde el archivo de QC de la matriz.

En cambio, el software de análisis de imágenes identificó cada punto y asumió que el centro de cada celda de la cuadrícula es el centro del punto. El software ha identificado incorrectamente varios puntos y dibujó círculos que no encierran completamente el punto. Los puntos incorrectamente identificados incluyen puntos ubicados en: fila 2 columna 2, fila 11 columna 6. Nótese que este método de análisis de imágenes sin datos de QC de la matriz es menos robusto en la identificación de puntos que el análisis de imágenes con datos de QC de la matriz que se muestra en la **Figura 13**.

5

10

15

20

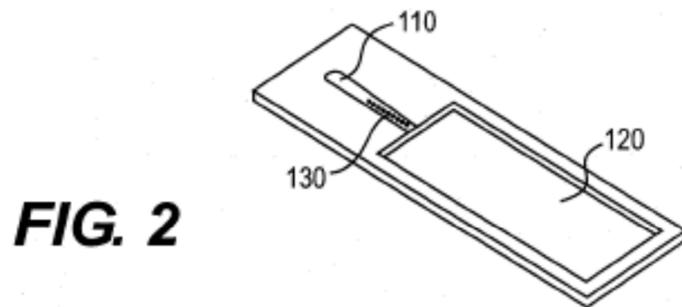
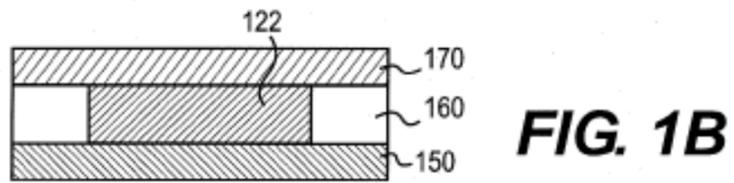
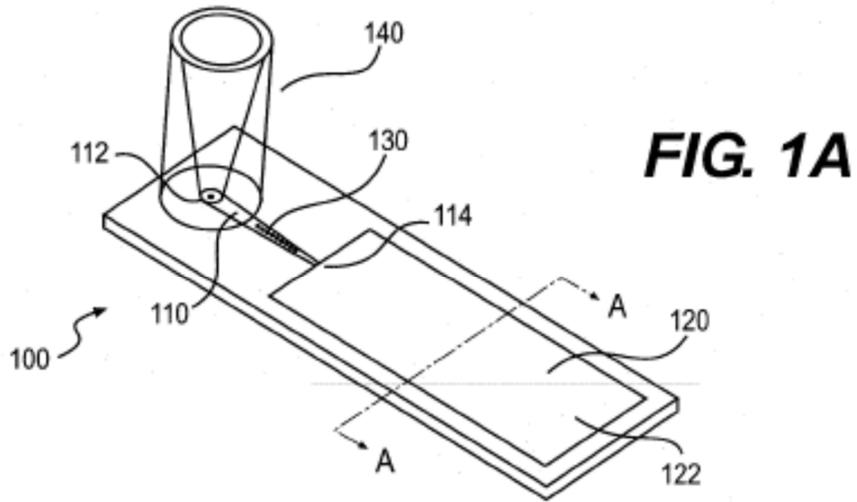
25

