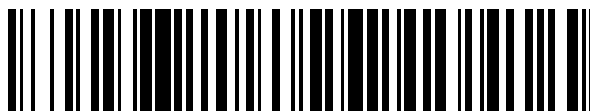


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 163**

51 Int. Cl.:

**G02B 27/14** (2006.01)

**G01N 15/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2007 PCT/US2007/004836**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2007 WO07100723**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2007 E 07751588 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 1987389**

54 Título: **Sistema óptico para un citómetro de flujo**

30 Prioridad:

**22.02.2006 US 776125 P**

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

**19.10.2017**

73 Titular/es:

**ACCURI INSTRUMENTS INC (100.0%)  
173 PARKLAND PLAZA  
ANN ARBOR, MI 48103, US**

72 Inventor/es:

**RICH, COLLIN, A.;  
FISHER, RICHARD, L. y  
BAIR, NATHANIEL, C.**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 638 163 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 óptico para un citómetro de flujo.

- 5 La presente invención se refiere en general al campo de citómetros de flujo y, más específicamente, a un sistema óptico nuevo y útil en el campo de citometría de flujo.

**Antecedentes**

- 10 El sistema óptico convencional para citómetros de flujo incluye una lente colectora para recoger luz procedente de la zona de interrogación, divisores de haz para dividir la luz en diferentes canales sobre la base de la longitud de onda y varios subsistemas detectores con filtros para dejar pasar solamente longitudes de onda particulares (tales como, 515-545 nm, 564-606 nm y 653-669 nm).

- 15 Para utilizar el sistema óptico convencional, los divisores de haz y los filtros deben disponerse en un orden muy particular (orden monótonamente creciente o decreciente). Por ejemplo, un primer divisor de haz debe dividir entre las dos bandas de frecuencia inferiores, un primer subsistema detector debe filtrar entre la banda de frecuencia más inferior, un segundo divisor de haz debe dividir entre las dos bandas de frecuencia superiores, un segundo subsistema detector debe filtrar entre las bandas de frecuencia medias, y un tercer subsistema detector debe filtrar entre las bandas de frecuencia más altas. Para cambiar la detección de longitud de onda del sistema óptico convencional (por ejemplo, para sustituir la banda de frecuencia que es originariamente la más alta por una banda de frecuencia que es ahora la más baja) se requeriría la reorganización de todo el sistema óptico (incluyendo canjear tanto los filtros como los divisores de haz). En otras palabras, con un sistema óptico  
20 convencional, la etapa de filtrar la luz del primer canal afecta a la luz del segundo canal.

- Así, el usuario debe disponer hábilmente los filtros en un orden particular o los subsistemas de detector no funcionarán correctamente. Esta limitación impide la fácil canjeabilidad de los filtros y la fácil modificación de los parámetros de detección. Además, la disposición particular de la tabla óptica reduce la fiabilidad y la robustez del citómetro de flujo puesto que la alineación de los divisores de haz afecta a la detección de cada uno de los subsistemas de detector.  
30

- Así, existe una necesidad en el campo de citómetros de flujo de crear un sistema óptico nuevo y útil. Esta invención proporciona tal sistema óptico nuevo y útil.  
35

- Ejemplos de diversos sistemas de citómetro de flujo anteriores con sistemas ópticos que incluyen múltiples lentes y filtros se describen en las patentes US 2006/0002634, EP 1396736 y US 4933813. Sin embargo, estas disposiciones pueden mejorarse en particular para permitir un establecimiento y modificación más fáciles de los parámetros de detección.  
40

