

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 756 399**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6816 (2008.01)

C12Q 1/6825 (2008.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2015 PCT/US2015/062109**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.06.2016 WO16085841**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2015 E 15816281 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 3223947**

54 Título: **Métodos y aparatos para la purificación y formación de imágenes de genes**

30 Prioridad:

24.11.2014 US 201462083681 P

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

27.04.2020

73 Titular/es:

**NANOSTRING TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
530 Fairview Avenue North, Suite 2000
Seattle, WA 98109, US**

72 Inventor/es:

**DUNAWAY, DWAYNE;
KHAFIZOV, RUSTEM;
MEI, QIAN;
DENNIS, LUCAS;
KROUSE, MICHAEL;
BEECHEM, JOSEPH M. y
SPRAGUE, ISAAC**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 756 399 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

Métodos y aparatos para la purificación y formación de imágenes de genes

Campo de la invención

5 Las presentes innovaciones generalmente están dirigidas al conteo digital de muestra moleculares, y más particularmente, incluyen métodos y aparatos para la purificación y formación de imágenes de una muestra de ácido nucleico y proteína de códigos de barras moleculares asociados.

10 Sin embargo, con el fin de desarrollar la comprensión del lector de las innovaciones, las divulgaciones se han recopilado en una sola descripción para ilustrar y aclarar cómo los aspectos de estas innovaciones operan independientemente, operan entre sí, así como entre innovaciones individuales, y/o cooperan colectivamente. La solicitud va a describir con más detalle las interrelaciones y sinergias entre las diferentes innovaciones.

Antecedentes de la invención

15 Los científicos usan una pluralidad de métodos para purificar y detectar moléculas. Los sistemas convencionales usan movimiento de fluidos y formación de imágenes de código de barras moleculares en instrumentos separados, tienen un canal de iluminación por canal de emisión, y tienen métodos ineficientes para mover la muestra a través de la máquina de purificación y formación de imágenes.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona sistemas, dispositivos y métodos para la purificación y formación de imágenes de ácido nucleico o proteína. La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

20 Un aspecto de la presente invención proporciona un cartucho configurado para purificar una muestra de la molécula objetivo hibridada y la formación de imágenes de la molécula objetivo hibridada. El cartucho comprende una zona de entrada de la muestra, una primera cámara de unión, un primer canal de elución, una segunda cámara de unión, un segundo canal de elución, y una zona de unión.

25 En este aspecto, la zona de entrada de la muestra está configurada para mantener una muestra de la molécula objetivo, comprendiendo la muestra una pluralidad de complejos hibridados que comprenden una pluralidad de moléculas objetivo cada una hibridada con una primera sonda y una segunda sonda, una pluralidad de primeras sondas no hibridadas, y una pluralidad de segundas sondas no hibridadas. La primera cámara de unión está configurada para recibir y/o contener una primera matriz de afinidad y para recibir la muestra. La primera matriz de afinidad opera con las primeras moléculas configuradas para unirse con las primeras sondas no hibridadas y complejos hibridados de la muestra durante un primer periodo de tiempo. Adicionalmente, la primera cámara de unión está configurada para recibir un primer regulador para eliminar las segundas sondas no hibridadas de la muestra después de que las primeras sondas no hibridadas y los complejos hibridados de la muestra se unen con la primera matriz de afinidad. El primer canal de elución está configurado operativamente con un primer calentador, y configurado para recibir la primera matriz de afinidad después del primer periodo de tiempo y configurado para calentar la primera matriz de afinidad para eluir una primera muestra eluida que comprende la pluralidad de los complejos hibridados y la pluralidad de las primeras sondas no hibridadas. La segunda cámara de unión está configurada para recibir y/o contiene una segunda matriz de afinidad y para recibir la primera muestra eluida. La segunda matriz de afinidad opera con segundas moléculas configuradas para unirse con los complejos hibridados durante un segundo período de tiempo. Además, la segunda cámara de unión está configurada para recibir un segundo regulador para eliminar al menos las primeras sondas no hibridadas. El segundo canal de elución está operativamente configurado con un segundo calentador, y configurado para recibir la segunda matriz de afinidad después del segundo periodo de tiempo y configurado para calentar la segunda matriz de afinidad para eluir una segunda muestra eluida que comprende la pluralidad de los complejos hibridados. La zona de unión tiene una superficie de unión activa configurada para recibir la segunda muestra eluida y unirse con los complejos hibridados.

45 En realizaciones de este aspecto, la molécula objetivo puede ser un ácido nucleico o una proteína. En ciertas realizaciones, la primera matriz de afinidad y la segunda matriz de afinidad, respectivamente, corresponden a un primer conjunto de perlas magnéticas (por ejemplo, perlas magnéticas acoplados a oligonucleótidos, por ejemplo, perlas magnéticas F) y un segundo conjunto de perlas magnéticas (por ejemplo, perlas magnéticas acopladas a oligonucleótidos, por ejemplo, perlas magnéticas G), respectivamente. El cartucho puede comprender además una pluralidad de zonas de entrada de regulador, una pluralidad de primeras cámaras de unión, una pluralidad de zonas de salida de residuos, y/o una pluralidad de almohadillas de perlas. El cartucho puede comprender además un desfogue de burbujas. El desfogue de burbujas puede estar configurado para separar la entrada de la muestra y/o la primera cámara de unión y/o para eliminar las burbujas de aire. En ciertas realizaciones, la superficie de unión activa puede comprender estreptavidina, una avidina (por ejemplo, Neutravidina^{MR}), u oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, las primeras sondas incluyen sondas de captura. En ciertas realizaciones, las segundas sondas incluyen sondas informadoras. En ciertas realizaciones, el cartucho puede estar operativamente acoplado a una pluralidad de válvulas de entrada de regulador fuera de la tarjeta operativamente acopladas a un colector de fluidos y/o una pluralidad de válvulas de residuos. En ciertas realizaciones, el cartucho comprende además una pluralidad de válvulas

de entrada de regulador en la tarjeta operativamente acopladas a un colector de fluidos. La pluralidad de válvulas de entrada del regulador fuera de la tarjeta puede estar configurada para recibir el primer regulador y/o el segundo regulador desde el colector de fluidos y/o proporcionar el regulador al cartucho. En ciertas realizaciones, el flujo de la segunda muestra eluida en la zona de unión puede hacerse en pequeñas etapas que pueden ser reordenadas con base en los perfiles de presión. En ciertas realizaciones, la zona de unión puede estar configurada además para recibir una solución (por ejemplo, que comprende la inclusión de ganchos G, medios antidesvanecimiento, y/o fiduciales) formulada para inmovilizar la segunda muestra eluida en la superficie de unión activa después del estiramiento con el flujo.

También se divulga en el presente documento un cartucho configurado para purificar una muestra de una molécula objetivo hibridada y la formación de imágenes de la molécula objetivo hibridada. El cartucho comprende una zona de entrada de regulador, un desfogue de burbujas, una primera cámara de unión, un primer canal de elución, una segunda cámara de unión, un segundo canal de elución, y una zona de unión.

En este aspecto de la divulgación, la zona de entrada del regulador se puede configurar para contener una muestra de la molécula objetivo, por ejemplo, que comprende una pluralidad de complejos hibridados (que incluyen una pluralidad de moléculas objetivo, sondas informadoras, y/o sondas de captura), una pluralidad de sondas informadoras no hibridadas, y/o una pluralidad de sondas de captura no hibridadas. El desfogue de burbujas puede configurarse para separar la entrada de la muestra y la primera cámara de unión y/o para eliminar las burbujas de aire. La primera cámara de unión puede configurarse para recibir y/o contener perlas magnéticas F y/o para recibir la muestra. La primera cámara de unión puede configurarse adicionalmente, para recibir un primer regulador para eliminar las sondas informadoras no hibridadas de la muestra después de que las sondas informadoras no hibridadas y/o los complejos hibridados de la muestra se unen con las perlas magnéticas F, que pueden operar con primeras moléculas configuradas para unirse con las sondas informadoras no hibridadas y/o los complejos hibridados de la muestra durante un primer periodo de tiempo. El primer canal de elución puede estar configurado para recibir las perlas magnéticas F después del primer período de tiempo y/o configurado para el calentamiento de las perlas magnéticas F para eluir una primera muestra eluida que comprende la pluralidad de complejos hibridados y/o la pluralidad de sondas informadoras no hibridadas. La segunda cámara de unión puede configurarse para recibir y/o contener perlas magnéticas G y/o para recibir la primera muestra eluida. La segunda cámara de unión puede configurarse, adicionalmente, para recibir un segundo regulador para eliminar al menos las sondas de captura no hibridadas. Las perlas magnéticas G pueden operar con moléculas segundas moléculas configuradas para unirse con los complejos hibridados durante un segundo período de tiempo. El segundo canal de elución puede configurarse para recibir las perlas magnéticas G después del segundo período de tiempo y/o configurarse para calentar las perlas magnéticas G para eluir una segunda muestra eluida que comprende la pluralidad de los complejos hibridados. La zona de unión puede tener una superficie de unión activa configurada para recibir la segunda muestra eluida y/o unirse con los complejos hibridados. El cartucho puede estar acoplado operativamente con una pluralidad de válvulas de entrada de regulador fuera de la tarjeta operativamente acopladas a un colector de fluidos. La pluralidad de válvulas de entrada de regulador fuera de la tarjeta puede estar configurada para recibir el primer regulador y/o el segundo regulador desde el colector de fluidos y/o proporcionar el primer y/o segundo regulador al cartucho. La pluralidad de válvulas de residuos puede estar configurada para recoger el primero y/o segundo regulador del cartucho.

En ciertas realizaciones de este aspecto de la divulgación, la molécula objetivo puede ser un ácido nucleico o una proteína. En ciertas realizaciones, la superficie de unión activa puede comprender estreptavidina, una avidina (por ejemplo, Neutraavidina^{MR}), u oligonucleótidos.

En aún otro aspecto de la presente invención se proporciona un sistema para obtener imágenes de una pluralidad de complejos hibridados. El sistema comprende un cartucho de la invención, una bandeja de cartucho acoplada operativamente al sistema y configurada para contener el cartucho, un imán acoplado operativamente al dispositivo de formación de imágenes por debajo de la bandeja del cartucho, un colector de fluidos operativamente acoplado al sistema por encima de la bandeja del cartucho y configurado para mantener y controlar el flujo de una pluralidad de reguladores, una pluralidad de válvulas de entrada del regulador fuera de la tarjeta operativamente acopladas al colector de fluidos y al cartucho; una pluralidad de válvulas de residuos operativamente acopladas al sistema por encima de la bandeja del cartucho, y una superficie de referencia de formación de imágenes operativamente acoplada al dispositivo de formación de imágenes por encima de la bandeja del cartucho.

En ciertas realizaciones, el imán puede estar configurado para mover las primeras perlas magnéticas y/o las segundas perlas magnéticas dentro de la primer y/o segunda cámaras de unión y/o el primero y/o segundo canales de elución. En ciertas realizaciones, el imán puede estar configurado para moverse en paralelo a la bandeja del cartucho. En ciertas realizaciones, la pluralidad de válvulas de entrada del regulador fuera de la tarjeta puede estar configuradas para recibir la pluralidad de reguladores desde el colector de fluidos y/o proporcionar la pluralidad de reguladores al cartucho. En ciertas realizaciones, la pluralidad de válvulas de residuos puede estar configuradas para recoger la pluralidad de reguladores desde el cartucho. En ciertas realizaciones, el sistema comprende, además, una almohadilla de contacto de leva acoplado operativamente al dispositivo de formación de imágenes y configurado para permitir la carga previa contra al menos una almohadilla de contacto, al menos un contacto ajustable entre una abrazadera de movimiento y una base del dispositivo de formación de imágenes, al menos un contacto ajustable configurado para permitir el ajuste de datos A, y un motor de abrazadera acoplado operativamente al dispositivo de formación de imágenes y configurado para mover la abrazadera en movimiento. En ciertas realizaciones, al menos una de la

pluralidad de válvulas de entrada del regulador fuera de la tarjeta y la pluralidad de válvulas de residuos operativamente acopladas al sistema por encima de la bandeja del cartucho puede ser controlado neumáticamente.

También se describe en el presente documento un método para purificar una muestra de la molécula objetivo hibridada y la formación de imágenes de la molécula objetivo hibridada. El método comprende las etapas de:

- 5 (a) recibir una muestra hibridada, comprendiendo la muestra una pluralidad de complejos hibridados que comprende moléculas objetivo hibridadas con las primeras sondas y las segunda sondas, una pluralidad de primeras sondas no hibridadas, y una pluralidad de segundas sondas no hibridadas,
- (b) unir las primeras sondas no hibridadas y los complejos hibridados de la muestra con una primera matriz de afinidad durante un primer periodo de tiempo para producir una primera mezcla;
- 10 (c) hacer fluir un primer regulador a través de la primera mezcla para eliminar las segundas sondas no hibridadas de la primera mezcla después de que las primeras sondas no hibridadas y los complejos hibridados de la muestra se unen con la primera matriz de afinidad
- (d) calentar la primera mezcla para liberar las primeras sondas no hibridadas y los complejos hibridados de la primera matriz de afinidad y eluir una primera muestra eluida que comprende la pluralidad de complejos hibridados y la pluralidad de primeras sondas no hibridadas,
- 15 (e) unir los complejos hibridados de la primera muestra eluida con una segunda matriz de afinidad durante un segundo periodo de tiempo para producir una segunda mezcla;
- (f) hacer fluir un segundo regulador a través de la segunda mezcla para eliminar las primeras sondas no hibridadas de la primera muestra eluida después de que los complejos hibridados se unen con la segunda matriz de afinidad,
- 20 (g) calentar la segunda mezcla para liberar los complejos hibridados de la segunda matriz de afinidad para eluir una segunda muestra eluida que comprende la pluralidad de complejos hibridados, y
- (h) unir los complejos hibridados a una superficie de unión activa para obtener imágenes de los mismos.

En ciertas realizaciones de este aspecto de la divulgación, la molécula objetivo puede ser un ácido nucleico o una proteína. En ciertas realizaciones, la primera matriz de afinidad y la segunda matriz de afinidad, respectivamente, corresponden a un primer conjunto de perlas magnéticas y un segundo conjunto de perlas magnéticas, respectivamente. En ciertas realizaciones, la superficie de unión activa puede comprender estreptavidina, una avidina (por ejemplo, Neutravidina^{MR}), u oligonucleótidos.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un método para purificar una muestra de la molécula objetivo hibridada y la formación de imágenes de la molécula objetivo hibridada. El método comprende las etapas de:

- 30 (a) proporcionar el cartucho de la invención;
- (b) recibir una muestra hibridada, comprendiendo la muestra una pluralidad de complejos hibridados que comprenden moléculas objetivo hibridadas con primeras sondas y segundas sondas, una pluralidad de primeras sondas no hibridadas, y una pluralidad de segundas sondas no hibridadas,
- (c) unir las primeras sondas no hibridadas y los complejos hibridados de la muestra a una primera matriz de afinidad en una primera cámara de unión durante un primer periodo de tiempo,
- 35 (d) hacer fluir un primer regulador en la primera cámara de unión para eliminar las segundas sondas no hibridadas de la muestra después de que las primeras sondas no hibridadas y los complejos hibridados de la muestra se unen con la primera matriz de afinidad,
- (e) dirigir la primera matriz de afinidad en un primer canal de elución,
- 40 (f) calentar la primera matriz de afinidad para eluir una primera muestra eluida que comprende la pluralidad de complejos hibridados y la pluralidad de primeras sondas no hibridadas,
- (g) unir los complejos hibridados de la primera muestra eluida a una segunda matriz de afinidad en una segunda cámara de unión durante un segundo periodo de tiempo,
- (h) hacer fluir un segundo regulador en la segunda cámara de unión para eliminar las primeras sondas no hibridadas de la primera muestra eluida después de que los complejos hibridados se unen con la segunda matriz de afinidad
- 45 (i) calentar la segunda matriz de afinidad para eluir una segunda muestra eluida que comprende la pluralidad de complejos hibridados, y
- (j) unir los complejos hibridados a una superficie de unión activa para obtener imágenes de los mismos.

En ciertas realizaciones de este aspecto, la molécula objetivo puede ser un ácido nucleico o una proteína. En ciertas realizaciones, la primera matriz de afinidad y la segunda matriz de afinidad, respectivamente, corresponden a un primer conjunto de perlas magnéticas (por ejemplo, perlas magnéticas F) y un segundo conjunto de perlas magnéticas (por ejemplo, perlas magnéticas, G). En ciertas realizaciones, la superficie de unión activa puede comprender estreptavidina una avidina (por ejemplo, Neutraavidina^{MR}), u oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, las primeras sondas incluyen sondas informadoras. En ciertas realizaciones, las segundas sondas incluyen sondas de captura. En ciertas realizaciones, la primera cámara de unión puede ser una cámara de unión F. En ciertas realizaciones, el primer período de tiempo puede ser un período de aproximadamente 8 minutos. En ciertas realizaciones, las primeras perlas magnéticas pueden calentarse a aproximadamente 47 °C durante aproximadamente 7 minutos. En ciertas realizaciones, la segunda cámara de unión puede ser una cámara de unión G. En ciertas realizaciones, el segundo regulador puede ser un fluido de elución F. En ciertas realizaciones, el segundo periodo de tiempo puede ser un período de aproximadamente 7 minutos. En ciertas realizaciones, el segundo regulador se puede añadir a la segunda cámara de unión en incrementos de 2 µL hacia adelante y 1 µL hacia atrás. En ciertas realizaciones, el segundo regulador se puede añadir en incrementos de aproximadamente +2,8 µL, +2 µL, -1 µL +2 µL, -1 µL +1,5 µL y 7 µL. En ciertas realizaciones, las segundas perlas magnéticas pueden calentarse a aproximadamente 47 °C durante aproximadamente 7 minutos. En ciertas realizaciones, el método comprende además una etapa de mover una cantidad de la primera muestra eluida a través de una almohadilla de matriz de afinidad en una primera dirección y una segunda dirección. En ciertas realizaciones, el primer regulador puede ser bombeado para mover la mezcla de muestra-perla a través de la primera almohadilla de perla en una primera dirección y una segunda dirección. En ciertas realizaciones, el primer regulador se puede añadir en incrementos de aproximadamente +15 µL y -15 µL. Cualquiera de los aspectos y formas de realización anteriores se pueden combinar con cualquier otro aspecto o forma de realización.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. En la memoria descriptiva, las formas singulares incluyen también el plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario; como ejemplos, los términos "un", "uno, una" y "el, la" se entiende que son singular o plural y el término "o" se entiende que es inclusivo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa uno o más elementos. A lo largo de la memoria descriptiva, la expresión "que comprende", o variaciones tales como "comprende" o "comprendiendo" se entenderá que implican la inclusión de un elemento establecido, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas. Aproximadamente puede entenderse como dentro del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, o 0,01% del valor estipulado. A menos que sea claro a partir del contexto, todos los valores numéricos proporcionados en este documento están modificados por el término "aproximadamente".

Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. Las referencias citadas en el presente documento no se consideran como estado de la técnica para la invención reivindicada. En el caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo definiciones, primará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Las copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con dibujos en color serán proporcionadas por la Oficina bajo petición y pago de la tasa necesaria.

Los apéndices y/o dibujos que se acompañan ilustran varios ejemplos no limitativos, aspectos innovadores en conformidad con la presente descripción:

La Figura 1A muestra diagramas de bloques de los procesos principales de acuerdo con algunas realizaciones.

Las Figuras 1B-E muestran diagramas de bloques que ilustran la química subyacente básica de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 2 muestra un diagrama de flujo lógico detallado que ilustra el proceso de purificación y de formación de imágenes de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 3A muestra una imagen marcada del cartucho del fluido.

La Figura 3B muestra la capa de fluido donde se producen las dos purificaciones.

La Figura 4 muestra un diagrama pictórico que ilustra el apilamiento de capas para construir el cartucho de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 5 muestra un diagrama pictórico que ilustra una máquina que lleva a cabo tanto las funciones de fluidos como de formación de imágenes.

La Figura 6A muestra diagramas pictóricos que ilustran en donde la muestra es introducida en el cartucho, de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 6B muestra donde se aplica cinta después de la entrada de la muestra y donde se elimina de los puertos del regulador (para evitar la contaminación cruzada) de acuerdo con algunas realizaciones.

5 Las Figuras 7-9B muestran diagramas pictóricos que ilustran un instrumento de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 10 muestra un diagrama pictórico que ilustra un cartucho de formación de imágenes, de acuerdo con algunas realizaciones.

Las Figuras 11-12 muestran diagramas pictóricos que ilustran la purificación de una muestra de acuerdo con algunas realizaciones.

10 Las Figuras 13A-14 muestran diagramas pictóricos que ilustran la purificación de una muestra de acuerdo con algunas realizaciones.

Las Figuras 15-17 muestran diagramas pictóricos que ilustran la purificación de una muestra de acuerdo con algunas realizaciones.

15 La Figura 18 muestra diagramas pictóricos que ilustran el movimiento de una muestra purificada hasta una superficie de formación de imágenes de acuerdo con algunas realizaciones.

Las Figuras 19A-B muestran gráficos que ilustran la adición de la muestra a la superficie de formación de imágenes de acuerdo con algunas realizaciones.

Las Figuras 20-21 muestran diagramas pictóricos que ilustran la unión de una muestra purificada a una superficie de formación de imágenes de acuerdo con algunas realizaciones.

20 La Figura 22 muestra los gráficos que comparan los resultados obtenidos con el sistema de análisis nCounter® y los resultados obtenidos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención para tres paneles PanCancer nCounter®.

La Figura 23 muestra un gráfico que ilustra los datos de expresión génica diferencial obtenidos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.

25 La Figura 24 muestra un gráfico que ilustra la detección de ARN total o lisados celulares crudos.

La Figura 25 muestra un gráfico que ilustra la detección de la expresión génica total a partir de tejido fresco congelado o de tejidos embebidos en parafina fijados con formalina (FFPE).

30 La Figura 26 muestra un gráfico que compara los resultados obtenidos con el sistema de análisis nCounter® y los resultados obtenidos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención para el Panel de progresión PanCancer.

La Figura 27 muestra un gráfico que compara los resultados obtenidos con el sistema de análisis nCounter® y los resultados obtenidos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención para el Panel de Human Immunology

35 La Figura 28 muestra un gráfico que compara los resultados obtenidos con el sistema de análisis nCounter® y los resultados obtenidos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención en un ensayo de variación del número de copia (CNV).

La Figura 29 muestra un gráfico que compara los resultados obtenidos con el sistema de análisis nCounter® y los resultados obtenidos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención en un análisis de miARN.

40 La Figura 30 muestra un gráfico que compara los resultados obtenidos con el sistema de análisis nCounter® y los resultados obtenidos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención para los datos de perfiles de ARN-proteína.

El número inicial de cada número de referencia dentro de los dibujos indica la Figura en la que se introduce y/o detallada ese número de referencia. Como tal, una discusión detallada del número de referencia 101 se encontraría y/o introduciría en la Figura 1. El número de referencia 201 se introduce en la Figura 2, etc.

