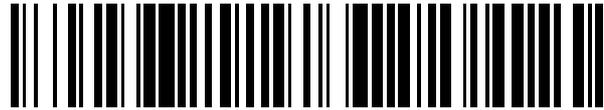


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 765**

51 Int. Cl.:

**G21K 1/00** (2006.01)

**G01N 15/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2003 E 10185539 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 2287858**

54 Título: **Sistema y procedimiento de clasificación de materiales usando orientación holográfica con láser**

30 Prioridad:

**31.07.2002 US 399386 P**

**20.12.2002 US 435541 P**

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

**28.03.2014**

73 Titular/es:

**PREMIUM GENETICS (UK) LIMITED (100.0%)  
Alpha Building, London Road  
Stapeley, Nantwich, Cheshire CW5 7JW , GB**

72 Inventor/es:

**GRUBER, LEWIS;  
BRADLEY, KENNETH;  
LOPES, WARD;  
LANCLOT, ROBERT W.;  
PLEWA, JOSEPH S. y  
GRIER, DAVID**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 451 765 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Sistema y procedimiento de clasificación de materiales usando orientación holográfica con láser

La presente invención reivindica prioridad de las solicitudes de patente provisionales estadounidenses n.º 60/399.386, presentada el 31 de julio de 2002 y n.º 60/435.541, presentada el 20 de diciembre de 2002, cuyos contenidos se incorporan en este documento como referencia.

**Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a un sistema y procedimiento de clasificación de materiales que usa orientación con láser y en particular que usa captura óptica holográfica.

En la industria estadounidense hay un gran número de necesidades de clasificación y separación no satisfechas relacionadas con materiales formados por partículas o unidades con un tamaño inferior a 50 micrómetros. Estas necesidades varían según el tipo de industria desde la determinación del tamaño de las partículas y la preparación de muestras en los campos especializados relacionados con la química y los materiales, incluyendo la fabricación de productos de nanotecnología, hasta la selección y purificación de proteínas en la industria farmacéutica y de la biotecnología. Otros ejemplos incluyen la clasificación y selección de células en el sector médico, el sector de diagnóstico y el sector de la agricultura.

La importancia de estas necesidades puede observarse analizando los gastos anuales en áreas en las que se han desarrollado soluciones especializadas o parciales, así como estimando el valor de mercado de productos clasificados/separados/purificados en áreas en las que actualmente no hay ni siquiera una solución parcial. Como un ejemplo del primer caso, la industria biotecnológica y la industria farmacéutica utilizan anualmente un elevado número de equipos y suministros para la purificación de las proteínas. Como un ejemplo del segundo caso, en el sector agrícola no existe actualmente ningún modo de seleccionar eficazmente el género de las crías de los animales de granja; sin embargo, se estima que solamente en lo que se refiere al ganado, se añadiría valor permitiendo tal selección de espermatozoides como parte del actual proceso de inseminación artificial utilizado ampliamente en la industria.

Fuera del mercado de la ganadería, el proceso de purificación de las células de los islotes del páncreas humano es actualmente un gran motivo de preocupación para los científicos médicos que desarrollan nuevos procedimientos para tratar la diabetes de tipo I. Se han hecho grandes avances en los procedimientos de trasplante de islotes, pero el problema de la purificación es uno de los escollos que aún perduran. Los procedimientos tradicionales para purificar las células de los islotes no son eficaces y dañan las células.

El trasplante de células de los islotes es importante porque, en la diabetes de tipo I, las células de los islotes presentes en el páncreas del paciente están dañadas y ya no producen insulina, que es necesaria para la supervivencia de las personas. El tratamiento actual para la diabetes de tipo I implica la inyección de insulina entre 1 y 5 veces al día. A pesar del tratamiento, la enfermedad produce a menudo complicaciones, incluyendo ceguera, problemas en el flujo sanguíneo que requieren amputación, insuficiencia renal y la muerte. Se espera que una mayor pureza y un menor número de contaminantes en las células de los islotes usadas en los trasplantes permita reducir la aparición de estas complicaciones.

De los casi un millón de enfermos que padecen actualmente diabetes de tipo I en los Estados Unidos, al menos 50.000 enfermos al año se someterían al trasplante de células de los islotes si estuviera disponible. Si el trasplante de células de los islotes se acepta a gran escala como una terapia eficaz, cabe esperar que los costes aumenten considerablemente. Este aumento sería impulsado por la dificultad de usar el tratamiento actual (las frecuentes inyecciones) y por las graves consecuencias incluso cuando se administra adecuadamente el tratamiento actual.

Por tanto, la purificación de los islotes es un serio problema que requiere una clasificación altamente selectiva de células humanas de una manera no dañina y no invasiva.

Otro problema que es necesario abordar es la purificación de células normales a partir de células cancerígenas en la médula ósea de personas que se someten a un tratamiento de radiación en todo el cuerpo para combatir del cáncer.

Otro problema adicional es la selección de células madre para investigar las causas de y para desarrollar terapias para, enfermedades como el párkinson.

Otro problema consiste en desarrollar nuevas maneras de interrogar automáticamente un gran número de células humanas y seleccionar aquellas que presentan características no receptivas al marcado fluorescente, lo que aumentaría en gran medida el alcance y la precisión de los diagnósticos médicos.

Una técnica convencional para manipular objetos microscópicos es la captura óptica. Una descripción aceptada del efecto de la captura óptica es que una luz cuidadosamente enfocada, tal como una luz enfocada por una lente de microscopio de alta apertura numérica, tiene un gradiente de intensidad pronunciado. Las trampas ópticas usan las fuerzas de gradiente de un haz de luz para atrapar una partícula en función de su constante dieléctrica.

5 "Partícula" se refiere a un material biológico o a otro material químico que incluye, sin limitarse a, oligonucleótidos, polinucleótidos, compuestos químicos, proteínas, lípidos, polisacáridos, ligandos, células, anticuerpos, antígenos, orgánulos celulares, lípidos, blastómeros, aglutinaciones de células, microorganismos, péptidos, ADNc, ARN, etc.

10 Para minimizar su energía, una partícula que tiene una constante dieléctrica mayor que el medio circundante se moverá hacia la región de una trampa óptica que tiene el campo eléctrico más elevado. Partículas con al menos un ligero diferencial de constante dieléctrica con su entorno son sensibles a este gradiente y son atraídas hacia o repelidas desde el punto de mayor intensidad de luz, es decir, hacia o desde el punto focal del haz de luz. Para construir una trampa óptica se utilizan fuerzas de gradiente óptico de un único haz de luz para manipular la posición de una partícula dieléctrica sumergida en un medio fluido con un índice de refracción menor que el de la partícula, pero también pueden manipularse partículas reflectantes, absorbentes y con una baja constante dieléctrica.

15 La fuerza de gradiente óptico en una trampa óptica compite con la presión de radiación que tiende a desplazar la partícula atrapada a lo largo del eje del haz. Una trampa óptica puede estar ubicada en cualquier sitio dentro del volumen focal de una lente de objetivo seleccionando de manera apropiada la dirección de propagación del haz de entrada y el grado de colimación. Un haz colimado que entra en la apertura trasera de una lente de objetivo queda enfocado en el centro del plano focal de la lente mientras que otro haz que entra en un ángulo queda desenfocado. Un haz ligeramente divergente se enfoca aguas abajo del plano focal mientras que un haz convergente se enfoca aguas arriba.

20 Cada uno de los múltiples haces que entran simultáneamente en la pupila de entrada de la lente forma una trampa óptica en el volumen focal en una ubicación determinada por su ángulo de incidencia. La técnica de captura óptica holográfica usa un elemento óptico difracting modificador de fase para imponer el patrón de fase para múltiples haces en el frente de onda de un único haz de entrada, transformando de ese modo el único haz en múltiples trampas.

25 Se prefiere la modulación de fase de un haz de entrada para crear trampas ópticas, ya que la captura se basa en las intensidades de los haces y no en sus fases relativas. Las modulaciones de amplitud pueden desviar la luz alejándola de las trampas y disminuir su eficacia.

30 Cuando una partícula es atrapada ópticamente, las fuerzas de gradiente óptico ejercidas por la trampa superan otras presiones de radiación que surgen debido a la dispersión y la absorción. Para un haz de láser de entrada TEM<sub>00</sub> gaussiano, esto significa normalmente que el diámetro del haz debería coincidir sustancialmente con el diámetro de la pupila de entrada. Una apertura numérica mínima preferida para formar una trampa está comprendida entre 0,9 aproximadamente y 1,0 aproximadamente.

35 Una dificultad a la hora de implementar la tecnología de captura óptica es que cada trampa que va a generarse requiere generalmente su propio haz de luz enfocado. Muchos sistemas de interés requieren múltiples trampas ópticas y varios procedimientos se han desarrollado para conseguir configuraciones de múltiples trampas. Un procedimiento existente usa un único haz de luz que se dirige entre ubicaciones de múltiples trampas para "compartir en el tiempo" el haz entre varias trampas. Sin embargo, a medida que aumenta el número de trampas, los intervalos durante los que cada trampa está en su estado "inactivo" pueden resultar largos para que las partículas se difuminen desde la ubicación de la trampa antes de que la trampa vuelva a activarse. Todos estos problemas han limitado las implementaciones de este procedimiento a menos de 10 trampas aproximadamente en cada sistema.

40 Otro procedimiento tradicional de creación de sistemas con múltiples trampas se basa en hacer pasar simultáneamente múltiples haces de luz a través de una única lente de alta apertura numérica. Esto se realiza o bien usando múltiples láseres o bien usando uno o más divisores de haz en el haz de un único láser. Un problema de esta técnica es que a medida que aumenta el número de trampas, el sistema óptico se vuelve cada vez más complejo. Debido a estos problemas, las implementaciones conocidas de este procedimiento están limitadas a menos de 5 trampas aproximadamente en cada sistema.

45 En un tercer enfoque para conseguir un sistema con múltiples trampas, un elemento óptico difracting (DOE) (por ejemplo, un holograma de desplazamiento de fase que utiliza una geometría de transmisión o una geometría de reflexión) se usa para alterar el frente de onda de un único haz de láser. Esta invención se da a conocer en la patente estadounidense n.º 6.055.106 a nombre de Grier y cols. El frente de onda se altera de manera que el haz de láser aguas abajo se convierte esencialmente en un gran número de haces de láser individuales con posiciones y direcciones de desplazamiento relativas fijadas por la naturaleza exacta del elemento óptico difracting. En

efecto, la transformada de Fourier del DOE produce un conjunto de picos de intensidad, cada uno de los cuales actúa como una trampa individual o "pinza".

Algunas implementaciones del tercer enfoque han usado un holograma de transmisión fijo para crear entre 16 y 400 centros de captura individuales.

5 Se ha usado un holograma fijo para demostrar el principio de la captura óptica holográfica pero usando una retícula de cristal líquido como la "fabricación" permitida de holograma de un holograma diferente para cada nueva distribución de trampas. La modulación de fase que varía espacialmente impuesta en el láser de captura por la retícula de cristal líquido puede controlarse fácilmente en tiempo real por un ordenador, permitiendo de este modo diversas manipulaciones dinámicas.

10 Otros tipos de trampas que pueden usarse para atrapar partículas de manera óptica incluyen, pero sin limitarse a, vórtices ópticos, botellas ópticas, rotadores ópticos y jaulas de luz. Un vórtice óptico produce un gradiente que rodea a un área de campo eléctrico cero que es útil para manipular partículas con constantes dieléctricas menores que el medio circundante o que son reflectantes, u otro tipo de partículas que son repelidas por una trampa óptica. Para minimizar su energía, este tipo de partícula se moverá hacia la región que tenga el campo eléctrico más bajo, concretamente el área de campo eléctrico cero en el punto focal de un haz de láser con la forma apropiada. El vórtice óptico proporciona un área de campo eléctrico cero muy parecido al orificio de una cámara de vacío toroidal (toroide). El gradiente óptico es radial con el campo eléctrico más alto en la circunferencia de la cámara de vacío toroidal. El vórtice óptico detiene a una pequeña partícula dentro del orificio de la cámara de vacío toroidal. La detención se consigue deslizando el vórtice sobre la pequeña partícula a lo largo de la línea de campo eléctrico cero.

La botella óptica difiere de un vórtice óptico porque solo tiene un campo eléctrico cero en el foco y un campo eléctrico distinto de cero en todas las demás direcciones que rodean al foco, al final del vórtice. Una botella óptica puede ser útil para atrapar átomos y nanoagrupaciones que puedan ser muy pequeños o muy absorbentes para ser atrapados con un vórtice óptico o con pinzas ópticas. (Véase el documento "*Generation of a beam with a dark focus surrounded by regions of higher intensity: The optical bottle beam*", de J. Arit y M. J. Padgett, Opt. Lett. 25, 191 a 193, 2000). La jaula de luz (patente estadounidense n.º 5.939.716) es, en términos generales, un concepto macroscópico similar al vórtice óptico. Una jaula de luz forma un anillo promediado en el tiempo de trampas ópticas para rodear a una partícula que es demasiado grande o reflectante para ser atrapada con constantes dieléctricas inferiores a la del medio circundante.

30 Cuando el haz de láser es dirigido a través de o reflejado desde el elemento óptico de modelado de fase, el elemento óptico de modelado de fase produce una pluralidad de pequeños haces que tienen un perfil de fase alterado. Dependiendo del número y tipo de trampas ópticas deseadas, la alteración puede incluir difracción, conformación de frente de onda, desplazamiento de fase, orientación, divergencia y convergencia. En función del perfil de fase elegido, el elemento óptico de modelado de fase puede usarse para generar trampas ópticas en forma de trampas ópticas, vórtices ópticos, botellas ópticas, rotadores ópticos, jaulas de luz y combinaciones de dos o más de estas formas.

