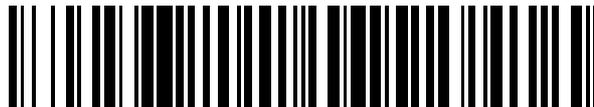


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 430**

51 Int. Cl.:

G21K 1/00 (2006.01)

G01N 1/10 (2006.01)

G02B 21/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2007 E 07823909 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2064708**

54 Título: **Clasificación óptica**

30 Prioridad:

21.09.2006 GB 0618606

15.01.2007 GB 0700738

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

20.02.2015

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY
OF ST. ANDREWS (100.0%)
COLLEGE GATE, NORTH STREET
ST. ANDREWS, FIFE KY16 9AJ, GB**

72 Inventor/es:

**MACDONALD, MICHAEL;
DHOLAKIA, KISHAN;
RHODES, DANIEL y
MILNE, GRAHAM**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 529 430 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

Clasificación óptica

5 La presente invención se refiere a clasificación óptica o separación de partículas y, en particular, células.

Antecedentes de la invención

10 Existen muchos esquemas de clasificación o separación de partículas, que varían desde electroforesis en gel, electroforesis capilar y centrifugación analítica hasta las novedosas barreras entrópicas. Los ejemplos de estos se describen en J. Han, H. G. Craighead, *Science* 288, 1026-1029 (12 de mayo de 2000) y D. Nykypanchuk, H. H. Strey, D. A. Hoagland, *Science* 297, 987-990 (9 de agosto de 2002). La mayoría de estas técnicas conocidas separan una mezcla polidispersa en un fluido que fluye en bandas que contienen partículas que se desplazan a diferentes velocidades a lo largo de la dirección de flujo. Esto normalmente conduce a un procesamiento discontinuo. En la electroforesis se utiliza un gel para obtener una movilidad dependiente del tamaño. La recuperación de fracciones se consigue mediante el post-procesamiento del gel. Sin embargo, a pesar de su amplio uso y eficacia esta metodología es lenta y es importante destacar que, debido a tamaños de poro limitados, tiene dificultad a la hora de separar objetos a nivel de tamaño microscópico por ejemplo células, cromosomas y materia coloidal.

20 Se usan también geles artificiales asimétricos bidimensionales fabricados litográficamente. Los ejemplos de estos se describen en los artículos de D. Ertas, *Physical Review Letters* 80, 1548-1551 (6 de febrero de 1998); T. A. I Duke, R. H. Austin, *Physical Review Letters* 80, 1552-1555 (16 de febrero de 1998) y C. F. Chou et al., *Biophysical Journal* 83, 2170- 2179 (octubre 2002). Estos geles producen la separación transversal respecto a la dirección de flujo. Debido a esto, pueden funcionar de forma continua, captándose diversas fracciones mediante los diferentes canales de recogida. Sin embargo, la clasificación basada en difusión resulta poco práctica por su lentitud a escala microscópica y superior.

30 Los últimos años han presenciado un gran crecimiento en la exploración del movimiento de partículas en escenarios ópticos. Un ejemplo de esto se describe en el artículo "Kinetically Locked-in Colloidal Transport in an Array of Optical Tweezers" de P. T. Korda et al, *Physical Review Letters* 89, número 12, Art. No. 128301 (16 de septiembre de 2002). En este caso, se deja que una mono-capa de esferas coloidales fluya a través de una serie de trampas ópticas discretas. Variando la orientación de la red de trampas se mostró que la dirección de flujo de las esferas podía variar. Debido a esto, se sugirió que la red podía usarse para fraccionar continuamente partículas mesoscópicas. Sin embargo, debido al uso de una red de trampas discretas localizadas, la canalización bloqueada cinéticamente observada a lo largo de vectores de red de bajo índice se limitaba intrínsecamente a desviaciones de ángulo pequeño. En la práctica, esto limita la capacidad práctica de la red para su uso en clasificación.

40 El documento PCT/GB2004/001993 describe otro esquema de clasificación óptica. En este, se usan redes ópticas tridimensionales para clasificar y fraccionar material biológico y coloidal en un fluido micro-fluídico. Diferentes partículas fluyen en diferentes trayectorias a través del escenario y, en consecuencia, salen en diferentes puntos. La selectividad y base de esta forma de clasificación es la afinidad de una partícula dada a los elementos del escenario óptico. Esto se describe también en M. MacDonald, G. Spalding y K. Dholakia, en *Nature* 426, 421 (2003), y por A. M. Lacasta, et al., en *Physical Review Letters* (2005), 94, 188902. Incluso en ausencia de flujo de fluidos pueden usarse patrones ópticos periódicos para clasificación, véase por ejemplo L. Paterson, et al., *Applied Physics Letters* (2005), 87, 123901. La clasificación o manipulación de partículas se describe también por ejemplo en los documentos US2005/0247866, WO03/062867, WO2006/032844, US2003/0111594, WO2005/054818 y JPH05026799.