45 Descripción detallada

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Los métodos mencionados en el presente documento se pueden llevar a cabo en cualquier orden de los eventos enumerados que es lógicamente posible, así como el orden enumerado de eventos. Además, cuando se proporciona

- un intervalo de valores, se entiende que cada valor que interviene, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado está comprendido dentro las realizaciones de la descripción. Además, se contempla que cualquier característica opcional de una y/u otra de las formas de realización descritas en el presente documento se pueden exponer y se reivindican de forma independiente, o en combinación con una cualquiera o más de las funciones de las características descritas en el presente documento.
- La referencia a un elemento singular incluye la posibilidad de que exista el plural de los mismos elementos presentes. Más específicamente, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un, uno, una", "y", "dicho" y "el, la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa. Se observa, además, que las reivindicaciones pueden ser redactadas para excluir cualquier elemento opcional.
- Como tal, esta declaración pretende servir como base antecedente para el uso de una terminología tan exclusiva como "únicamente", "solamente" y similares en relación con la mención de los elementos reivindicados, o el uso de una "limitación negativa". Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención.
- En algunas realizaciones, un usuario que lee una muestra (por ejemplo, una muestra de ácido nucleico) puede desear utilizar un solo dispositivo tanto para purificar como para detectar la muestra. En algunas realizaciones, el uso de un solo dispositivo tanto para ambos propósitos puede reducir el tiempo de procesamiento, la probabilidad de contaminación, el costo de la realización de análisis de imágenes, reducir el costo general del sistema, reducir el personal/etapas, y/o similares.
- Las Figuras 1A-E muestran diagramas de bloque que ilustran el proceso de purificación y de formación de imágenes de acuerdo con algunas realizaciones. Por ejemplo, un usuario del instrumento puede hibridar y/o bien preparar una muestra para su procesamiento. Haciendo referencia a la Figura 1B, en algunos ejemplos, el usuario puede desear hibridar un ácido nucleico 114 objetivo, por ejemplo, usando sondas configuradas para unirse al ácido nucleico 114 objetivo y que incluye etiquetas de afinidad configuradas para unirse a perlas magnéticas. ácidos nucleicos 114 objetivo pueden incluir todas las formas de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN, ADN, microARN, y/o similares). Las proteínas, y/o cualesquiera otras moléculas que se pueden unir a las sondas de captura y/o informadora (por ejemplo, que pueden ser detectadas a través de un compuesto intermedio de ácido nucleico) también se pueden hibridar para análisis. Por ejemplo, la hibridación puede implicar mezclar los ácidos nucleicos objetivo con sondas 116 de captura y sondas 120 informadoras, una sonda 116 de captura puede incluir una fracción de biotina utilizada para unir el complejo a una superficie de formación de imágenes, y/o una etiqueta F configurada para unirse a perlas magnéticas F. Una sonda 120 informadora puede incluir un código de barras fluorescente utilizado en el proceso de formación de imágenes, y/o una etiqueta G configurada para unirse a perlas magnéticas G. Cuando el ácido nucleico 114 objetivo se une a una sonda informadora y captura, puede crear un complejo 124 tripartito hibridado que puede entonces ser purificado para procesos de formación de imágenes y/o similares.
- Como se muestra en la Figura 1B, aproximadamente dos sondas de 50 pares de bases se hibridan directamente con cada molécula objetivo en solución para formar un complejo tripartito hibridado. La sonda informadora porta un código de barras fluorescente específico, y la sonda de captura contiene una fracción de biotina que más tarde une el complejo tripartito a la superficie de formación de imágenes. Ambas sondas contienen etiquetas de afinidad (llamadas "F" o "G") que se requieren para la purificación y la inmovilización con base en perlas magnéticas.
- Haciendo referencia a la Figura 1A, el usuario puede pipetear una muestra 102 (por ejemplo, una muestra de ácido nucleico hibridado y/o una muestra biológica hibridado similar) en un cartucho de muestra configurado para ser colocado en una bandeja de cartucho del instrumento (que puede ser manejado de forma automática a través de aspectos/realizaciones de la presente divulgación). La muestra biológica hibridada también puede incluir sondas no hibridadas que pueden no haberse unido a los genes (por ejemplo, sondas en exceso). El cartucho también puede tener almohadillas (por ejemplo, almohadillas de fibra de vidrio) configuradas para contener perlas magnéticas. Las perlas magnéticas pueden ser de una pluralidad de variedades, tales como perlas F, perlas G, y/o similares. En algunas implementaciones, las perlas F son perlas magnéticas acopladas a oligonucleótidos de ADN que son el complemento inverso de las secuencias repetidas encontradas en la sonda de captura, y se usan como una matriz de afinidad para separar los complejos hibridados y sondas de captura y/o informadoras libres durante la purificación. Las perlas magnéticas se pueden secar con regulador y un azúcar (por ejemplo, trehalosa) para estabilizar las perlas y prepararlas para la suspensión en una muestra. El cartucho también puede estar configurado con válvulas de entrada de regulador en la tarjeta configuradas para recibir regulador de las válvulas de regulador fuera de la tarjeta (por ejemplo, véase 902 de la Figura 9A), y válvulas neumáticas configurados para control de flujo entre las cámaras de unión, cámaras de elución y/o zonas similares usadas para los procesos de purificación y contenedores de residuos configurados para contener los fluidos de elución utilizados.
- El cartucho puede ser un cartucho de múltiples capas (por ejemplo, véase 402 en la Figura 4) que comprende los siguientes componentes:

Capas	Materiales	Color
1	250 µm de Melinex®	blanco
2	250 µm de ACA	azul
3	250 µm de PDMS	amarillo
4	120 µm de PDMS	rojo
5	250 µm de ACA	verde
6	3 mm de PMMA	gris

Haciendo referencia a la Figura 1A, la muestra se puede introducir en perlas magnéticas secas (por ejemplo, perlas magnéticas F (por ejemplo, perlas F, perlas magnéticas anti-F) que están acoplados a un oligonucleótido de ADN de 15 mer, 5'-GCT GTGATG ATA GAC-3' (SEQ ID NO: 1), complementario a las repeticiones en la sonda de captura) configurado para eliminar el exceso de al menos un tipo de sonda (por ejemplo, las sondas informadoras) de la muestra hibridada (por ejemplo, véase 104 de la Figura 1A). Las perlas F se pueden secar en SSPE 5X y trehalosa al 40% en las almohadillas (por ejemplo, véase 309 de la Figura 3A; la almohadilla de perlas se oculta parcialmente bajo el desfogue de burbujas). En algunas realizaciones, las perlas F y la muestra se pueden combinar en una cámara de unión (por ejemplo, véase 308 de las Figuras 3A y 3B) configurada para facilitar la unión de las perlas F a las moléculas de complejo tripartito hibridado (por ejemplo, véase 126 de la Figura 1C), y permitir que las perlas se pueden lavar de manera que al menos algunas de las sondas no hibridadas (por ejemplo, sondas informadoras) se laven de la muestra (por ejemplo, véase 128 de la Figura 1C). La cámara de unión puede estar configurada con un canal de elución (por ejemplo, véase 310 de las Figuras 3A y 3B) que puede permitir que las perlas se calienten (por ejemplo, a 47 °C) y que la muestra se eluya (por ejemplo, véase 130 de la Figura 1C).

La muestra puede luego pasarse a una segunda cámara de unión de perlas magnéticas (por ejemplo, véase 106 de la Figura 1A y 314 de las Figuras 3A y 3B) que puede estar configurada para contener otro conjunto de perlas magnéticas (por ejemplo, perlas magnéticas G; también conocidas como perlas de G y/o perlas magnéticas anti-G, que se acoplan a un oligonucleótido de ADN de 15 mer, 5'-GGT TGT CTG GAT GTT-3' (SEQ ID NO: 2) complementario a las repeticiones en la sonda informadora) que puede ser capaz de unirse a las sondas informadoras de las moléculas del complejo tripartito hibridado (por ejemplo, véase 132 de la Figura 1C). La segunda cámara de unión de perlas magnéticas (por ejemplo, véase 314 de las Figuras 3A y 3B) también puede permitir el lavado de la muestra para eliminar el exceso de moléculas de otro tipo de sonda (por ejemplo, sondas de captura) de la muestra hibridada (por ejemplo, véase 134 de la Figura 1C). Las perlas G se pueden secar en una almohadilla en SSPE 20X y trehalosa al 40% (por ejemplo, véase 312 de la Figura 3A). La cámara de unión a perlas G también se puede configurar con un canal de elución (por ejemplo, véase 315 de las Figuras 3A y 3B), que también puede facilitar la elución (por ejemplo, a 47 °C) de las moléculas del complejo tripartito hibridado de las perlas (por ejemplo, véase 136 de la Figura 1C).

Como se muestra en la Figura 1C, después de la hibridación en laboratorio, las muestras se transfieren al instrumento nCounter®. Las sondas en exceso se eliminan a través de dos rondas de purificación con base en perlas magnéticas. Las primeras perlas magnéticas anti-F se unen a un complejo tripartito, así como a las sondas de captura no unidas. Las sondas informadoras no unidas son lavadas, y los componentes restantes se eluyen. En segundo lugar, las perlas magnéticas anti-G se unen a las sondas informadoras. En este estado, todas las sondas informadoras restantes se hibridan con sus ácidos nucleicos objetivos respectivos. Las sondas de captura no unidas son lavadas. Una etapa final de elución deja solamente complejos tripartitos purificados.

Otro ejemplo utiliza una matriz polimérica porosa en lugar de perlas magnéticas. La superficie puede activarse mediante la unión de oligonucleótidos. Estos materiales poliméricos porosos son sustratos muy económicos y ofrecen reducción de costos significativa en comparación con perlas magnéticas. Una matriz polimérica porosa eficaz es polietileno de alta densidad con tamaños de poro de 25, 75 y 125 nm nominal.

Haciendo referencia a la Figura 1A, la muestra (que ahora puede purificarse del exceso de moléculas de sondas) puede entonces ser pasada a una superficie 108 de formación de imágenes (por ejemplo, una superficie de estreptavidina) para ser estirada e inmovilizada para obtener imágenes 110. Por ejemplo, haciendo referencia a la Figura 1D, las fracciones de biotina en las sondas de captura en el complejo tripartito se pueden unir a la superficie 138 de formación de imágenes. El instrumento puede entonces hacer fluir regulador y/o fluidos similares sobre la superficie de formación de imágenes del cartucho 140 de microfluidos (por ejemplo, véase 316 de la Figura 3A) para alargar y alinear los complejos en la superficie. En algunas implementaciones el regulador y/o un fluido similar también pueden contener una molécula (por ejemplo, oligonucleótidos anti-G biotinilado y/o moléculas similares) que pueden facilitar la unión de la sonda informadora en los complejos tripartitos a la superficie 142 de formación de imágenes. El instrumento puede entonces detectar los complejos en la muestra con el fin de generar un gráfico resultante y/o la representación numérica de las moléculas 112 detectadas. Por ejemplo, el instrumento puede incluir un microscopio de epifluorescencia configurado para contar los códigos de barras fluorescentes de las sondas informadoras en los

complejos tripartitos, y hacer coincidir el conteo con los correspondientes objetivos moleculares con el fin de identificar la molécula en la muestra (por ejemplo, véase la Figura 1E).

5 Como se muestra en la Figura 1D, después de la purificación, las muestras se mueven a la superficie de formación de imágenes, que está recubierta con estreptavidina. Las fracciones de biotina en cada sonda de captura se unen a la superficie de formación de imágenes. El flujo dentro del cartucho de microfluidos, se alarga entonces y alinea los complejos tripartitos. El regulador de inmovilización contiene oligonucleótidos anti-G biotinilados que anclan las sondas informadoras a la superficie de formación de imágenes.

10 Como se muestra en la Figura 1E, se obtienen imágenes de las muestras mediante un microscopio de epifluorescencia con el instrumento nCounter®. Los códigos de barras se cuentan y se hacen coincidir con sus objetivos correspondientes. Los recuentos para cada objetivo se exportan en un archivo de valores separados por comas.

15 La Figura 2 muestra un diagrama de flujo lógico que ilustra el proceso de purificación y formación de imágenes de acuerdo con algunas realizaciones. Por ejemplo, el usuario puede hibridar una muestra (por ejemplo, una muestra biológica; véase 114 en la Figura 1B) con exceso de sondas 202 de captura e informadoras a aproximadamente 65 °C. El usuario puede entonces colocar la muestra hibridada (por ejemplo, pipeteando una parte de la muestra hibridada) en una zona 204 de entrada de la muestra (por ejemplo, véase también 302 de la Figura 3A, 602 de la Figura 6A) configurada para contener la muestra biológica. Los puertos de entrada de la muestra en la zona de entrada de la muestra se pueden tener forma de cono para permitir un pipeteo más fácil. El usuario puede utilizar una pipeta de un solo canal o de múltiples canales para transferir la muestra. En algunas realizaciones, el usuario puede sellar las entradas de la muestra (por ejemplo, con cinta adhesiva transparente como se muestra en 604 de la Figura 6B), y puede eliminar el sello (por ejemplo, cinta opaca como se muestra en 606 de la Figura 6B) de la zona de entrada del regulador (por ejemplo, véase 304 de la Figura 3A) configurada para recibir regulador del instrumento.

20 El usuario puede cargar el cartucho sobre una bandeja de cartucho (por ejemplo, la bandeja 702 en la Figura 7) en el instrumento 206. Las Figuras 8-9B ilustran un motor de abrazadera y/o otros mecanismos para sujetar, mover, y calentar el cartucho; así como obtención de imágenes de la muestra en el cartucho, y la transferencia de fluidos hacia y desde el cartucho. Por ejemplo, la bandeja del cartucho puede ser cargada en un nido del instrumento a medida que la bandeja se mueve en el interior del dispositivo, y puede conectarse a un colector de fluidos y a las superficies de referencia de formación de imágenes operativamente conectadas por encima del cartucho, con calentadores y puntos de contacto en el fondo posicionados por debajo del cartucho y configurados para empujar el cartucho hacia arriba contra el colector de fluidos, y puntos de referencia de formación de imágenes con mecanismo de leva y resortes (por ejemplo, véase la Figura 8 y la Figura 9B). Además, el instrumento puede incluir un colector 906 de fluidos acoplado operativamente a las válvulas 902 de entrada del regulador fuera de la tarjeta y las válvulas 904 de residuos, que pueden conectarse al cartucho y proporcionar fluidos al cartucho, o eliminar los fluidos usados del cartucho, respectivamente.

25 El dispositivo puede determinar automáticamente si el cartucho ha sido cargado correctamente, y también puede asegurar que el reactivo (por ejemplo, regulador) y las botellas de residuos (por ejemplo, 502 en la Figura 5) están conectadas correctamente al cartucho, y que las botellas de reactivo tienen niveles suficientes de regulador y/o fluidos similares. En algunas realizaciones, el usuario puede verse obligado a reemplazar botellas de reactivos si se requiere más fluido (por ejemplo, a través de la pantalla 504 en la Figura 5), y/o similares.

30 El instrumento puede mover entonces la muestra desde la zona de entrada de la muestra a través del flujo (por ejemplo, 30 µL), a través de un desfogue y/o trampa de burbujas (por ejemplo, una membrana hidrófoba; véase 306 en la Figura 3A) configurado con una burbuja de aire para separar la muestra del regulador. Esta burbuja evita la dispersión de la muestra mediante la separación de los dos líquidos. En algunas implementaciones las cámaras de unión (por ejemplo, como la cámara de unión F y la cámara de unión G) pueden contener perlas magnéticas y/u otro aparato de unión de moléculas para la purificación de una muestra. La cámara de unión de F puede contener perlas magnéticas F secas que pueden ser configuradas para unirse a un exceso de moléculas de sonda (por ejemplo, exceso de moléculas sonda informadora) en la muestra hibridada (por ejemplo, véase 126 de la Figura 1C). El instrumento puede mover la muestra y las perlas (por ejemplo, 15 µL hacia adelante y hacia atrás varias veces) con una bomba sobre las almohadillas 210 de perlas porosas con el fin de facilitar mejor la resuspensión y la unión de las perlas F al exceso de sondas de captura y a las moléculas de la muestra (por ejemplo, véase la Figura 11). Las perlas F pueden sedimentarse fuera de la solución; por lo tanto, el movimiento puede ser necesario con el fin de mantenerlas en suspensión en la solución. El desfogue de burbujas (por ejemplo, véase 1002 en la Figura 10) puede estar situado físicamente entre la zona de entrada de la muestra (por ejemplo, véase 1004 en la Figura 10) y la cámara de unión F (por ejemplo, véase 308 en las Figuras 3A y 3B), y pueden estar configurado para eliminar las burbujas, especialmente las burbujas grandes entre la muestra y el regulador después de que ha terminado la mezcla y la unión. Sin embargo, es importante que la burbuja entre la muestra y el regulador no pase el desfogue de burbujas durante este proceso de mezcla con el fin de mantener la suficiente contrapresión para empujar la muestra de nuevo en vez de empujar el aire a través del desfogue de burbujas.

35 El dispositivo puede determinar automáticamente si el cartucho ha sido cargado correctamente, y también puede asegurar que el reactivo (por ejemplo, regulador) y las botellas de residuos (por ejemplo, 502 en la Figura 5) están conectadas correctamente al cartucho, y que las botellas de reactivo tienen niveles suficientes de regulador y/o fluidos similares. En algunas realizaciones, el usuario puede verse obligado a reemplazar botellas de reactivos si se requiere más fluido (por ejemplo, a través de la pantalla 504 en la Figura 5), y/o similares.

40 El instrumento puede mover entonces la muestra desde la zona de entrada de la muestra a través del flujo (por ejemplo, 30 µL), a través de un desfogue y/o trampa de burbujas (por ejemplo, una membrana hidrófoba; véase 306 en la Figura 3A) configurado con una burbuja de aire para separar la muestra del regulador. Esta burbuja evita la dispersión de la muestra mediante la separación de los dos líquidos. En algunas implementaciones las cámaras de unión (por ejemplo, como la cámara de unión F y la cámara de unión G) pueden contener perlas magnéticas y/u otro aparato de unión de moléculas para la purificación de una muestra. La cámara de unión de F puede contener perlas magnéticas F secas que pueden ser configuradas para unirse a un exceso de moléculas de sonda (por ejemplo, exceso de moléculas sonda informadora) en la muestra hibridada (por ejemplo, véase 126 de la Figura 1C). El instrumento puede mover la muestra y las perlas (por ejemplo, 15 µL hacia adelante y hacia atrás varias veces) con una bomba sobre las almohadillas 210 de perlas porosas con el fin de facilitar mejor la resuspensión y la unión de las perlas F al exceso de sondas de captura y a las moléculas de la muestra (por ejemplo, véase la Figura 11). Las perlas F pueden sedimentarse fuera de la solución; por lo tanto, el movimiento puede ser necesario con el fin de mantenerlas en suspensión en la solución. El desfogue de burbujas (por ejemplo, véase 1002 en la Figura 10) puede estar situado físicamente entre la zona de entrada de la muestra (por ejemplo, véase 1004 en la Figura 10) y la cámara de unión F (por ejemplo, véase 308 en las Figuras 3A y 3B), y pueden estar configurado para eliminar las burbujas, especialmente las burbujas grandes entre la muestra y el regulador después de que ha terminado la mezcla y la unión. Sin embargo, es importante que la burbuja entre la muestra y el regulador no pase el desfogue de burbujas durante este proceso de mezcla con el fin de mantener la suficiente contrapresión para empujar la muestra de nuevo en vez de empujar el aire a través del desfogue de burbujas.

45 El instrumento puede mover entonces la muestra desde la zona de entrada de la muestra a través del flujo (por ejemplo, 30 µL), a través de un desfogue y/o trampa de burbujas (por ejemplo, una membrana hidrófoba; véase 306 en la Figura 3A) configurado con una burbuja de aire para separar la muestra del regulador. Esta burbuja evita la dispersión de la muestra mediante la separación de los dos líquidos. En algunas implementaciones las cámaras de unión (por ejemplo, como la cámara de unión F y la cámara de unión G) pueden contener perlas magnéticas y/u otro aparato de unión de moléculas para la purificación de una muestra. La cámara de unión de F puede contener perlas magnéticas F secas que pueden ser configuradas para unirse a un exceso de moléculas de sonda (por ejemplo, exceso de moléculas sonda informadora) en la muestra hibridada (por ejemplo, véase 126 de la Figura 1C). El instrumento puede mover la muestra y las perlas (por ejemplo, 15 µL hacia adelante y hacia atrás varias veces) con una bomba sobre las almohadillas 210 de perlas porosas con el fin de facilitar mejor la resuspensión y la unión de las perlas F al exceso de sondas de captura y a las moléculas de la muestra (por ejemplo, véase la Figura 11). Las perlas F pueden sedimentarse fuera de la solución; por lo tanto, el movimiento puede ser necesario con el fin de mantenerlas en suspensión en la solución. El desfogue de burbujas (por ejemplo, véase 1002 en la Figura 10) puede estar situado físicamente entre la zona de entrada de la muestra (por ejemplo, véase 1004 en la Figura 10) y la cámara de unión F (por ejemplo, véase 308 en las Figuras 3A y 3B), y pueden estar configurado para eliminar las burbujas, especialmente las burbujas grandes entre la muestra y el regulador después de que ha terminado la mezcla y la unión. Sin embargo, es importante que la burbuja entre la muestra y el regulador no pase el desfogue de burbujas durante este proceso de mezcla con el fin de mantener la suficiente contrapresión para empujar la muestra de nuevo en vez de empujar el aire a través del desfogue de burbujas.

50 El instrumento puede mover entonces la muestra desde la zona de entrada de la muestra a través del flujo (por ejemplo, 30 µL), a través de un desfogue y/o trampa de burbujas (por ejemplo, una membrana hidrófoba; véase 306 en la Figura 3A) configurado con una burbuja de aire para separar la muestra del regulador. Esta burbuja evita la dispersión de la muestra mediante la separación de los dos líquidos. En algunas implementaciones las cámaras de unión (por ejemplo, como la cámara de unión F y la cámara de unión G) pueden contener perlas magnéticas y/u otro aparato de unión de moléculas para la purificación de una muestra. La cámara de unión de F puede contener perlas magnéticas F secas que pueden ser configuradas para unirse a un exceso de moléculas de sonda (por ejemplo, exceso de moléculas sonda informadora) en la muestra hibridada (por ejemplo, véase 126 de la Figura 1C). El instrumento puede mover la muestra y las perlas (por ejemplo, 15 µL hacia adelante y hacia atrás varias veces) con una bomba sobre las almohadillas 210 de perlas porosas con el fin de facilitar mejor la resuspensión y la unión de las perlas F al exceso de sondas de captura y a las moléculas de la muestra (por ejemplo, véase la Figura 11). Las perlas F pueden sedimentarse fuera de la solución; por lo tanto, el movimiento puede ser necesario con el fin de mantenerlas en suspensión en la solución. El desfogue de burbujas (por ejemplo, véase 1002 en la Figura 10) puede estar situado físicamente entre la zona de entrada de la muestra (por ejemplo, véase 1004 en la Figura 10) y la cámara de unión F (por ejemplo, véase 308 en las Figuras 3A y 3B), y pueden estar configurado para eliminar las burbujas, especialmente las burbujas grandes entre la muestra y el regulador después de que ha terminado la mezcla y la unión. Sin embargo, es importante que la burbuja entre la muestra y el regulador no pase el desfogue de burbujas durante este proceso de mezcla con el fin de mantener la suficiente contrapresión para empujar la muestra de nuevo en vez de empujar el aire a través del desfogue de burbujas.

55 El instrumento puede mover entonces la muestra desde la zona de entrada de la muestra a través del flujo (por ejemplo, 30 µL), a través de un desfogue y/o trampa de burbujas (por ejemplo, una membrana hidrófoba; véase 306 en la Figura 3A) configurado con una burbuja de aire para separar la muestra del regulador. Esta burbuja evita la dispersión de la muestra mediante la separación de los dos líquidos. En algunas implementaciones las cámaras de unión (por ejemplo, como la cámara de unión F y la cámara de unión G) pueden contener perlas magnéticas y/u otro aparato de unión de moléculas para la purificación de una muestra. La cámara de unión de F puede contener perlas magnéticas F secas que pueden ser configuradas para unirse a un exceso de moléculas de sonda (por ejemplo, exceso de moléculas sonda informadora) en la muestra hibridada (por ejemplo, véase 126 de la Figura 1C). El instrumento puede mover la muestra y las perlas (por ejemplo, 15 µL hacia adelante y hacia atrás varias veces) con una bomba sobre las almohadillas 210 de perlas porosas con el fin de facilitar mejor la resuspensión y la unión de las perlas F al exceso de sondas de captura y a las moléculas de la muestra (por ejemplo, véase la Figura 11). Las perlas F pueden sedimentarse fuera de la solución; por lo tanto, el movimiento puede ser necesario con el fin de mantenerlas en suspensión en la solución. El desfogue de burbujas (por ejemplo, véase 1002 en la Figura 10) puede estar situado físicamente entre la zona de entrada de la muestra (por ejemplo, véase 1004 en la Figura 10) y la cámara de unión F (por ejemplo, véase 308 en las Figuras 3A y 3B), y pueden estar configurado para eliminar las burbujas, especialmente las burbujas grandes entre la muestra y el regulador después de que ha terminado la mezcla y la unión. Sin embargo, es importante que la burbuja entre la muestra y el regulador no pase el desfogue de burbujas durante este proceso de mezcla con el fin de mantener la suficiente contrapresión para empujar la muestra de nuevo en vez de empujar el aire a través del desfogue de burbujas.

60 En algunas realizaciones, el movimiento de un par de imanes hacia adelante y hacia atrás a través de la cámara puede hacerse en lugar de mover la muestra hacia adelante y hacia atrás con el flujo. Los imanes pueden ser utilizados en pares para generar un campo magnético complejo adecuado para la mezcla. El punto muerto por encima y entre los

imanes puede ser crítico para una buena mezcla. La velocidad del imán puede estar relacionado con el tamaño de la cámara y la cantidad de perlas (por ejemplo).