30

35

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un sistema de micromatrices (100) para la detección de una molécula objetivo en una muestra acuosa que comprende:
- una cámara de matrices (110) con una entrada de muestra (112), una salida de muestra (114), una superficie interior superior, una superficie interior inferior, paredes laterales y un micromatriz (130) ubicada en la superficie interior inferior;
- 10 una cámara de residuos (120) que comprende una entrada de residuos (116) y un material absorbente (122) y una ventilación (124); y
- un canal (118) que tiene una sección de expansión (118A) con un primer extremo próximo a la salida (114) de la cámara de matrices (110) y un segundo extremo próximo a la entrada (116) de la cámara de residuos (120),
- donde la cámara de residuos (120) está en comunicación fluida con la cámara de matrices (110) a través del canal (118),
- 15 donde la superficie interior superior de la cámara de matrices (110) es una superficie hidrófila que formaría un ángulo de contacto de 45° o menor con una gota de agua pura que reposa sobre dicha superficie, lo que facilita el llenado completo con un fluido acuoso de la cámara de matrices (110) y donde el área transversal en el primer extremo de la sección de expansión (118A) del canal (118) es más pequeña que el área transversal en el segundo extremo de la
- 20 sección de expansión (118A) del canal (118), donde la sección de expansión (118A) tiene un área transversal progresivamente creciente hacia la dirección de la cámara de desechos (120), de modo que las burbujas de aire en la cámara de matrices (110), una vez que ingresan en el canal (118), quedan atrapadas en las paredes laterales de la
- sección (118A) y no bloquean el flujo de fluido en el canal (118), donde la pared lateral de la sección de expansión (118A) es hidrófoba y donde el canal (118) comprende además una sección (118B) entre la sección de expansión (118A) y la entrada (116) de la cámara de desechos (120) que contiene dos vueltas bruscas en el canal (118), las dos
- 25 vueltas bruscas forman una sección de canal en forma de S o en forma de Z.
- 2.** El sistema de micromatrices (100) de la reivindicación 1, donde la sección de expansión (118A) del canal (118) tiene áreas transversales que aumentan de manera escalonada desde el primer extremo hasta el segundo extremo.
- 3.** El sistema de micromatrices (100) de la reivindicación 1, donde la sección entre la sección de expansión (118A) y la entrada (116) de la cámara de desechos (120) contiene dos vueltas bruscas en el canal (118); las dos vueltas bruscas forman vueltas de 90° en el canal (118).
- 30 **4.** El sistema de micromatrices (100) de la reivindicación 1, donde la entrada de muestra (112) está situada en un primer extremo de la cámara de matrices (110) y la salida de muestra (114) está situada en un segundo extremo de la cámara de matrices (110) y donde el área transversal de la cámara de matrices (110) disminuye de manera escalonada desde el primer extremo al segundo extremo.
- 35