- La patente US nº 4.293.221 divulga sistemas de flujo para análisis fotométrico de partículas, tales como células biológicas, particularmente para obtener contornos multidimensionales de tipo hendidura-exploración, así como otras imágenes. En un enfoque amplio, las células teñidas de fluorocromo en suspensión fluyen a través de una hendidura enfocada de luz de excitación láser que define una región de excitación plana en el plano X-Y. Cuando cada célula tintada de fluorocromo fluye a través de la región de excitación, se generan emisiones de fluorescencia en la intersección de la región de excitación y la célula. Para generar un contorno de tipo hendidura-exploración a lo largo del eje Z, se vigilan las emisiones de fluorescencia cuando la célula fluye a través de la región de excitación y una pluralidad de secciones transversales paralelas sustancialmente planas de la célula a lo largo del eje Z se excitan para fluorescencia. Para generar contornos de tipo hendidura-exploración a lo largo de los ejes X e Y celulares, diversas formas de realización del sistema óptico definen diversas combinaciones de partes lineales celulares dentro de la sección transversal del eje Z. La fluorescencia u otras emisiones procedentes de estas partes lineales celulares se combinan entonces integrándose para generar los contornos deseados. En otro enfoque amplio descrito, un volumen tridimensional de una célula en flujo se ilumina con radiación de excitación que no sea un haz estrecho. Tres sistemas ópticos ven un punto central en el sistema de flujo. Los sistemas ópticos son de formación de imagen por hendidura y tienen tres respectivos ejes ortogonales uno con relación a otro y están situados simétricamente alrededor de la corriente, de tal modo que el eje de  
55

flujo forme ángulos iguales con cada eje óptico. Un tubo fotomultiplicador para cada sistema óptico detecta la fluorescencia de las células tomadas como imagen.

5 Por tanto, según la presente invención, se proporciona un citómetro de flujo como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

**Breve descripción de las figuras**

10 La figura 1 es una representación esquemática de la primera forma de realización preferida de la invención.

Las figuras 2 y 3 son unas vistas detalladas superior y lateral, respectivamente, de una lente colectora de una variación de la primera forma de realización preferida de la invención.

15 La figura 4 es una representación esquemática de una segunda forma de realización preferida de la invención.

**Descripción de las formas de realización preferidas**

20 La siguiente descripción de las formas de realización preferidas de la invención no está destinada a limitar la invención a estas formas de realización preferidas, sino más bien a habilitar a cualquier experto en la materia a realizar y utilizar esta invención.

25 Como se muestra en la figura 1, el sistema óptico 10 de las formas de realización preferidas de la invención está integrado preferentemente en un citómetro de flujo. En este entorno preferido, el citómetro de flujo define un canal de flujo 14 con una zona de interrogación 12 e incluye una fuente de iluminación 16 que incide en la zona de interrogación 12 desde una dirección particular. El sistema óptico 10 incluye preferentemente un sistema de lente 18 con múltiples superficies de lente 20 dispuestas alrededor de la zona de interrogación 12, y un sistema de detección 22 con múltiples detectores 24 dispuestos para detectar la luz recogida y colimada por el sistema de lente 18. Los múltiples detectores 24 están acoplados cada uno de ellos a un filtro local 26 que filtra independientemente la luz recogida para longitudes de onda específicas. Aunque el sistema óptico 10 de la forma de realización preferida se ha diseñado específicamente para una zona de interrogación 12 de un citómetro de flujo, el sistema puede utilizarse alternativamente en cualquier sistema adecuado para recoger luz desde un punto a lo largo de múltiples trayectorias.

30 El sistema de lente 18 de la primera forma de realización preferida funciona para recoger y colimar la luz dispersa y/o emitida desde la zona de interrogación 12. El sistema de lente 18 incluye cinco o más superficies de lente 20 (una hacia delante, dos de dispersión lateral y dos o más de fluorescencia). En la forma de realización preferida, el sistema de lente 18 está compuesto de lentes independientes. En una forma de realización alternativa, el sistema de lente 18 puede estar formado como una pieza unitaria con múltiples facetas. El sistema de lente 18 está dispuesto preferentemente a lo largo de un plano paralelo a la fuente de luz y perpendicular al canal de flujo 14, pero puede disponerse alternativamente de cualquier manera adecuada.