50 Hasta la fecha se ha realizado la clasificación óptica usando métodos holográficos e interferométricos. Ambos tienen inconvenientes. Los sistemas interferométricos requieren componentes de división de rayo especializados y no reconfigurables. Los moduladores de luz espaciales y las técnicas holográficas ofrecen la posibilidad de cambiar los patrones de luz pero son de una calidad y eficiencia de rayo relativamente pobre. Asimismo, los moduladores de luz espaciales y muchos hologramas no pueden manipular altas potencias de láser y se requieren algoritmos complejos para patrones de luz 3D de buena calidad. También tienen tasas de refresco muy lentas, lo que limita su uso en entornos dinámicos. Ambos tienen limitaciones en la fuerza que puede aplicarse a las micro-partículas, debido a que la variación temporal del campo de luz no puede usarse fácilmente para potenciar la separación óptica.

Sumario de la invención

60 La invención se define en las reivindicaciones independientes adjuntas.

Algunas características preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes.

65 Usando un dispositivo acusto-óptico, el escenario óptico puede modificarse muy rápido en el tiempo, lo que significa que la clasificación óptica puede reconfigurarse fácilmente para diferentes aplicaciones. Esto tiene ventajas prácticas

significativas, por ejemplo para aplicaciones de laboratorio en chip.

Los dispositivos acusto-ópticos permiten que la potencia, la frecuencia o la dirección espacial de un rayo láser se controle con una señal eléctrica usando el efecto acusto-óptico, es decir, la modificación del índice de refracción mediante la presión mecánica de oscilación de una onda sonora. El elemento clave de un dispositivo acusto-óptico es un cristal transparente o pieza de vidrio a través de la cual se propaga la luz. Fijado al cristal hay un transductor piezoeléctrico que se usa para excitar una onda sonora de alta frecuencia, normalmente con una frecuencia del orden de 100 MHz.

La luz que pasa a través de un cristal acusto-óptico experimenta difracción de Bragg en una rejilla de índice de refracción periódico generada por la onda sonora. El rayo óptico dispersado tiene una frecuencia óptica ligeramente modificada y una dirección ligeramente diferente. La frecuencia y dirección del rayo dispersado puede controlarse mediante la frecuencia de la onda sonora, mientras que la potencia acústica permite que la potencia óptica se controle rápidamente. Para una potencia acústica suficientemente alta, más del 50 % de la potencia óptica puede difractarse en un eje. La rápida velocidad de refresco de este sistema significa que su uso en clasificación óptica permite que el escenario óptico se reconfigure rápida y dinámicamente, incluso a potencias relativamente altas.

Se hace que fluya el fluido en el que están suspendidas las partículas. En este caso, el escenario o patrón óptico puede tener una fuerza en gradiente que actúa con o contra el flujo de fluidos. Cuando se opone al flujo, la clasificación ocurre debido al equilibrio selectivo entre cada una de las especies que se están clasificando, ocurriendo el equilibrio a diferentes valores de potencia y/o flujo debido a las diferentes propiedades físicas de cada especie de la muestra.

Breve descripción de los dibujos

Se describirán ahora diversos aspectos de la invención a modo de ejemplo únicamente y con referencia a los dibujos adjuntos, de los cuales:

La Figura 1 es un diagrama de bloques de un sistema óptico para generar un escenario óptico para clasificar partículas;

La Figura 2(a) es una imagen de un escenario óptico que se usó para clasificar partículas de tres tamaños diferentes;

La Figura 2(b) muestra partículas rastreadas dentro del escenario de la Figura 2(a);

La Figura 3(a) es una imagen de otro escenario óptico que se usó para clasificar cuatro tamaños de partícula diferentes pero sin ninguna discreción (es decir, huecos) a lo largo de la trayectoria de salida del escenario;

La Figura 3(b) es una imagen de un escenario óptico (encarte) que se usó para clasificar tres tamaños de partícula diferentes en flujos laminares paralelos separados con huecos discretos en la trayectoria de salida, donde se muestran las trayectorias de las partículas atrapadas; y

La Figura 4 es una imagen de un escenario óptico (encarte) que se usó para clasificar cuatro tamaños de partícula diferentes en flujos laminares paralelos separados con huecos discretos en la trayectoria de salida, donde se muestran las trayectorias de las partículas atrapadas.

Descripción detallada de los dibujos

La invención proporciona la clasificación de partículas en un fluido usando un escenario óptico generado por un dispositivo acusto-óptico. El escenario óptico puede tener un potencial que varía gradualmente en una dirección o dimensión predeterminada. Para crear el escenario óptico puede usarse una disposición de atrapamiento o pinzamiento óptico en la que se genera la luz mediante un dispositivo acusto-óptico.

La Figura 1 muestra el despliegue de un sistema de atrapamiento o pinzamiento óptico típico que puede usarse de acuerdo con la presente invención. Este tiene un láser con una óptica expansora y colimadora del rayo en su salida. La salida de luz de la óptica colimadora se dirige sobre un sistema acusto-óptico de doble eje como por ejemplo el sistema proporcionado por NEOS, EE.UU. o Inter-action, EE.UU. Este tiene dos cristales acusto-ópticos consecutivos o en una unidad para permitir la traslación del rayo en ambas direcciones x e y.

El sistema de doble eje funciona para producir un rayo óptico y explora la trama en ambas dimensiones x e y. La exploración del rayo se controla usando un programa LabVIEW y dos tensiones CC variables generadas por una tarjeta National Instruments DAQ (MI0-16E-4). El programa toma como entrada un mapa de bits de escala de grises de nivel 256 convencional como una representación de la distribución óptica deseada. La imagen 2D se procesa después en dos formas de onda que se alimentan a la tarjeta DAQ. Estas formas de onda contienen la información posicional para los componentes x e y del dispositivo acusto-óptico respectivamente.