Con respecto a la manipulación de materiales, se ha demostrado la manipulación de virus y bacterias con pinzas además de la manipulación de esferas dieléctricas con pinzas. Además de procarionas y virus, se ha manipulado con pinzas de manera satisfactoria una gran variedad de protistas, tales como la *Tetrahymena thermophila*. Además, se han atrapado y manipulado células somáticas tales como leucocitos y células epiteliales de la mejilla, así como células de línea germinal tales como espermatozoides.

Los investigadores han buscado procedimientos indirectos para manipular células, tales como capturar células con micropartículas de diamante y después manipular con pinzas las partículas de diamante. La manipulación de células ha incluido la orientación de las células para su análisis microscópico así como estirar las células. Las células de tejidos también se han ordenado con pinzas in vitro en la misma distribución espacial que en vivo.

Además de las propias células, se han usado pinzas ópticas para manipular orgánulos celulares, tales como vesículas transportadas a lo largo de microconductos, cromosomas o ADN globular. También se han introducido objetos en células usando pinzas ópticas.

Varios procesos de clasificación con fines biológicos son también posibles usando pinzas ópticas. Ya se ha demostrado la clasificación de células usando la captura óptica tradicional para ensayos y la recogida y clasificación de cromosomas para crear bibliotecas. También se han desarrollado ensayos con células para determinar el uso de drogas.

Por consiguiente, como un ejemplo de nuevos tipos de clasificación usando trampas ópticas orientadas con láser, se necesita un procedimiento de clasificación de células que use una técnica que aisle células valiosas con

respecto a otras células, tejidos y contaminantes. Además, se necesita una manera de conseguir una contribución única de la captura óptica a las necesidades industriales más importantes de clasificación y purificación (de células). Además, existe la necesidad de separar los espermatozoides en el mercado de la ganadería.

**Sumario de la invención**

5 La presente invención se refiere a un sistema y procedimiento de clasificación de materiales que usa orientación con láser y en particular, que usa captura óptica holográfica.

La presente invención proporciona un aparato de clasificación de partículas que comprende una celda de flujo que presenta un canal de entrada de fluido (300) para introducir una muestra de partículas en un flujo laminar; dos canales de salida (302, 303) dispuestos a ambos lados de dicho canal de entrada de fluido (301), siendo  
 10 adecuados cada uno de dichos dos canales de salida (302, 303) para hacer fluir a través de los mismos una disolución amortiguadora y siendo adecuados cada uno de dichos dos canales de salida (302, 303) para introducir dicha disolución amortiguadora en dichos dos canales de salida (302, 303) a caudales que mantienen un flujo laminar con dicho flujo laminar en dicho canal de entrada de fluido (301); una región de clasificación que no tiene ninguna separación mecánica entre dicho canal de entrada de fluido (301) y dichos dos canales de salida (302,  
 15 303) y que tiene dichos flujos laminares en la misma; un sistema de captura óptica configurado para producir una formación en embudo de trampas ópticas (305) en dicho canal de entrada de fluido cerca de dicha región de clasificación, estando configuradas dichas trampas ópticas (305) para atrapar dichas partículas en dicho canal de entrada de fluido (301) y para separar dichas partículas en la región de clasificación; en el que dicho sistema de captura óptica incluye una lente de objetivo de alta apertura numérica (304) configurada para implementar dicha  
 20 formación en embudo de trampas ópticas (305); y un sistema de detección configurado para detectar dichas partículas atrapadas para determinar las partículas que van a separarse en dicha región de clasificación.

En la presente invención se usa captura óptica, que es una tecnología que se ha usado como una herramienta para manipular objetos microscópicos. Una descripción aceptada del efecto es que luz cuidadosamente enfocada, tal como la luz enfocada por una lente de microscopio de alta apertura numérica, tiene un gradiente de intensidad  
 25 pronunciado. Las trampas ópticas usan las fuerzas de gradiente de un haz de luz para atrapar partículas en función de su constante dieléctrica. Para minimizar su energía, una partícula que tiene una constante dieléctrica mayor que el medio circundante se moverá hacia la región de una trampa óptica que tiene el campo eléctrico más elevado.

La captura óptica de la presente invención se usa para tratar la clasificación y la purificación de células de varias  
 30 maneras. Por ejemplo, las fuerzas ejercidas por las trampas ópticas sobre un material son sensibles a la distribución exacta de la constante dieléctrica en ese material. Por lo tanto, la fuerza óptica depende de la composición y forma del objeto.

Además, otras fuerzas sobre el objeto son sensibles a la interacción hidrodinámica entre el objeto y el control de  
 35 fluido circundante del tamaño y forma del material de las sondas de flujo de fluido y a características como la rugosidad de la superficie.

Además, la localización de un objeto en una posición conocida permite procedimientos de interrogación automatizada adicionales, tales como la formación de imágenes a gran velocidad y mediciones de dispersiones específicas de una partícula.

En una realización de acuerdo con la presente invención, para conseguir un sistema de múltiples trampas se usa  
 40 un elemento óptico difractingente (DOE, es decir, un holograma de desplazamiento de fase que utiliza bien una geometría de transmisión o bien una geometría de reflexión) para alterar un frente de onda de un único haz de láser. El frente de onda se altera de manera que el haz de láser aguas abajo se convierte esencialmente en un gran número de haces de láser individuales con posiciones y direcciones de desplazamiento relativas fijadas por la naturaleza exacta del elemento óptico difractingente.

La clasificación usando orientación holográfica con láser implica establecer clases de identificación para los  
 45 objetos que van a clasificarse, introducir un objeto que va a clasificarse en una área de clasificación y manipular el objeto con un láser orientado según su clase de identidad. La manipulación puede consistir en sujetar, mover, girar, etiquetar o dañar el objeto de diferente manera según su clase de identidad. Por tanto, la presente invención proporciona una manera de implementar un enfoque paralelo a la clasificación de células usando captura óptica  
 50 holográfica.

En una realización de acuerdo con la presente invención, la espectroscopia de una muestra de material biológico puede llevarse a cabo con una fuente de iluminación de formación de imágenes adecuada para la espectroscopia inelástica o la retrodispersión de luz polarizada, siendo útil la primera para evaluar la identidad química y siendo adecuada la segunda para medir las dimensiones de estructuras internas tales como el tamaño de un núcleo. En

algunas realizaciones, las células se interrogan usando tales procedimientos espectroscópicos. El espectro de aquellas células que tuvieron resultados positivos (es decir, aquellas células que reaccionaron con o a las que se les añadió una etiqueta) puede obtenerse usando esta iluminación de formación de imágenes.

5 Un programa informático puede analizar los datos espectrales para identificar los blancos deseados (es decir, células que portan un cromosoma X o un cromosoma Y, o tipos de células supuestamente cancerígenas, precancerígenas y/o no cancerígenas, etc.), después puede aplicar la información para controlar que el elemento óptico de modelado de fase (es decir, las trampas ópticas) segregue o retenga esos blancos deseados o seleccionados (es decir, tipos de células). Las células retenidas pueden identificarse en función de la reacción o la  
 10 unión de las células retenidas a componentes químicos, o usando la fluorescencia natural del objeto o la fluorescencia de una sustancia asociada al objeto, como una etiqueta identificativa o etiqueta de origen. Al finalizar el ensayo puede llevarse a cabo la selección, a través de un ordenador y/o un operario, para determinar qué células van a descartarse y qué células van a recogerse.

15 La manipulación de las células en general, es más segura con múltiples haces disponibles. Al igual que un lecho de clavos, múltiples pinzas garantizan que se introduzca menos energía en cualquier punto particular de la célula. Esto elimina los puntos calientes y reduce el riesgo de daño. Cualquier proceso destructivo de dos fotones se beneficia considerablemente ya que la absorción es proporcional al cuadrado de la potencia del láser. Simplemente añadiendo una segunda pinza se reduce en un factor de cuatro la absorción de dos fotones en un punto particular. Células grandes como la Tetrahymena requieren una gran cantidad de potencia de láser para que sean atrapadas de manera eficaz. Dirigir la potencia hacia una única trampa puede producir daños inmediatos en la célula.

20 La manipulación de incluso una sola célula se mejora considerablemente utilizando la captura óptica holográfica, por ejemplo. Una única célula epitelial de la mejilla puede ser manipulada por una fila de pinzas, que levantan la célula a lo largo del perímetro en un lado. La rotación resultante permite una visión de 360 grados de la célula. Además de la ventaja de poder observar muestras biológicas, también ofrece la capacidad de orientar muestras de manera estable, lo que tiene un claro beneficio en estudios tales como los experimentos de dispersión, que  
 25 dependen en gran medida de la orientación de la muestra.

La clasificación con un amplio campo de visión tiene muchas ventajas como unas mayores prestaciones. Sin embargo, la utilización de pinzas estándar en un WFOV (amplio campo de visión) puede fallar debido a una presión de radiación excesiva. La utilización de pinzas en un amplio campo de visión usando captura óptica holográfica puede permitir la capacidad de formar modos exóticos de luz que reducen considerablemente la  
 30 presión de radiación del haz de luz. Las trampas de vórtice, por ejemplo, tienen un centro oscuro debido a las fases variables de cancelación de luz en el centro de la trampa. Este centro oscuro significa que la mayoría de los rayos de luz que recorren el centro del haz ya no existen. Estos mismos haces son los que albergan la mayor parte de la presión de radiación de la luz, de manera que su eliminación mitiga considerablemente la dificultad de la captura axial. Otros modos, por ejemplo los modos de cámara de vacío toroidal, tienen la misma ventaja.

35 En una realización de acuerdo con la presente invención, el procedimiento y sistema da lugar a un proceso automatizado o semiautomatizado para realizar un seguimiento del movimiento y los contenidos de cada trampa óptica. En una realización de acuerdo con la presente invención, el movimiento puede supervisarse a través de un tren de datos ópticos que puede visualizarse, o convertirse a una señal de vídeo, supervisarse o analizarse mediante la inspección visual de un operario, de manera espectroscópica, y/o mediante monitorización con vídeo.  
 40 El tren de datos ópticos también puede procesarse mediante un fotodetector para controlar la intensidad o por cualquier dispositivo adecuado para convertir el tren de datos ópticos en un tren de datos digitales adaptado para usarse por un ordenador y un programa. El programa informático controla la selección de células y la generación de trampas ópticas.

45 En otras realizaciones de acuerdo con la presente invención, el movimiento de las células se sigue en función del movimiento predeterminado de cada trampa óptica provocado al codificar el elemento óptico de modelado de fase. Además, en algunas realizaciones, un programa informático mantiene un registro de cada célula contenida en cada trampa óptica.

En una realización de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo la clasificación de espermatozoides que portan el cromosoma X o el cromosoma Y para la ganadería.

50 En la industria del ganado vacuno, la capacidad de modificar la proporción macho/hembra de las crías desde la combinación actual de 50%:50% hasta una combinación de 85%:15% aumentaría drásticamente el valor de las camadas anuales. En la industria de productos lácteos se produciría un aumento similar en el valor, aunque menor.

55 La presente invención también proporciona un procedimiento de clasificación de partículas que comprende las siguientes etapas: introducir una muestra de partículas en un flujo laminar en un canal de entrada de fluido (301)

de una celda de flujo; introducir una disolución amortiguadora en un flujo laminar en dos canales de salida (302, 303), estando dispuestos dichos canales de salida (302, 303) a ambos lados de dicho canal de entrada de fluido (301), en el que dicha disolución amortiguadora se introduce en dichos canales de salida (302, 303) a caudales que mantienen un flujo laminar con dicho flujo laminar en dicho canal de entrada de fluido; proporcionar una región de clasificación que no tiene ninguna separación mecánica entre dicho canal de entrada de fluido (301) y dichos canales de salida (302, 303) y que tiene dichos flujos laminares en la misma; producir una formación en embudo de trampas ópticas (305) en dicho canal de entrada de fluido (301) usando un sistema de captura óptica, en el que dicha formación en embudo de trampas ópticas (305) se implementa mediante una lente de objetivo de alta apertura numérica (304) incluida en dicho sistema de captura óptica; atrapar dichas partículas en dicho canal de entrada de fluido (301) mediante dicha formación en embudo de trampas ópticas (305); detectar e identificar dichas partículas usando un sistema de detección para determinar las partículas que van a clasificarse en dicha región de clasificación; separar dichas partículas en la región de clasificación mediante dicha formación en embudo de trampas ópticas (305).

Por tanto se han descrito, en términos generales, algunas características de acuerdo con la presente invención para que pueda entenderse mejor la siguiente descripción detallada de la misma y para que pueda apreciarse mejor la presente contribución a la técnica. Evidentemente, hay características adicionales de acuerdo con la presente invención que se describirán posteriormente y que formarán el contenido de las reivindicaciones adjuntas.

A este respecto, antes de explicar en detalle al menos una realización de acuerdo con la presente invención, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción ni a las disposiciones de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. Los procedimientos y aparatos de acuerdo con la presente invención son capaces de otras realizaciones y de llevarse a la práctica y realizarse de varias maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y la terminología empleadas en este documento, así como el resumen incluido posteriormente, tienen fines descriptivos y no limitativos.

De este modo, los expertos en la técnica apreciarán que la concepción en la que está basada esta divulgación puede utilizarse fácilmente como base para diseñar otras estructuras, procedimientos y sistemas para llevar a cabo los diversos fines de la presente invención. Por lo tanto, es importante considerar que las reivindicaciones incluyen estas construcciones equivalentes siempre que no se aparten de los procedimientos y aparatos de acuerdo con la presente invención.

### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 ilustra de manera esquemática un sistema de captura óptica holográfica.

Las FIG. 2A y 2B son un diagrama esquemático de vista lateral y un diagrama esquemático de vista desde arriba, respectivamente, que muestran una muestra que está siendo introducida en un portamuestras.