35 El sistema de lente 18 puede incluir por lo menos cinco lentes enteras (preferentemente, una lente esférica 011-0330 producida por Optosigma de Santa Ana, California). Las lentes enteras incluyen preferentemente una apertura numérica utilizable de aproximadamente 0,31. En una variación, como se muestra en la figura 2, el sistema de lente 18 incluye lentes truncadas (preferentemente, una lente esférica 46-347 producida por Edmund Optics de Barrington, Nueva Jersey). En otras variaciones, las lentes pueden ser enteras o truncadas, pueden ser esféricas o esféricas y pueden ser similares o disimilares entre ellas.

40 El truncado de las lentes funciona para incrementar la capacidad de recoger luz del sistema de lente 18, mientras se mantiene una estrecha proximidad a la zona de interrogación. Hay un límite al tamaño máximo de la apertura numérica de la lente debido a la disposición geométrica de las lentes alrededor de la zona de interrogación 12. Truncando las lentes, éstas pueden localizarse a la misma distancia de la zona de interrogación 12 que una lente esférica, al tiempo que tienen una altura incrementada y, por tanto, una apertura numérica incrementada. Con una capacidad de recoger luz incrementada (o

apertura numérica incrementada de la superficie de lente), el sistema será capaz de proporcionar una imagen más brillante y permitirá la visualización de detalles más finos. Preferentemente, las lentes se truncan para eliminar el borde de la lente. Más preferentemente, como se muestra en las figuras 2 y 3, las lentes se truncan aproximadamente un 35% en la dirección horizontal para eliminar tanto el  
 5 borde como una parte de la lente dentro del diámetro de apertura transparente. Sin embargo, las lentes pueden truncarse en cualquier cantidad adecuada para aumentar la capacidad de recoger luz del sistema de lente 18, mientras mantienen una estrecha proximidad a la zona de interrogación. La anchura de la lente es la dimensión en el plano de la figura 1. La apertura numérica de la lente puede incrementarse aumentando la altura de la lente. La eficiencia de recogida de potencia de la lente  
 10 aumenta proporcionalmente con el incremento en altura. Las lentes esféricas truncadas incluyen preferentemente una apertura numérica utilizable de aproximadamente 0,49.

Las superficies de lente 20 pueden incluir revestimientos que funcionan para convertir las superficies de lente 20 en filtros específicos de longitud de onda. Los revestimientos pueden incluir diversos compuestos inorgánicos u orgánicos, de tal manera que los compuestos absorban longitudes de onda de luz específicas mientras transmiten otras longitudes de onda. Cada lente presenta preferentemente un revestimiento diferente, de tal manera que filtrará una longitud de onda específica que sea diferente de las longitudes de onda filtradas por las otras superficies de lente 20. Alternativamente, por lo menos dos superficies de lente 20 pueden presentar el mismo revestimiento. Las superficies de lente revestidas 20 pueden trabajar cooperativamente con los filtros locales 26 acoplados a los detectores 24 que filtran longitudes de onda específicas o pueden filtrar independientemente unas longitudes de onda específicas.

El sistema detector de la primera forma de realización preferida funciona para detectar luz procedente del sistema de lente 18. El sistema detector incluye preferentemente múltiples detectores 24. Los detectores son preferentemente un tubo fotomultiplicador ("PMT") o un fotodiodo, pero pueden incluir alternativamente cualquier dispositivo adecuado, tal como una cámara, para detectar luz u otra energía electromagnética. En la primera forma de realización preferida, el sistema detector incluye un detector 24 para cada superficie de lente 20 del sistema de lente 18. Los detectores 24 están dispuestos preferentemente en una trayectoria directa desde las superficies de lente 20, y la luz recogida y dirigida por el sistema de lente 18 es guiada preferentemente a los detectores 24 por una trayectoria de luz apropiada. La trayectoria de luz es preferentemente un canal de aire por simplicidad, pero puede ser alternativamente un cable de fibra óptica o cualquier otro guíaondas apropiado. Según un ejemplo mostrado en la figura 4, el sistema detector incluye más detectores 24 que las superficies de lente 20 del sistema de lente 18. En esta forma de realización, el sistema de lente 18 incluye también dispositivos ópticos convencionales, tales como divisores de haz 28, para derivar la luz recogida y dirigida al sistema detector. En esta forma de realización, los divisores de haz 28 son preferentemente no selectivos con respecto a la longitud de onda, lo que preserva la libertad para filtrar independientemente unas longitudes de onda específicas (utilizando filtros locales 26) en cada uno de los diversos detectores 24.