El proceso de unión puede, en algunas realizaciones, durar al menos 8 minutos (por ejemplo). La burbuja del desfogue de burbujas puede eliminarse entonces 212 durante la mezcla de la muestra hibridada con las perlas F. Un imán (por ejemplo, un imán F; véase 1202 en la Figura 12) en el instrumento configurado para moverse en paralelo al cartucho se puede mover bajo la cámara de unión F con el fin de recoger las perlas 214 F, y mantenerlas en su lugar a medida que se lavan con un regulador 216 de elución añadido desde la zona de entrada del regulador. El regulador de elución puede facilitar la eliminación de al menos un tipo de sondas no hibridadas (por ejemplo, sondas de informador o de captura no hibridadas, (por ejemplo, véase 128 de la Figura 1C)) de las perlas F. Durante la etapa de lavado de múltiples etapas, las perlas se pueden mover alrededor de la cámara de unión F moviendo el imán (por ejemplo, véase 1302 en la Figura 13A). Este movimiento y propagación de las perlas puede permitir un mejor lavado de las perlas capturadas.

Las perlas, a través del imán, pueden entonces ser empujadas en un canal 218 de elución F (por ejemplo, véase también 310 de las Figuras 3A y 3B), que puede estar conectado a un calentador (por ejemplo, un calentador F; véase 1304 en Figura 13B) que puede estar configurado para calentar las perlas 220 F (por ejemplo, a 47 °C durante cuatro minutos) con el fin de eluir las moléculas de la muestra de las perlas F (por ejemplo, véase 130 de la Figura 1C). Las perlas F, después del proceso de calentamiento, pueden ser devueltas a la cámara 222 de unión F (por ejemplo, véase la Figura 14) a medida que la muestra eluida se mueve en una segunda cámara 224 de unión (por ejemplo, una cámara de unión G; véase 314 en la Figura 3A o 3B), configurada para facilitar la unión de un segundo conjunto de perlas magnéticas secas (por ejemplo, perlas magnéticas G) a las moléculas del complejo tripartito hibridado.

Una introducción del fluido por etapas y un proceso de mezcla fluido pueden utilizarse con las perlas magnéticas G y la muestra eluida con el fin de lograr una resuspensión de las perlas y unión 226 a la muestra. Las perlas magnéticas G pueden unirse a las sondas informadoras y/u otras sondas que todavía pueden estar unidas a las moléculas de la muestra (por ejemplo, véase 132 de la Figura 1C). Por ejemplo, la introducción de la muestra eluida F en la cámara de unión G se puede realizar en etapas pequeñas repetidas de 2 µL hacia delante, seguido por 1µL hacia atrás. El movimiento hacia adelante y hacia atrás del fluido puede ayudar a resuspender las perlas G y hacer que los sistemas sean insensibles a pequeñas diferencias en el tamaño de la almohadilla de perlas /bolsillo de perlas. Esta mezcla hacia adelante y hacia atrás puede ocurrir a través de la almohadilla porosa. En algunas realizaciones, un perfil de flujo exacto puede ser +5 µL, -4 µL, +5 µL, -4µL +5 µL. La unión puede ocurrir durante un período de tiempo determinado, antes de introducir otros 7 µL. En algunas realizaciones (por ejemplo, véase la Figura 15), la elución se puede hacer fluir en un carril en un tiempo 1502 hasta que todas las eluciones hayan fluido en los carriles 1504 (por ejemplo, el proceso puede durar 7 minutos).

Una cámara de formación de imágenes, mientras tanto, se puede lavar 228 con el fin de eliminar las moléculas (por ejemplo, trehalosa y avidina libre) mientras que las perlas G se unen a la muestra eluida. Un imán (por ejemplo, un imán G; véase 1204 en la Figura 12) puede ser movido bajo la cámara 230 de unión G con el fin de recoger todas las perlas G y mantenerlas mientras que un calentador (por ejemplo, el calentador F) calienta la cámara 232 de unión y elución F (por ejemplo, a 35 °C). Mientras tanto un regulador de elución (por ejemplo, calentado por el calentador) puede ser lavado sobre las perlas G con el fin de facilitar la eliminación del exceso de sondas de captura no hibridadas de las perlas G (por ejemplo, véase 134 de la Figura 1C). Las perlas pueden ser entonces movidas a una cámara de elución G (por ejemplo, véase 315 en las Figuras 3A y 3B y 1602 y 1604 en la Figura 16) a través del imán 234, de manera que un segundo calentador (por ejemplo, un calentador G; véase 1306 en las Figuras 13B y 1702 en la Figura 17) configurado para liberar la muestra purificada (por ejemplo, complejos tripartitos) de las perlas G, pueda ser iniciado 236.

El calentador G puede ser operado a 47 °C durante 4 minutos para liberar la muestra de las perlas (por ejemplo, véase 136 de la Figura 1C). El imán puede entonces mover las perlas G nuevamente a la cámara 238 de unión, y la muestra purificada puede ser movida 240 (por ejemplo, véase la Figura 18) en una zona de unión de una superficie SA (por ejemplo, véase 316 en las Figuras 3A y 3B). Velocidad de flujo en la cámara se puede realizar en etapas que son aproximadamente la mitad del volumen de la cámara o menos (por ejemplo, aproximadamente 0,25 µL cada 78 segundos). El volumen de elución pequeño y el flujo controlado (usando una bomba de jeringa en lugar de gravedad), permite una unión más rápida y más eficiente.

En algunas realizaciones, se puede realizar una secuenciación dinámica de doce carriles con el fin de igualar el volumen de flujo de las muestras eluidas que se unen a la superficie SA. Por ejemplo, aproximadamente 0,25 µL pueden fluir cada 76 segundos en cada carril. El proceso por etapas se puede realizar en secuencia: etapas de 0,25 µL cada 6,3 segundos por carril en una secuencia (por ejemplo, carriles uno a doce), que puede resultar en un $12 * 6,3 = 75,6$ segundos de tiempo de espera en cada carril para cada etapa de 0,25 µL. Ya que se pueden abrir y cerrar doce válvulas en secuencia para doce carriles separados y mover únicamente un volumen pequeño, el desplazamiento de volumen de cada válvula individual puede afectar la variabilidad del conteo informador de carril a carril. La variación en el volumen de desplazamiento de la bomba misma puede no afectar la variabilidad; sin embargo, la diferencia en los volúmenes de desplazamiento debido a las válvulas puede tener un gran efecto sobre la variabilidad. El desplazamiento de cada válvula puede ser estimado (por ejemplo, véase 1902 en la Figura 19A) mediante el uso de la diferencia de lectura de presión del estado cerrado frente al estado abierto de la válvula. La minimización de la

variabilidad de carril a carril puede requerir la reducción al mínimo de la variabilidad del volumen de desplazamiento mediante el reordenamiento de los carriles. Para minimizar la variabilidad, el instrumento puede empezar empujando desde la válvula que tiene el volumen de desplazamiento más alto, luego el segundo más alto y así sucesivamente terminando con el más pequeño. La transición desde el más pequeño hasta el más alto puede tener el efecto más negativo; para corregir esto, el instrumento puede ser configurado para empujar un volumen extra de 0,083 µL en ese único carril (por ejemplo, 0,333 µL en lugar de 0,25 µL; véase 1904 de la Figura 19B).

En algunas realizaciones (por ejemplo, en la Figura 20), la superficie SA puede ser una superficie revestida con estreptavidina, y puede unirse a las sondas hibridadas en la muestra 2002 (por ejemplo, véase también 138 en la Figura 1D). Allí, las moléculas en la segunda muestra eluida purificada, pueden ser estiradas e inmovilizadas 242 en la superficie SA (por ejemplo, véase también 2102 en la Figuras 21 y 140 y 142 de la Figura 1D), por ejemplo, a través de una única solución que comprende al menos ganchos G (oligo biotinilado anti-G 15 mer), medios de montaje (antidecoloración), y fiduciales (perlas fluorescentes biotiniladas multiespectrales de 100 nm, es decir, difracción limitada), y se añaden a la superficie SA a una velocidad de flujo particular (por ejemplo, véase , 2104 en la Figura 21, que es un gráfico que indica las velocidades de flujo que pueden ser utilizadas). Los ganchos G se utilizan para inmovilizar el segundo extremo del informador durante el estiramiento. El medio de montaje está presente para prevenir el fotoblanqueamiento y la fotodestrucción del ADN (debido a la interacción de la luz con los colorantes que crean radicales libres que pueden romper la cadena principal del ADN). Los fiduciales producen una señal fluorescente (en todos los canales) que se utiliza para alinear las imágenes. Los ganchos G, los medios de montaje, los fiduciales, y el regulador de estiramiento se requiere que estén en soluciones separadas en los procesos de inmovilización basados en el electroestiramiento previamente descrito. En algunas realizaciones, el proceso puede reemplazar cuatro reguladores y puede eliminar la necesidad de electrodos y de una fuente de alimentación. También puede eliminar un problema de contaminación con ganchos G, que es causada por los ganchos G que se deslizan hacia los electrodos en los diseños anteriores y pasan a procesos de muestras posteriores. El instrumento puede entonces detectar las moléculas 244 estiradas de la superficie SA en el cartucho y producir una salida (por ejemplo, una imagen, un reporte, y/o similares) para el usuario (por ejemplo, véase 144 de la Figura 1E). En algunas realizaciones, el instrumento puede tener un subcomponente óptico de bajo costo que utiliza un sistema de iluminación de tres LED.

El instrumento también puede llevar a cabo un gradiente de unión y optimización de la zona con base en la densidad. La unión a la superficie de estreptavidina puede generar un gradiente informador de unión sobre el canal - mayor densidad en un extremo (entrada) con disminución gradual hacia el otro extremo (salida). Con base en la densidad del informador determinada mediante un estudio de escaneo inicial, se puede seleccionar la ubicación de la zona de formación de imágenes para la recolección óptima de datos. La selección de la zona de barrido final en el lado de alta densidad (cerca del extremo de entrada) puede generalmente recoger más datos. Sin embargo, en el caso una densidad de unión muy alta, el barrido puede iniciarse desde una zona menos densa moviendo la zona de barrido más allá del extremo de entrada. Este esquema aumenta el intervalo dinámico de la concentración de la muestra.

Durante la formación de imágenes, el medio de montaje puede ser intercambiado para minimizar la fotodestrucción y minimizar la unión no específica de informadores no funcionales residuales mediante la eliminación de los informadores libres. Si se dejan algunos informadores libres flotando libremente en la cámara de formación de imágenes, el flujo del regulador formación de imágenes los lava, evitando así la unión a través de los ganchos G en solución.

Las enseñanzas relevantes adicionales para la presente invención se describen en uno o más de los siguientes documentos: US 2011/0086774, US 2011/0145176, US 2011/0201515, US 2011/0229888, US 2013/0004482, US 2013/0017971, US 2013/0178372, US 2013/0230851, US 2013/0337444, US 2013/0345161, US 2014/0005067, US 2014/0017688, US 2014/0037620, US 2014/0087959, US 2014/0154681, US 2014/0162251, US 2014/0371088, US 2015/0072021, US 2015/0252440, US 7.473.767; US 7.919.237; US 7.941.279; US 8.148.512; US 8.415.102; US 8.492.094; US 8.519.115; US 8.986.926; US 9.066.963 y US 9.181.588.

El siguiente ejemplo se ofrece a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplo

Las realizaciones de la presente divulgación proporcionan una detección y cuantificación superiores de la expresión génica y la síntesis de proteínas.

Como se muestra en la Figura 22, las realizaciones detectan efectivamente los objetivos a partir de tres paneles PanCancer nCounter®: el panel de rutas PanCancer, el panel de progresión PanCancer y el panel de perfilado inmune PanCancer. En el presente documento, los datos obtenidos a partir de las realizaciones (identificadas como "Perfilador *SPRINT* nCounter") se correlacionan con los datos obtenidos a partir del sistema de análisis nCounter®. Como se muestra en la Figura 23, las realizaciones permiten la identificación de genes expresados diferencialmente en muestras de linfoma. Como se muestra en la Figura 24, las realizaciones pueden detectar la expresión génica en ARN total purificado o en los lisados celulares sin purificar; es notable que los ensayos requieren una preparación limitada de la muestra. Como se muestra en la Figura 25, las realizaciones proporcionan una detección confiable y fidedigna de la expresión génica con diversos tipos de muestras, incluyendo, pero sin limitarse a, tejido fresco congelado y tejidos embebidos en parafina fijados con formalina (FFPE). Como se muestra en la Figura 26, las realizaciones

detectan efectivamente la expresión génica para el panel de progresión PanCancer y con resultados altamente correlacionados con respecto a los resultados obtenidos con el sistema de análisis nCounter®. Es de destacar que las realizaciones de la presente invención (identificadas como "Sprint") utilizan como mucho la mitad de la entrada de la muestra (en peso) tal como se utiliza con el sistema de análisis nCounter® (identificado como "sistema de análisis").

5 Como se muestra en la Figura 27, las realizaciones detectan efectivamente objetivos en el panel de inmunología humano. En el presente documento, los datos obtenidos a partir de las realizaciones (identificadas como "Perfilador *SPRINT* nCounter") se correlacionan con los datos obtenidos del sistema de análisis nCounter®. Como se muestra en la Figura 28, las realizaciones eficazmente cuantifican objetivos en un ensayo de variación del número de copia (CNV). Se obtuvieron datos similares del número de copia para muestras de ADN procesadas en las realizaciones de la presente invención (identificado como "perfilador *SPRINT* nCounter") y el sistema de análisis nCounter®. En el presente documento, los datos de número de copias para cada gen están directamente por encima de una marca de la señal en el eje X. Por lo tanto, un par relacionado verticalmente que comprende un cuadrado (datos de las realizaciones de la presente invención) y un círculo (datos del sistema de análisis nCounter®) representan los datos para un gen particular. Como se muestra en la Figura 29, las realizaciones detectan efectivamente objetivos de miARN.

10 En este documento, los datos obtenidos a partir de las realizaciones se correlacionan con los datos obtenidos a partir del sistema de análisis nCounter®. Como se muestra en la Figura 30, las realizaciones efectivamente detectan ARN y proteínas objetivos. En el presente documento, los datos obtenidos a partir realizaciones (identificadas como "Perfilador *SPRINT* nCounter") se correlacionan con los datos obtenidos a partir del sistema de análisis nCounter®. Los elementos referenciados se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que cualquier invención descrita en este documento no tiene derecho a anteceder tal material en virtud de la invención anterior.

Aunque se han descrito en el presente documento ejemplos de realizaciones de los dispositivos, sistemas y métodos, son posibles otras modificaciones. Como se señaló en otro lugar, estas realizaciones se han descrito sólo con fines ilustrativos y no limitantes. Otras realizaciones son posibles y están cubiertas por la divulgación, que serán evidentes a partir de las enseñanzas contenidas en este documento. Por lo tanto, la amplitud y alcance de la descripción no deben estar limitados a ninguna de las realizaciones descritas anteriormente, sino que deben definirse sólo de acuerdo con las reivindicaciones soportadas por la presente descripción y sus equivalentes. Además, cualquier flujo lógico representado en la descripción anterior y/o figuras que se acompañan pueden no requerir el orden particular mostrado, o el orden secuencial, para lograr los resultados deseados. Por otra parte, las realizaciones de la presente descripción pueden incluir métodos, sistemas y dispositivos que pueden incluir adicionalmente todos y cada uno de los elementos de cualquier otro de los métodos, sistemas y dispositivos descritos, incluyendo todos y cada uno de los elementos correspondientes a la purificación y formación de imágenes de genes. En otras palabras, los elementos de una y/u otra realización descrita pueden ser intercambiables con elementos de otras realizaciones descritas. Además, una o más características/elementos de realizaciones divulgadas pueden ser eliminados y aún así dar como resultado una materia patentable (y, por lo tanto, resultar en aún más realizaciones de la presente descripción). Además, algunas realizaciones de la presente divulgación son distinguibles de la técnica anterior expresamente por no requerir una y/o otra de las características dadas a conocer en la técnica anterior (por ejemplo, algunas realizaciones pueden incluir limitaciones negativas). Algunas de las realizaciones descritas en el presente documento están dentro del alcance de al menos algunas de las siguientes reivindicaciones de las numerosas reivindicaciones que están soportadas por la presente divulgación que pueden presentarse.

25

30

35

40

Listado de secuencias

<110> NanoString Technologies, Inc.

Dunaway, Dwayne

Khafizov, Rust

45 Mi, Qian

Dennis Lucas

Krouse, Michael

Haya, Joseph;

Isaac Sprague

50 <120> MÉTODOS Y APARATOS PARA LA PURIFICACIÓN Y FORMACIÓN DE IMÁGENES DE GENES

<130> NATE-023/001

<150> US 62/083.681

<151> 2014-11-24

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polinucleótido Sintético

<400> 1

gctgtgatga tagac 15

10 <210> 2

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> > Polinucleótido Sintético

<400> 2

ggtctgtgtg atgtt 15

REIVINDICACIONES

1. Un cartucho configurado para la purificación de una muestra de una molécula objetivo hibridada y la formación de imágenes de una molécula objetivo hibridada, que comprende:
- 5 una zona de entrada de la muestra configurada para contener una muestra de la molécula objetivo, comprendiendo la muestra:
- una pluralidad de complejos hibridados que comprende una pluralidad de moléculas objetivo cada una hibridada con una primera sonda y una segunda sonda,
- una pluralidad de primeras sondas no hibridadas, y
- una pluralidad de segundas sondas no hibridadas;
- 10 una primera cámara de unión configurada para recibir y/o contener una primera matriz de afinidad y para recibir la muestra, en la que:
- la primera matriz de afinidad opera con las primeras moléculas configuradas para unirse con las primeras sondas no hibridadas y complejos hibridados de la muestra durante un primer periodo de tiempo;
- 15 la primera cámara de unión está configurada adicionalmente para recibir un primer regulador para eliminar las segundas sondas no hibridadas de la muestra después de que las primeras sondas no hibridadas y los complejos hibridados de la muestra se unen con la primera matriz de afinidad;
- Un primer canal de elución configurado operativamente con un primer calentador, y configurado para recibir la primera matriz de afinidad después del primer periodo de tiempo y configurado para calentar la primera matriz de afinidad para eluir una primera muestra eluida que comprende la pluralidad de los complejos hibridados y la pluralidad de las
- 20 primeras sondas no hibridadas;
- una segunda cámara de unión configurada para recibir y/o contener una segunda matriz de afinidad y para recibir la primera muestra eluida, en la que:
- la segunda matriz de afinidad opera con segundas moléculas configuradas para unirse con los complejos hibridados durante un segundo periodo de tiempo;
- 25 la segunda cámara de unión está configurada adicionalmente para recibir un segundo regulador para eliminar al menos las primeras sondas no hibridadas;
- un segundo canal de elución operativamente configurado con un segundo calentador, y configurado para recibir la segunda matriz de afinidad después del segundo periodo de tiempo y configurado para calentar la segunda matriz de afinidad para eluir una segunda muestra eluida que comprende la pluralidad de los complejos hibridados; y
- 30 una zona de unión tiene una superficie de unión activa configurada para recibir la segunda muestra eluida y unirse con los complejos hibridados.
2. El cartucho de la reivindicación 1, en el que el cartucho comprende, además:
- un desfogue de burbujas;
- una pluralidad de zonas de entrada d regulador,
- 35 una pluralidad de primeras cámaras de unión,
- una pluralidad de zonas de salida de residuos, y
- una pluralidad de almohadillas de perlas;
- y opcionalmente, en el que la pluralidad de zonas de entrada del regulador es una pluralidad de válvulas de entrada fuera de la tarjeta operativamente acopladas a un colector de fluidos, estando la pluralidad de válvulas de entrada del regulador fuera de tarjeta configuradas para recibir el primer regulador y el segunda regulador del colector de fluidos y proporcionar el primer y segundo regulador al cartucho; y la pluralidad de zonas de salida de residuos es una pluralidad de válvulas de residuos configuradas para recoger el primer y segundo regulador del cartucho.
- 40
3. El cartucho de la reivindicación 2, en el que el desfogue de burbujas está configurado para separar la entrada de la muestra y la primera cámara de unión y para eliminar las burbujas de aire.
- 45
4. El cartucho de la reivindicación 1, estando el cartucho operativamente acoplado a:
- una pluralidad de válvulas de entrada del regulador fuera de la tarjeta operativamente acopladas a un colector de

fluidos; y

una pluralidad de válvulas de residuos.

5. El cartucho de la reivindicación 1, comprendiendo además el cartucho:

una pluralidad de válvulas de entrada del regulador en la tarjeta operativamente acopladas a un colector de fluidos.

5 6. El cartucho de la reivindicación 1, en el que la zona de unión está configurada además para recibir una solución formulada para inmovilizar la segunda muestra eluida en la superficie de unión activa después del estiramiento con fluido.

7. Un sistema para formación de imágenes que comprende una pluralidad de complejos hibridados;

un cartucho de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6;

10 una bandeja de cartucho operativamente acoplada al sistema y configurada para contener el cartucho;

un imán operativamente acoplado al dispositivo de formación de imágenes por debajo de la bandeja del cartucho;

un colector de fluidos operativamente acoplado al sistema por encima de la bandeja del cartucho y configurado para mantener y controlar el flujo de una pluralidad de reguladores;

15 una pluralidad de válvulas de entrada del regulador fuera de la tarjeta operativamente acopladas al colector de fluidos y el cartucho;

una pluralidad de válvulas de residuos operativamente acopladas al sistema por encima de la bandeja del cartucho; y

una superficie de referencia de formación de imágenes operativamente acoplada al dispositivo de formación de imágenes por encima de la bandeja del cartucho.

8. El sistema de la reivindicación 7, que comprende, además:

20 una almohadilla de contacto de leva operativamente acoplada al dispositivo de formación de imágenes y configurado para permitir la carga previa contra al menos una almohadilla de contacto;

al menos un contacto ajustable entre una abrazadera móvil y la base del dispositivo de formación de imágenes, al menos un contacto ajustable configurado para permitir el ajuste de datos A; y

25 un motor de abrazadera operativamente acoplado al dispositivo de formación de imágenes y configurado para mover la abrazadera de movimiento.

9. El sistema de la reivindicación 7, en el que al menos una de la pluralidad de válvulas de entrada del regulador fuera de la tarjeta y la pluralidad de válvulas de residuos operativamente acopladas al sistema por encima de la bandeja del cartucho está controladas neumáticamente.

30 10. Un método para purificar una muestra de moléculas objetivo hibridadas y la formación de imágenes de la molécula objetivo hibridada, que comprende:

proporcionar el cartucho de cualquiera de las reivindicaciones 1-6;

recibir una muestra hibridada, comprendiendo la muestra una pluralidad de complejos hibridados que comprenden las moléculas objetivo hibridadas con las primeras sondas y segundas sondas, una pluralidad de primeras sondas no hibridadas, y una pluralidad de segundas sondas no hibridadas;

35 unir las primeras sondas no hibridadas y los complejos hibridados de la muestra a una primera matriz de afinidad de en una primera cámara de unión durante un primer periodo de tiempo;

hacer fluir un primera regulador en la primera cámara de unión para eliminar las segundas sondas no hibridadas de la muestra después de que las primeras sondas no hibridadas y los complejos hibridados de la muestra se unen con la primera matriz de afinidad;

40 dirigir la primera matriz de afinidad en un primer canal de elución;

calentar la primera matriz de afinidad para eluir una primera muestra eluida que comprende la pluralidad de complejos hibridados y la pluralidad de primeras sondas no hibridadas;

unir los complejos hibridados de la primera muestra eluida a una segunda matriz de afinidad una segunda cámara de unión durante un segundo período de tiempo;

45 hacer fluir un segundo regulador en la segunda cámara de unión para eliminar la primera de las sondas no hibridadas

de la primera muestra eluida después de que los complejos hibridados se unen con la segunda matriz de afinidad;

calentar la segunda matriz de afinidad para eluir una segunda muestra eluida que comprende la pluralidad de los complejos hibridados; y

unir los complejos hibridados a una superficie de unión activa para formación de imágenes de los mismos.