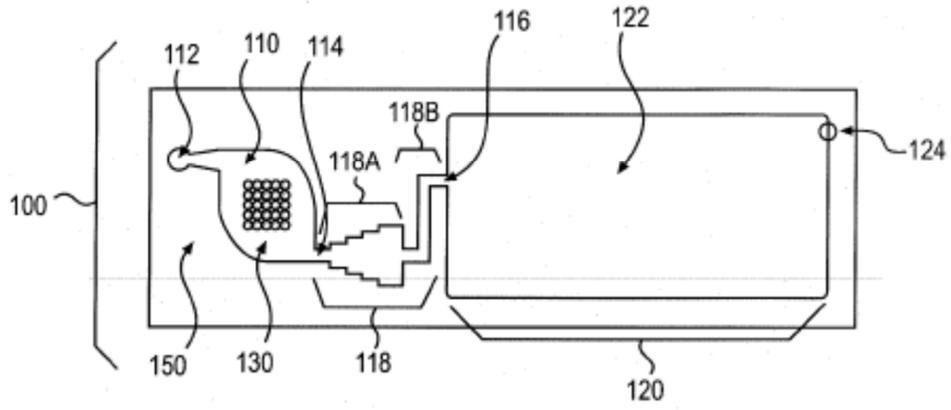


FIG. 3

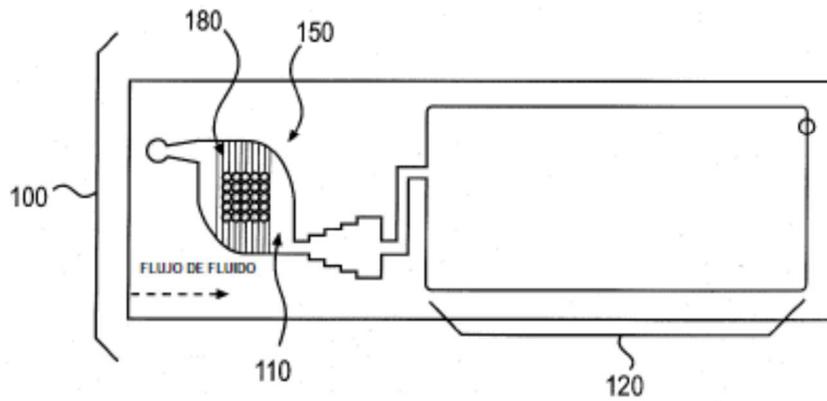


FIG. 4A

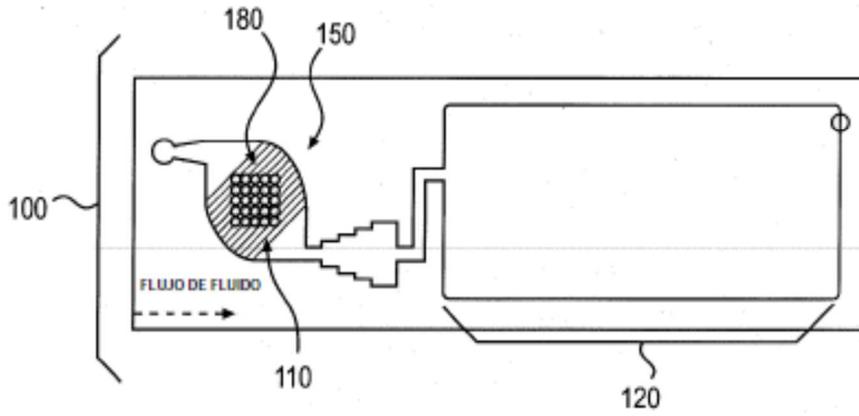


FIG. 4D

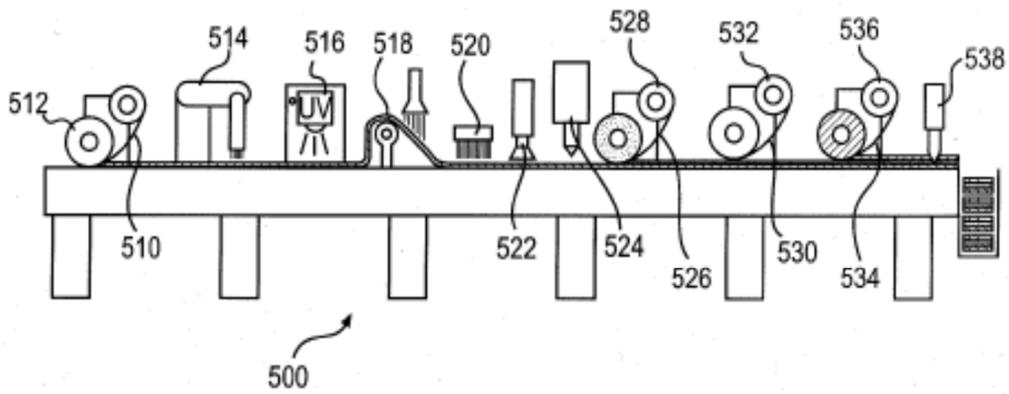


FIG. 5

	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
1														
2	0.1 nM	1nM	10nM	0.1 uM	1 uM	10uM	0.1 nM	1nM	10nM	0.1 uM	1 uM	10 uM		
3	1 nM		31			H			31			1 nM		
4	10 nM	14	35					14	35			0.1 uM		
5	0.1 uM		36		29				36		29	10 nM		
6	1 uM		37	dN20		90			37	dN20		1 nM		
7	10 uM						CY3/5					0.1 nM		
8	0.1 nM					CY3/5	CY3/5					1 uM		
9	1 nM		31			H			31			0.1 uM		
10	10 nM	14	35					14	35			10 nM		
11	0.1 uM		36		29				36		29	1 nM		
12	1 uM		37	dN20		90			37	dN20		0.1 nM		
13	10 uM	1nM	10nM	0.1 uM	1 uM	10uM	0.1 nM	1nM	10nM	0.1 uM	1 uM	10 uM		
14														

9	mecA-P1
29	PmecA3 (mecA GENE)
14	tufA- PanStaphHP5 (Staph GENUS)
18	S. AUREUS (SA5)
19	S. AUREUS (SA6)
31	S. AUREUS 7 (SA7)
35	SA-orfX1
36	SA-orfX2a (tipos)
37	SA-orfX2b
90	M13#6 CONTROL INTERNO POSITIVO