Los detectores 24 están acoplados cada uno de ellos a un filtro local 26 que filtra independientemente unas longitudes de onda específicas. El filtro local 26 es accedido preferentemente con facilidad por el usuario, de tal modo que el usuario pueda canjear filtros diferentes y cambiar la detección de longitud de onda del sistema detector. La etapa de filtrar la luz del primer canal no afecta preferentemente a la luz del segundo canal del sistema detector. Así, el usuario puede canjear fácilmente los filtros en cualquier orden para conseguir los mismos parámetros de detección. Además, puesto que cada uno de los detectores está alineado independientemente con el filtro local y la superficie de lente, el sistema óptico experimenta una fiabilidad incrementada y la robustez con respecto a citómetros de flujo convencionales.

Como un experto en la materia reconocerá a partir de la descripción detallada previa y de las figuras y reivindicaciones, pueden realizarse modificaciones y cambios a las formas de realización preferidas. La invención está definida en las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Sistema de citómetro de flujo con un sistema óptico, que comprende:

5 un canal de flujo (14) con una zona de interrogación (12);  
una fuente de iluminación (16) que incide en el canal de flujo (14) en la zona de interrogación (12) desde una dirección particular; y

10 un sistema óptico (10) que incluye  
un sistema de lente (18) con múltiples superficies de lente (20) dispuestas alrededor de la zona de interrogación (12) a lo largo de un plano perpendicular al canal de flujo, y cada superficie de lente está dispuesta para recoger y colimar luz procedente de la zona de  
15 interrogación (12); y

un sistema de detección (22) con múltiples detectores (24) adaptados para detectar luz procedente del sistema de lente (18), incluyendo cada detector (24) un filtro local correspondiente (26);

20 caracterizado por que:  
el sistema de lente (18) incluye por lo menos cinco superficies de lente (20) dispuestas alrededor de la zona de interrogación (12) que incluyen una superficie de lente de dispersión hacia delante, dos superficies de lente de dispersión lateral, y por lo menos dos superficies de lente de  
25 fluorescencia, incluyendo el sistema de lente (18) una pieza unitaria con múltiples facetas que definen las superficies de lente (20); y por que

30 cada filtro local (26) filtra independientemente unas longitudes de onda específicas, de tal manera que la luz filtrada por un filtro local para un primer detector (24) no afecte a la luz detectada por un segundo detector (24).

2. Sistema según la reivindicación 1, en el que por lo menos una de las múltiples lentes está curvada esféricamente.

35 3. Sistema según la reivindicación 2, en el que la lente esférica presenta un valor de apertura numérica utilizable comprendido entre 0,25 y 0,35.

40 4. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las superficies de lente incluyen un revestimiento adaptado para convertir la superficie de lente en un filtro específico en longitud de onda.

45 5. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sistema detector (22) incluye un detector (24) para cada superficie de lente (20) del sistema de lente (18); y en el que la luz recogida y colimada por las superficies de lente (20) es guiada en una trayectoria directa hasta los detectores (24).

6. Sistema según la reivindicación 5, en el que la luz recogida y colimada por las superficies de lente (20) es guiada en una trayectoria no bifurcada hasta los detectores (24).

50 7. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el sistema detector (22) incluye múltiples detectores (24) para cada superficie de lente (20) del sistema de lente (18), incluyendo además por lo menos un divisor de haz (28) que deriva la luz recogida y colimada procedente de la superficie de lente (20) hacia los múltiples detectores (24), y en el que el divisor de haz (28) es no selectivo con respecto a la longitud de onda.

55 8. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que cada uno de los detectores (24) está independientemente alineado con su filtro local (26) y superficie de lente (20) correspondientes.