- 5 11. El método de la reivindicación 10, que comprende, además:
mover una cantidad de la primera muestra eluida a través de una almohadilla de matriz de afinidad en una primera dirección y una segunda dirección.
12. El método de la reivindicación 10, en el que el primer regulador se bombea para mover la mezcla muestra-perla a través de la primera almohadilla de perlas en una primera dirección y una segunda dirección.
- 10 13. El método de la reivindicación 10, en el que la molécula objetivo es un ácido nucleico o una proteína.
14. El cartucho de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 10, en el que la primera matriz de afinidad y la segunda matriz de afinidad corresponden a un primer conjunto de perlas magnéticas y un segundo conjunto de perlas magnéticas, respectivamente.
- 15 15. El cartucho de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 10, en el que la superficie de unión activa comprende uno de estreptavidina, una avidina y oligonucleótidos.
16. El método de la reivindicación 10, en el que las primeras sondas incluyen sondas de captura.
17. El método de la reivindicación 10, en el que las segundas sondas incluyen sondas informadoras.
18. El cartucho o método de la reivindicación 14, en el que las primeras perlas magnéticas incluyen perlas magnéticas acopladas a oligonucleótidos.
- 20 19. El cartucho o método de la reivindicación 18, en el que las perlas magnéticas acopladas a oligonucleótidos incluyen perlas magnéticas F.
20. El cartucho o método de la reivindicación 14, en el que las segundas perlas magnéticas incluyen perlas magnéticas acopladas a oligonucleótidos.
- 25 21. El cartucho o método de la reivindicación 20, en el que las perlas magnéticas acoplados a oligonucleótidos incluyen perlas magnéticas G.
22. El método de la reivindicación 10 cuando depende de la reivindicación 4, en el que la pluralidad de válvulas de entrada del regulador fuera de la tarjeta está configuradas para recibir al primera regulador y al segundo regulador desde el colector de fluido y proporcionar el regulador al cartucho.
- 30 23. El método de la reivindicación 10, en el que el flujo de la segunda muestra eluida a la zona de la unión se hace en pequeñas etapas que se reordenan con base en los perfiles de presión.
24. El método de la reivindicación 10 cuando depende de la reivindicación 6, en el que la solución incluye ganchos G, medio antidecoloración y fiduciales.