La FIG. 3 ilustra una micrografía electrónica de exploración de una cámara de muestras.

La FIG. 4 muestra una vista ampliada del área de trabajo de una cámara de muestras.

La FIG. 5 es un diagrama esquemático de un sistema de captura óptica holográfica para clasificar objetos.

La FIG. 6 ilustra un ejemplo de desviación lateral para la clasificación.

Las FIG. 7A y 7B ilustran una vista delantera y una vista lateral esquemáticas, respectivamente, de las trampas en embudo según una realización de acuerdo con la presente invención.

La FIG. 8 ilustra un clasificador de células basado en un disco giratorio.

La FIG. 9 ilustra una peristalsis óptica.

### Descripción detallada de la invención

En un aparato o sistema de captura óptica holográfica 100 como el ilustrado en la FIG. 1, la luz incide desde un sistema láser y entra como se muestra mediante la flecha con sentido descendente, para activar el sistema 100.

Un elemento óptico de modulado de fase 101 es preferentemente un elemento óptico dinámico (DOE), con una superficie dinámica, que es también un modulador espacial de luz solamente de fase (SLM) <BR> tal como el "PAL-SLM serie X7665" fabricado por Hamamatsu de Japón, el "SLM 512SA7" o el "SLM 512SA15", ambos fabricados por Boulder Nonlinear Systems de Lafayette, Colorado. Estos elementos ópticos dinámicos de fase modelada 101 se controlan por ordenador para generar los pequeños haces mediante un holograma codificado en el medio que puede modificarse para generar los pequeños haces y seleccionar la forma de los pequeños haces.

Un patrón de fase 102 generado en la parte inferior izquierda de la FIG. 1 produce las trampas 103 mostradas en la parte inferior derecha rellenas con esferas de sílice 104 de  $1\ \mu\text{m}$  de diámetro suspendidas en agua 105. Por tanto, el sistema 100 se controla por el holograma dinámico mostrado en la parte inferior izquierda.

5 El haz de láser se desplaza a través de las lentes 106, 107 hacia el espejo dichroico 108. El divisor de haz 108 está compuesto por un espejo dichroico, un espejo de banda prohibida fotónica, un espejo omnidireccional u otro dispositivo similar. El divisor de haz 108 refleja de manera selectiva la longitud de onda de la luz usada para formar las trampas ópticas 103 y transmite otras longitudes de onda. La parte de luz reflejada desde el área del divisor de haz 108 pasa después a través de un área de un elemento óptico de modelado de fase codificada  
10 (de objetivo) 109.

Antes de la presente invención, en la captura óptica con un solo haz (lo que también se denomina pinzas ópticas o de láser) se consideraba que una lente de alta apertura numérica era necesaria para trampas ópticas aceptables. Una base de este razonamiento era que, para la captura óptica, se usa el gradiente en el campo eléctrico de la luz incidente para atrapar la partícula. Con el fin de tener una gran fuerza de captura se consideraba necesario tener  
15 un gran gradiente en el campo eléctrico (o una densidad numérica de rayos). La manera habitual de conseguir esto es hacer pasar el campo de luz a través de una lente de alta apertura numérica.

Un problema relacionado con la observación y la captura de muestras dentro de un gran campo de visión es que tal observación y captura necesita una lente de objetivo con una baja apertura numérica. A diferencia de las enseñanzas anteriores, esta configuración proporciona una lente de baja apertura numérica como, por ejemplo, la  
20 lente de objetivo 109 de la FIG. 1. La capacidad de observar y atrapar en esta situación podría ser útil en cualquier aplicación en la que resulte ventajoso un amplio campo de visión proporcionado por una lente de bajo aumento, tal como colocar partes microscópicas fabricadas o trabajar con un gran número de objetos, tales como células, por ejemplo.

Como un ejemplo, esferas de sílice 104 de 3 micrómetros suspendidas en agua 105 se atraparón con lentes 109  
25 con una baja apertura numérica sin precedentes. Las lentes 109 usadas fueron fabricadas por Nikon:

(a) Plan 4x con AN de 0,10; y

(b) Plan 1 Ox con AN de 0,25.

Elementos ópticos de modelado de fase adecuados se caracterizan por ser transmisores o reflectantes dependiendo de cómo dirijan el haz de luz enfocado u otra fuente de energía. Elementos ópticos difrangent  
30 transmisores transmiten el haz de luz u otra fuente de energía, mientras que elementos ópticos difrangent reflectantes reflejan el haz.

El elemento óptico de modelado de fase 101 también puede clasificarse por tener una superficie estática o dinámica. Ejemplos de elementos ópticos estáticos de modelado de fase adecuados incluyen aquellos con una o  
35 más regiones de superficie fija, tales como retículas, incluidas retículas de difracción, retículas reflectantes y retículas transmisoras, hologramas, incluidos hologramas policromáticos, plantillas, filtros holográficos de conformación de luz, hologramas policromáticos, lentes, espejos, prismas, retardadores, etc. El elemento óptico estático de modelado de fase transmisor se caracteriza por una superficie fija.

Sin embargo, en algunas configuraciones, el elemento óptico de modelado de fase 101 es móvil, permitiendo de  
40 ese modo la selección de una más de las regiones de superficie fija moviendo el elemento óptico de modelado de fase 101 con respecto al haz de láser para seleccionar la región apropiada.

El elemento óptico estático de modelado de fase puede acoplarse a un husillo y girar con un motor eléctrico controlado (no mostrado). El elemento óptico estático de modelo de fase tiene una superficie fija y regiones discretas. En otros ejemplos de elementos ópticos estáticos de modelado de fase, ya sean transmisores o  
45 reflectantes, la superficie fija tiene una superficie no homogénea que contiene regiones que varían casi continuamente, o una combinación de regiones discretas y regiones que varían casi continuamente.

Ejemplos de elementos ópticos dinámicos de modelado de fase adecuados que tienen un aspecto que depende del tiempo para su función incluyen patrones difrangent generados por ordenador, materiales de desplazamiento de fase, disposiciones de desplazamiento de fase de cristal líquido, disposiciones de microespejos, incluidas  
50 disposiciones de microespejos de modo pistón, moduladores espaciales de luz, deflectores electro-ópticos, moduladores acústico-ópticos, espejos deformables, disposiciones de MEMS reflectantes, etc. Con un elemento óptico dinámico de modelado de fase 101, el medio 105 que comprende el elemento óptico de modelado de fase 101 codifica un holograma que puede alterarse para impartir un desplazamiento de fase modelada al haz de luz enfocado, lo que da como resultado un cambio correspondiente en el perfil de fase del haz de luz enfocado, tal

como difracción, o convergencia. Además, el medio 105 puede alterarse para producir un cambio en la ubicación de las trampas ópticas 103. Una ventaja de los elementos ópticos dinámicos de modelado de fase 101 es que el medio 105 puede alterarse para mover de manera independiente cada trampa óptica 103.

5 En ejemplos en los que el perfil de fase de los pequeños haces es menos intenso en la periferia y más intenso en las regiones internas desde de la periferia, sobrellenar la apertura trasera en menos del 15 por ciento aproximadamente es útil para formar trampas ópticas con mayor intensidad en la periferia que trampas ópticas formadas sin sobrellenar la apertura trasera.

10 En algunos ejemplos puede modificarse la forma original de una trampa óptica para adoptar la forma de una trama óptica de puntos, un vórtice óptico, un haz de Bessel, una botella óptica, un rotador óptico o una jaula de luz. La trampa óptica puede moverse en dos o en tres dimensiones. El elemento óptico de modelado de fase es también útil para impartir un modo topológico particular a la luz de láser, por ejemplo, convirtiendo un modo gaussiano en un modo de Gauss-Laguerre. Por consiguiente, un pequeño haz puede formarse en un modo de Gauss-Laguerre mientras que otro pequeño haz puede formarse en modo gaussiano. La utilización de los modos de Gauss-Laguerre mejora considerablemente la captura al reducir la presión de radiación.

## 15 **1. Sistema de formación de imágenes**

El diseño actual del instrumento usa una cámara CCD de alta resolución para el sistema primario de formación de imágenes 110. La principal ventaja de la cámara CCD (véase el número de referencia 511 en la FIG. 5) es la proporción favorable entre coste y rendimiento, ya que esta tecnología lleva varios años en el mercado.

Otra ventaja de las cámaras CCD es su amplia gama dinámica y la facilidad de generar datos de salida digitales.

20 Las imágenes se ven en una pantalla de ordenador (véase el número de referencia 510 en la FIG. 5) para proporcionar un sistema de referencia para seleccionar la ubicación de las trampas así como para minimizar la posibilidad de una exposición involuntaria del operario al láser.

## **2. Interfaz de usuario**

### **a. Visualización de objetos**

25 La interfaz de usuario consiste en una pantalla de ordenador que muestra el campo de visión adquirido por la cámara CCD. El usuario designa las ubicaciones de las trampas con un ratón. También existe la opción de eliminar una ubicación.

30 Como se describe posteriormente en mayor detalle, el usuario también puede especificar la potencia de cada trampa para evitar dañar la muestra. Además es deseable poder modificar la potencia de las trampas ya que la captura depende de la diferencia entre el índice de refracción de la muestra y el del medio de suspensión, lo que puede variar entre cada muestra.

### **b. El holograma**

35 El objetivo de designar las ubicaciones de las trampas es proporcionar datos de entrada para el cálculo del holograma. El holograma es esencialmente una función cuya transformada de Fourier produce la disposición de trampas deseada. Sin embargo, en el caso de la pantalla de cristal líquido, esta función es un objeto de fase (es decir, un objeto que cambia la fase del frente de onda sin absorber ninguna energía).

### **c. Procedimientos de selección**

Cuando se necesita un elevado número de trampas, designar su ubicación con el ratón de un ordenador puede ser una tarea excesivamente larga. Por lo tanto, hay varias opciones para reducir el tiempo requerido.

40 Con frecuencia es deseable usar las trampas para mover un objeto en una dirección particular. Esto puede conseguirse usando el ratón para crear una línea (arrastrándolo). El programa informático interpreta una línea como una indicación para implantar una serie de trampas de manera secuencial y suficientemente juntas como para mover el blanco en pequeñas etapas sin perder su pista.

45 La presente configuración incluye además la capacidad de modificar la altura de las trampas. Si un haz de láser es paralelo al eje óptico de la lente de objetivo 109, entonces una trampa se forma a la misma altura que el plano focal de la lente 109. La modificación de la altura de una trampa se consigue ajustando el holograma de manera que el haz de luz que forma una trampa converja (o diverja) ligeramente a medida que entra en la lente de objetivo 109 del microscopio. Ajustar la altura de una trampa es posible usando lentes pero solo una captura óptica holográfica (HOT) permite ajustar la altura de cada trampa individual de manera independiente a cualquier otra

trampa. Esto se consigue mediante el programa informático que ajusta la modulación de fase provocada por el holograma de cristal líquido.

### 3. Portamuestras

#### a. Características generales

- 5 La cámara de muestras 200 (véanse las FIG. 2A y 2B) es económica y desechable. Aunque posteriormente se describe una cámara de muestras 200, otro objetivo es crear un diseño flexible que pueda modificarse para diferentes aplicaciones.

10 La cámara de muestras 200 está dispuesta sobre la superficie de un portaobjetos de microscopio 201. La cámara de muestras 200 contiene una serie de canales 203 para introducir muestras u objetos. Los canales 203 están conectados para suministrar y recoger depósitos mediante un sistema de conductos delgados 204 (disponible comercialmente). Las muestras u objetos quedarán suspendidos en un medio líquido y se introducirán en el área de trabajo a través de los canales 203. La cámara de muestras 200 está cubierta con un cubreobjetos 205.

#### b. Fabricación de la cámara de muestras

15 Puede usarse una resina de polidimetilsiloxano (PDMS) para fabricar la cámara 200. El proceso implica crear el patrón deseado de canales 203 en un ordenador usando procedimientos CAD/CAM estándar y transferir el patrón a una fotomáscara usando técnicas fotorresistentes/de grabado convencionales. Después la fotomáscara se usa como una máscara en negativo para crear un patrón inverso de canales que se graba en una oblea de silicio. La profundidad de los canales 203 se controla por el tiempo de grabado. La oblea de silicio es una réplica en negativo de la cámara de muestras real 200. La etapa final consiste en crear la cámara de muestras en positivo 200  
20 vertiendo PDMS en la oblea y mediante polimerización. Esto da como resultado un molde de PDMS que se une a una placa de vidrio 201 y que se cubre con un cubreobjetos 205. La unión entre el vidrio y el PDMS se lleva a cabo mediante un ataque con oxígeno que activa las superficies expuestas.

25 Son necesarias varias etapas adicionales para garantizar una calidad consistente. Por ejemplo, la disolución/el endurecedor de PDMS se mantiene al vacío con el fin de impedir la formación de burbujas. La oblea de silicio se silaniza para impedir que el PDMS se pegue a la oblea. Hay varias etapas en las que se limpian las réplicas y se mantienen unos controles ambientales apropiados. Esto representa a la tecnología estándar.

30 Los canales 203 se conectan al sistema de conductos de microcalibre 204 usando pequeñas agujas de jeringa 206 sujetas usando pegamento 214, que se insertan a través del molde de PDMS en pequeños depósitos circulares 207 conectados a cada canal 203. Disoluciones de muestra se introducen en el canal 203 usando microbombas 208.

La FIG. 2B muestra un diagrama de una disposición típica para la introducción de una muestra a través de la bomba de jeringa 208 en 210. El medio se introduce en 211; lo que se sobra se recoge en 212 y las cantidades deseadas en 213.