El sistema acusto-óptico se coloca en un punto conjugado con la abertura trasera de un objetivo de microscopio de inmersión de aceite 100x NA=1,25. La luz del sistema acusto-óptico pasa a través de la lente conjugada C1 y la lente conjugada C2 y sobre la lente del objetivo del microscopio, donde se dirige hacia la fase de muestra. Se proporciona una cámara CCD para capturar imágenes del escenario óptico y la muestra.

Para crear escenarios ópticos para clasificación de partículas, se usó un láser de fibra de itrio de 1070 nm (Láser IPG) con un rayo de salida de 5 mm de diámetro y un ancho de banda de 5 GHz. Se midió que la potencia en el rayo después del dispositivo acusto-óptico era del orden de 400 mW, aunque 100 mW normalmente serían suficientes. Se hizo que el dispositivo acusto-óptico explorara el escenario óptico deseado como se define en el programa LabVIEW. Las observaciones de la dinámica coloidal y la dispersión de luz se realizaron a través del mismo objetivo para atrapamiento y clasificación, y se empleó iluminación con luz blanca desde abajo usando la fuente de luz blanca de alta potencia. Se determinaron las trayectorias de partículas sobre una región del escenario creado. Las partículas se siguieron a tasas de fotograma de video convencionales (25 fotogramas/s) y las trayectorias se mapearon con el software LabView™ usando un algoritmo de ajuste de patrón.

Para la clasificación, el escenario óptico tiene que variar al menos en una dirección. En los experimentos para ensayar la eficacia del dispositivo acusto-óptico, se definieron múltiples niveles de escala de grises en una imagen láser de exploración de trama, teniendo cada nivel un potencial óptico diferente. Para conseguir esto, el láser se pausó en cada "pixel" durante una cantidad de tiempo variable. La longitud de la pausa se determinó por el brillo del pixel correspondiente en la imagen de entrada original. La velocidad a la que se repite la imagen puede seleccionarla el usuario. Para los experimentos descritos en lo sucesivo en este documento las imágenes se exploraron a 100 Hz. La escala espacial de la imagen en el plano de la muestra se eligió de manera que el desplazamiento de los píxeles adyacentes fuera menor que el diámetro del rayo de exploración (2,5 μm). Esto permitió la generación de un escenario óptico integrado en el tiempo eficazmente continuo en lugar de una serie de sitios de atrapamiento discretos.

Una consideración importante es un efecto temporal debido a la acción de la exploración de trama sobre la partícula. Se observaron partículas de alto índice que se movían a lo largo de la dirección de la exploración. En una exploración de trama 2D, las partículas se movían a lo largo de una diagonal en el plano de la imagen aplicada. En general, la deriva de la partícula debido a este efecto de exploración puede dominar el comportamiento generado por el gradiente de intensidad local del patrón aplicado. Para estudiar el comportamiento de la partícula libre de tales efectos de variación en el tiempo, este dispositivo de exploración puede retirarse. Por ejemplo, puesto que surge el efecto temporal debido a la naturaleza secuencial y direccional de la exploración de trama, una opción es aleatorizar el orden en el que los píxeles son estirados por el láser. Otra opción es aplicar pequeños cambios secuenciales a la señal de la unidad AOD. Esto puede conseguirse haciendo funcionar el explorador de trama a la inversa en cada segundo fotograma. Se observó que este proceso suprimía el comportamiento de las partículas asociado con la exploración, de manera que podía estudiarse el comportamiento de las partículas debido al escenario óptico integrado en el tiempo aplicado.

La Figura 2 muestra un patrón óptico de exploración para clasificar una mezcla polidispersa de esferas de sílice suspendidas en agua desionizada, teniendo las esferas tres tamaños diferentes: 2,47 μm , 3,01 μm y 5,08 μm . El escenario tiene una línea diagonal de brillo uniforme a la derecha del patrón que actúa como un embudo óptico para canalizar la mezcla coloidal polidispersa en una corriente de partículas individuales o dobles casi uniforme de aproximadamente 2 μm de anchura. A la izquierda del embudo óptico hay una rampa de salida que consiste en un elemento lineal de intensidad variable. Esto guía a la corriente de partículas a través del flujo. Esto tiene una intensidad óptica gradual no periódica con distintas zonas de intensidad decreciente a lo largo de su longitud. La ausencia de periodicidad permite que objetos de diferente tamaño/índice de refracción salgan del patrón de luz en diferentes puntos. El flujo de fluidos puede variarse normalmente a velocidades de 0-100 $\mu\text{m/s}$ de derecha a izquierda en la Figura 2. Mientras atraviesan la rampa de salida, las esferas experimentan una fuerza de arrastre hidrodinámico que tira de ellas hacia la izquierda. Para una aproximación razonable, esta fuerza es linealmente proporcional al radio de la partícula. En el patrón, las esferas experimentan una fuerza de atrapamiento óptico que es proporcional al cubo del radio de la partícula. Como resultado, es probable que las partículas más pequeñas se dirijan fuera del primer escenario óptico.