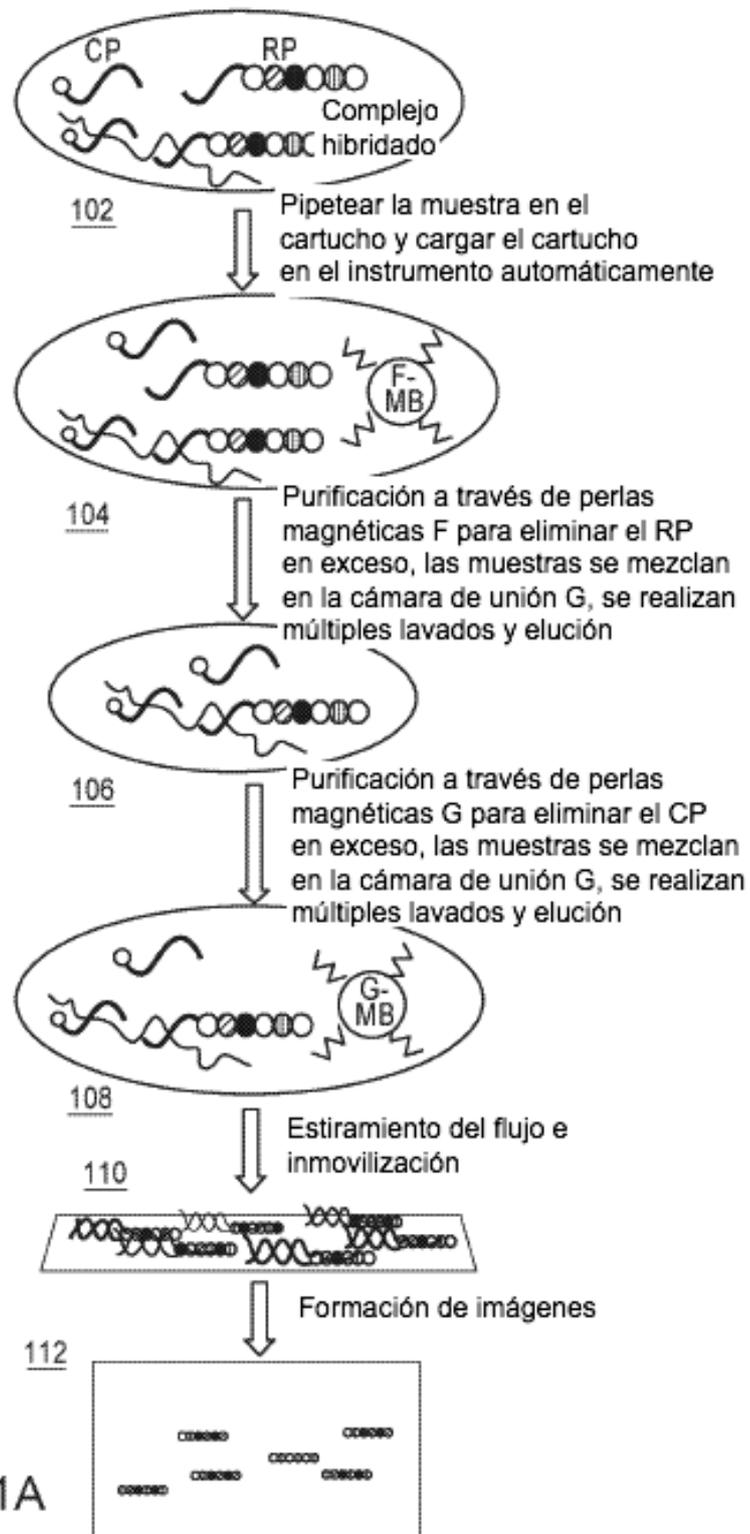


FIGURA 1A

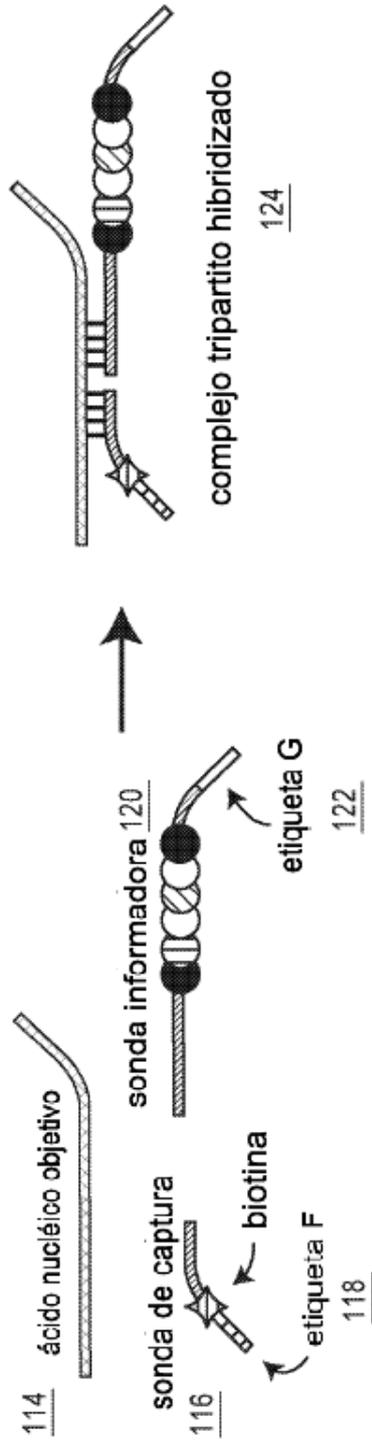


FIGURA 1B

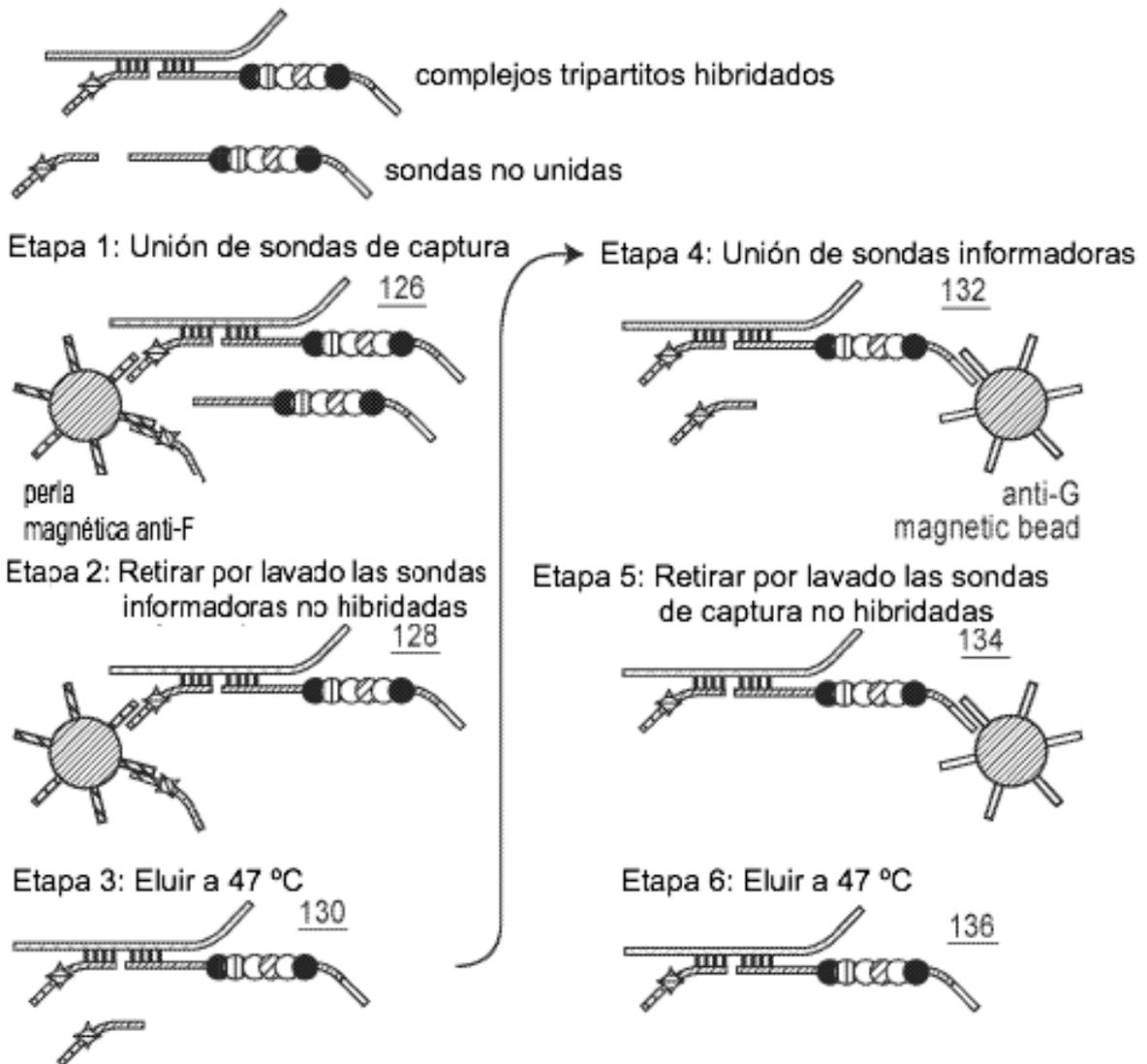


FIGURA 1C

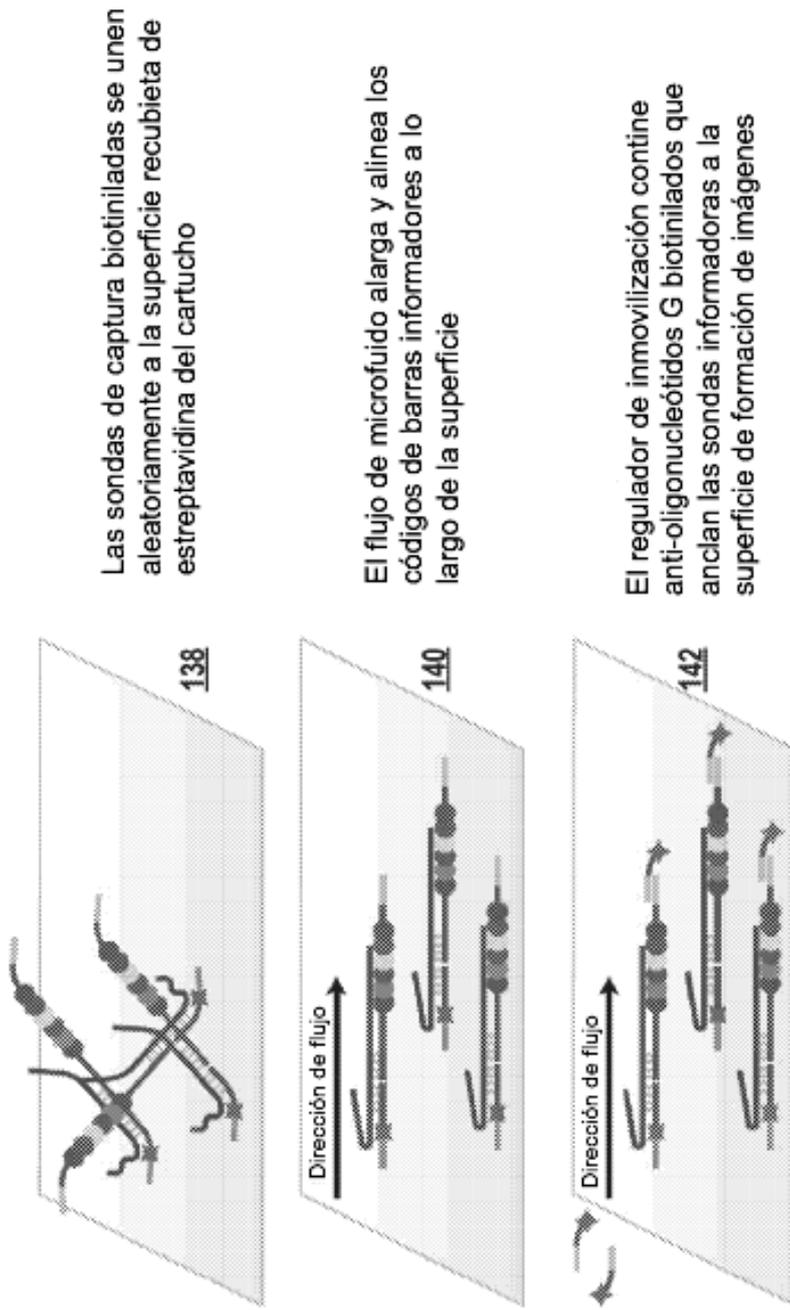


FIGURA 1D

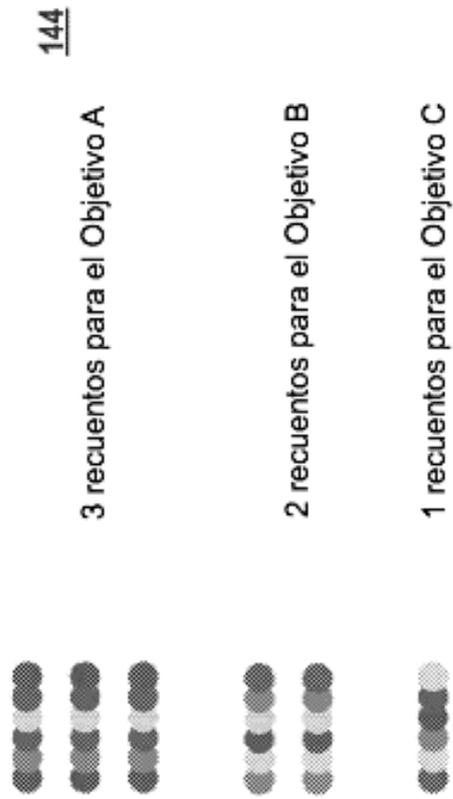


FIGURA 1E

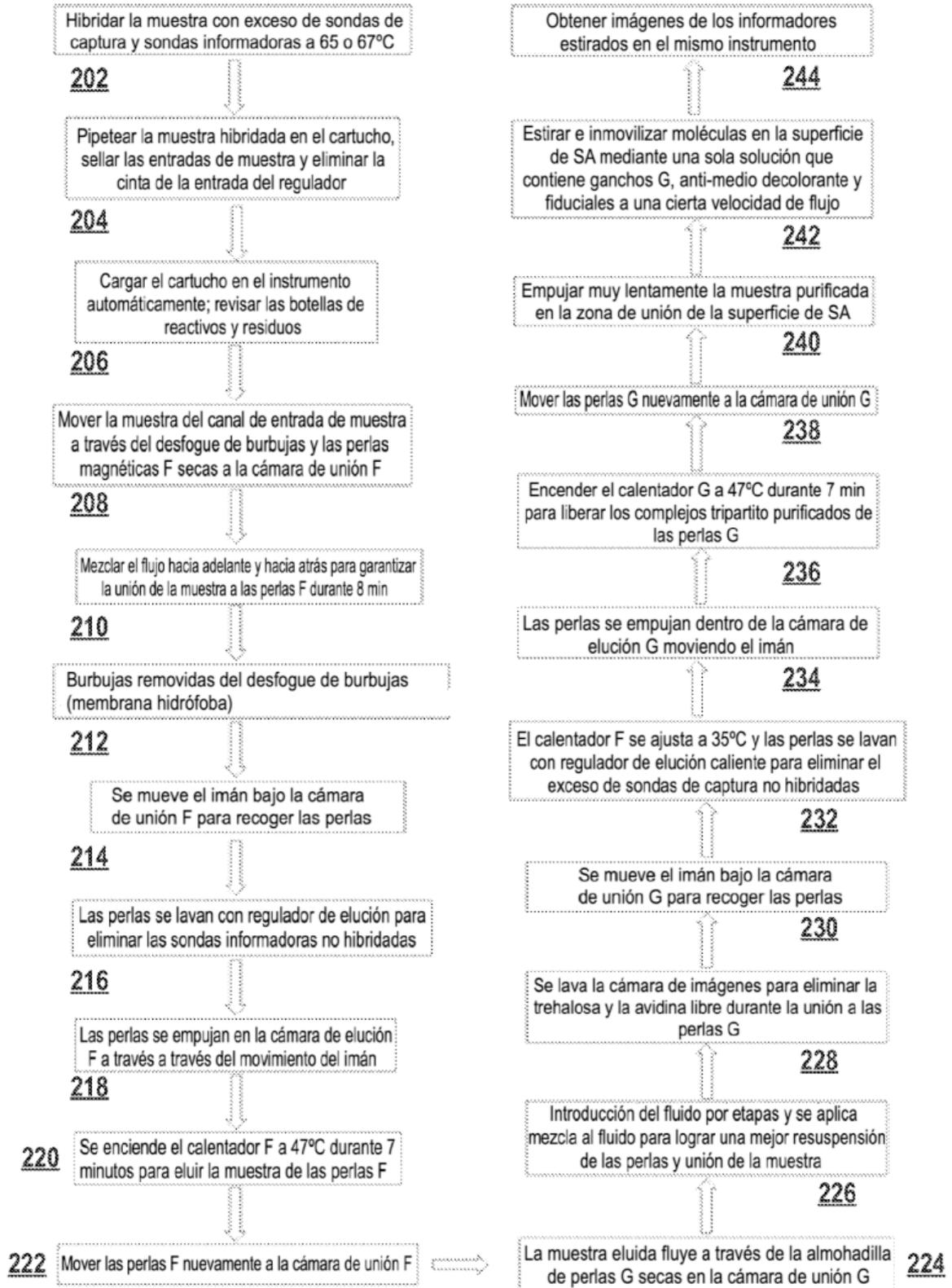


FIGURA 2

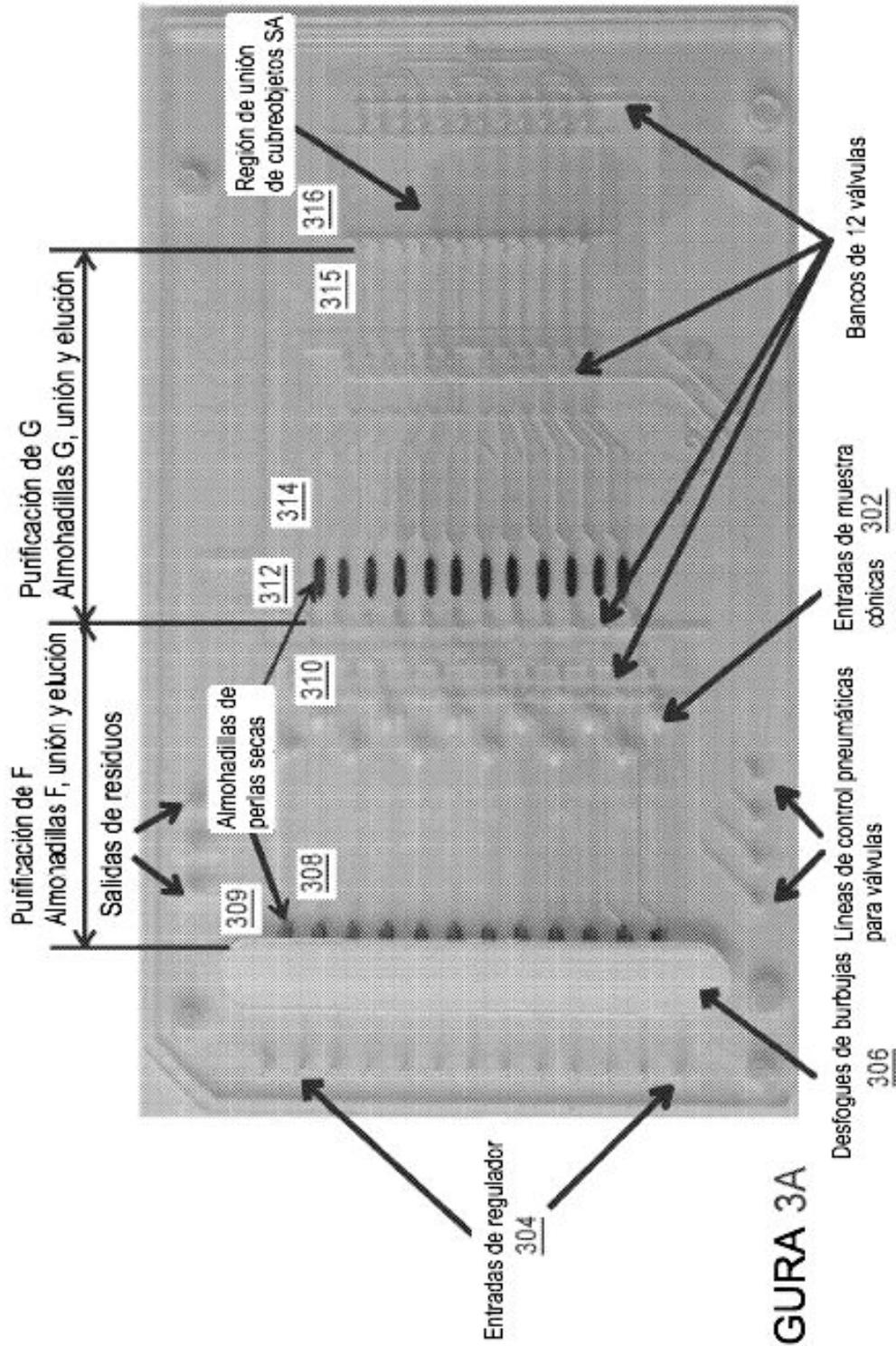


FIGURA 3A

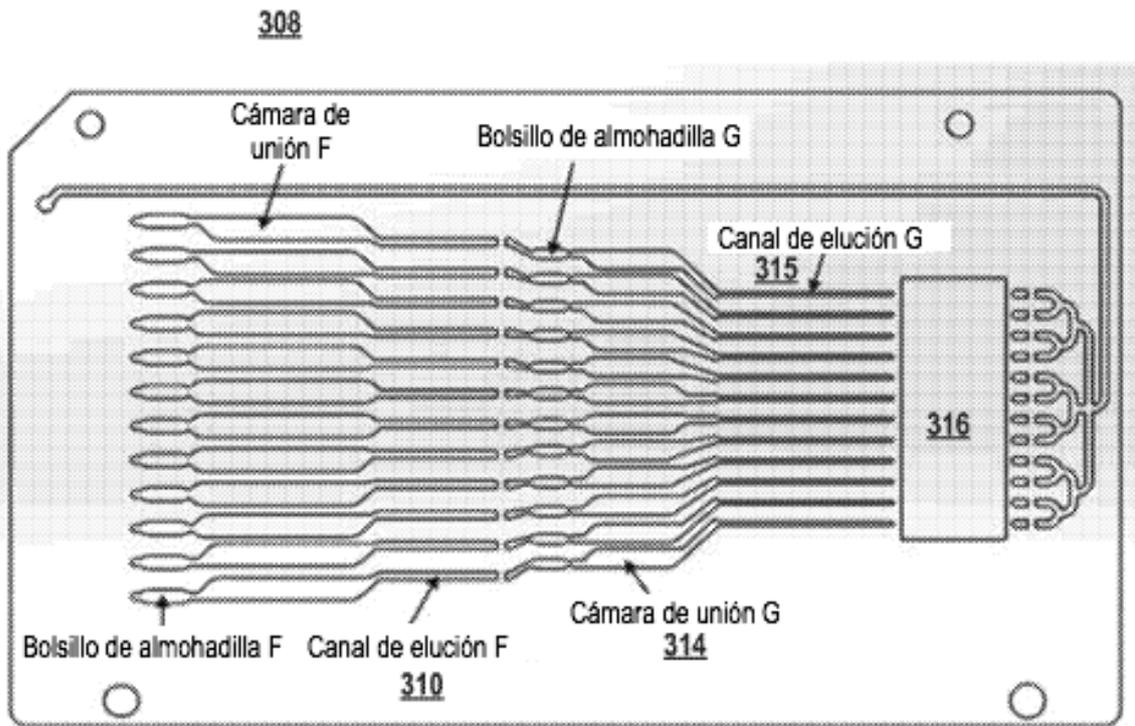


FIGURA 3B

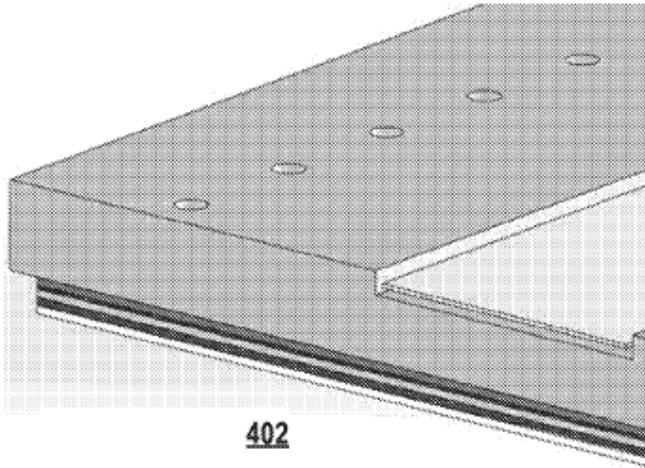
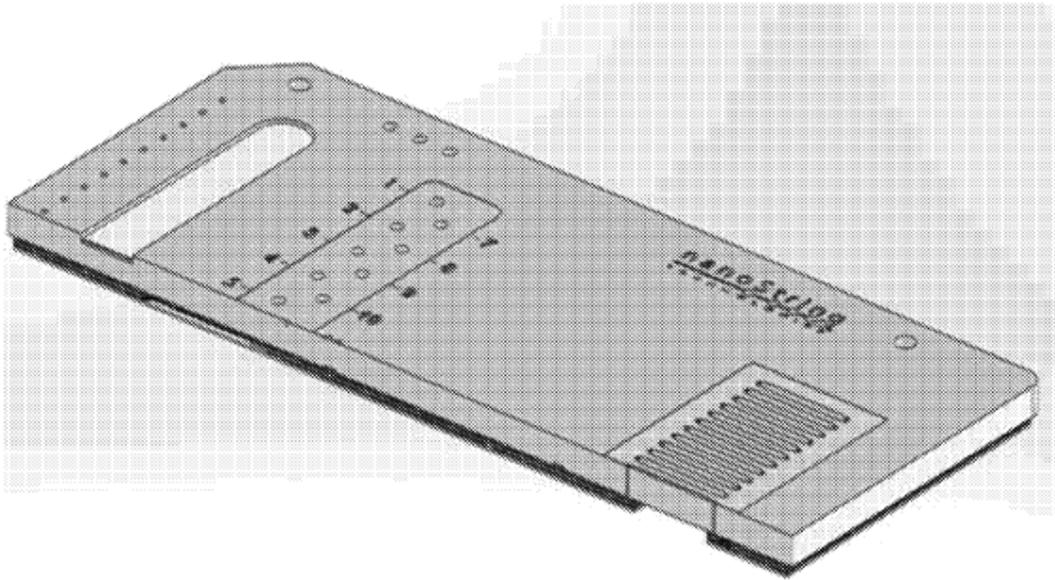


FIGURA 4

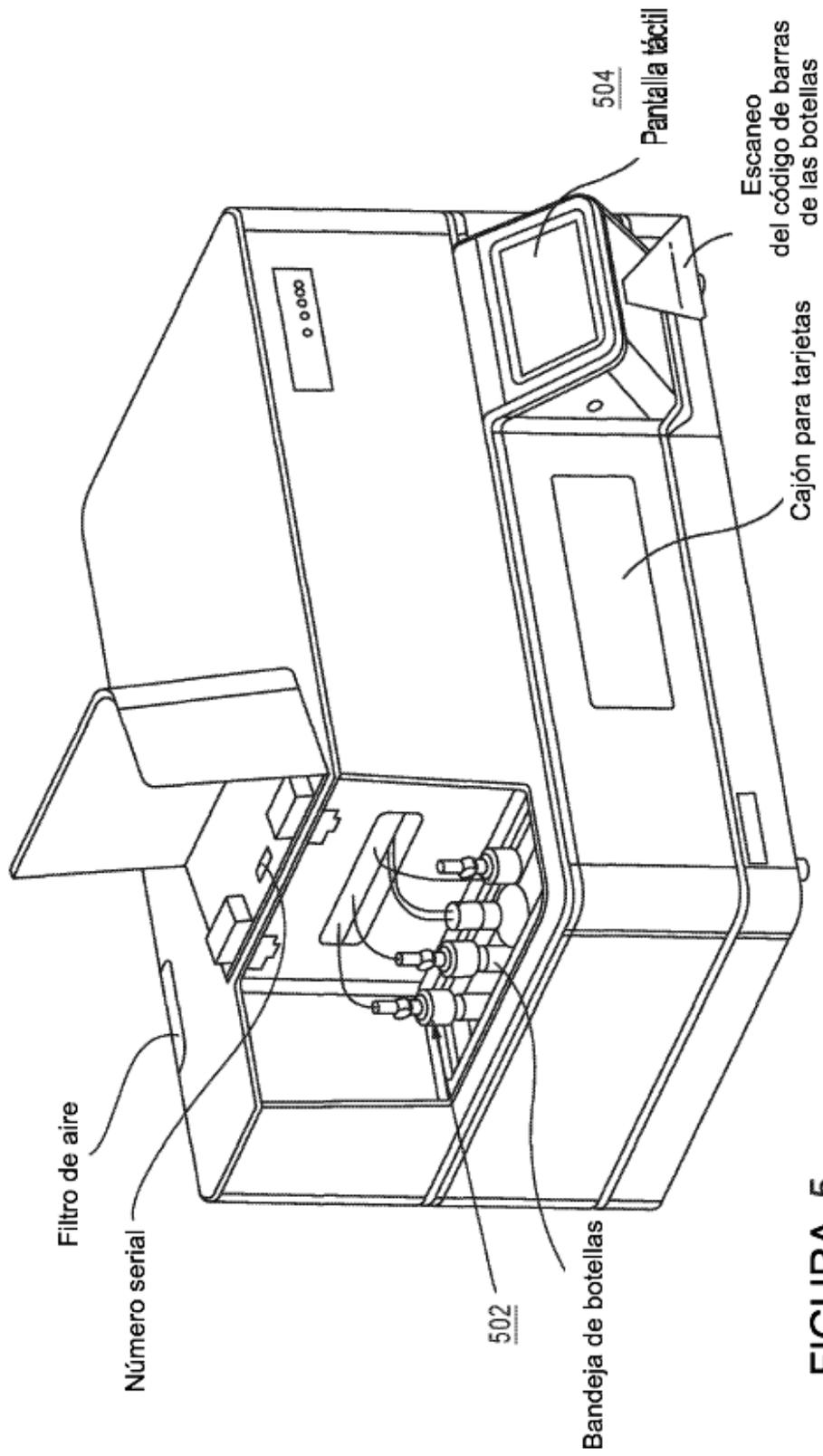
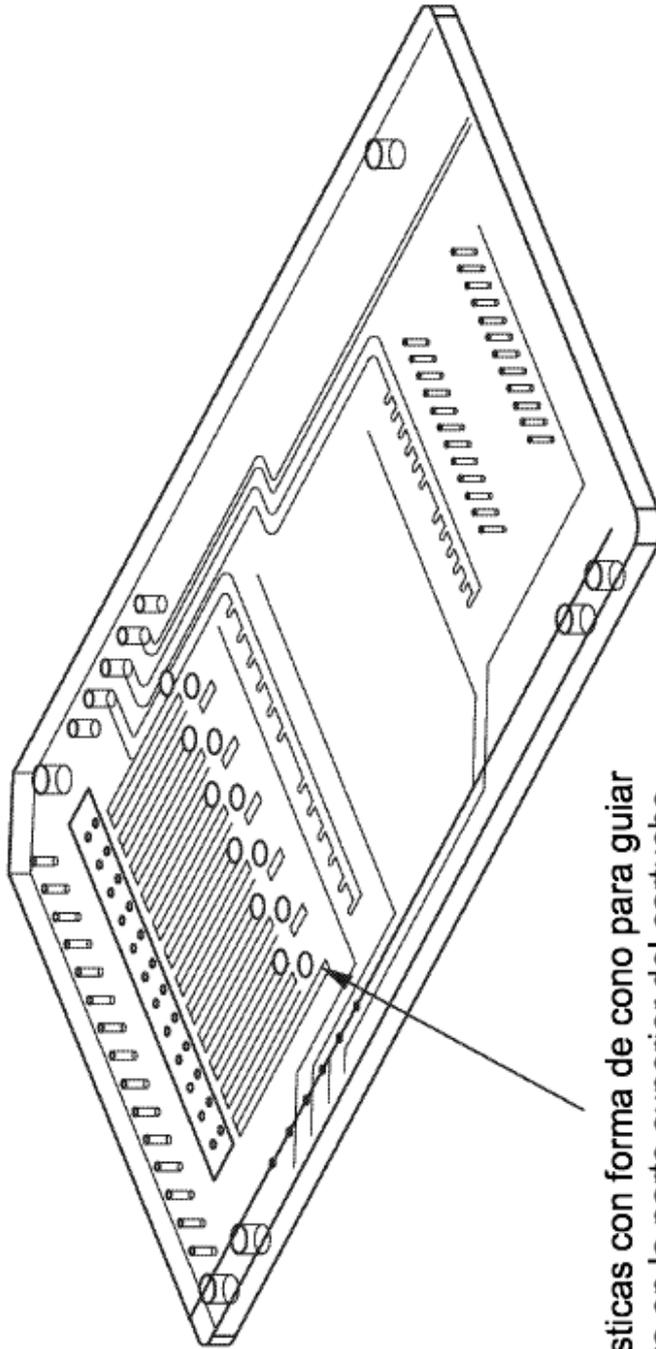


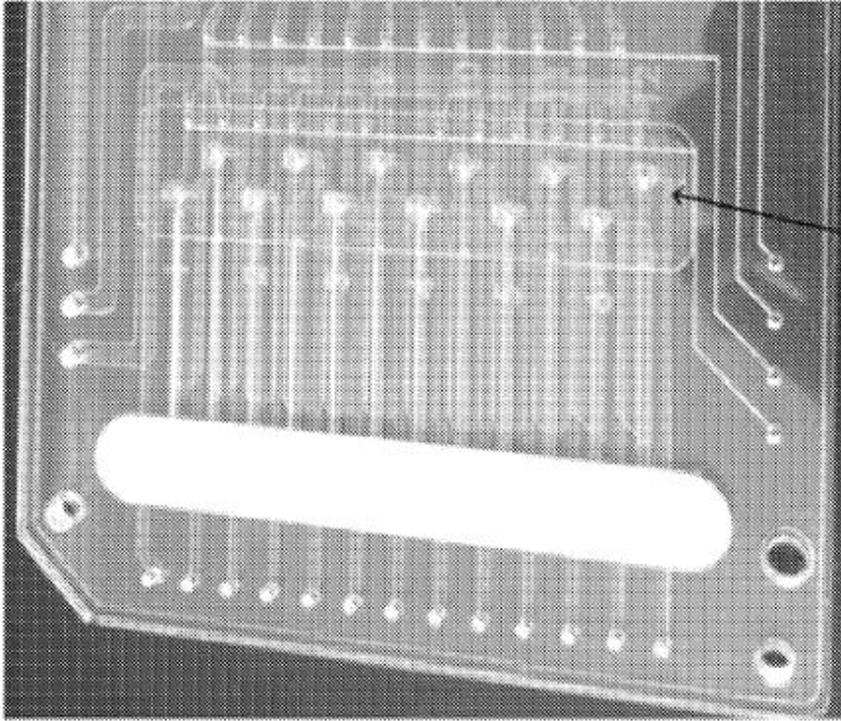
FIGURA 5



Características con forma de cono para guiar
la pipeta en la parte superior del cartucho