35 La FIG. 3 muestra una representación de una micrografía electrónica de exploración del diagrama de la FIG. 2B tal y como se creó realmente a partir del proceso descrito anteriormente. Los canales tienen un ancho de 50 micrómetros y una profundidad de 50 micrómetros aproximadamente. La FIG. 4 muestra una representación de una micrografía electrónica de exploración del volumen de "trabajo" donde se producirían las manipulaciones de la muestra sujeta a estudio. Los diagramas muestran claramente que los canales 203 son lisos y están limpios. Aunque los canales 203 tienen una sección transversal rectangular, también pueden concebirse otras formas. Los  
40 canales 203 están diseñados para permitir que las muestras fluyan hacia una "área de trabajo" cuya forma puede personalizarse según los requisitos experimentales.

#### c. Trampas ópticas holográficas

45 A diferencia de las trampas ópticas de barrido que tratan múltiples puntos de captura en secuencia y que por tanto se comparten en el tiempo, las trampas ópticas holográficas iluminan cada una de sus trampas continuamente. Para que una trampa óptica de barrido consiga la misma fuerza de captura que una trampa iluminada continuamente, debe proporcionarse al menos la misma intensidad promediada en el tiempo. Esto significa que la trampa de barrido debe tener una intensidad máxima superior en un factor proporcional a al menos el número de regiones de captura. Esta mayor intensidad máxima aumenta las oportunidades de producir daños inducidos de manera óptica en el material atrapado. Este daño puede producirse al menos de tres maneras: (1) una absorción  
50 de un solo fotón que da lugar a un calentamiento focal, (2) una absorción de un solo fotón que da lugar a transformaciones fotoquímicas y (3) una absorción de múltiples fotones que da lugar a transformaciones fotoquímicas. Los casos (1) y (2) pueden mitigarse eligiendo una longitud de onda de luz que sea absorbida débilmente por el material de captura y por el medio fluido circundante. El caso (3) es un problema más general y

5 se mitiga en parte trabajando con luz de mayor longitud de onda. Por tanto, las trampas ópticas holográficas pueden manipular materiales delicados de manera más cuidadosa y con mayores efectos distribuyendo continuamente cantidades más pequeñas de fuerza entre una pluralidad de puntos sobre un objeto en lugar de dañar potencialmente el objeto aplicando la fuerza total en un único punto o a una mayor intensidad durante un periodo de tiempo.

10 El diseño es flexible ya que cualquier patrón deseado de canales 203 puede diseñarse con un programa informático CAD/CAM estándar. La complejidad del patrón no es un factor siempre que los canales 203 estén lo suficientemente separados como para no entorpecerse entre sí. Como puede observarse en las FIG. 2B y 3, múltiples conjuntos de canales 203 pueden alojarse fácilmente, de manera que un único chip puede usarse para más de un experimento. Además, una vez que se ha creado un molde puede usarse para fabricar miles de cámaras de muestras por lo que la metodología puede adaptarse fácilmente a técnicas de producción en masa. Se estima que el coste marginal de una única cámara sería del orden de algunos céntimos en la producción en masa.

#### 4. Sistema óptico

##### a. Síntesis del holograma

15 Versiones tempranas de las trampas ópticas holográficas usaban hologramas fijos fabricados a partir de varios materiales. Estos eran adecuados para demostrar el principio de usar hologramas para crear hasta varios cientos de trampas. Sin embargo el principal inconveniente de estos hologramas era que eran estáticos y se tardaba horas en fabricar un único holograma. Con el advenimiento del hardware para crear pantallas de cristal líquido controladas por ordenador capaces de formar una gran cantidad de hologramas por segundo, el uso de las trampas ópticas como un dispositivo dinámico se ha convertido en una realidad práctica. El principio de generación del holograma se describe posteriormente.

##### b. El microscopio

25 El sistema óptico 110 consiste en un microscopio estándar con luz de alta calidad. El objetivo es una lente de alta apertura numérica 109 acoplada con una lente condensadora de gran distancia de trabajo. La lente de objetivo de alta apertura numérica 109 se usa para las capturas. Aunque la lente condensadora de gran distancia de trabajo puede reducir en cierto modo la resolución de las imágenes, no compromete las capturas y proporciona un espacio adicional cerca del portamuestras para alojar conductos y receptáculos. Los objetos pueden moverse sujetándolos con las trampas y moviendo la platina del microscopio vertical o lateralmente.

30 En una configuración se usa una potencia de láser de 2 mW aproximadamente para producir 200 microvatios en la trampa. El nivel de potencia disponible con un láser de 2W es adecuado para crear 1000 trampas aproximadamente. Se usa un láser verde (532 nm), pero también pueden usarse otras longitudes de onda, incluyendo, por ejemplo, un láser de infrarrojo lejano para trabajar con materiales que absorben cerca del valor de 532 nm.

35 La captura depende del gradiente del índice de refracción de manera que materiales con índices de refracción cercanos al del medio circundante necesitan trampas con mayores niveles de potencia. Además, la tolerancia de los materiales a los daños variará según la potencia de la trampa, por lo que es deseable que el usuario pueda controlar este parámetro. El usuario puede aumentar el nivel de potencia en cualquier trampa particular usando un "regulador de potencia" visualizado en la interfaz gráfica.

##### c. El holograma de cristal líquido (también denominado modulador espacial de luz o SLM)

40 El modulador espacial de luz 108 es esencialmente una disposición de cristal líquido controlada por un campo electrostático que, a su vez, puede ser controlado por un programa informático. La disposición de cristal líquido tiene la propiedad de que retarda la fase de luz en diferentes cantidades en función de la resistencia del campo eléctrico aplicado.

45 Los dispositivos de cristal líquido nemático se usan en dispositivos de visualización o en aplicaciones en las que se necesita una gran profundidad de modulación solamente de fase (2II o superior). Las moléculas de cristal líquido nemático están dispuestas normalmente en paralelo con respecto a la superficie del dispositivo proporcionando el máximo retardo debido a la birrefringencia del cristal líquido. Cuando se aplica un campo eléctrico, las moléculas se disponen en paralelo con respecto al campo eléctrico. A medida que aumenta el voltaje el índice de refracción a lo largo del eje extraordinario y por tanto la birrefringencia, disminuye de manera eficaz provocando una reducción en el retardo del dispositivo.

##### d. El láser

Láseres útiles incluyen láseres de estado sólido, láseres bombeados por diodo, láseres de gas, láseres de

colorante, láseres de alexandrita, láseres de electrones libres, láseres VCSEL, láseres de diodo, láseres de titanio-zafiro, láseres de YAG dopado, láseres de YLF dopado, láseres de YAG bombeados por diodo y láseres de YAG bombeados por lámparas de centelleo. Nd bombeado por diodo: se prefieren láseres de YAG que funcionen entre 10 mW y 5 W. Las longitudes de onda preferidas del haz de láser usado para formar disposiciones para investigar material biológico incluyen longitudes de onda de infrarrojo, de infrarrojo cercano, de rojo visible, verde y azul visible, siendo las longitudes de onda comprendidas entre 400 nm aproximadamente y 1060 nm aproximadamente las más preferidas.

## 5. Procedimiento de funcionamiento

En una configuración, un sistema de captura óptica 500 (véase la FIG. 5) (tal como el sistema BioRyx vendido por Arryx, Inc., Chicago, Illinois) incluye un microscopio 501 de la serie Nixon TE 2000 en el que se ha colocado una montura para formar las trampas ópticas usando una unidad de captura óptica holográfica 505. El revólver 502 al que está acoplado un alojamiento se encaja directamente en el microscopio 501 a través de la montura. Para la formación de imágenes, una fuente de iluminación 503 está prevista encima de la lente de objetivo 504 para iluminar la muestra 506.

En una disposición, el sistema de captura óptica 100 (véanse las FIG. 1 y 5) incluye un extremo del primer canal de luz que está muy próximo al elemento óptico y el otro extremo del primer canal de luz que intersecta y se comunica con un segundo canal de luz formado de manera perpendicular al mismo. El segundo canal de luz está formado dentro de una base de una torreta de montaje de lente de microscopio o "revólver". El revólver está adaptado para montarse en un microscopio de la serie Nixon TE 200. El segundo canal de luz se comunica con un tercer canal de luz que también es perpendicular al segundo canal de luz. El tercer canal de luz se extiende desde la superficie superior del revolver a través de la base del revólver y es paralelo a una lente de enfoque / lente de objetivo 109. La lente de enfoque 109 tiene una parte superior y una parte inferior que forman una apertura trasera. Un divisor de haz con espejo dicroico 108 está interpuesto en el tercer canal de luz entre el segundo canal de luz y la apertura trasera de la lente de enfoque.

Otros componentes del sistema de trampas ópticas que forman las trampas ópticas incluyen un primer espejo, que refleja los pequeños haces que emanan del elemento óptico de modelado de fase 101 a través del primer canal de luz, un primer conjunto de dispositivos ópticos de transferencia 106 dispuestos dentro del primer canal de luz, alineados para recibir los pequeños haces reflejados por el primer espejo, un segundo conjunto de dispositivos ópticos de transferencia 107 dispuestos dentro del primer canal de luz, alineados para recibir los pequeños haces que pasan a través del primer conjunto de lentes de transferencia y un segundo espejo 108, situado en la intersección del primer canal de luz y el segundo canal de luz, alineado para reflejar los pequeños haces que pasan a través del segundo conjunto de dispositivos ópticos de transferencia y a través del tercer canal de luz.

Para generar las trampas ópticas, un haz de láser es dirigido desde un láser 507 (véase la FIG. 5) a través de un colimador y a través de un extremo de fibra óptica 508 y es reflejado desde la superficie dinámica del elemento óptico difractingente 509. El haz de luz que sale del extremo del colimador de la fibra óptica se difracta por la superficie dinámica del elemento óptico difractingente en una pluralidad de pequeños haces. El número, tipo y dirección de cada pequeño haz puede controlarse y modificarse alterando el holograma codificado en el medio de superficie dinámica. Después los pequeños haces se reflejan desde el primer espejo a través del primer conjunto de dispositivos ópticos de transferencia debajo del primer canal de luz a través del segundo conjunto de dispositivos ópticos de transferencia hacia el segundo espejo y se dirigen con el espejo dicroico 509 hacia arriba hasta la apertura trasera de la lente de objetivo 504 y convergen a través de la lente de objetivo 504, produciendo de este modo las condiciones de gradiente óptico necesarias para formar las trampas ópticas. Esa parte de la luz que se divide a través del espejo dicroico 509, para la formación de imágenes, pasa a través de la parte inferior del tercer canal de luz formando un tren de datos ópticos (véase la FIG. 1).

La espectroscopia de una muestra de material biológico puede llevarse a cabo con una fuente de iluminación de formación de imágenes 503 adecuada para una espectroscopia o una retrodispersión de luz polarizada, siendo útil la primera para evaluar la identidad química y siendo adecuada la segunda para medir las dimensiones de estructuras internas tales como el tamaño de un núcleo. En algunas disposiciones, las células se interrogan usando tales procedimientos espectroscópicos. Un ordenador 510 puede usarse para analizar los datos espectrales y para identificar células que portan o bien un cromosoma X o un cromosoma Y, o tipos de células supuestamente cancerígenas, precancerígenas y/o no cancerígenas. Después el programa informático puede aplicar la información para hacer que las trampas ópticas contengan los tipos de células seleccionados. Después las células retenidas pueden identificarse en función de la reacción con o unión a compuestos químicos de las células retenidas.

El presente procedimiento y sistema da lugar a un proceso automatizado o semiautomatizado para realizar un seguimiento del movimiento y los contenidos de cada trampa óptica. El movimiento puede supervisarse a través de

una cámara de vídeo 511, un espectro o un tren de datos ópticos y que proporciona un programa informático que controla la selección de células y la generación de trampas ópticas. En otras configuraciones, el movimiento de las células se supervisa en función del movimiento predeterminado de cada trampa óptica generado al codificar el elemento óptico de modelado de fase. Además, en algunas configuraciones se usa un programa informático para mantener un registro de cada célula retenida en cada trampa óptica.

Después el tren de datos ópticos puede visualizarse, convertirse a una señal de vídeo, monitorizarse o analizarse mediante la inspección visual de un operario, de manera espectroscópica, y/o mediante monitorización con vídeo. El tren de datos ópticos también puede procesarse mediante un fotodetector para controlar la intensidad o por cualquier dispositivo adecuado para convertir el tren de datos ópticos en un tren de datos digitales adaptado para usarse por un ordenador.

En un enfoque que no utiliza un SLM, el movimiento se consigue transfiriendo los objetos desde un primer conjunto de trampas ópticas hasta un segundo, tercer y después cuarto, etc., conjunto. Para mover los objetos desde la primera posición hasta una segunda posición, un elemento óptico estático de modelado de fase se hace girar alrededor de un husillo para alinear el haz de láser con una segunda región que genera el segundo conjunto de trampas ópticas en un segundo conjunto correspondiente de posiciones predeterminadas. Al construir el segundo conjunto de trampas ópticas con una proximidad adecuada a la primera posición, las sondas pueden pasarse desde el primer conjunto de trampas ópticas hasta el segundo conjunto de trampas ópticas. La secuencia puede continuar haciendo pasar las sondas desde el segundo conjunto de posiciones predeterminadas hasta un tercer conjunto de posiciones predeterminadas, desde el tercer conjunto de posiciones hasta un cuarto conjunto de posiciones predeterminadas y desde el cuarto conjunto de posiciones predeterminadas y así sucesivamente mediante la rotación del elemento óptico de modelado de fase para alinear la región apropiada correspondiente a la posición deseada. El intervalo de tiempo entre la terminación de un conjunto de trampas ópticas y la generación del siguiente tiene una duración para garantizar que las sondas se transfieran al siguiente conjunto de trampas ópticas antes de que dispersen.