La Figura 2 muestra los resultados de clasificación conseguidos usando el embudo y el escenario óptico con rampa de salida. Cuando la corriente de partículas desde el embudo óptico era incidente sobre la línea de intensidad graduada cada partícula interactuaba de forma diferente con el potencial óptico. Posteriormente, cada esfera se movía a lo largo de la línea graduada a una extensión diferente dependiendo de su tamaño y salía por la línea en un punto diferente. La Figura 2 muestra trayectorias rastreadas para las tres partículas que mostraban el comportamiento de la partícula. Los cálculos verifican que los objetos también pueden clasificarse basándose en el índice de refracción de una forma similar. En el campo óptico de la Figura 2 las partículas más pequeñas (2,47 μm) salen primero, mientras que las partículas más grandes continúan más tiempo a lo largo de la rampa.

Para mejorar la definición de dónde las partículas salen de la rampa, se insertaron huecos discretos de tamaño creciente entre las regiones de intensidad constante. El tamaño de cada puerto de salida se selecciona para adaptarse al tamaño de las partículas al nivel pertinente de intensidad. Como se muestra, cada puerto está situado en una unión entre diferentes regiones de clasificación de partículas. Estos puertos producen corrientes de salida de partículas muy localizadas, como se muestra en la Figura 3. Si se evitan las colisiones e interacciones entre partículas, lo que puede evitarse manteniendo la densidad de partículas suficientemente baja, puede conseguirse una eficacia de clasificación cercana al 100 %.

La Figura 4 muestra más resultados obtenidos usando el mismo patrón óptico que el de la Figura 3, pero en este caso con una mezcla que contiene cuatro tamaños diferentes de microesferas de sílice, siendo estas de 2,3 μm , 3,0 μm , 5,17 μm y 6,84 μm . De nuevo, si se evitan las colisiones e interacciones entre partículas, lo que puede evitarse manteniendo la densidad de partículas suficientemente baja, puede conseguirse una eficacia de clasificación cercana al 100 %.

En los ejemplos anteriores, se retiraron los efectos temporales de la velocidad de exploración, y las partículas clasificadas mediante la rampa de salida se alejaron de esta mediante el flujo de fluido en la cámara de muestra. Sin embargo, puede usarse la dirección de exploración para potenciar las características de clasificación. Por ejemplo, si se hace que el rayo láser se contra-propague contra el flujo, la fuerza sobre las partículas se potencia, de manera que la sensibilidad de la clasificación aumenta. En algunas circunstancias, el ajuste de la velocidad de exploración del sistema acusto-óptico permite que las partículas se clasifiquen. Por ejemplo, la velocidad de exploración podría ajustarse para que las partículas más grandes se atrapen y arrastren fuera del flujo dentro del escenario de clasificación, mientras que puede permitirse que los objetos más pequeños se difundan. En este caso, la velocidad de exploración del dispositivo debe superar el tiempo de difusión de partícula de las partículas debido al movimiento browniano.

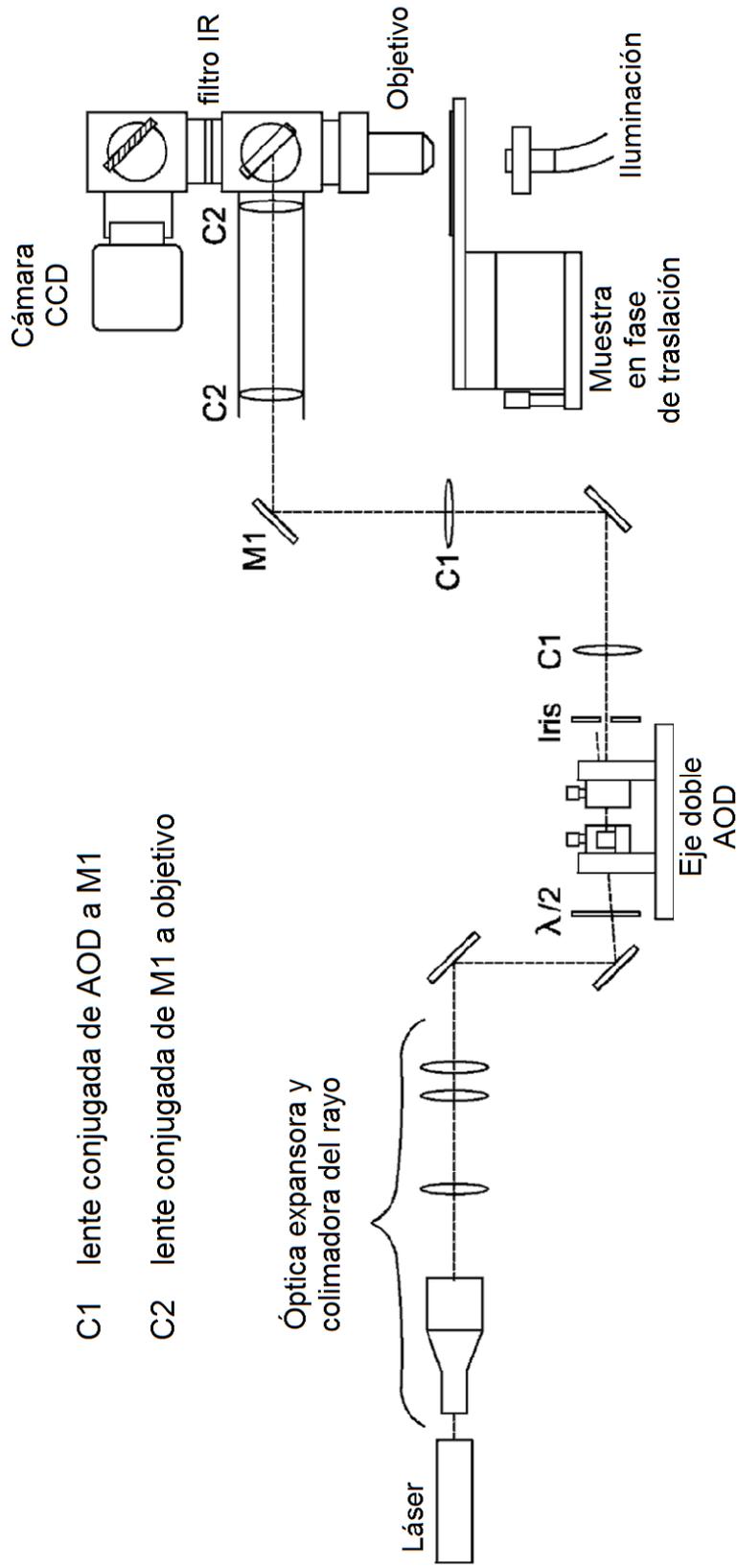
La presente invención permite la clasificación de una mezcla polidispersa de partículas en un escenario óptico potencial creado usando un modulador acusto-óptico de doble eje. El uso de un dispositivo reconfigurable tal como un dispositivo acusto-óptico permite una rápida y fácil modificación del escenario. La inclusión de huecos personalizados en la rampa de salida conduce a unas corrientes de salida laminares paralelas altamente localizadas para los diferentes tamaños de partícula.