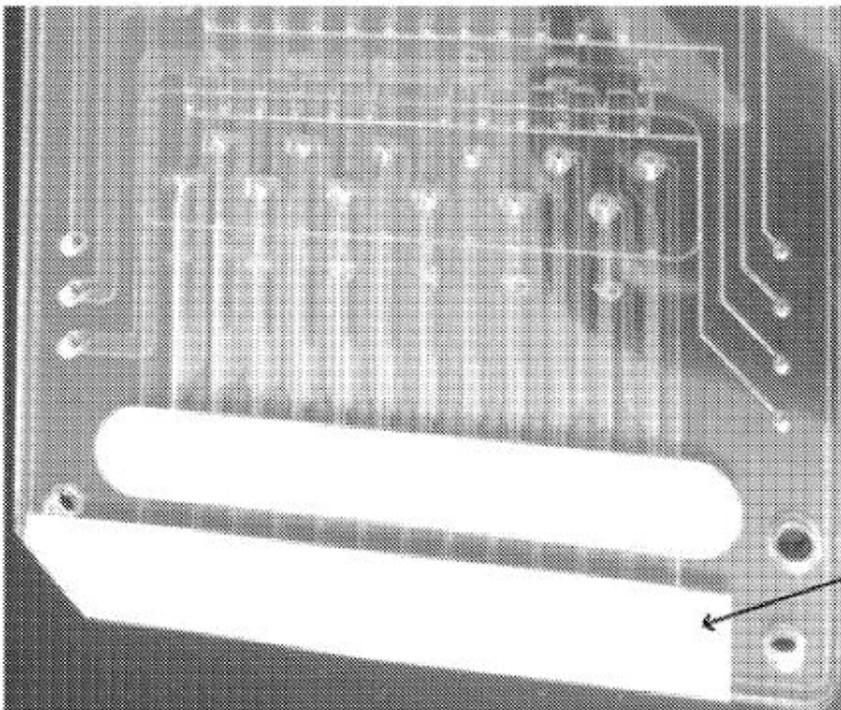
602

FIGURA 6A



Entradas de muestra en cinta adhesiva transparente

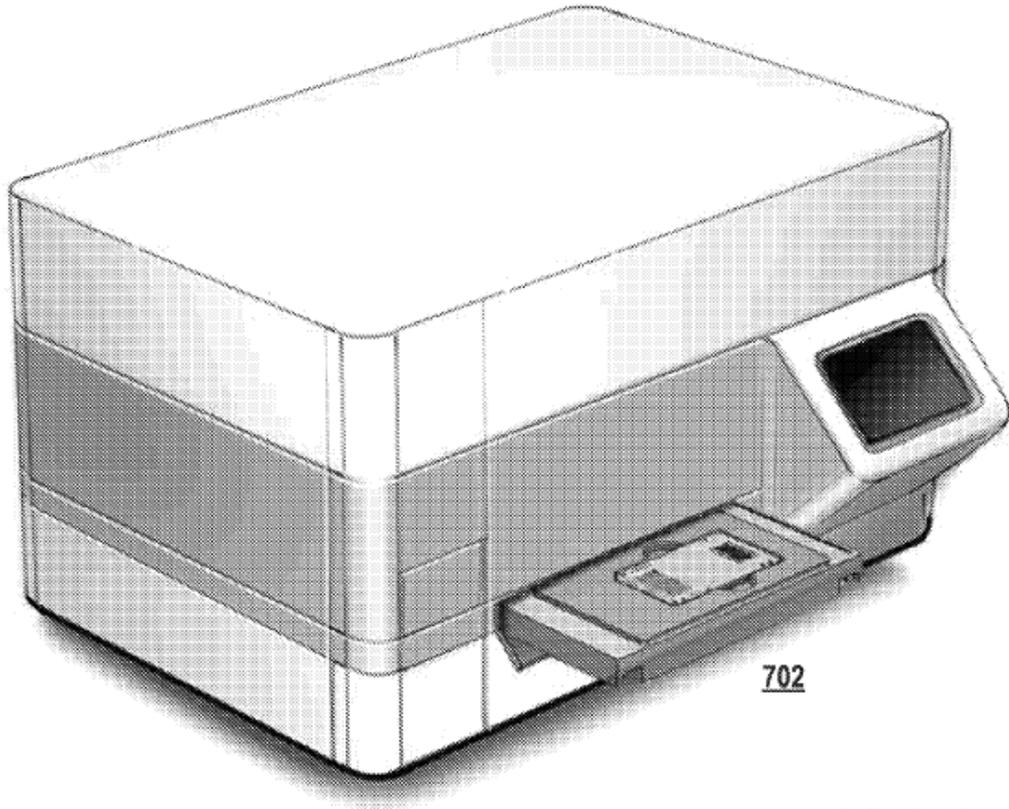
604



Puntos del regulador sobre cinta adhesiva

606

FIGURA 6B



702

FIGURA 7

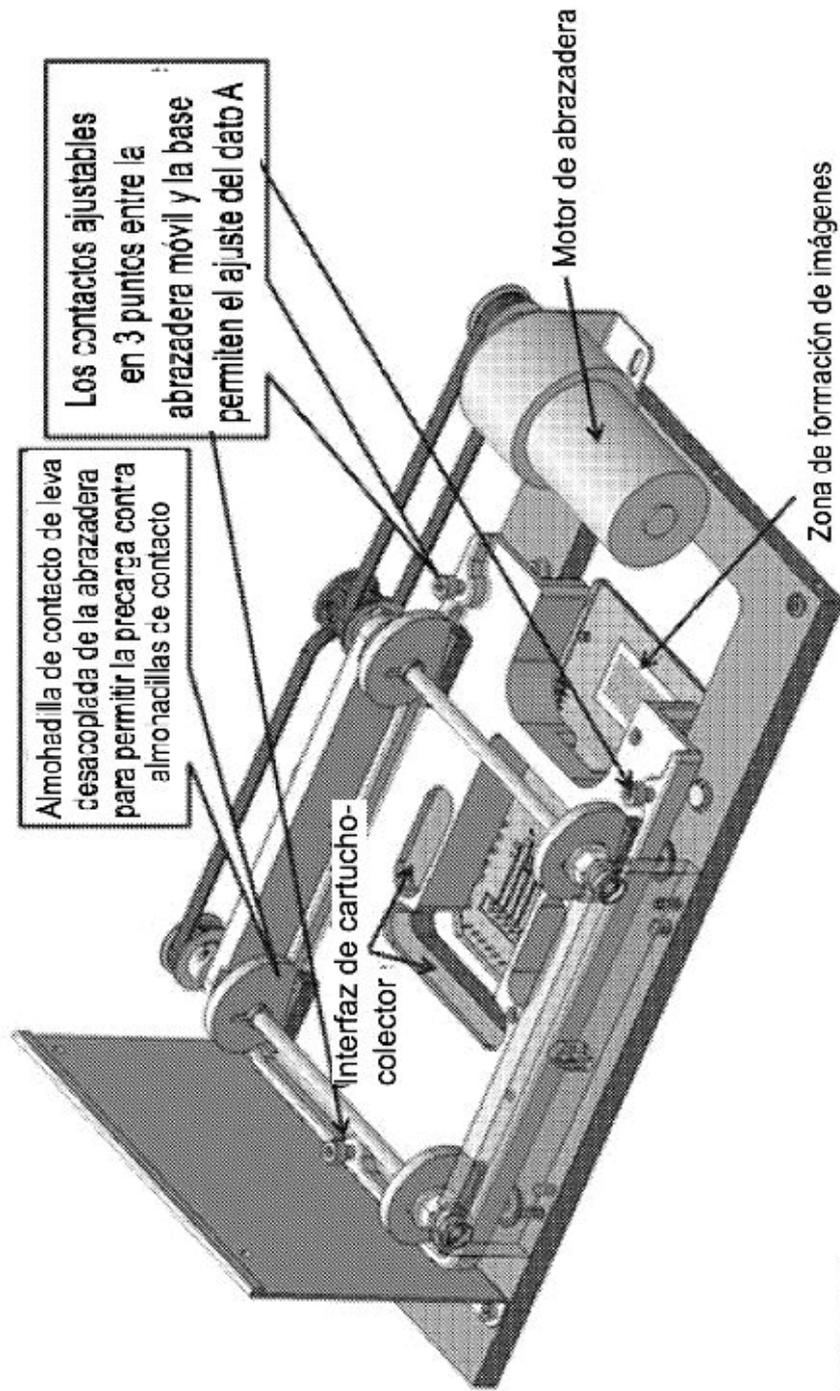


FIGURA 8

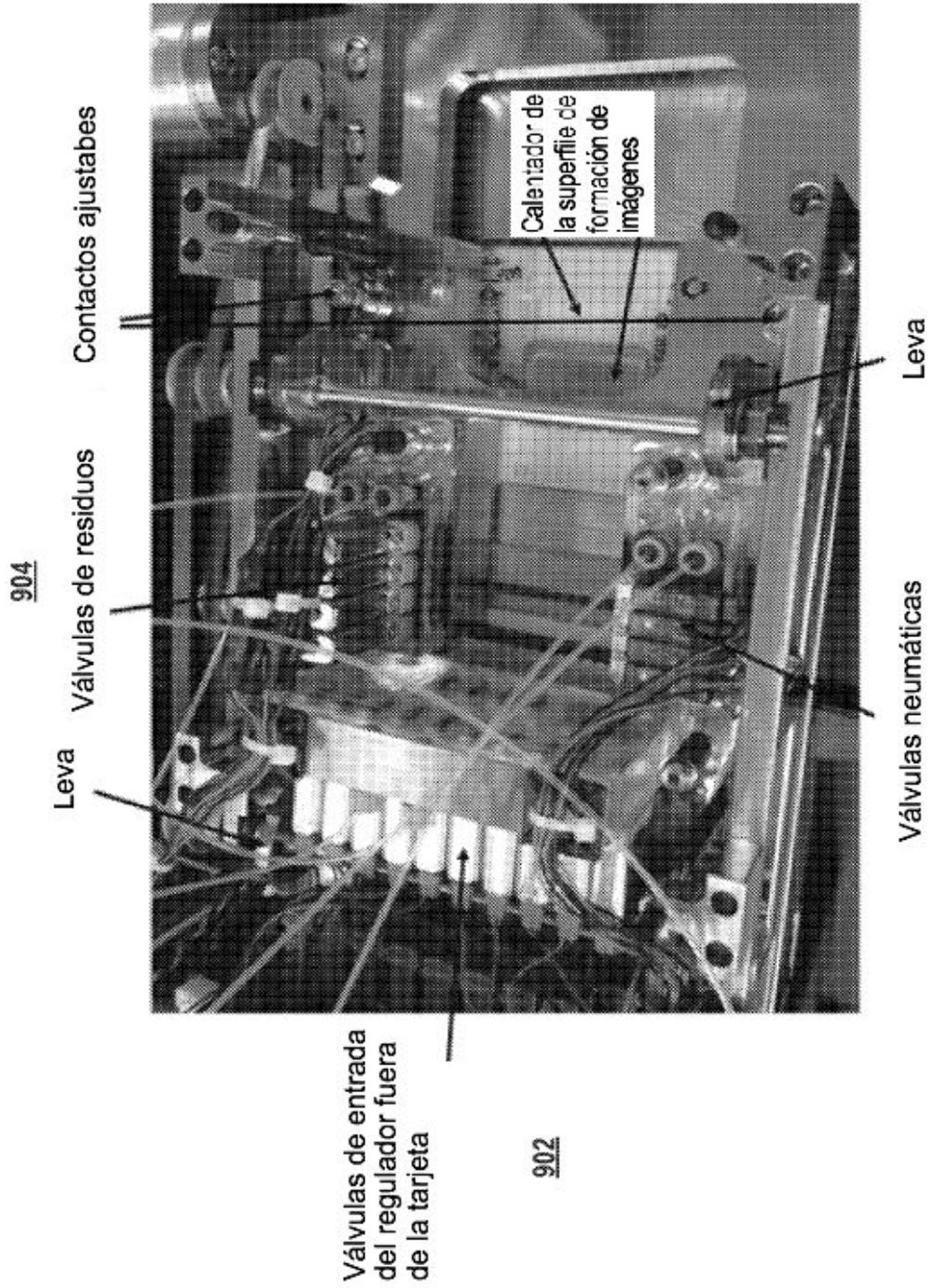


FIGURA 9A

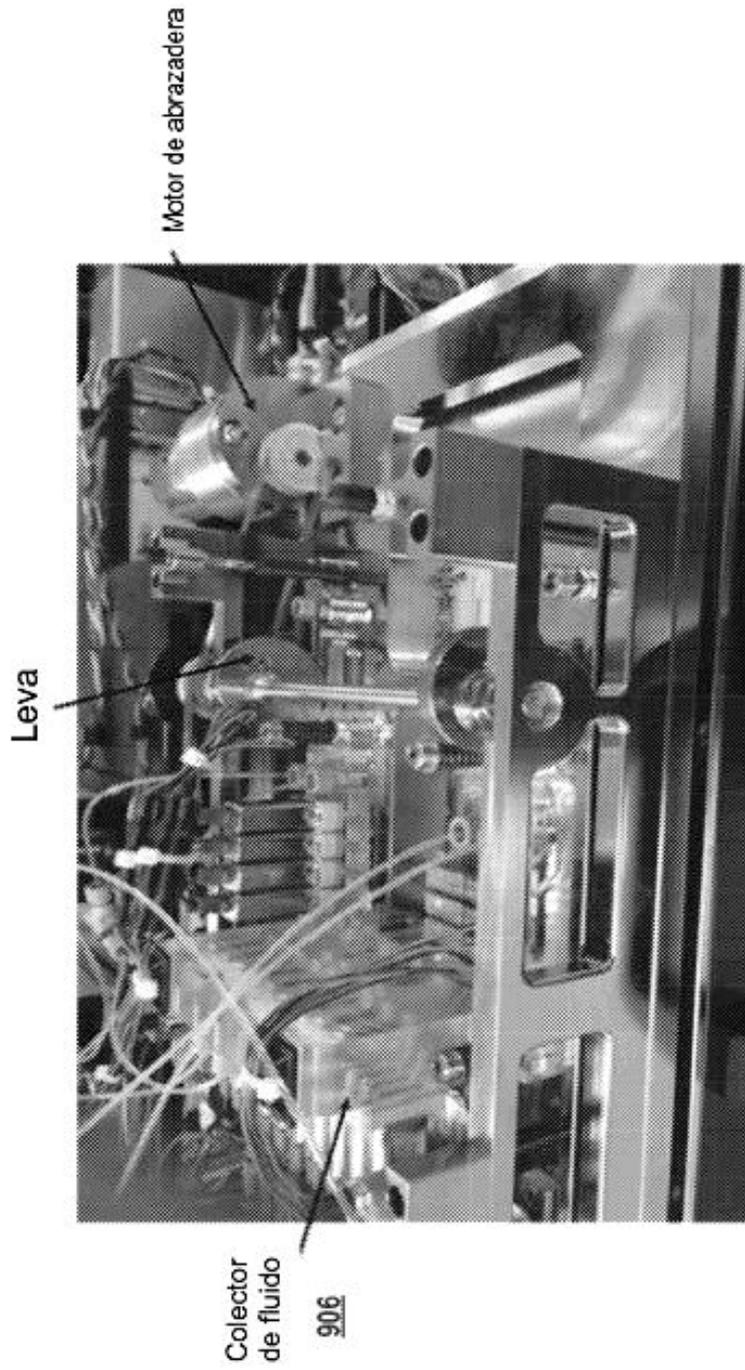


FIGURA 9B

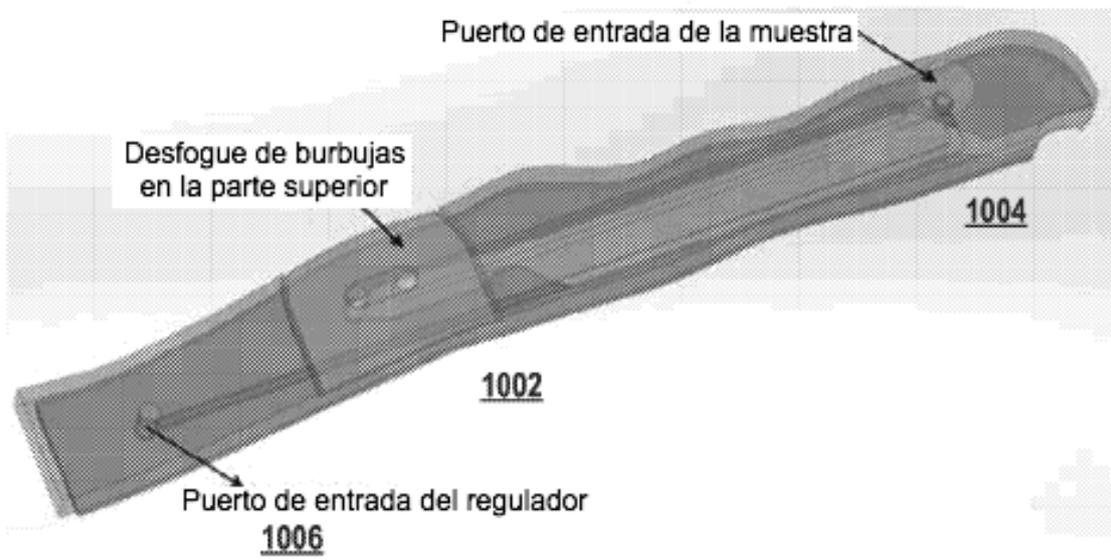


FIGURA 10

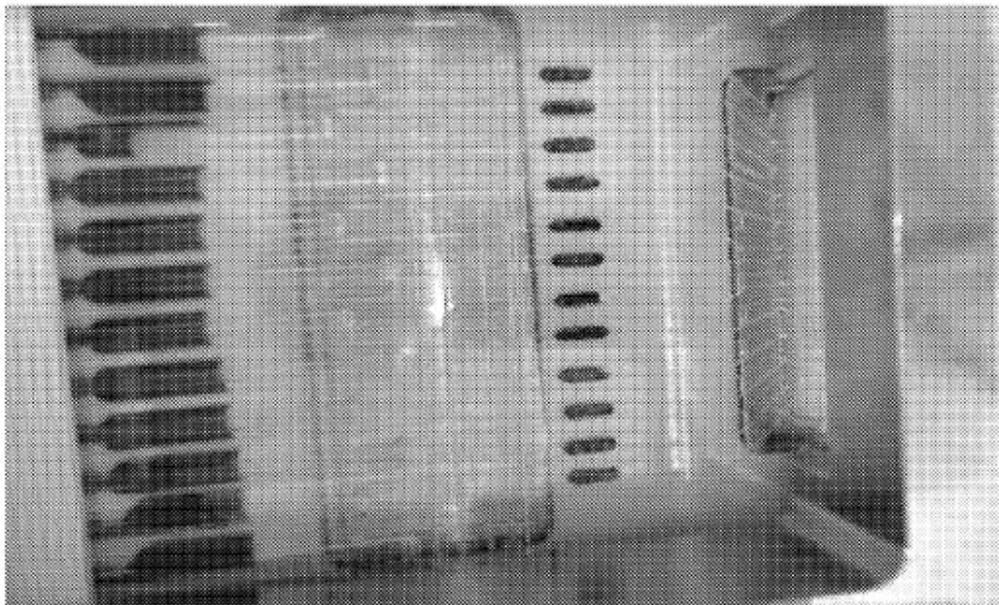
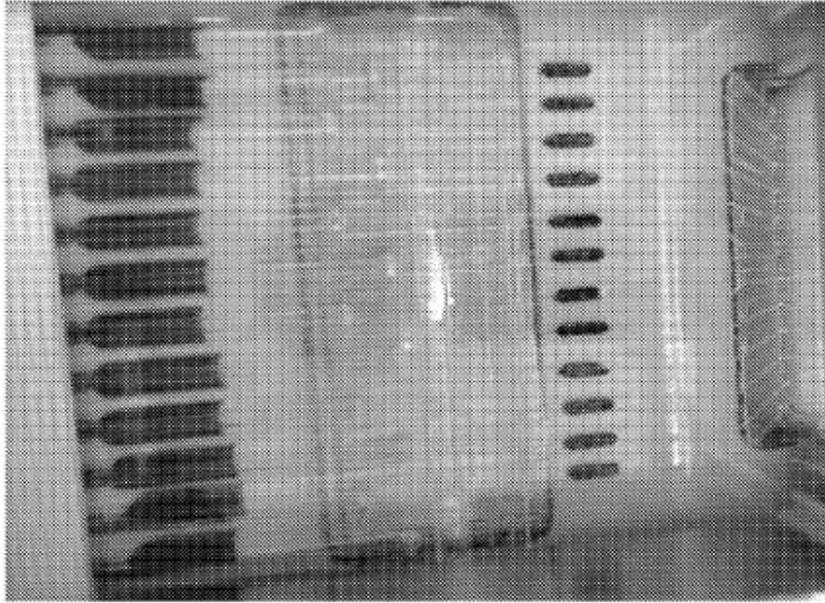


FIGURA 11

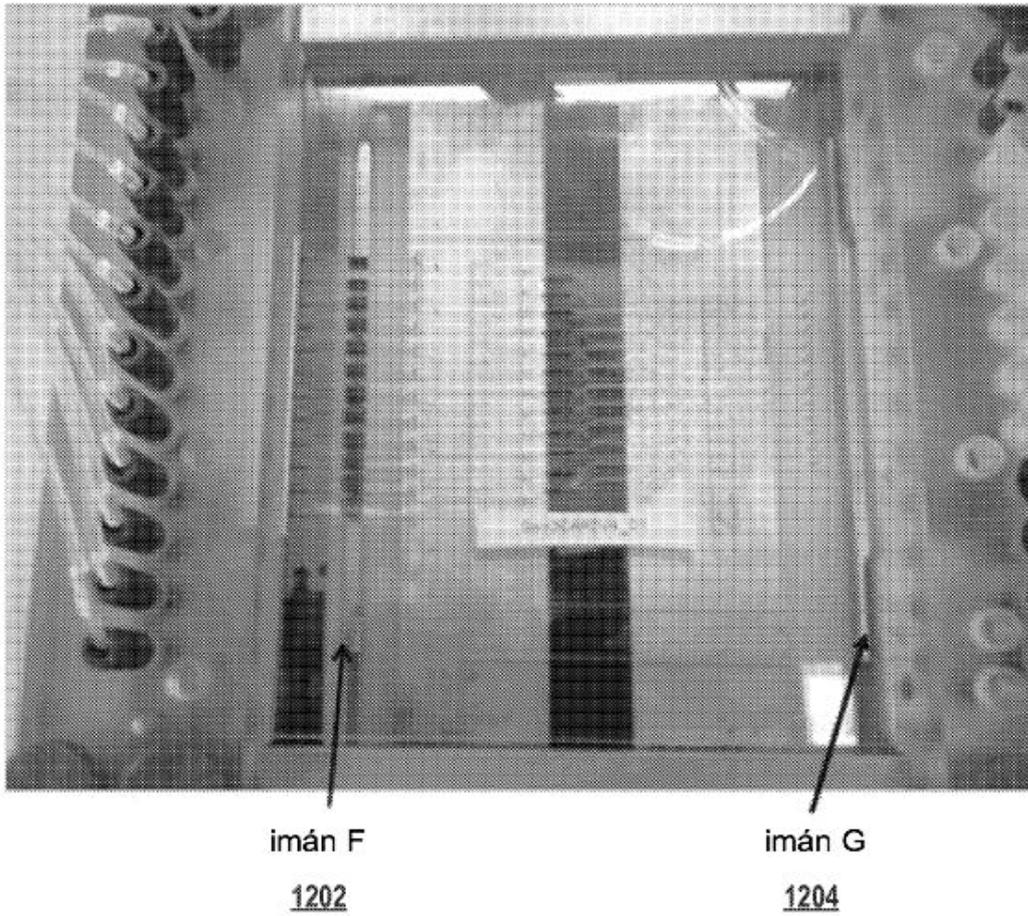
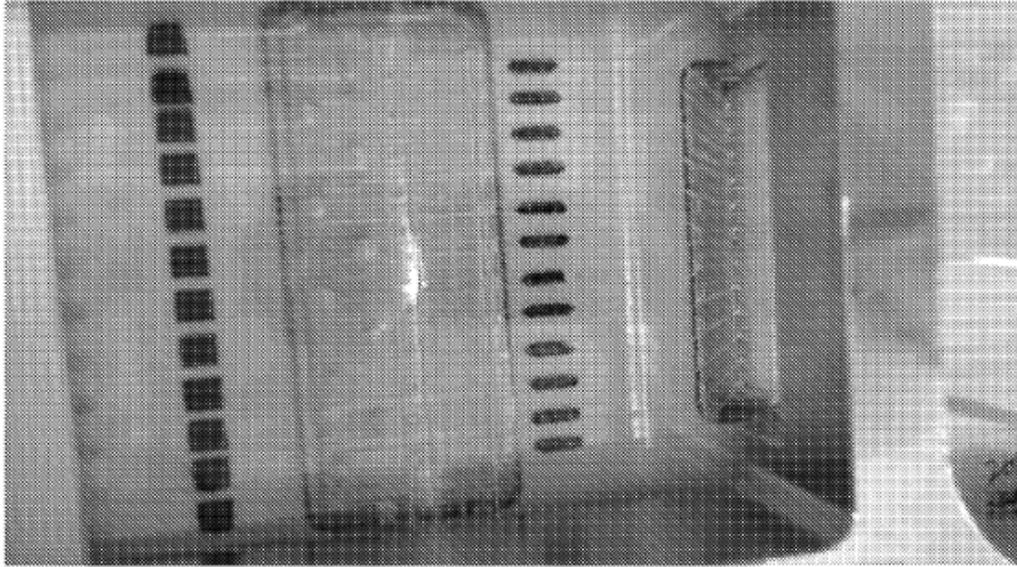
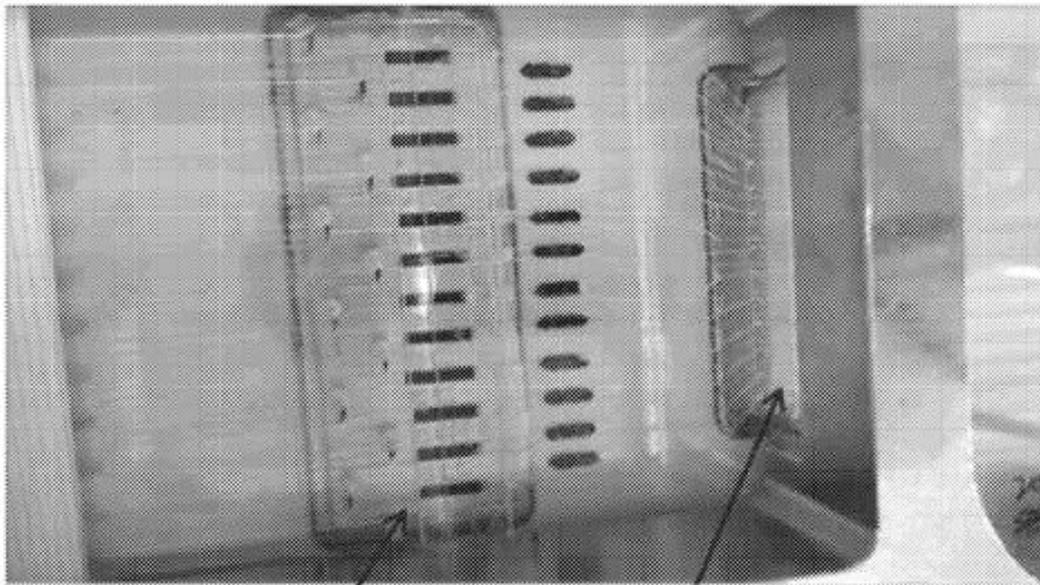
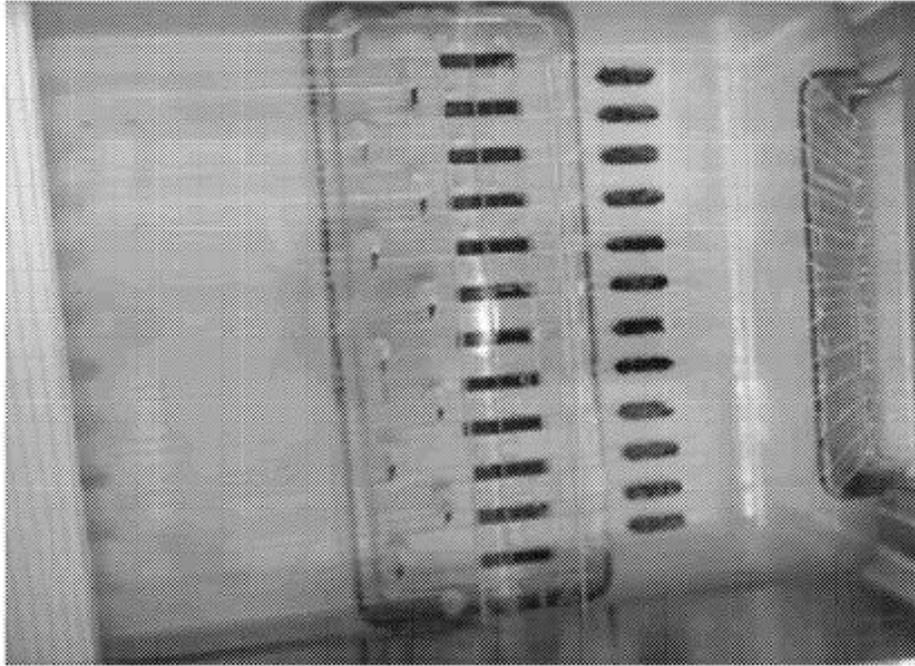


FIGURA 12



1302

FIGURA 13A



Calentador de la región F
1304

Calentador de la región G
1306

FIGURA 13B

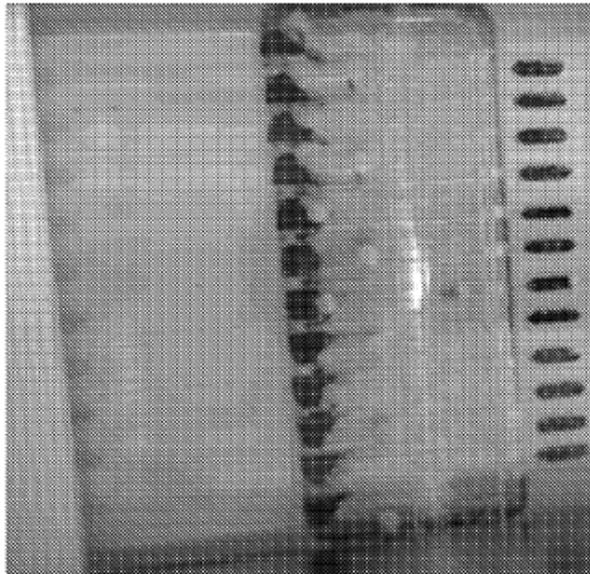
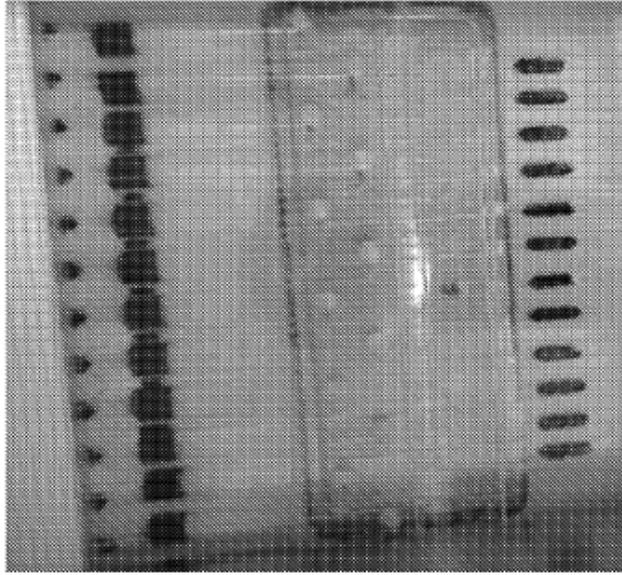
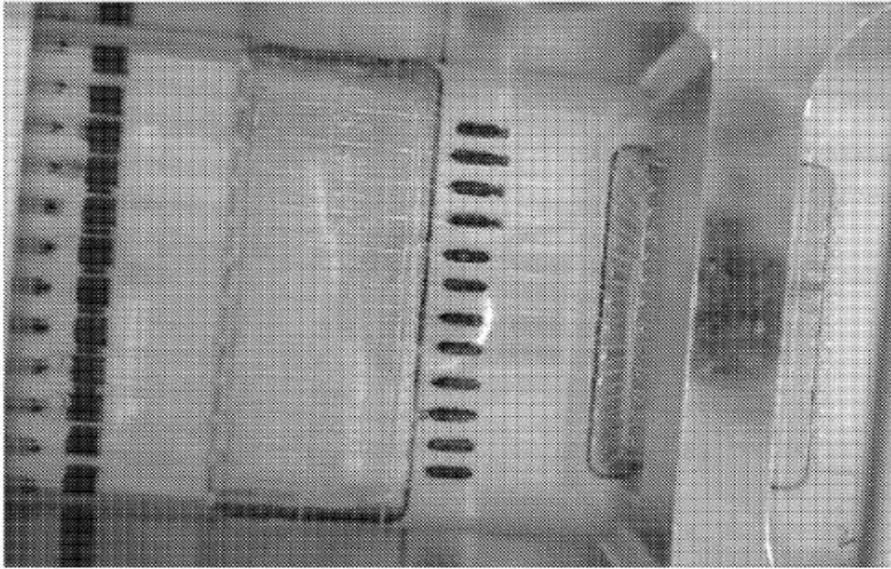
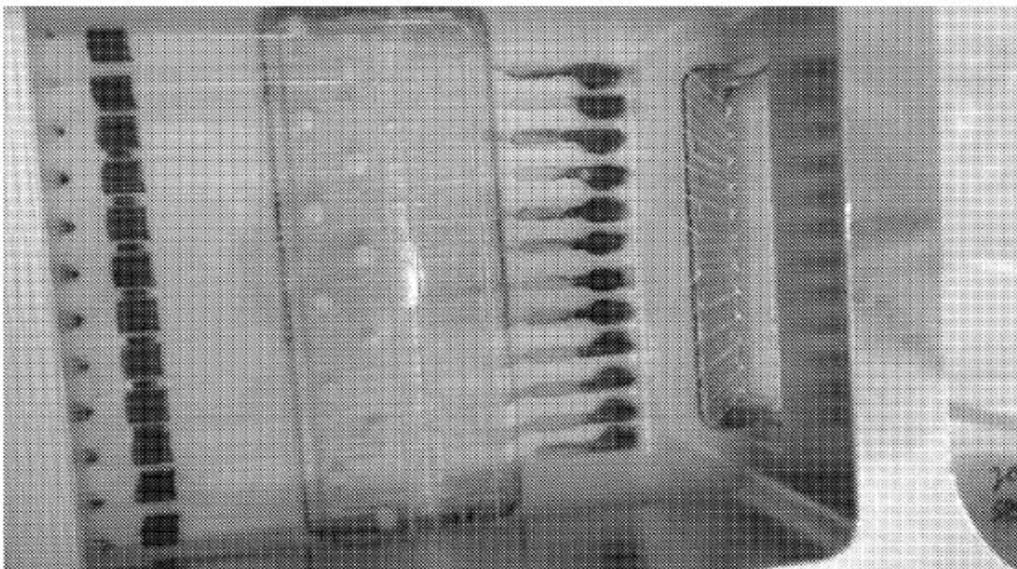