FIG. 6

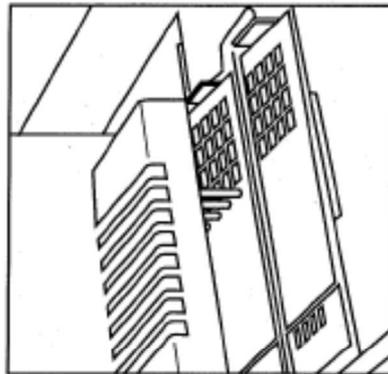


FIG. 7

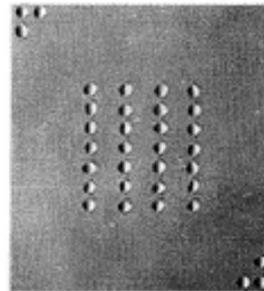


IMAGEN DE CAMPO CLARO ANTES DE LA POLIMERIZACIÓN

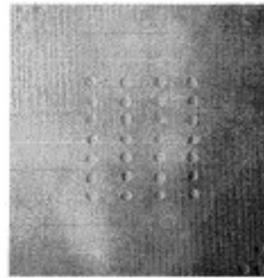


IMAGEN DE CAMPO CLARO DESPUÉS DE LA POLIMERIZACIÓN

FIG. 8

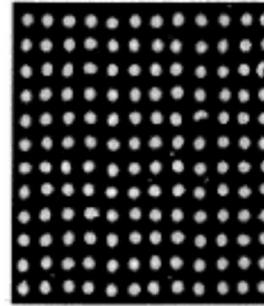


IMAGEN DE FLUORESCENCIA DESPUÉS DE LA POLIMERIZACIÓN