Debido a que el patrón y, por tanto, la funcionalidad del dispositivo en el que se realiza la invención pueden cambiarse en tiempo real, esto abre la posibilidad de retroalimentar información al sistema y cambiar dinámicamente el escenario óptico en respuesta a la retroalimentación, lo que implica inteligencia de sistemas. Por ejemplo, una muestra puede cargarse en un chip para análisis y las partículas clasificarse. Después, dependiendo de los resultados de clasificación iniciales, puede decirse que el chip se auto-reconfigure para realizar una nueva tarea. De esta manera, se proporciona un sistema de ensayo inteligente que podría programarse a través de una forma de pseudocódigo. Un ejemplo específico podría ser: introducir las células; enriquecer para una especie de célula; recircular hasta un clasificador óptico reconfigurado que clasifica ciertas especies de células; si el analito clasificado produce principalmente especies A entonces realizar la tarea 1 para análisis adicional; si el producto es principalmente B entonces realizar la tarea 2; según el resultado de la tarea 1 o la tarea 2 decidir realizar un proceso de enriquecimiento/clasificación adicional o retirar a la cámara de extracción. Después puede hacerse un diagnóstico o las células están listas para un trabajado adicional.

Un experto en la materia apreciará que son posibles variaciones de las disposiciones desveladas sin alejarse de la invención. Por ejemplo, aunque se describe la intensidad del escenario óptico en cada píxel, determinada por el tiempo que el rayo láser está pausado, los niveles de intensidad en principio podrían controlarse por la inclusión de un modulador de amplitud de alta velocidad tal como una célula Pockels en el tren óptico, programada para funcionar en sincronización con el dispositivo acusto-óptico. Como alternativa, podría usarse un dispositivo acusto-óptico que puede modular la potencia del rayo transmitido. Asimismo, aunque la invención ha descrito también fundamentalmente con referencia a clasificación según el tamaño de partícula, podría usarse igualmente para clasificación según el índice de refracción o la forma de las partículas. Por consiguiente, la descripción anterior de la realización específica se realiza a modo de ejemplo únicamente y no con el fin de limitación. Queda claro para el experto que pueden hacerse modificaciones minoritarias sin cambios significativos en la operación descrita.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para clasificar partículas en un fluido que comprende: generar un escenario óptico y hacer fluir el fluido a través del escenario óptico, en donde el escenario óptico comprende un túnel óptico y una rampa de salida que tiene una línea de intensidad graduada, en donde el embudo óptico se proporciona para dirigir las partículas hacia la línea de intensidad graduada y la línea de intensidad graduada tiene una intensidad óptica graduada no periódica con distintas zonas de intensidad decreciente a lo largo de su longitud que guían a las partículas a través del flujo de fluido y permiten que las partículas de diferentes tamaños o índices de refracción o formas salgan en diferentes posiciones, clasificando de esta manera las partículas en el flujo de fluido.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la línea de intensidad graduada tiene una intensidad óptica graduada que varía gradualmente en una dirección o dimensión predeterminadas.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que intensidad óptica graduada de la línea de intensidad graduada varía discontinuamente o en etapas.
- 20 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que se forma al menos un hueco en la línea de intensidad graduada, para proporcionar así uno o más puertos de salida para las partículas clasificadas.
- 25 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 en el que se forman múltiples puertos de salida y los puertos de salida varían de tamaño, para permitir así un tamaño o un índice de refracción o una forma diferentes de las partículas que pasan a través de los mismos.
- 30 6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el embudo óptico se dimensiona para proporcionar una corriente de partículas individuales o dobles.
7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el escenario óptico se genera usando un dispositivo acusto-óptico.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7 que comprende: seleccionar una velocidad de exploración del dispositivo acusto-óptico para mover las partículas a través del escenario de clasificación óptica.