En un movimiento escalonado de los objetos desde una gran separación hasta una escasa separación, el movimiento escalonado de las células se produce de manera similar. Sin embargo, a medida que los objetos pasan de un primer conjunto de trampas ópticas a un segundo conjunto y se mueven hacia una segunda posición y posiciones subsiguientes, la disposición escalonada de las trampas permite que los objetos se agrupen de manera densa sin que un conjunto de trampas esté situado demasiado cerca de dos objetos al mismo tiempo lo que podría provocar que los objetos fueran retenidos por la trampa óptica equivocada.

Una vez que un objeto o una célula ha interactuado con una trampa, pueden usarse procedimientos espectrales para investigar la célula. El espectro de esas células que dieron un resultado positivo (es decir, aquellas células que reaccionaron con o a las que se les añadió una etiqueta) puede obtenerse usando iluminación de formación de imágenes tal como la adecuada para una espectroscopia inelástica o una retrodispersión de luz polarizada. Un ordenador puede analizar los datos espectrales para identificar los blancos deseados y hacer que el elemento óptico de modelado de fase segregue esos blancos deseados. Tras finalizar el ensayo puede llevarse a cabo la selección, a través de un ordenador y/o un operario, para determinar qué células van a descartarse y qué células van a recogerse.

La peristalsis óptica (véase la FIG. 9) es un proceso existente que utiliza líneas paralelas de trampas 400 en un canal microfluídico 401 dispuesto de manera que la separación entre las líneas permite que las partículas 402 atrapadas en una línea sean conducidas hacia las trampas de la otra línea cuando la primera línea de trampas está desactivada. La peristalsis óptica puede usarse como una alternativa a y junto con etiquetas fluorescentes (como se describe posteriormente con relación a las aplicaciones). El proceso se lleva a cabo determinando los tiempos de extinción de las líneas de trampas temporizadas de manera que las partículas se mueven en direcciones deseadas especificadas por la disposición de las líneas de trampas. Eligiendo si una línea de trampas en un lado u otro de una partícula se activa o se desactiva, la partícula puede moverse hacia delante o hacia atrás en una dirección. Utilizando un gran número de trampas, un elevado número de partículas puede moverse de este modo siguiendo una dirección dada. Por tanto, las partículas atraídas hacia las trampas pueden moverse hacia un área dada y si se desea, recogerse ahí.

Asimismo, reduciendo gradualmente la separación entre las trampas de las líneas hacia una dirección dada y/o modificando la curvatura de las líneas de trampas, las partículas pueden conducirse siguiendo un patrón de enfoque para concentrarlas. Invertir este patrón dispersaría las partículas.

La separación entre las líneas de trampas puede ser relativamente mayor para acelerar el movimiento de las partículas o relativamente más estrecha para ralentizarlo. Asimismo, también puede modificarse la intensidad de las trampas o líneas seleccionadas y por tanto su efecto en las partículas. Haciendo converger o divergir los flujos, las partículas pueden combinarse o separarse. Además, la peristalsis óptica puede combinarse con diferentes

efectos de resistencia viscosa al avance o campos eléctricos para producir conjuntos complejos y específicos de valores de parámetro para separar de manera precisa los materiales, por ejemplo. Ejerciendo una oposición a la captura y otras fuerzas, el punto de equilibrio de las dos fuerzas determina si una partícula se mueve con la trampa o la otra fuerza.

- 5 En una disposición, la peristalsis óptica puede implementarse con un sistema holográfico que pasa por un ciclo a través de una secuencia de patrones de fase para implementar una secuencia correspondiente de patrones de captura óptica holográfica. Tales patrones pueden codificarse en un relieve de superficie de elementos ópticos difrangentemente montados en la cara de un prisma, donde cada patrón se hace girar en su sitio mediante un motor. Asimismo, elementos ópticos difrangentemente transmisores pueden colocarse en el perímetro de un disco y hacerse girar para entrar en un ciclo a través de los patrones. También pueden usarse retículas de fase conmutables y hologramas de fase codificados en una película.
- 10

En lo que respecta a partículas que superan la ubicación de una formación rectilínea mediante una fuerza de desvío externa, tal como un flujo de fluido, donde la fuerza de captura es considerablemente mayor que la fuerza de impulsión externa, las partículas quedan atrapadas. Si la fuerza de desvío es mayor, las partículas fluyen más allá de la formación.

15

Entre estos extremos, la fuerza de desvío supera a la fuerza de captura en un grado diferente para diferentes fracciones de las partículas, provocando que las partículas salten de trampa en trampa a lo largo de la dirección del eje principal de la formación. Puede observarse una desviación neta de cero si la formación se hace girar  $45^\circ$  ya que: (1) se producen desplazamientos positivos y negativos con la misma probabilidad; o (2) las partículas quedan inmovilizadas en la dirección [11], saltando en diagonal a través de la formación.

20

Las partículas afectadas en un mayor grado por una formación pueden desviarse con mayores ángulos que las partículas afectadas en un mayor grado por la fuerza de desvío. La fuerza de gradiente óptico ejercida sobre las partículas varía aproximadamente como  $a^3$ , donde  $a$  = radio. La resistencia al avance de Stokes en las partículas varía como "a". Por tanto, las partículas más grandes se ven afectadas de manera desproporcionada por las formaciones de trampas, mientras que las partículas más pequeñas experimentan una menor desviación. Hay que orientar la formación casi en el ángulo de desviación óptimo y ajustar la intensidad para hacer que las partículas más grandes estén en la condición de salto y por tanto, tengan una mayor desviación que las partículas más pequeñas. Partículas desviadas de diferente manera pueden recogerse o fraccionarse adicionalmente mediante formaciones adicionales situadas aguas abajo de la primera.

25

Algunas técnicas convencionales de fraccionamiento consiguen una separación en la dirección de una fuerza aplicada. Sin embargo, tales técnicas funcionan con lotes de muestras y no de manera continua.

30

Otras técnicas convencionales de microfraccionamiento utilizan tamices microfabricados que consisten en un reticulado bidimensional de obstáculos o barreras. Por ejemplo, una colocación asimétrica de barreras rectifica el movimiento browniano de partículas que pasan a través del tamiz, provocando que las partículas sigan trayectorias que dependen de los coeficientes de difusión de las partículas. Sin embargo, el uso de reticulados microfabricados produce obstrucciones y no pueden ajustarse al tamaño y tipo de las partículas.

35

En la FIG. 6, se muestra un ejemplo de clasificación de partículas. Aunque el ejemplo ilustrado muestra una desviación lateral, la peristalsis óptica puede obtenerse en el mismo sistema. Una representación de una imagen de vídeo muestra la separación basada en luz del material, en este caso adaptada a diferentes objetos en función del tamaño de las partículas. El flujo en el canal superior izquierdo contiene partículas de 1, 2,25 y  $4,5 \mu\text{m}$  y otro flujo entra desde el lado inferior izquierdo. Las líneas superpuestas indican respectivamente el flujo de cada uno de los canales cuando el láser del sistema está desactivado. Cuando la potencia del láser se activa, la luz en la región de interacción (indicada por el recuadro superpuesto de color verde), extrae las partículas de  $4,5 \mu\text{m}$  del flujo superior y las proporciona al canal inferior derecho, como se indica mediante la trayectoria superpuesta de color blanco.

40

45

## 6. Aplicación en la clasificación de espermatozoides

### a. Antecedentes

En una aplicación se implementa un clasificador de células de alta resolución y de alto rendimiento usando tecnología de captura óptica. La necesidad de implementar esta tecnología como una nueva base para la clasificación de células resulta evidente por la incapacidad de los citómetros de flujo tradicionales a la hora de llevar a cabo determinaciones en alta resolución de las características celulares necesarias en muchos problemas de clasificación. En este ejemplo de separación de los espermatozoides que portan el cromosoma X y los que portan el cromosoma Y en la industria ganadera, las medidas de caudal disminuyen sustancialmente con respecto a las tasas de los sistemas punteros de la actualidad. La razón es que la citometría de flujo tradicional es la mejor

50

a la hora de realizar una determinación de fluorescencia/no fluorescencia y en este modo, puede funcionar a magnitudes que proporcionan una salida de 30.000 células/segundo. Puesto que el problema pasa a ser discriminar entre diferentes niveles de fluorescencia (como es el caso del problema de separación de los espermatozoides), estos procedimientos pasan a ser bastante ineficaces. En el problema de la separación de los espermatozoides, donde el espermatozoide que porta el cromosoma X y el que porta el cromosoma Y difieren en fluorescencia en un 4% aproximadamente, la tasa se reduce a 4.000 células de salida aproximadamente por segundo (véase el documento de J. L. Schenk, y cols., *Proceedings, The Range Beef Cow Symposium XVI*, 1999).

#### b. Clasificación usando trampas ópticas holográficas

El procedimiento para implementar una clasificación de células de alta resolución y alto rendimiento tiene los siguientes componentes: un desarrollo microfluídico, un desarrollo de sistema de trampas ópticas (componente de captura para el sistema de embudo y el componente de captura para el sistema de separación), medición de fluorescencia de alta resolución, control de sistema (incluyendo el cálculo del holograma) y diseño mecánico.

El primer componente es una celda de flujo que tiene un canal de entrada de fluido, que transporta la muestra de entrada y dos canales de salida que transportan células separadas desde el canal de entrada. El segundo componente es un conjunto de trampas que llevan a cabo la función de “embudo” (esta “función de embudo” es equivalente a la de la boquilla que forma el flujo de gotas en un citómetro de flujo tradicional). El tercer componente es el sistema de detección y finalmente, el cuarto componente es el sistema de clasificación. Las FIG. 7A y 7B ilustran la relación entre estos cuatro componentes.

En este ejemplo se usa esperma como una muestra objetivo para la separación. El procedimiento tradicional que diferencia los espermatozoides que portan el cromosoma X y los espermatozoides que portan el cromosoma Y utiliza Hoechst 33342, un colorante que se adhiere específicamente al ADN de tal manera que la fluorescencia total presente es una medida del ADN total presente. Las mediciones de esta fluorescencia proporcionan una estimación de la naturaleza de la carga cromosómica subyacente. (Schenk, 1999, también, Erik B. van Munster, *Cytometry*, volumen 47, página 192, 2002).

La característica esencial que permite a esta realización propuesta de la presente invención conseguir altas prestaciones es su capacidad intrínseca de recorrer el material en líneas paralelas simultáneamente y muy cerca las una de las otras. Para esta implementación inicial se crea un sistema de flujo con 10 líneas de entrada 300, cada una separada en 10 micrómetros. Esto establece un ancho global hacia el flujo desde el depósito de entrada de 110 micrómetros. Cada uno de los canales de salida 302, 303 tiene la misma anchura de 110 micrómetros que el canal de entrada 301 y se extienden paralelos al canal de entrada 301 como se muestra en las FIG. 7A y 7B. En los “canales de salida” 302, 303 se introduce una disolución amortiguadora, que se suministra en estos canales con el mismo caudal mantenido en el canal de entrada 301. Estos tres canales 301, 302, 303 están diseñados para mantener un flujo laminar por encima de los intervalos de flujo de interés. En la región de clasificación, donde las células específicas se transfieren desde el canal de entrada 301 hasta uno de los canales de salida 302, 303, los tres flujos son adyacentes sin ninguna separación mecánica entre los mismos. Los flujos laminares mantienen a cualquier material en sus flujos respectivos a no ser que se introduzca una fuerza externa específica para transferir ese material de un canal de flujo a otro.

Las trampas de embudo 305 actúan sobre las células de entrada 306 de manera que se desplazan en líneas de flujo bien definidas y de manera que las células de entrada 306 se separan entre sí una distancia mínima 306 que se fija por el operario. Los caudales en los canales 301, 302, 303 se fijan por esta distancia mínima 306, por la tasa de “actualización” del dispositivo que está realizando la función de separación y por la tasa de procesamiento de células global deseada. Suponiendo que la distancia mínima en nuestro caso de muestra es de 20 micrómetros (suficiente para separar completamente las cabezas de los espermatozoides, pero una distancia que permitirá un solapamiento intrascendente de las colas) y una tasa de procesamiento de 1.500 células/segundo, este sistema usa un caudal de 3 mm/segundo [(15.000 células/segundo) x (20 micrómetros/línea de células) (10 líneas)].

El sistema de embudo está compuesto por un patrón de trampas de baja intensidad 305 establecido por un conjunto de hologramas estáticos que están montados en una rueda giratoria de manera que el patrón cambia en función del patrón de rotación. Las trampas de embudo situadas más aguas abajo tienen una intensidad y una posición fijas, sirviendo solo para mantener la separación entre las líneas de flujo de las células. Las trampas aguas arriba 305 pueden cambiar tanto de intensidad como de posición en el tiempo para perturbar el flujo de las células aglutinadas y dejar pasar células individuales, o no aglutinadas.

La medición sobre la que se realiza la determinación de clasificación puede producirse en la región aguas abajo de las trampas de embudo 305 o puede producirse en una región más allá del sistema de embudo. Para este sistema inicial, la medición consistirá en la detección de fluorescencia de alta resolución. Sin embargo, en el futuro pueden implementarse otros criterios de clasificación activos, tales como mediciones de dispersión, o pueden usarse técnicas pasivas tales como aquellas que usan desviación óptica como las descritas anteriormente.

El componente final del dispositivo es el sistema de separación en el que se utilizan los criterios de clasificación para desviar las células hacia uno de los canales de salida 302, 303 o para permitir que permanezcan en el flujo del canal de entrada 301. El parámetro crucial para este componente es el campo de visión de la lente de objetivo de alta apertura numérica 304 usada para implementar la formación de trampas dinámicas 305 que producen la separación. El ancho de este campo de visión tiene 110 micrómetros, al igual el que el ancho de los canales individuales. Sin embargo, la longitud depende de los caudales, de la profundidad de los canales y de las tasas de actualización del dispositivo óptico usado para controlar estas trampas.