FIGURA 14

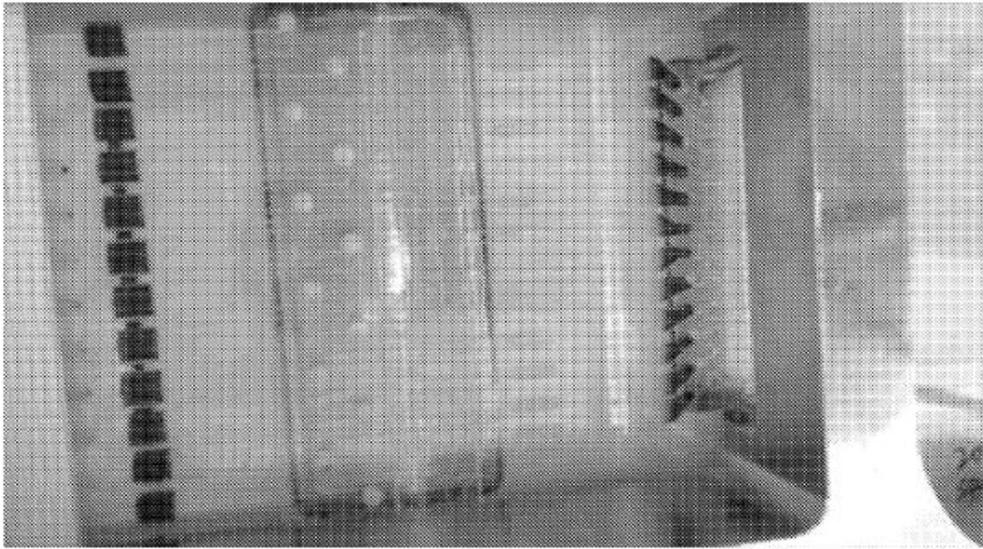


1502

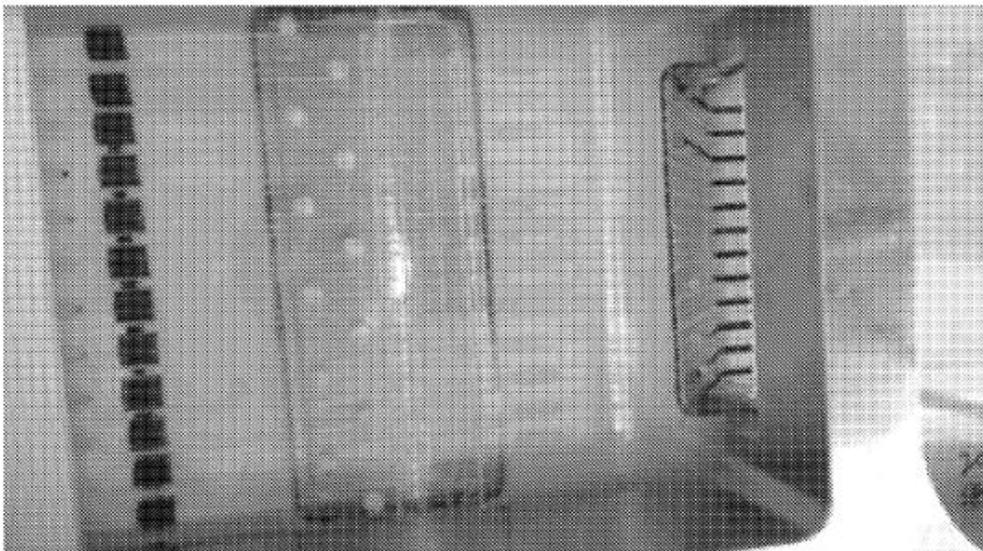


1504

FIGURA 15

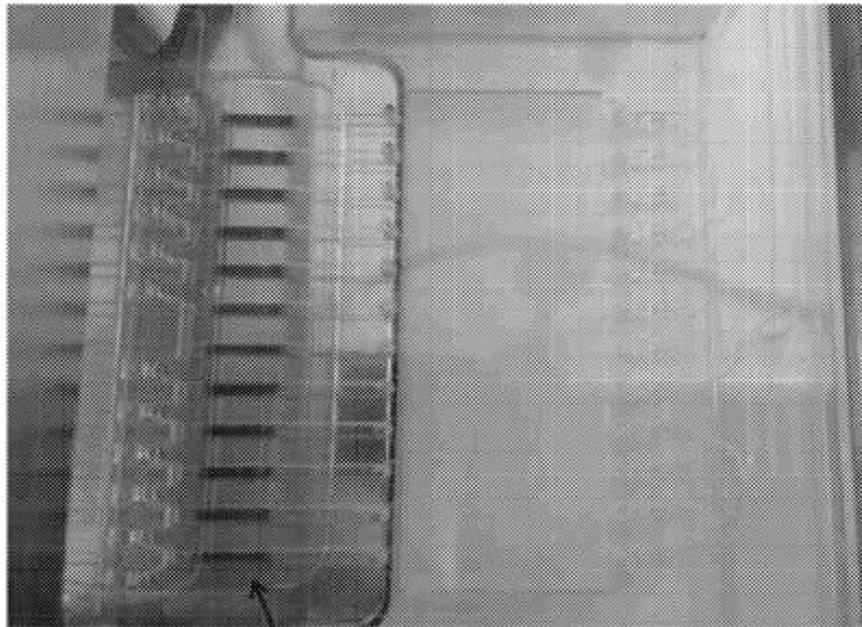
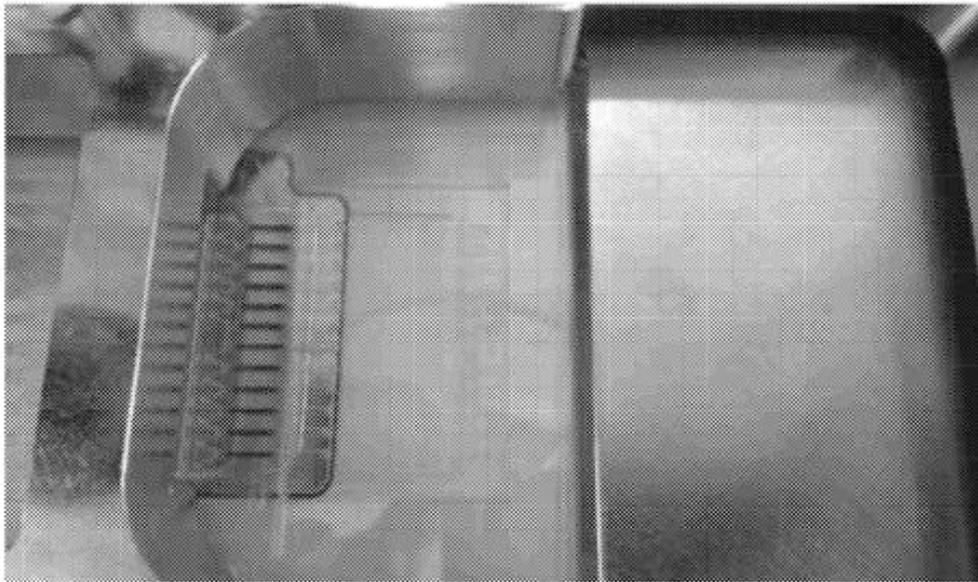


1602



1604

FIGURA 16



Calentador de la región G

1702

FIGURA 17

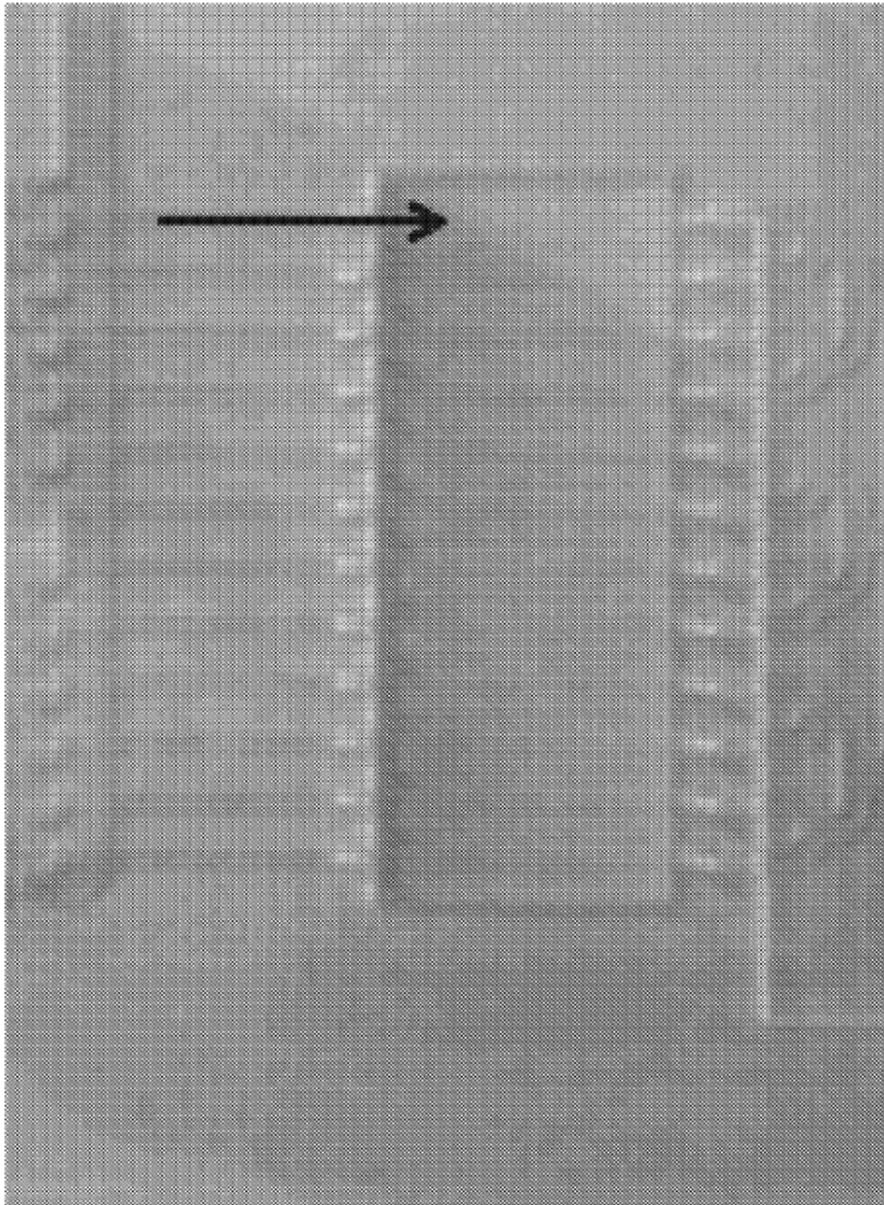


FIGURA 18

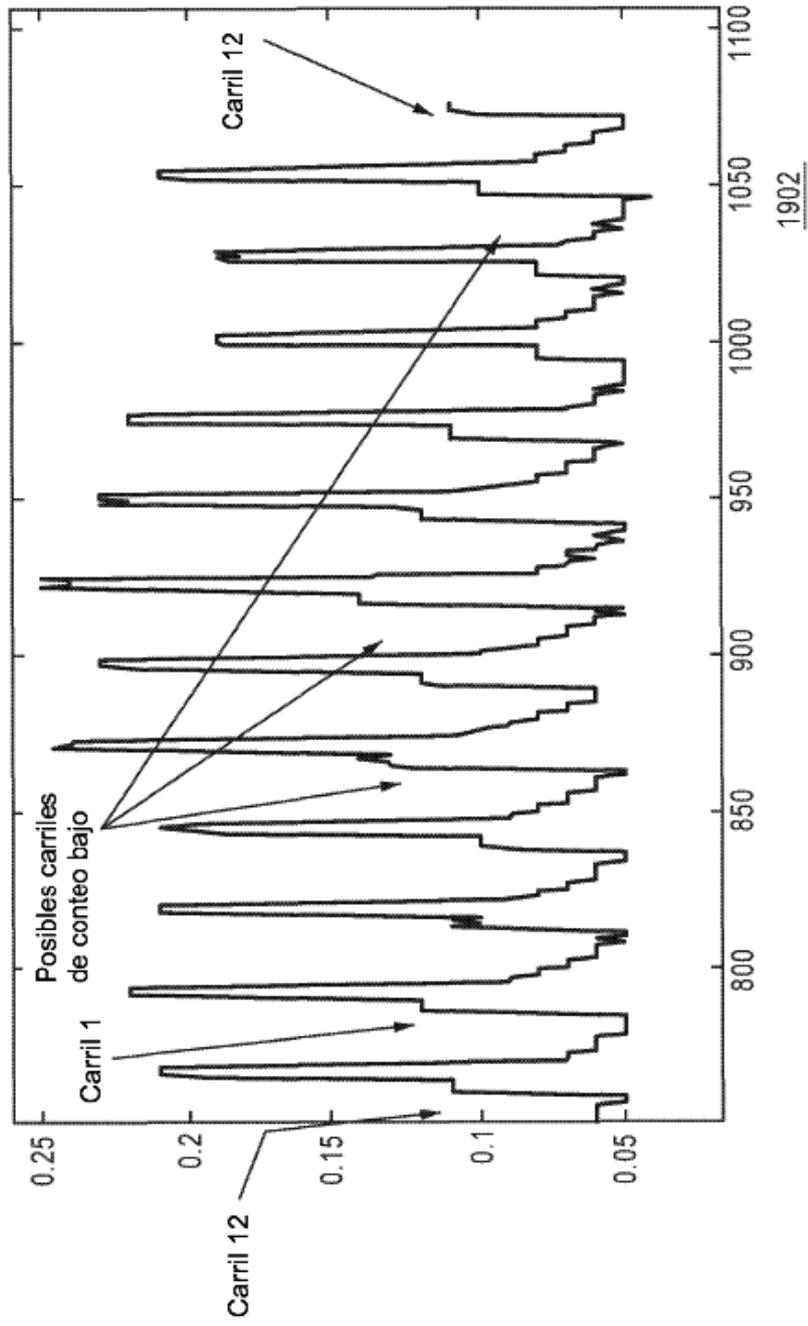
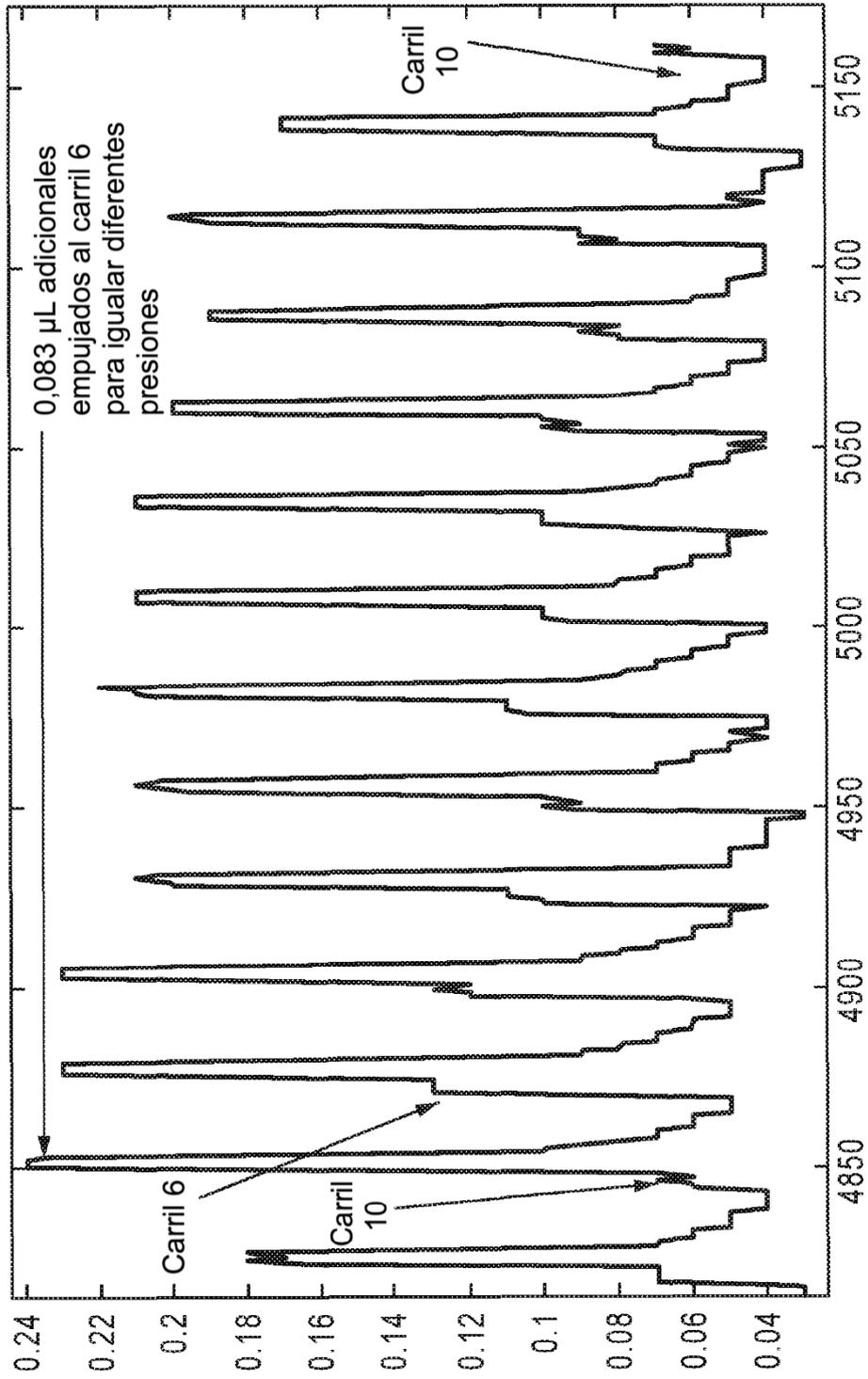
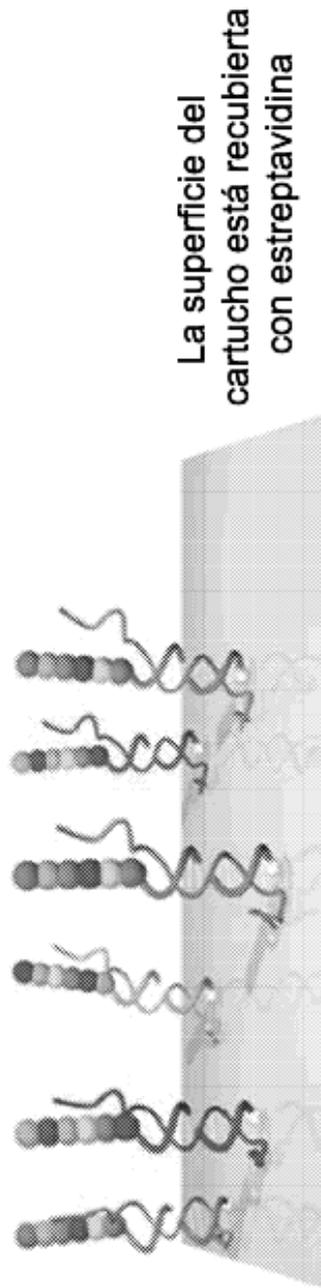