C1 lente conjugada de AOD a M1

C2 lente conjugada de M1 a objetivo

Figura 1

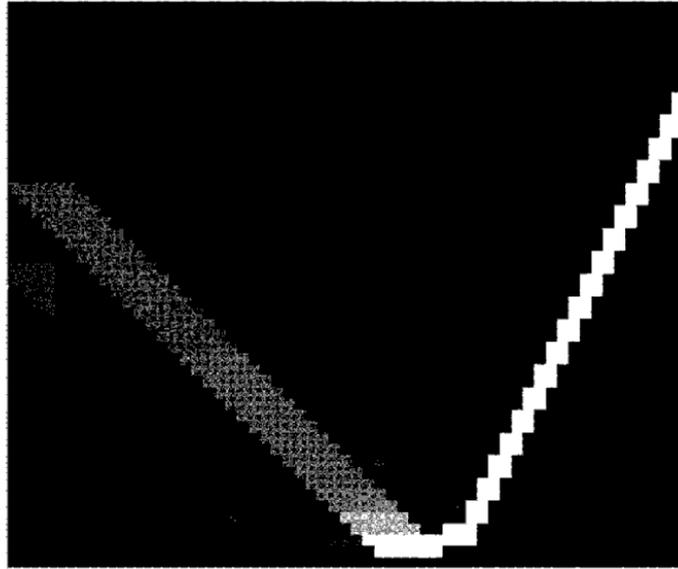