En la actualidad, una realización de acuerdo con la presente invención incluye moduladores espaciales de luz que crean máscaras de fase que son altamente eficaces para hacer funcionar los sistemas de captura óptica. Estos dispositivos tienen tasas de actualización de 30 Hz o más. Con una profundidad de canal estimada de 10 micrómetros y suponiendo que los espermatozoides deberían moverse en etapas de 1 micrómetro, se utilizan 10 actualizaciones del modulador espacial de luz para mover una célula desde el centro del canal de entrada 301 hasta el centro de cualquiera de los canales de salida 302, 303. Con un valor de actualización de 30 Hz, la implementación de estas 10 etapas se producirá en 1/3 segundos. A un caudal de 3 mm/segundo, estas 10 etapas se implementan en una longitud de 1 mm en la dirección de flujo. La lente de objetivo 304 para el componente de separación tendría por tanto un área de trabajo de 110 micrómetros x 1000 micrómetros. Un área de desarrollo importante de este proyecto es el diseño de este ensamblado de lente. El equilibrio en el diseño de lentes está generalmente entre el campo de visión y la apertura numérica. Es decir, para un ensamblado de lente de una complejidad particular, un aumento de rendimiento importante en una de estas áreas vendrá acompañado de una reducción de rendimiento en la otra área. Por esta razón las lentes de alto rendimiento usadas en áreas tales como la producción litográfica de alta resolución de dispositivos electrónicos con circuito integrado son muy complejas. Sin embargo, la presente invención está muy por debajo de los niveles de rendimiento de estos ensamblados de lente.

### 7. Información sobre el uso de pinzas con vórtices de campo amplio

El uso de pinzas con un amplio campo de visión requiere lentes de objetivo de microscopio que tengan una apertura numérica relativamente baja. La capacidad de atrapar objetos de manera óptica en la dirección axial se basa en enfocar hacia abajo un haz de luz de manera que tenga los mayores gradientes en la dirección axial. Esto implica la formación de un cono de luz con el radio más ancho posible. El radio del cono se determina directamente mediante la apertura numérica del objetivo, es decir, una alta apertura numérica significa un radio de cono ancho. Esto se opone directamente a los requisitos de un amplio campo de visión. Esto ha dificultado tradicionalmente el uso de pinzas con un amplio campo de visión en la dirección axial. Una de las contribuciones más importantes a la dificultad de usar pinzas en la dirección axial es la presión de radiación del haz de luz enfocado. Especialmente para partículas que tienen una densidad muy parecida a la del medio circundante, por ejemplo microesferas de poliestireno, la presión de radiación puede sacar las partículas fuera de la trampa. Con un objetivo de baja apertura numérica, resulta difícil vencer la presión de radiación con la suficiente fuerza de pinzado en la dirección axial. Sin embargo, las trampas ópticas holográficas tienen la capacidad de formar modos de luz exóticos que reducen considerablemente la presión de radiación del haz de luz. Las trampas de vórtice, por ejemplo, tienen un centro oscuro debido a las fases variables de cancelación de luz en el centro de la trampa. Este centro oscuro significa que la mayoría de los rayos de luz que recorren el centro del haz ya no existen. Estos mismos haces son los que albergan la mayor parte de la presión de radiación de la luz, de manera que su eliminación mitiga considerablemente la dificultad de la captura axial. Otros modos, por ejemplo los modos de cámara de vacío toroidal, tienen la misma ventaja.

La manipulación (empuje, orientación, clasificación) de objetos o células en general es más segura con múltiples haces disponibles. Al igual que un lecho de clavos, múltiples pinzas garantizan que se introduzca menos energía en cualquier punto particular de la célula. Esto elimina los puntos calientes y reduce el riesgo de daño. Cualquier proceso destructivo de dos fotones se beneficia considerablemente ya que la absorción es proporcional al cuadrado de la potencia del láser. Simplemente añadiendo una segunda pinza se reduce en un factor de cuatro la absorción de dos fotones en un punto particular. Células grandes como la Tetahymena, que se mantienen en su sitio mediante una disposición de pinzas, requieren una gran cantidad de potencia de láser para que sean atrapadas de manera eficaz. Dirigir la potencia hacia una única trampa puede producir daños inmediatos en la célula.

Finalmente, la manipulación de incluso una sola célula se mejora considerablemente utilizando captura óptica holográfica. Una única célula epitelial de la mejilla puede manipularse por una serie de pinzas, que levantan la célula a lo largo del perímetro en un lado. La rotación resultante permite una visión de 360 grados de la célula. Además de la ventaja de poder observar muestras biológicas, también existe la capacidad de orientar muestras de manera estable, lo que tiene un claro beneficio en estudios tales como los experimentos de dispersión que dependen en gran medida de la orientación de la muestra.

### 8. Clasificador de células basado en un disco giratorio

Debido a la gran cantidad de esperma que eyaculan normalmente los animales bovinos y a la pequeña cantidad de tiempo disponible antes de que el esperma se vuelva inservible, un gran número de espermatozoides por segundo (del orden de un millón) se clasifican por un clasificador de espermatozoides disponible comercialmente. La clasificación con trampas ópticas holográficas confiere una gran ventaja gracias a su capacidad de procesar en paralelo un gran número de células.

La tecnología para usar láseres para acceder rápidamente a un gran número de ubicaciones ya existe en forma de reproductor de discos láser giratorios, reproductor de CD o reproductor de DVD. Estos dispositivos combinan el movimiento giratorio del disco con el movimiento radial del láser para acceder a ubicaciones con velocidades increíblemente altas. Por ejemplo, un reproductor de DVD típico puede acceder aproximadamente a 4.000 millones de "bits" diferentes del disco en aproximadamente dos horas. Combinar este enfoque de disco giratorio con la captura óptica (véase la FIG. 8) permite acceder a las células a tasas similares y la captura óptica holográfica aumenta estas tasas en factores de 100 o incluso más. Esta disposición no está dentro del alcance de la presente invención.

Como se muestra en la FIG. 8, los objetos o las células se introducen en la entrada de muestras 700 y usando un sistema de suministro de muestras 701 apropiado, las células se proporcionan al disco de distribución de muestras 702 que se hace girar mediante un control de motor. El sistema de formación de imágenes y de captura 703, que está conectado a un sistema de control y de análisis 704, clasifica las células y estas se recogen en cámaras de muestras 705 y 706.

Hay muchos mecanismos para distribuir las células sobre la superficie del disco. Cámaras de fluidos que alojan células individuales, geles que inmovilizan las células, superficies pegajosas o enceradas que unen las células o incluso congelar las células formando una masa sólida, son procedimientos que pueden utilizarse. Una vez que las células están situadas de manera que mantienen sus posiciones relativas, pueden medirse de manera apropiada. Después puede usarse la captura óptica para liberar de la superficie o volumen bien las células deseadas o bien las células no deseadas. En situaciones en las que se desea una clasificación en más de dos grupos, cada grupo puede liberarse en una única pasada, pudiendo realizarse múltiples pasadas.

### 9. Destrucción de muestras biológicas

Un gran número de aplicaciones se beneficia de la capacidad de destruir selectivamente las muestras biológicas. Eliminar los patógenos de la sangre es una de estas aplicaciones. La clasificación de células es otra aplicación. Las células se identifican, uno o más grupos de células se destruyen y después se eliminan las células muertas. La destrucción se lleva a cabo mediante la energía luminosa de los propios láseres y no requiere necesariamente trampas ópticas para llevar a cabo esta función.

Esencialmente, las células se calientan o el medio circundante a las células se calienta con el haz de láser, dañando y destruyendo las células. Las trampas ópticas holográficas, gracias a su versatilidad y su control tridimensional, permiten destruir células de manera selectiva, masiva y en paralelo.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un aparato de clasificación de partículas, que comprende:
- una celda de flujo que presenta un canal de entrada de fluido (300) para introducir una muestra de partículas en un flujo laminar;
- 5 dos canales de salida (302, 303) dispuestos a ambos lados de dicho canal de entrada de fluido (301), siendo adecuados cada uno de dichos dos canales de salida (302, 303) para hacer fluir a través de los mismos una disolución amortiguadora y siendo adecuados cada uno de dichos dos canales de salida (302, 303) para introducir dicha disolución amortiguadora en dichos dos canales de salida (302, 303) a caudales que mantienen un flujo laminar con dicho flujo laminar en dicho canal de entrada de fluido (301);
- 10 una región de clasificación que no tiene ninguna separación mecánica entre dicho canal de entrada de fluido (301) y dichos dos canales de salida (302, 303) y que tiene dichos flujos laminares en la misma;
- un sistema de captura óptica configurado para producir una formación en embudo de trampas ópticas (305) en dicho canal de entrada de fluido cerca de dicha región de clasificación, estando configuradas dichas trampas ópticas (305) para atrapar dichas partículas en dicho canal de entrada de fluido (301) y para separar dichas
- 15 partículas en la región de clasificación;
- en el que dicho sistema de captura óptica incluye una lente de objetivo de alta apertura numérica (304) configurada para implementar dicha formación en embudo de trampas ópticas (305); y
- un sistema de detección configurado para detectar dichas partículas atrapadas para determinar las partículas que van a separarse en dicha región de clasificación.
- 20 2.- El aparato según la reivindicación 1,
- que comprende una rueda giratoria con un conjunto de hologramas estáticos montados en la misma, configurada para establecer el sistema de embudo de un patrón de trampas de baja intensidad (305) y para modificar este patrón en función del patrón de rotación de la rueda.
- 3.- El aparato según la reivindicación 2, configurado de manera que las trampas ópticas en embudo (305) situadas
- 25 en la posición más aguas abajo de dicho canal de entrada de fluido (301) tienen una intensidad y una posición fijas y están configuradas para mantener una separación entre dichas partículas en dicho flujo laminar en dicho canal de entrada de fluido.
- 4.- El aparato según la reivindicación 2, configurado de manera que las trampas ópticas en embudo (305) situadas en una posición aguas arriba de dicho canal de entrada de fluido tienen una intensidad y una posición que pueden modificarse para perturbar un flujo de partículas cuando dichas partículas están aglutinadas y para dejar pasar dichas partículas cuando dichas partículas son partículas individuales o no están aglutinadas.
- 30 5.- El aparato según la reivindicación 1, en el que dicho sistema de detección es uno de entre un sistema de detección de fluorescencia de alta resolución, un sistema de medición de dispersión y un sistema de desviación óptica.
- 6.- El aparato según la reivindicación 1, configurado de manera que el campo de visión de dicha lente de objetivo (304) tiene el mismo ancho que cada uno de dicho canal de entrada de fluido (301) y dichos dos canales de salida (302, 303).
- 7.- El aparato según la reivindicación 1, en el que dicho sistema de captura óptica incluye moduladores espaciales de luz configurados para crear máscaras de fase para hacer funcionar dicho sistema de captura óptica.
- 40 8.- El aparato según la reivindicación 7, configurado de manera que las tasas de actualización de dichos moduladores espaciales de luz son de 30 Hz o más.
- 9.- El aparato según la reivindicación 1, en el que dichas partículas son células.
- 10.- El aparato según la reivindicación 9, en el que dichas partículas son espermatozoides.
- 11.- El aparato según la reivindicación 1, en el que dicho sistema de captura óptica está configurado para atrapar y separar dichas partículas de dicho canal de entrada de fluido hacia cualquiera de dichos canales de salida.
- 45 12.- El aparato según la reivindicación 5, en el que dicho sistema de detección está configurado para analizar dichas partículas y para identificar dichas partículas como partículas deseadas o no deseadas y para dañar o

destruir dichas partículas no deseadas mediante un haz de láser.

13.- El aparato según la reivindicación 10, en el que dicho sistema de detección es un sistema de detección de fluorescencia, que está configurado para detectar la fluorescencia de dichos espermatozoides, con el fin de determinar la carga cromosómica subyacente y que está configurado para identificar los cromosomas X y los cromosomas Y de dichos espermatozoides;

y en el que dicho sistema de captura óptica está configurado para clasificar los espermatozoides que portan el cromosoma X y los espermatozoides que portan el cromosoma Y en dicha región de clasificación.

14.- El aparato según la reivindicación 13, que comprende un colorante que se adhiere específicamente al ADN de manera que la fluorescencia total presente es una medida del ADN total presente.

15.- El aparato según la reivindicación 13, en el que dicho sistema de captura óptica incluye un modulador espacial de luz configurado para crear máscaras de fase para hacer funcionar dicho sistema de captura óptica.

16.- El aparato según la reivindicación 13, configurado para clasificar dichos espermatozoides que portan el cromosoma X y dichos espermatozoides que portan el cromosoma Y a partir de dicho canal de entrada de fluido usando dichas trampas ópticas (305) de dicho sistema de captura óptica, hacia cualquiera de dichos canales de salida.

17.- El aparato según la reivindicación 13, configurado de manera que bien dichos espermatozoides que portan el cromosoma X o bien dichos espermatozoides que portan el cromosoma Y son dañados o destruidos por un haz de láser.

18.- El aparato según la reivindicación 1, en el que dichos dos canales de salida (301, 302) son paralelos a dicho canal de entrada de fluido (301).