FIGURA 19A



1904

FIGURA 19B



2002

FIGURA 20

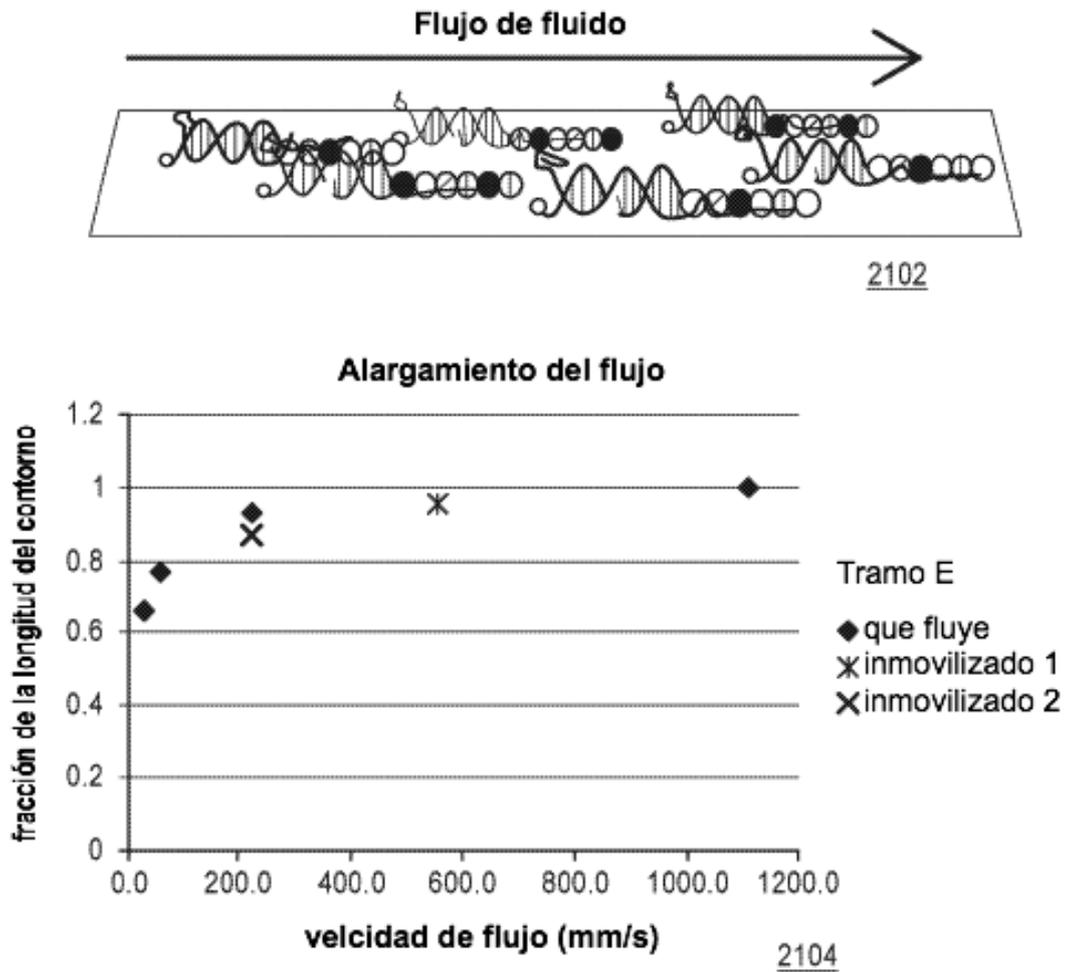


FIGURA 21

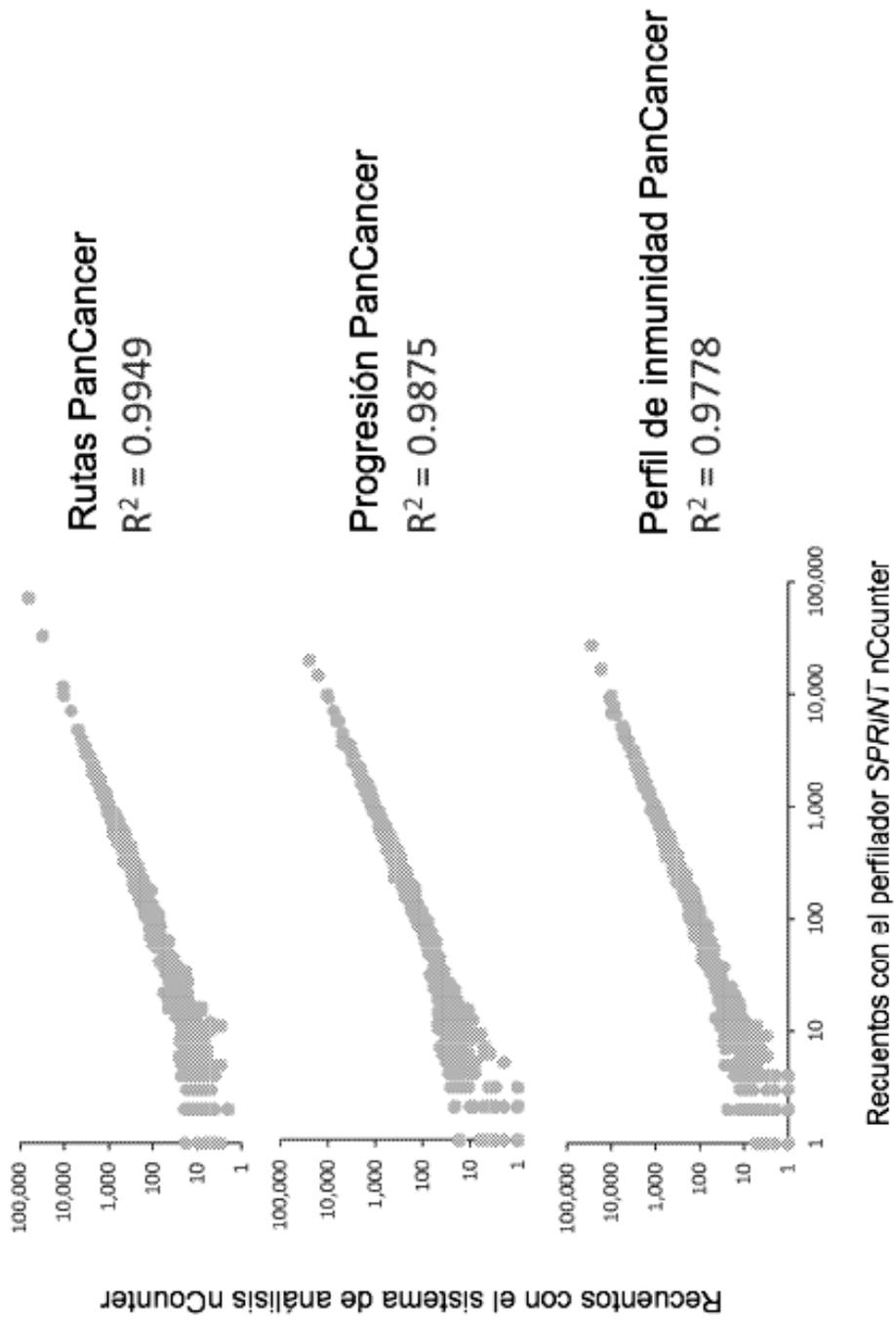


FIGURA 22

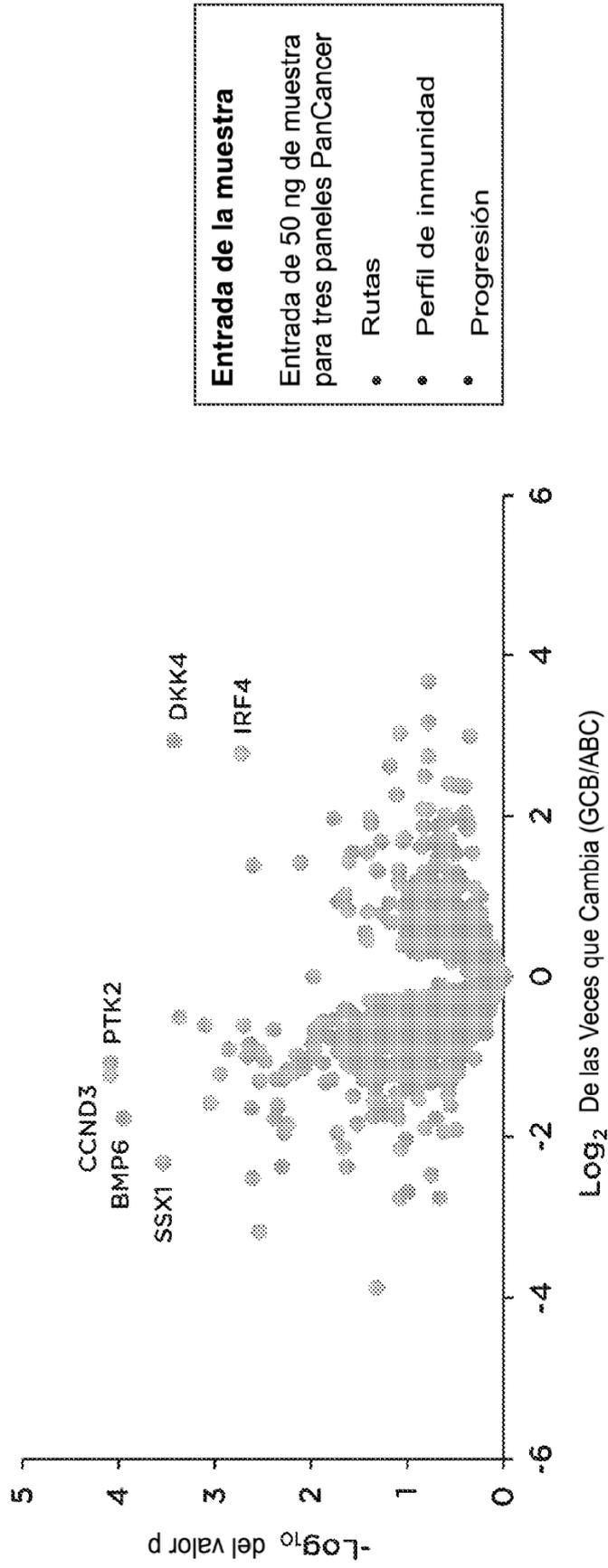


FIGURA 23

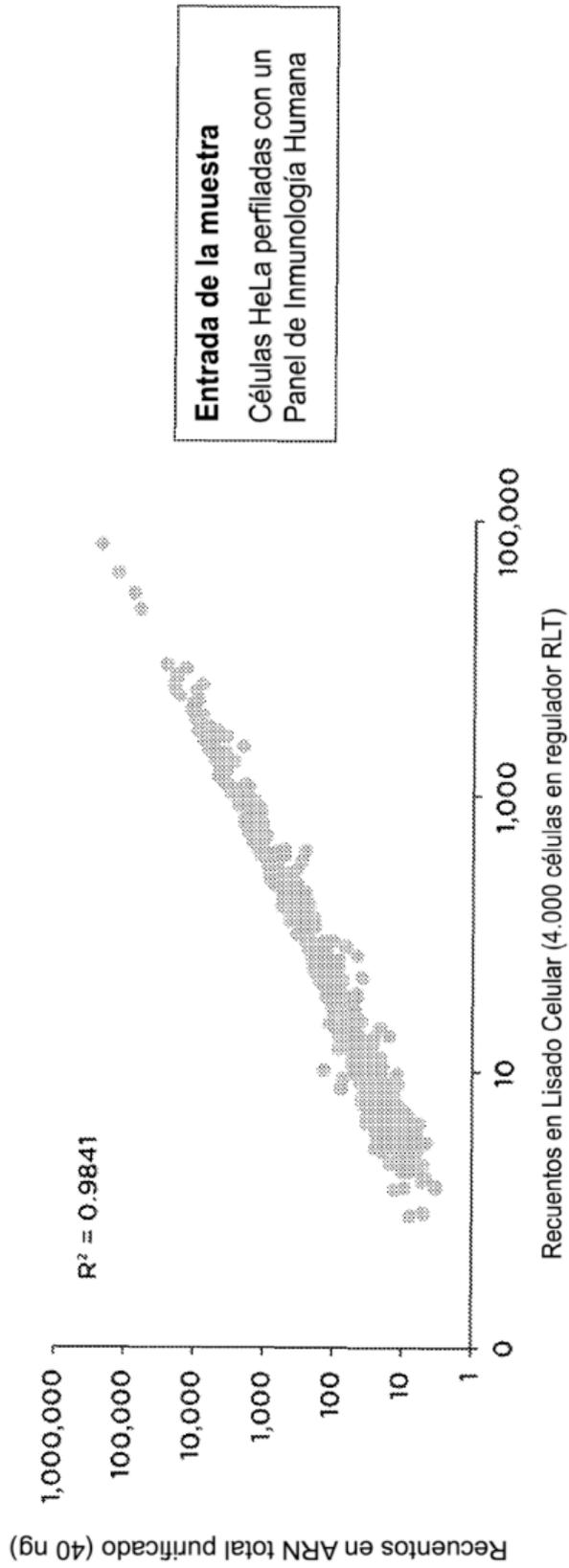


FIGURA 24

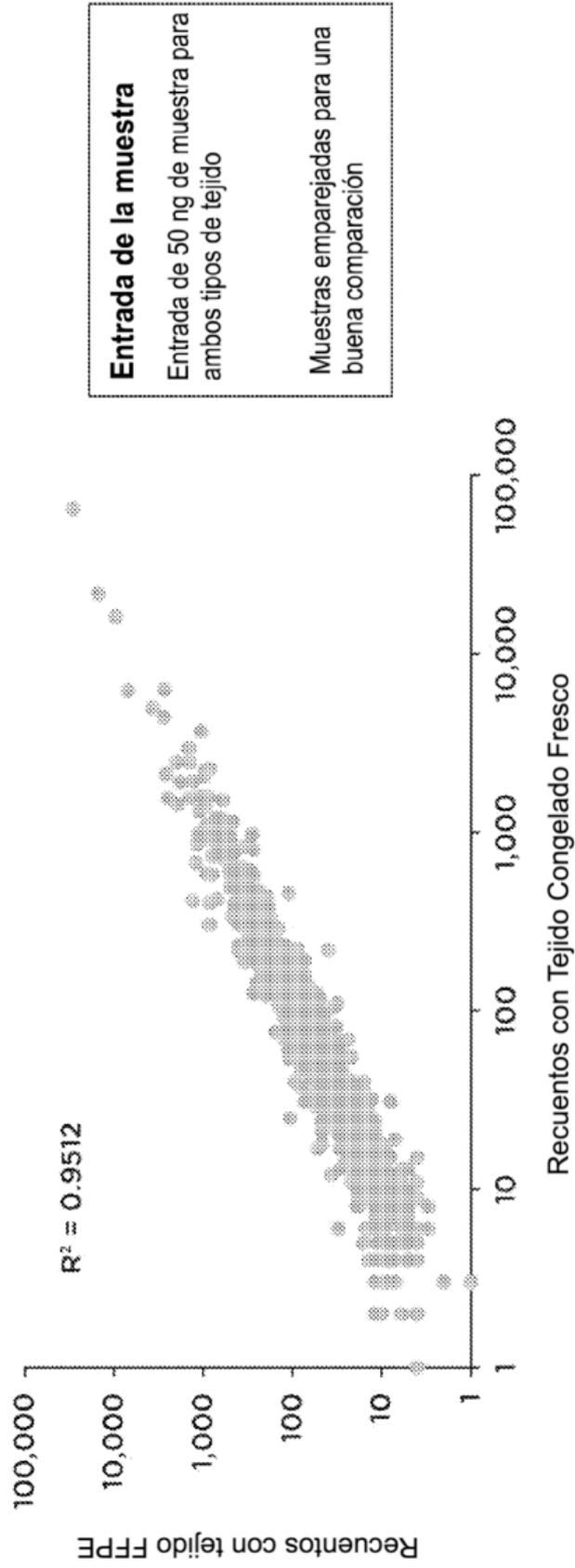


FIGURA 25

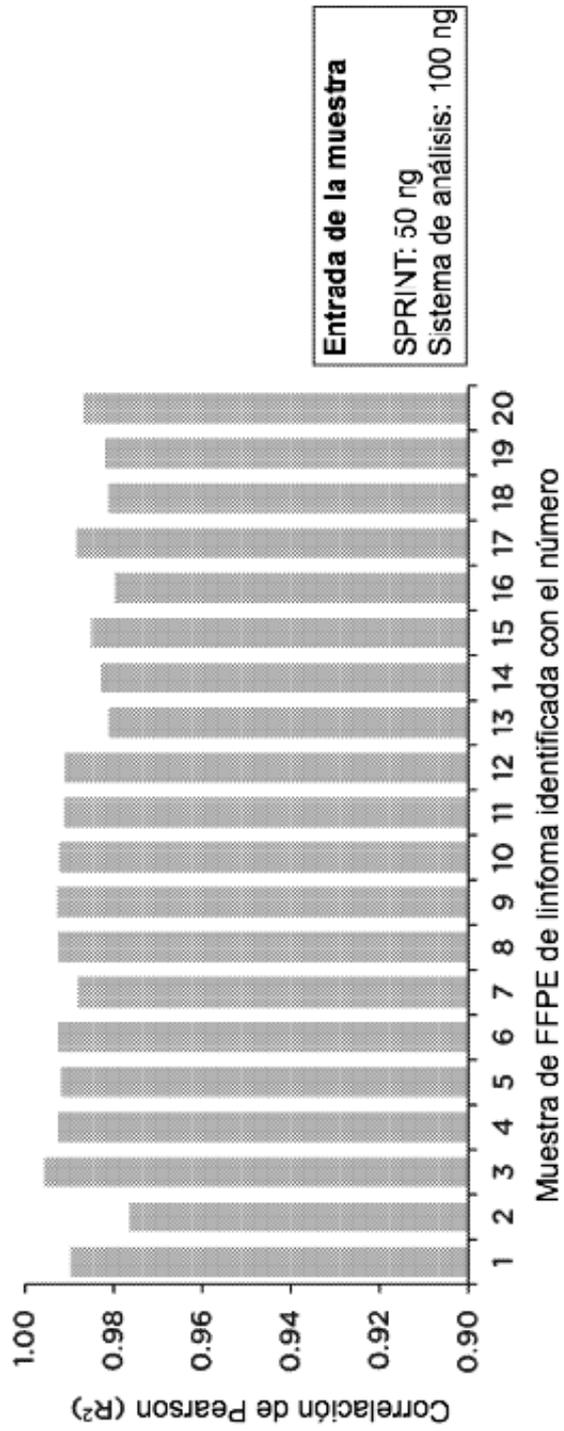


FIGURA 26

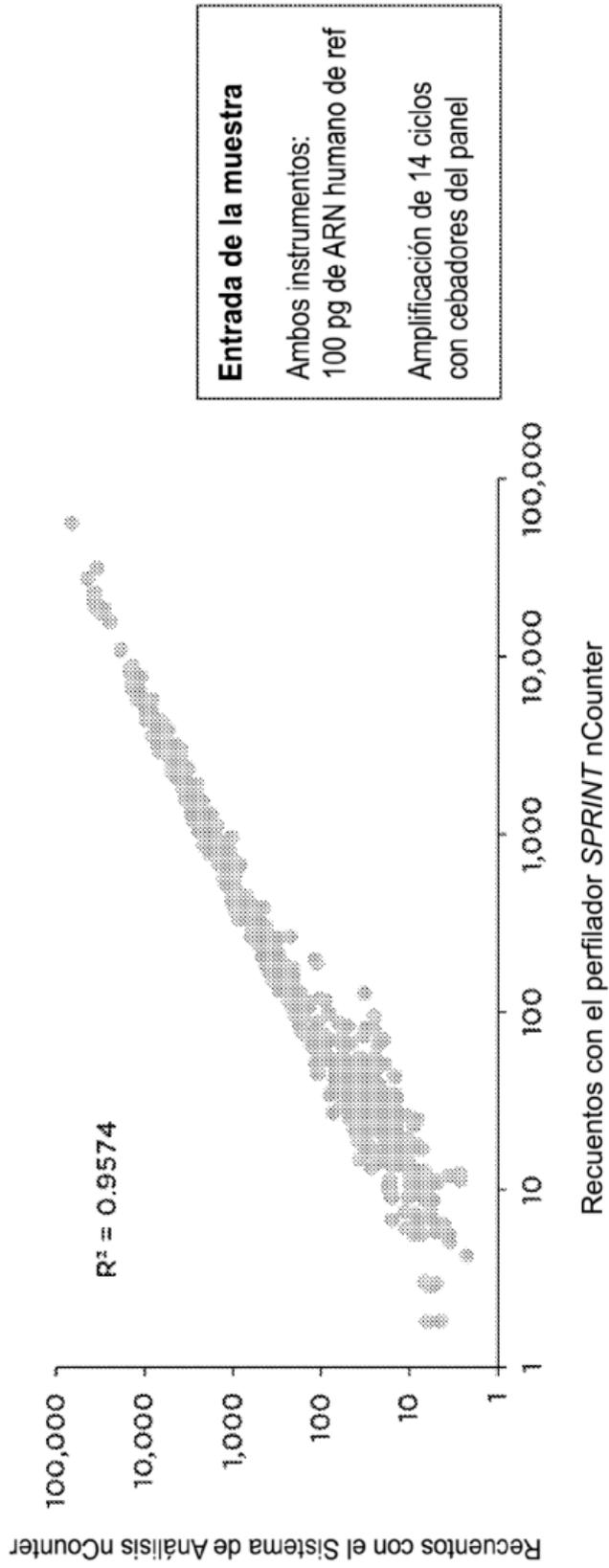


FIGURA 27

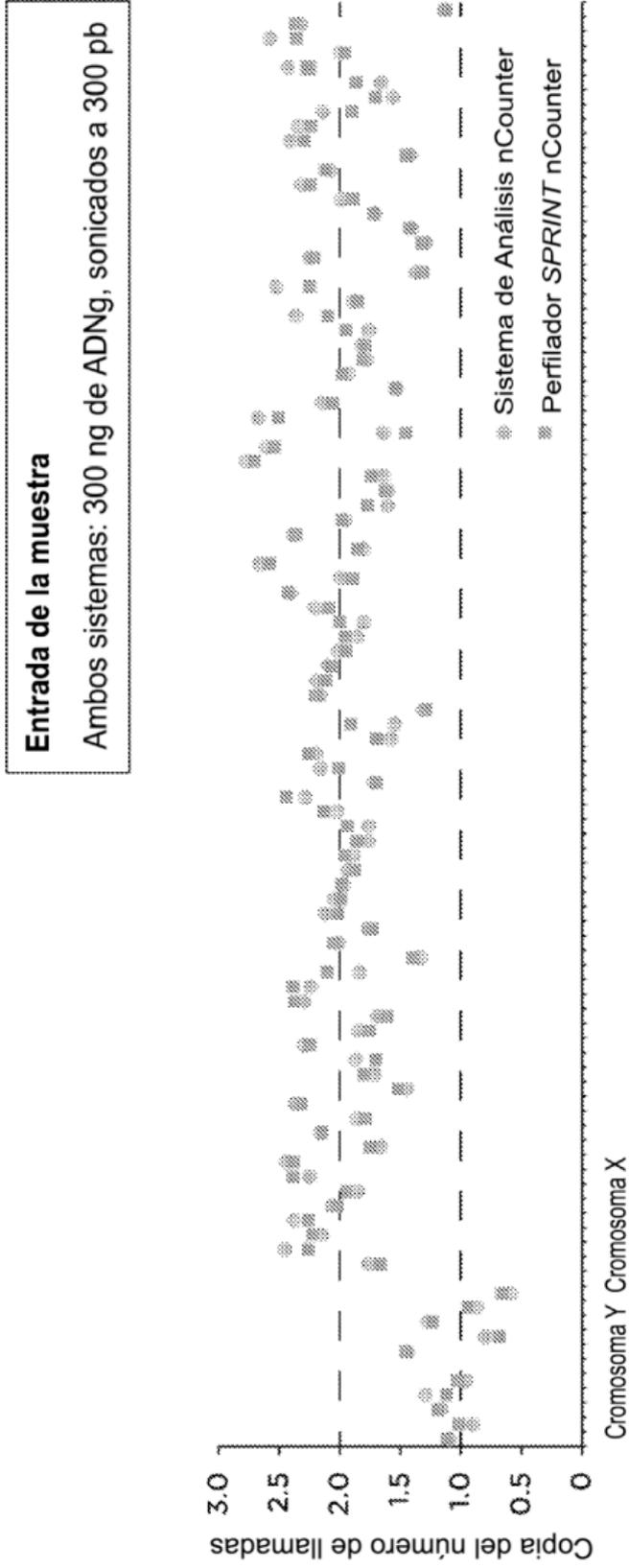


FIGURA 28

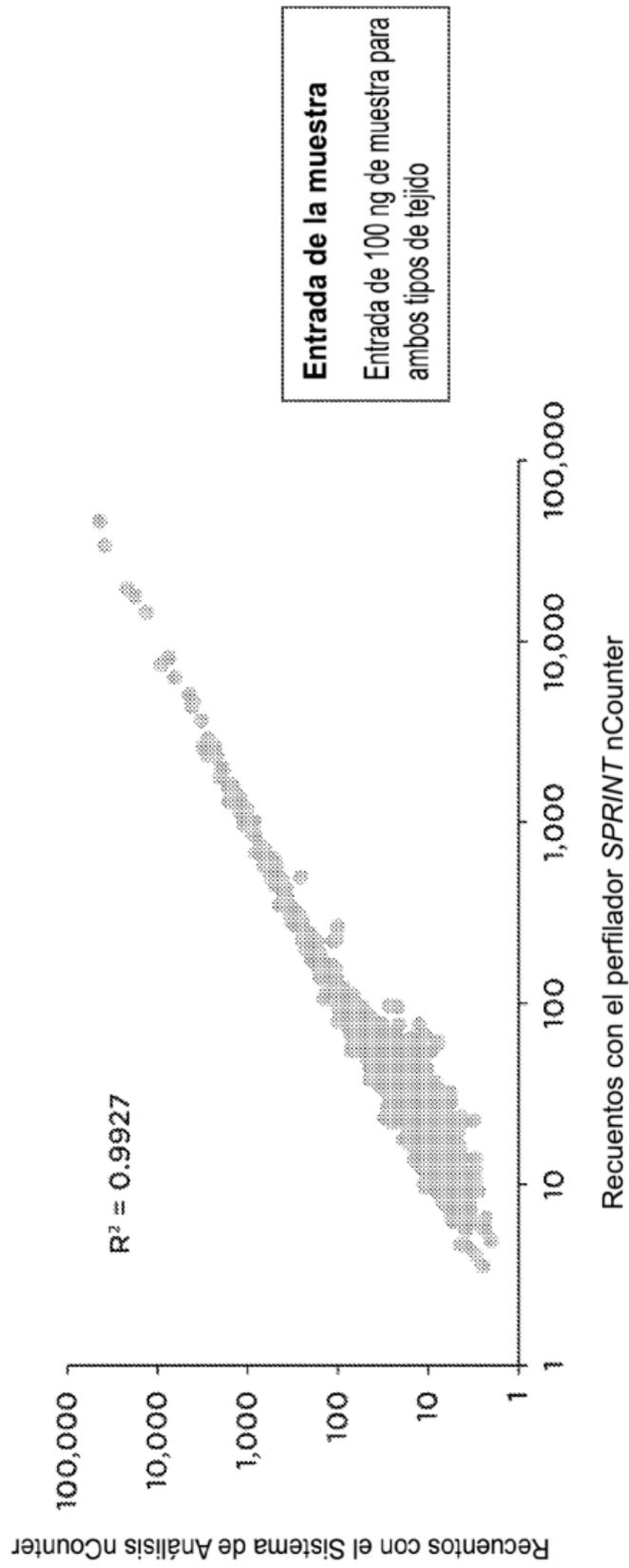


FIGURA 29

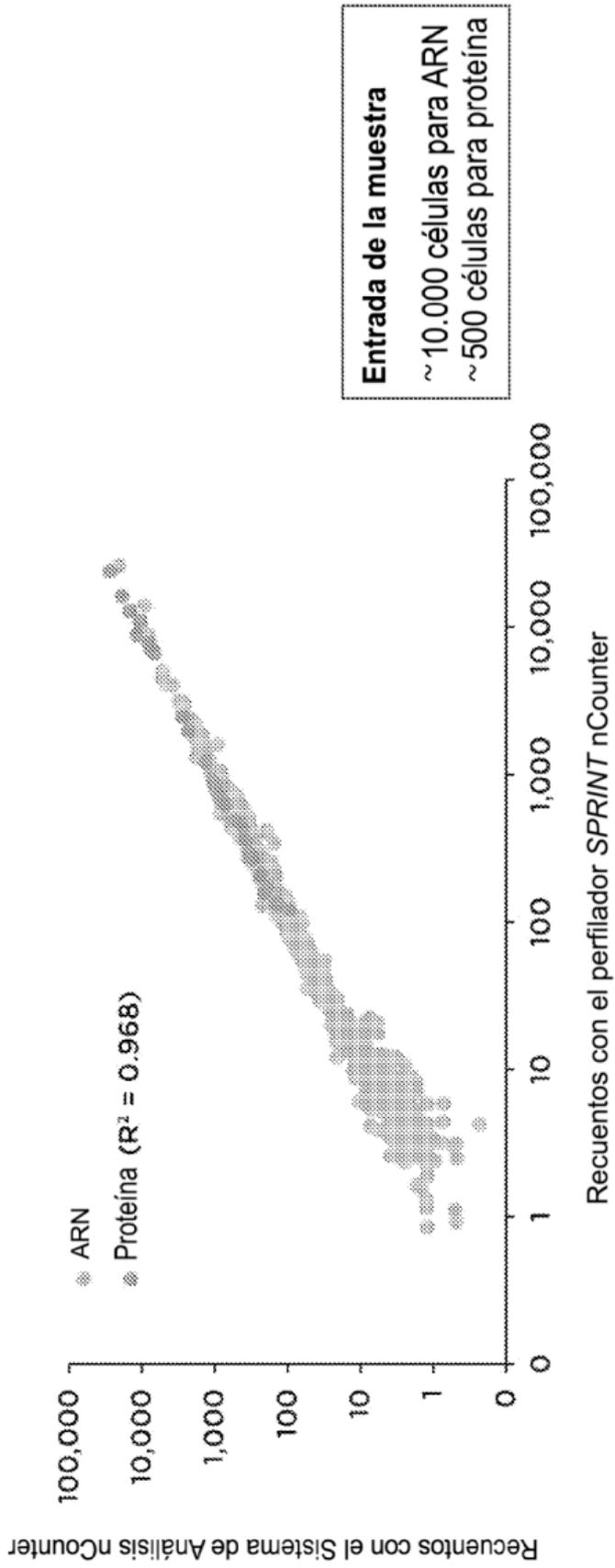


FIGURA 30