Figura 2a

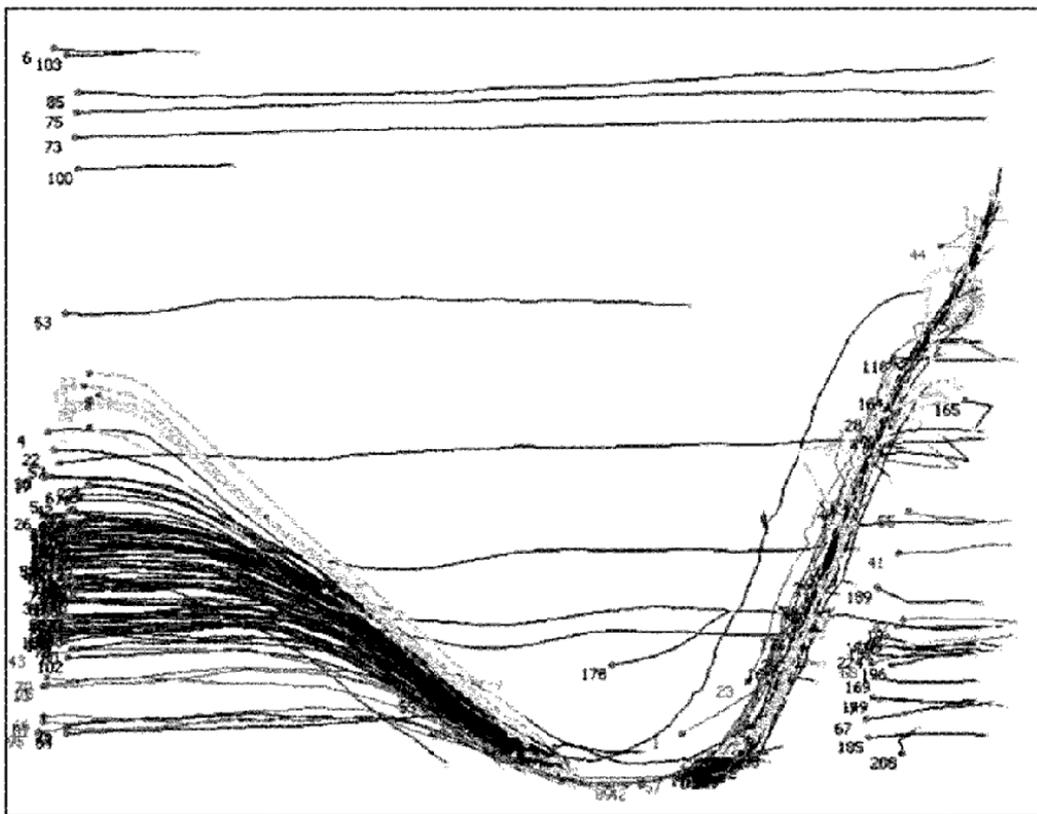


Figura 2b

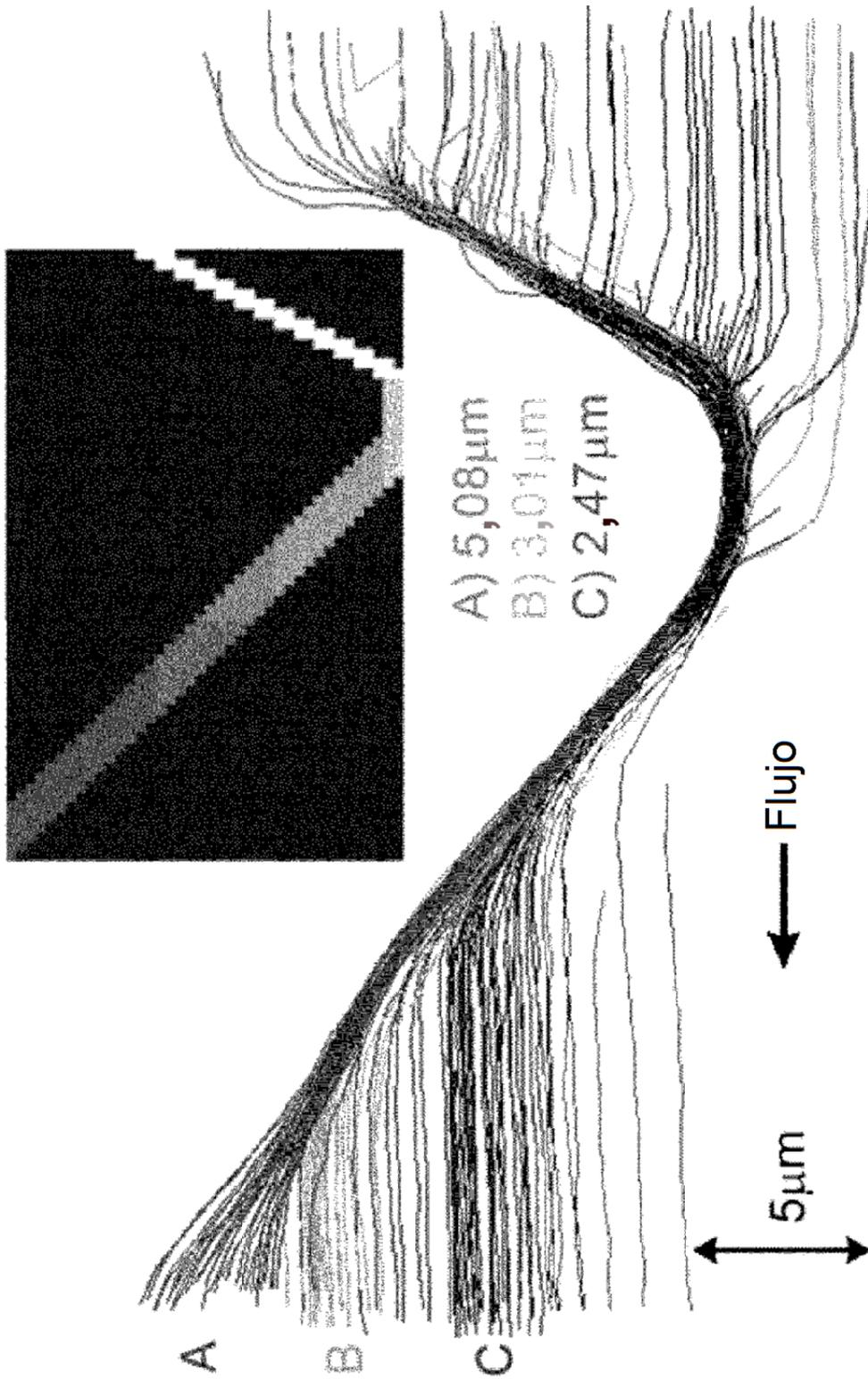


Figura 3 (a)