19.- Un procedimiento de clasificación de partículas, que comprende las siguientes etapas:

introducir una muestra de partículas en un flujo laminar en un canal de entrada de fluido (301) de una celda de flujo;

introducir una disolución amortiguadora en un flujo laminar en dos canales de salida (302, 303), estando dispuestos dichos canales de salida (302, 303) a ambos lados de dicho canal de entrada de fluido (301), en el que dicha disolución amortiguadora se introduce en dichos canales de salida (302, 303) a caudales que mantienen un flujo laminar con dicho flujo laminar en dicho canal de entrada de fluido;

proporcionar una región de clasificación que no tiene ninguna separación mecánica entre dicho canal de entrada de fluido (301) y dichos canales de salida (302, 303) y que tiene dichos flujos laminares en la misma;

producir una formación en embudo de trampas ópticas (305) en dicho canal de entrada de fluido (301) usando un sistema de captura óptica, en el que dicha formación en embudo de trampas ópticas (305) se implementa mediante una lente de objetivo de alta apertura numérica (304) incluida en dicho sistema de captura óptica;

atrapar dichas partículas en dicho canal de entrada de fluido (301) mediante dicha formación en embudo de trampas ópticas (305);

detectar e identificar dichas partículas usando un sistema de detección para determinar las partículas que van a clasificarse en dicha región de clasificación;

separar dichas partículas en la región de clasificación mediante dicha formación en embudo de trampas ópticas (305).

20.- El procedimiento según la reivindicación 19,

en el que dicha formación en embudo de trampas ópticas se establece mediante un conjunto de hologramas estáticos que están montados en una rueda giratoria de manera que el patrón cambia en función del patrón de rotación de la rueda.

21.- El procedimiento según la reivindicación 19, en el que dichas trampas ópticas (305) ubicadas en la posición más aguas abajo de dicho canal de entrada de fluido (301) tienen una intensidad y una posición fijas y están configuradas para mantener una separación entre dichas partículas en dicho flujo laminar en dicho canal de entrada de fluido (301).

22.- El procedimiento según la reivindicación 19, en el que dichas trampas ópticas (305) situadas en una posición

aguas arriba de dicho canal de entrada de fluido (301) tienen una intensidad y una posición que pueden modificarse para perturbar un flujo de partículas cuando dichas partículas están aglutinadas y para dejar pasar dichas partículas cuando dichas partículas son partículas individuales o no están aglutinadas.

- 5 23.- El procedimiento según la reivindicación 19, en el que dicho sistema de detección es uno de entre un sistema de detección de fluorescencia de alta resolución, un sistema de medición de dispersión y un sistema de desviación óptica.
- 24.- El procedimiento según la reivindicación 19, en el que el campo de visión de dicha lente de objetivo (304) tiene el mismo ancho que cada uno de dicho canal de entrada de fluido (301) y dichos dos canales de salida (302, 303).
- 10 25.- El procedimiento según la reivindicación 19, en el que dicho sistema de captura óptica incluye moduladores espaciales de luz que crean máscaras de fase para hacer funcionar dicho sistema de captura óptica.
- 26.- El procedimiento según la reivindicación 25, en el que las tasas de actualización de dichos moduladores espaciales de luz son de 30 Hz o más.
- 27.- El procedimiento según la reivindicación 26, en el que dichas partículas son células.
- 28.- El procedimiento según la reivindicación 27, en el que las células son espermatozoides.
- 15 29.- El procedimiento según la reivindicación 19, en el que dichas partículas se clasifican usando dichas trampas ópticas (305) de dicho sistema de captura óptica, desde dicho canal de entrada de fluido (301) hasta cualquiera de dichos canales de salida (302, 303).
- 30.- El procedimiento según la reivindicación 19, en el que dichas partículas se identifican como partículas deseadas o no deseadas y dichas partículas no deseadas son dañadas o destruidas por un haz de láser.
- 20 31.- El procedimiento según la reivindicación 19,
- en el que dichas partículas son espermatozoides que portan el cromosoma X y espermatozoides que portan el cromosoma Y que usan un colorante que se adhiere específicamente al ADN;
- en el que dicho sistema de detección es un sistema de detección de fluorescencia que detecta la fluorescencia de dichos espermatozoides con el fin de determinar la carga cromosómica subyacente y que identifica los
- 25 cromosomas X y los cromosomas Y de dichos espermatozoides;
- en el que dichos espermatozoides que portan el cromosoma X y dichos espermatozoides que portan el cromosoma Y se clasifican usando trampas ópticas (305) de dicho sistema de captura óptica, en dicha región de clasificación.
- 32.- El procedimiento según la reivindicación 31, en el que dicho colorante se adhiere específicamente al ADN, de manera que la fluorescencia total presente es una medida del ADN total presente.
- 30 33.- El procedimiento según la reivindicación 31, en el que el caudal de dichos espermatozoides en dicho canal de entrada (301) y el caudal de la disolución amortiguadora en dichos dos canales de salida (302, 303) es el mismo.
- 34.- El procedimiento según la reivindicación 31, en el que el caudal en dicho canal de entrada de fluido (301) y el caudal en dichos dos canales de salida (302, 303) se fijan mediante una distancia de separación predeterminada entre dichos espermatozoides, una tasa de actualización de dicho sistema de captura óptica que lleva a cabo la
- 35 función de separación y mediante un tasa de procesamiento de espermatozoides predeterminada.
- 35.- El procedimiento según la reivindicación 31, en el que el ancho del campo de visión de dicha lente de objetivo de alta apertura numérica es el mismo que el ancho de dicho canal de entrada de fluido y que el ancho de dichos dos canales de salida y una longitud de dicho campo de visión de dicha lente de objetivo de alta apertura numérica depende del caudal en dicho canal de entrada de fluido y dichos dos canales de salida, la profundidad de dicho
- 40 canal de entrada de fluido y dichos dos canales de salida y una tasa de actualización de dicho sistema de captura óptica usado para controlar dichas trampas ópticas.
- 36.- El procedimiento según la reivindicación 31, en el que dicho sistema de captura óptica incluye un modulador espacial de luz que crea máscaras de fase para hacer funcionar dicho sistema de captura óptica.
- 45 37.- El procedimiento según la reivindicación 31, en el que dichos espermatozoides que portan el cromosoma X y dichos espermatozoides que portan el cromosoma Y se clasifican usando dichas trampas ópticas (305) de dicho sistema de captura óptica, desde dicho canal de entrada de fluido (301) hasta cualquiera de dichos canales de salida (302, 303).

38.- El procedimiento según la reivindicación 31, en el que uno de dichos espermatozoides que portan el cromosoma X o dichos espermatozoides que portan el cromosoma Y es dañado o destruido por un haz de láser.

5 39.- El procedimiento según la reivindicación 30, en el que dichas partículas que son dañadas o destruidas por dicho haz de láser son o bien espermatozoides que portan el cromosoma X o bien espermatozoides que portan el cromosoma Y y dicha destrucción produce una muestra que tiene más de dichos otros de dichos espermatozoides que portan el cromosoma X o dichos espermatozoides que portan el cromosoma Y.

40.- El procedimiento según la reivindicación 38, en el que dicho daño o destrucción mediante dicho haz de láser produce una muestra que tiene más de dichos otros de dichos espermatozoides que portan el cromosoma X o dichos espermatozoides que portan el cromosoma Y.