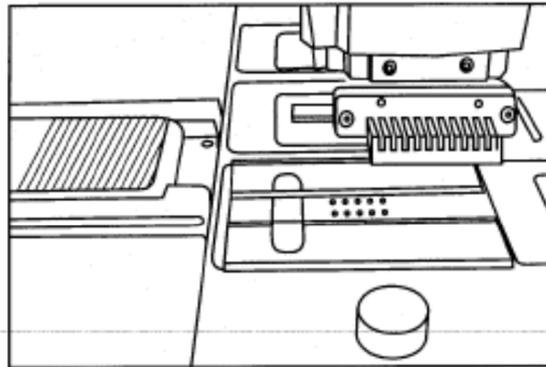


FIG. 9

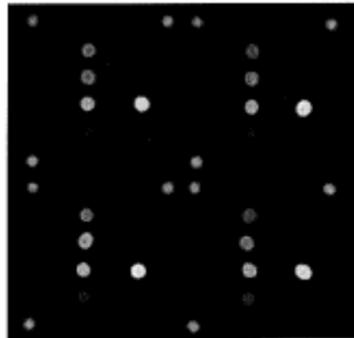


FIG. 10

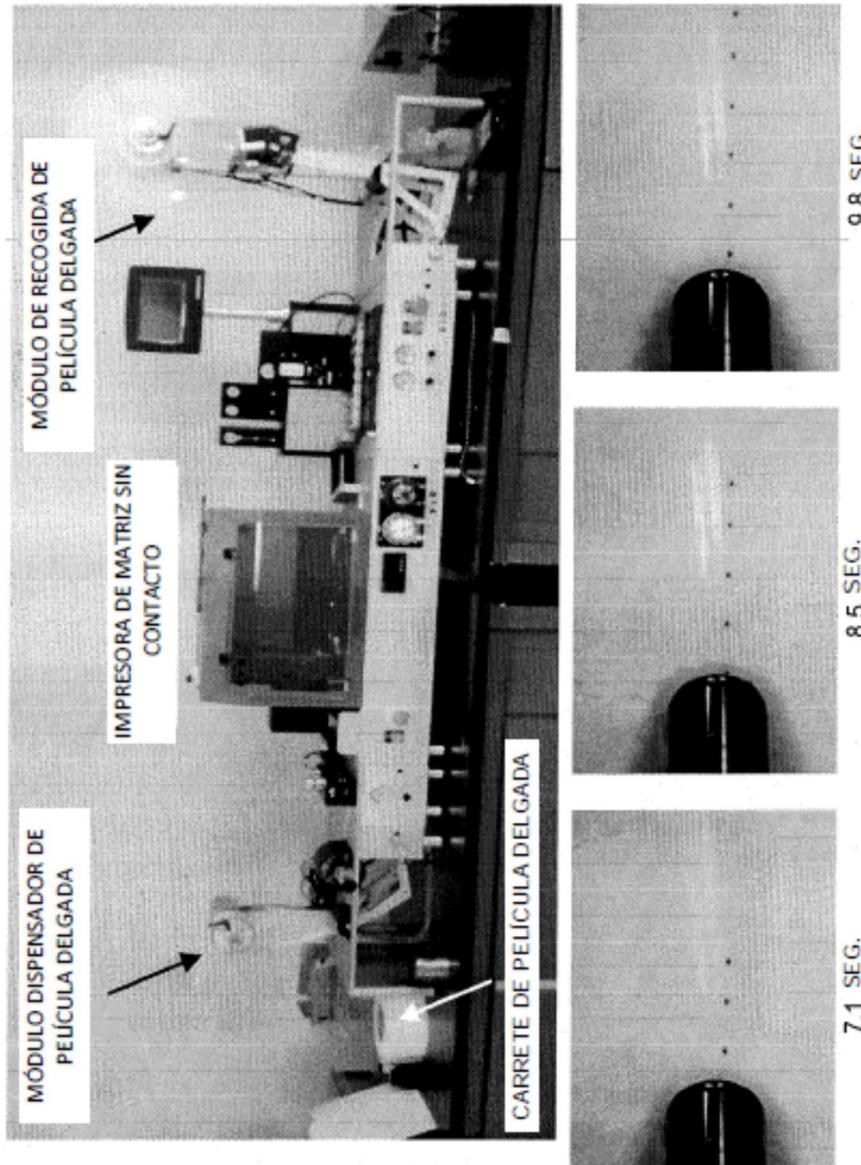


FIG. 11

FIG. 12

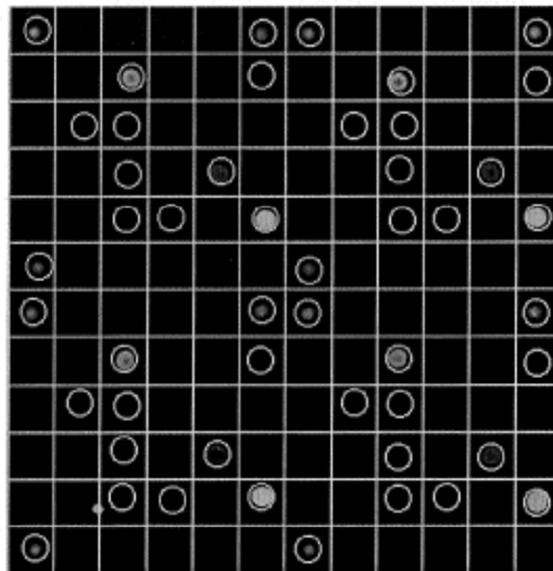
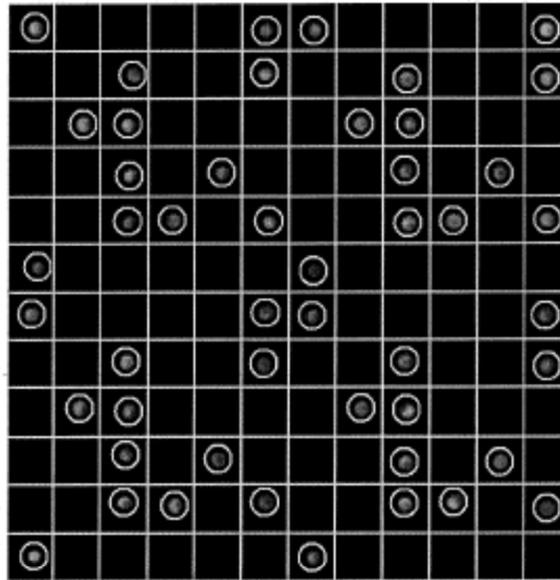


FIG. 13

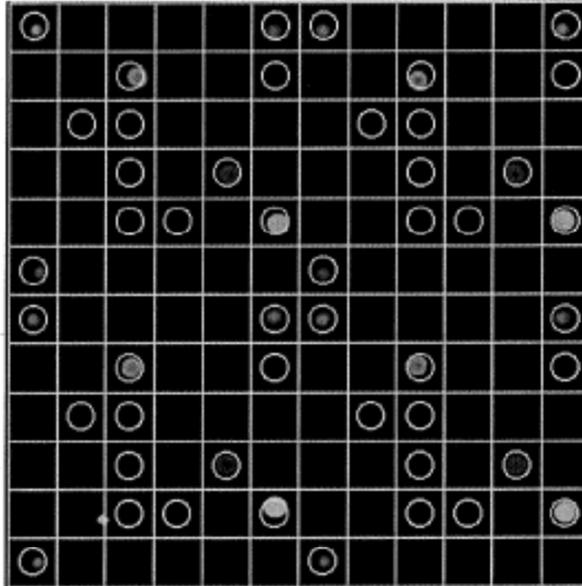


FIG. 14