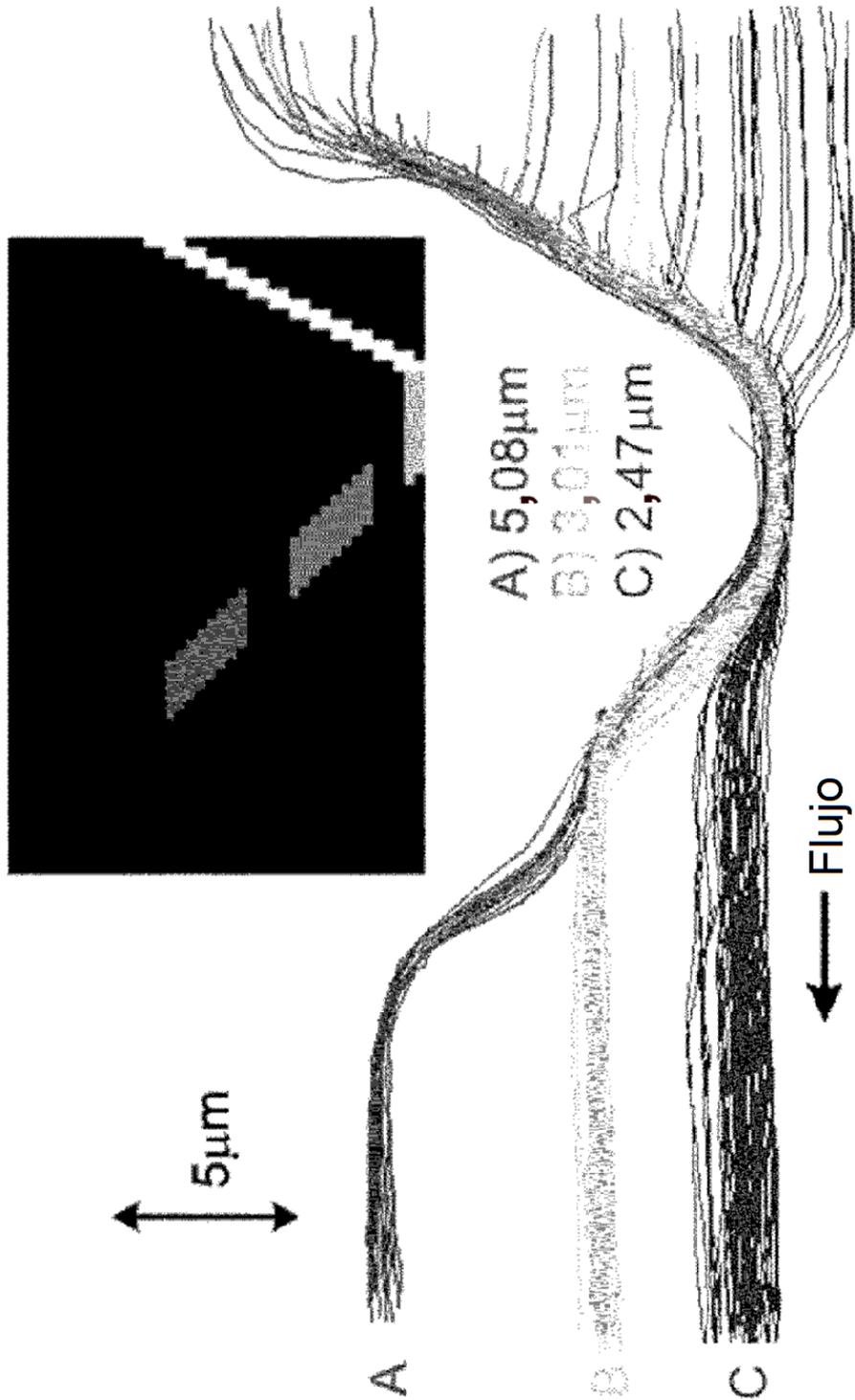


Figura 3 (b)

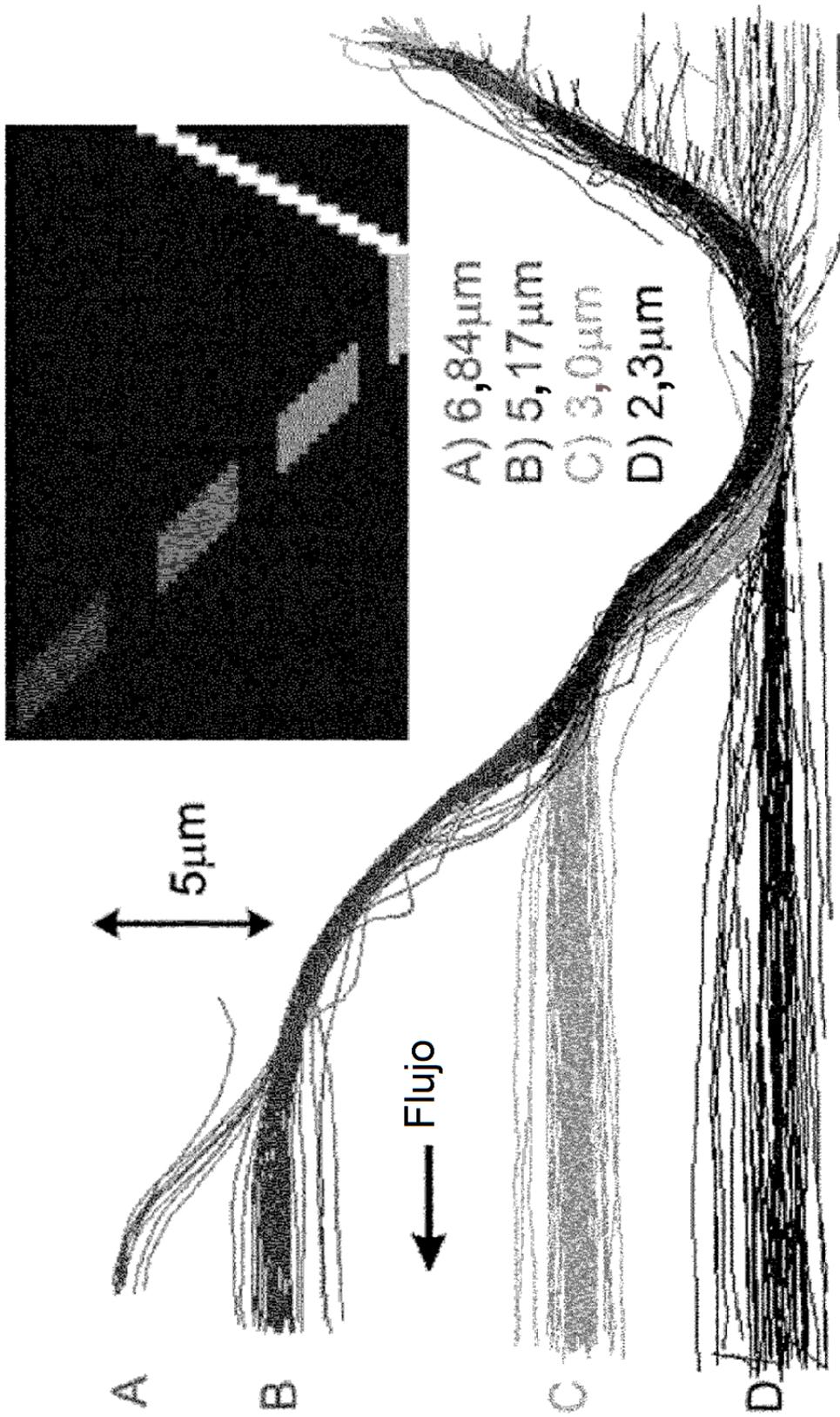


Figura 4