10

FIG. 1

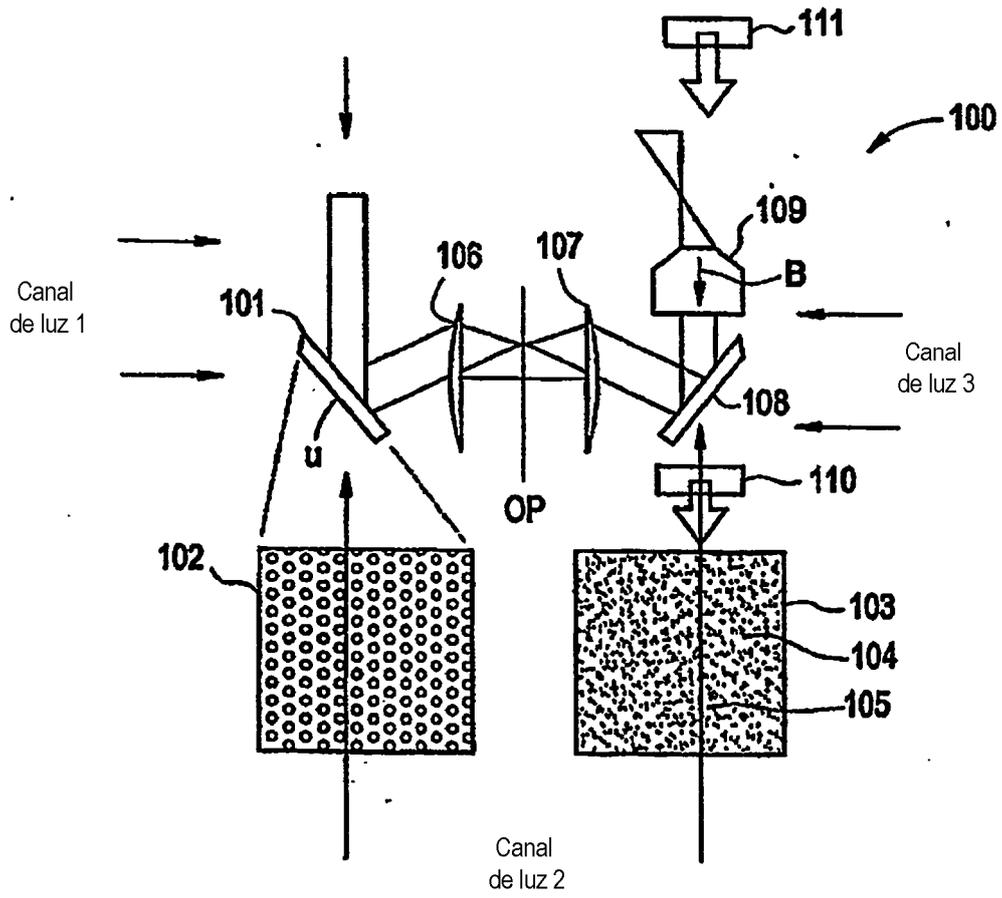


FIG. 2A

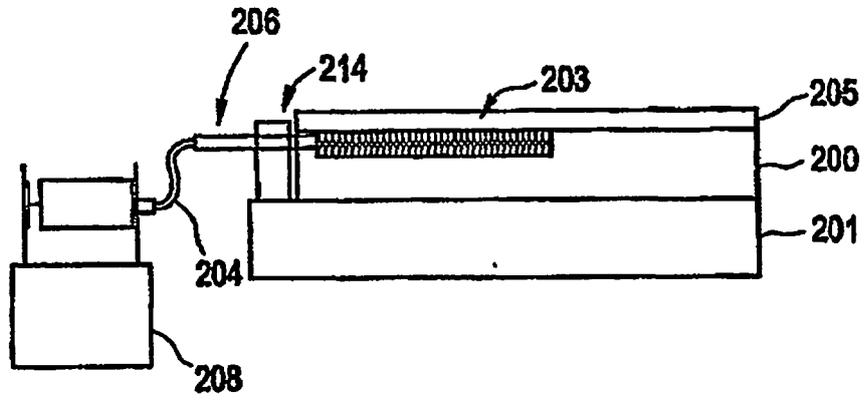


FIG. 2B

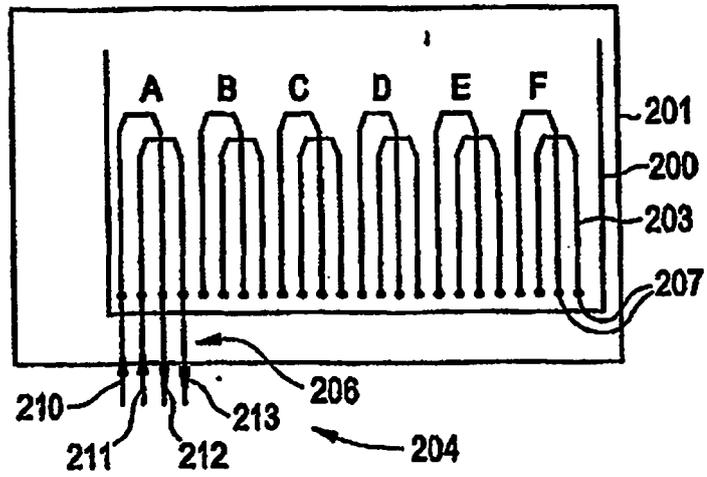


FIG. 3

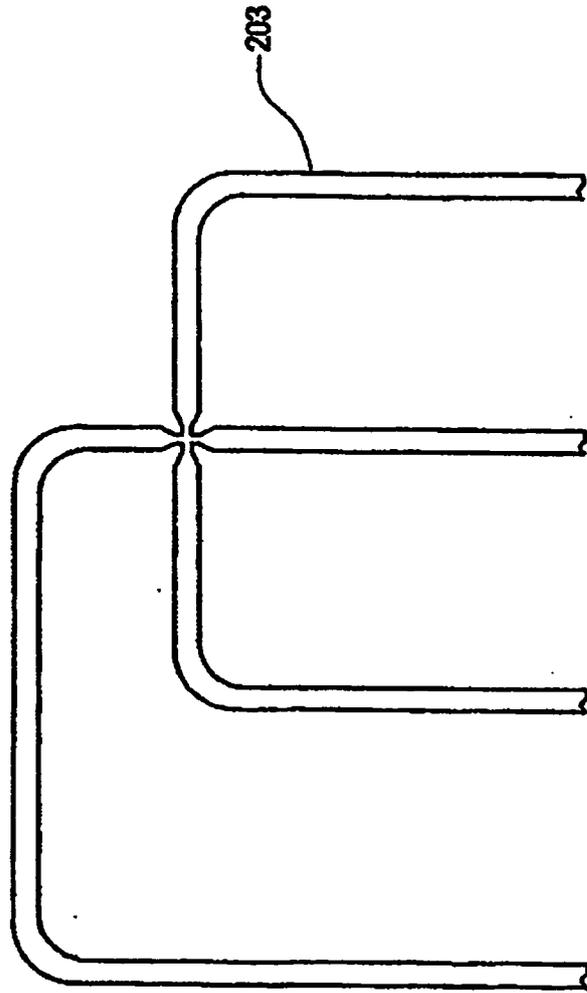


FIG. 4

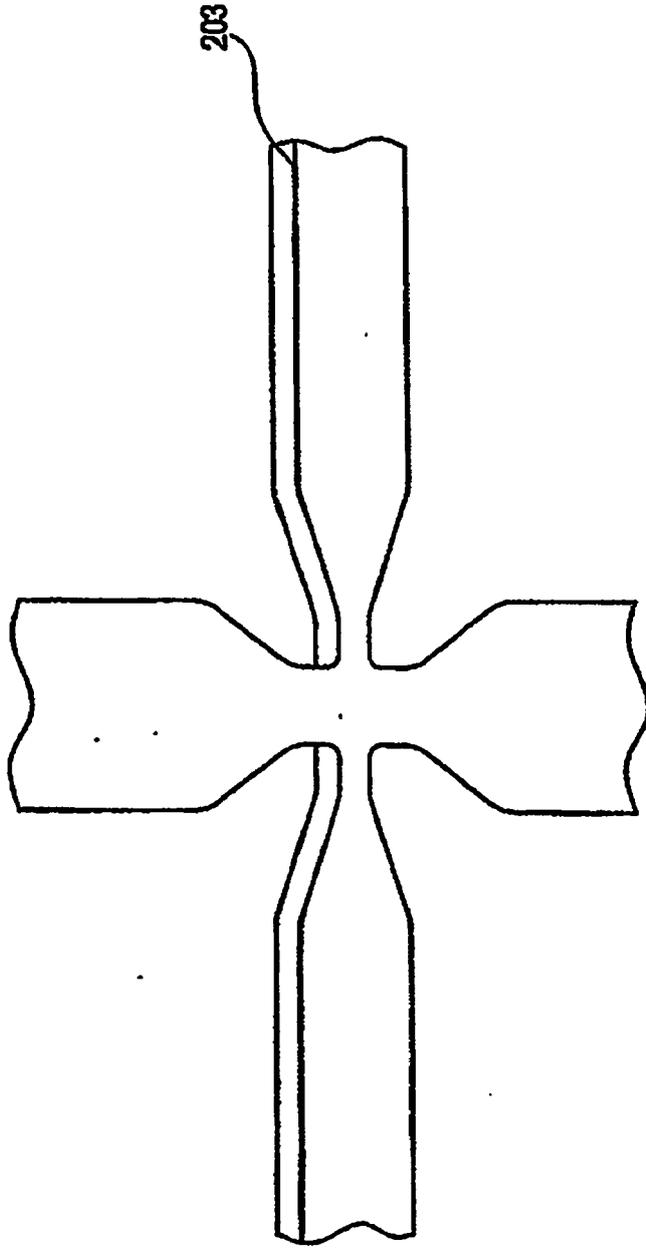


FIG. 5

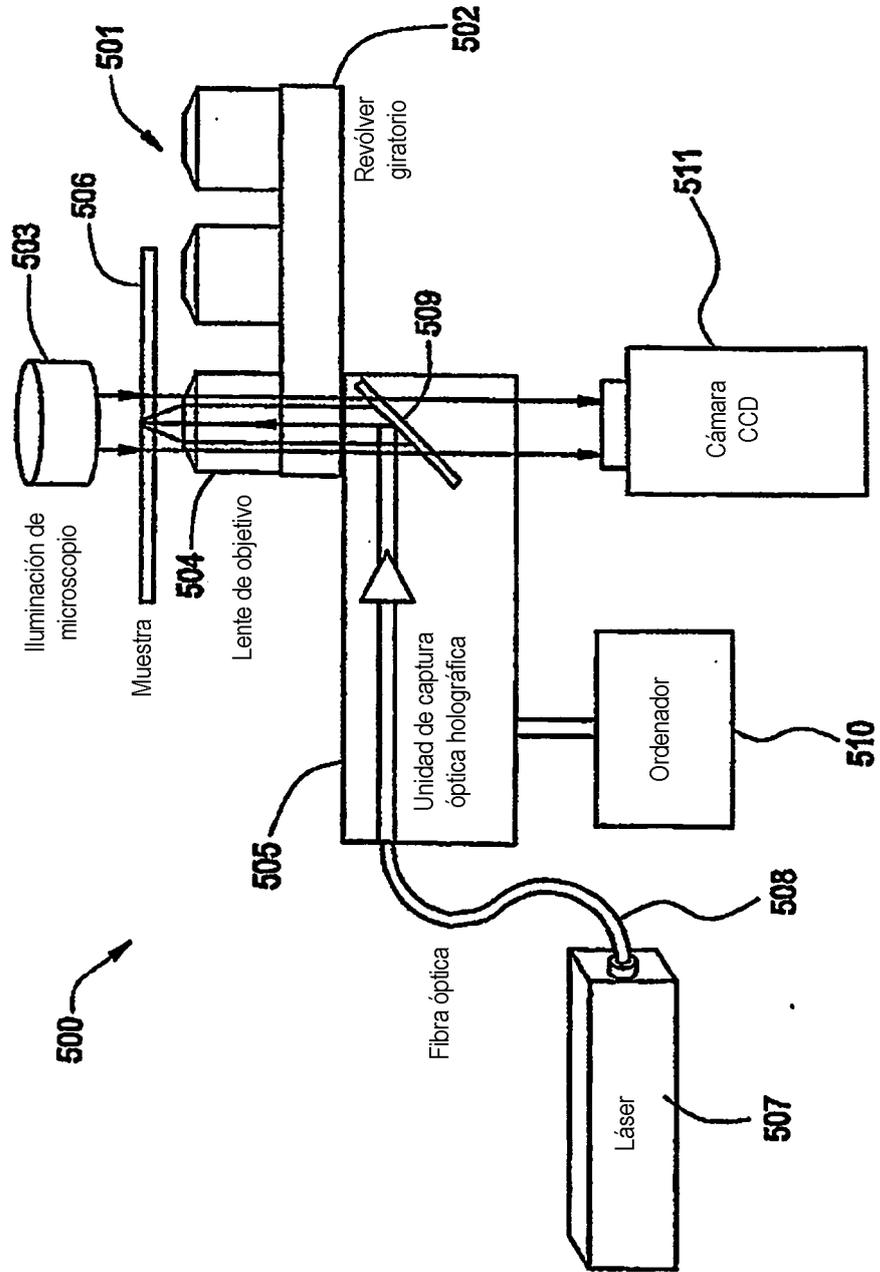


FIG. 6

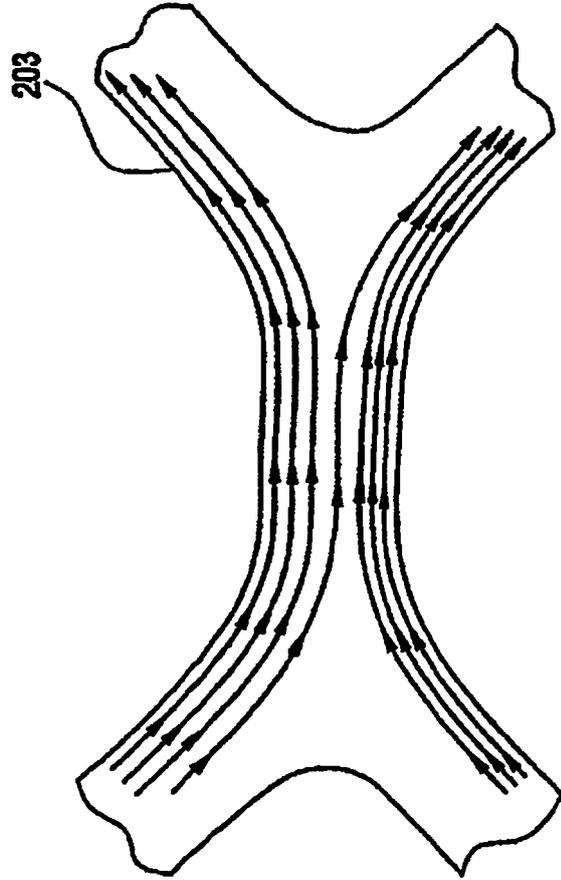


FIG. 7B

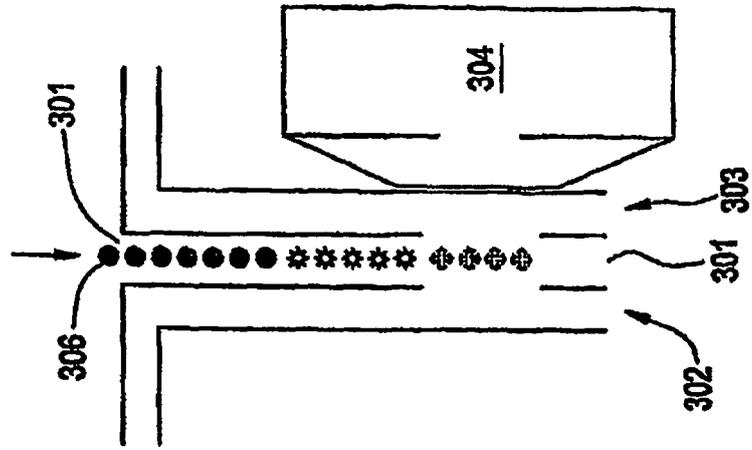


FIG. 7A

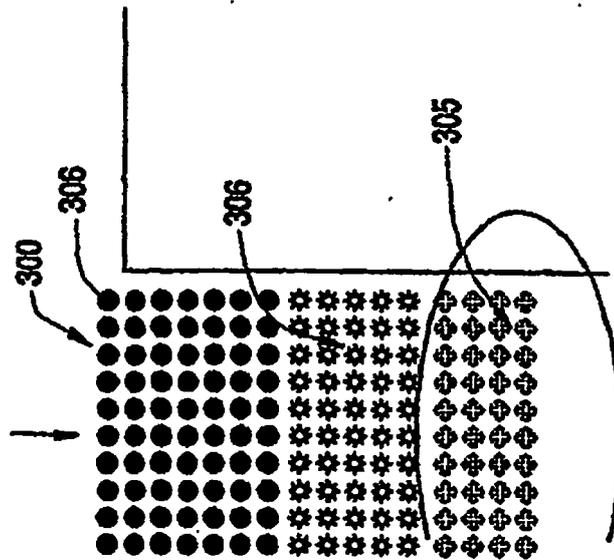


FIG. 8

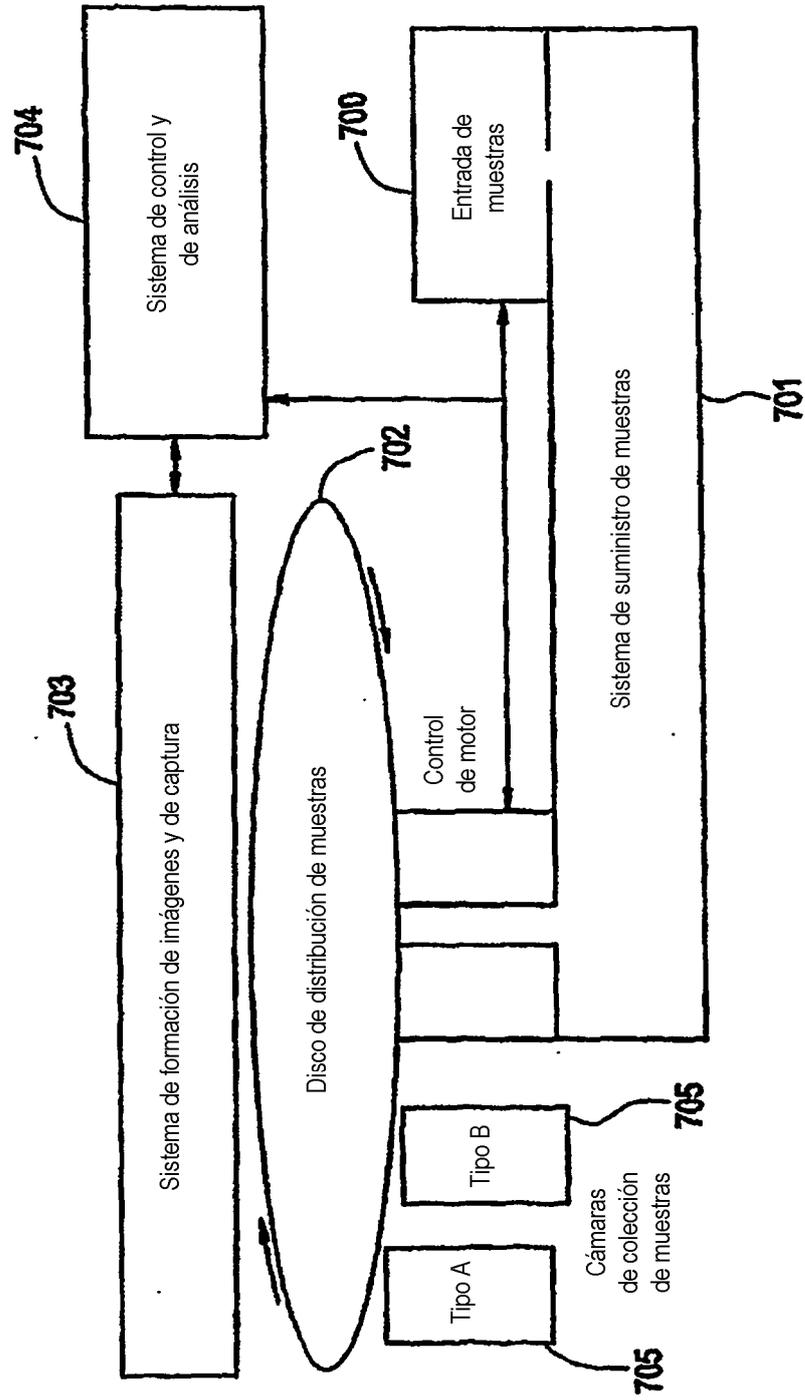


FIG. 9