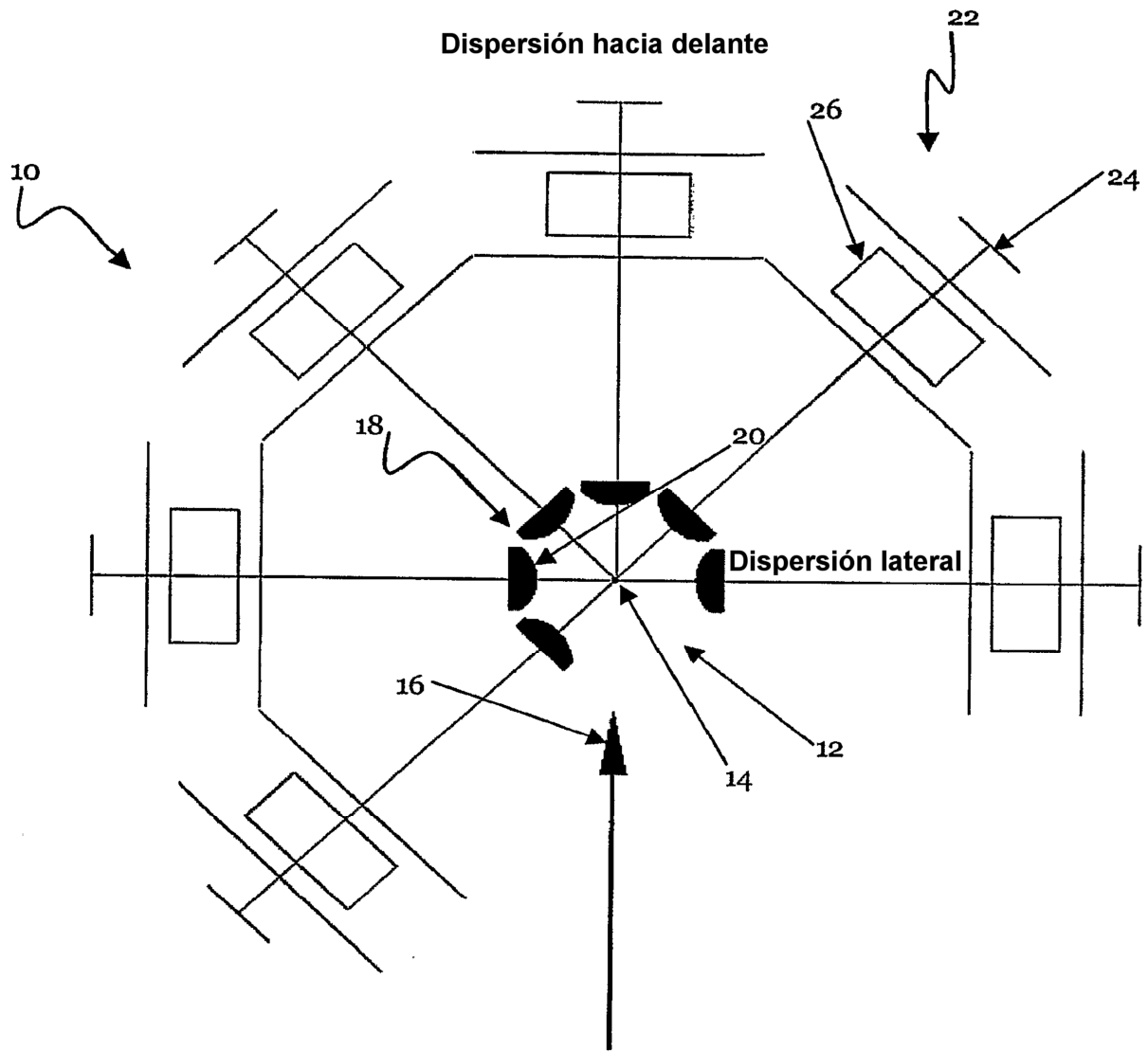


FIGURA 1

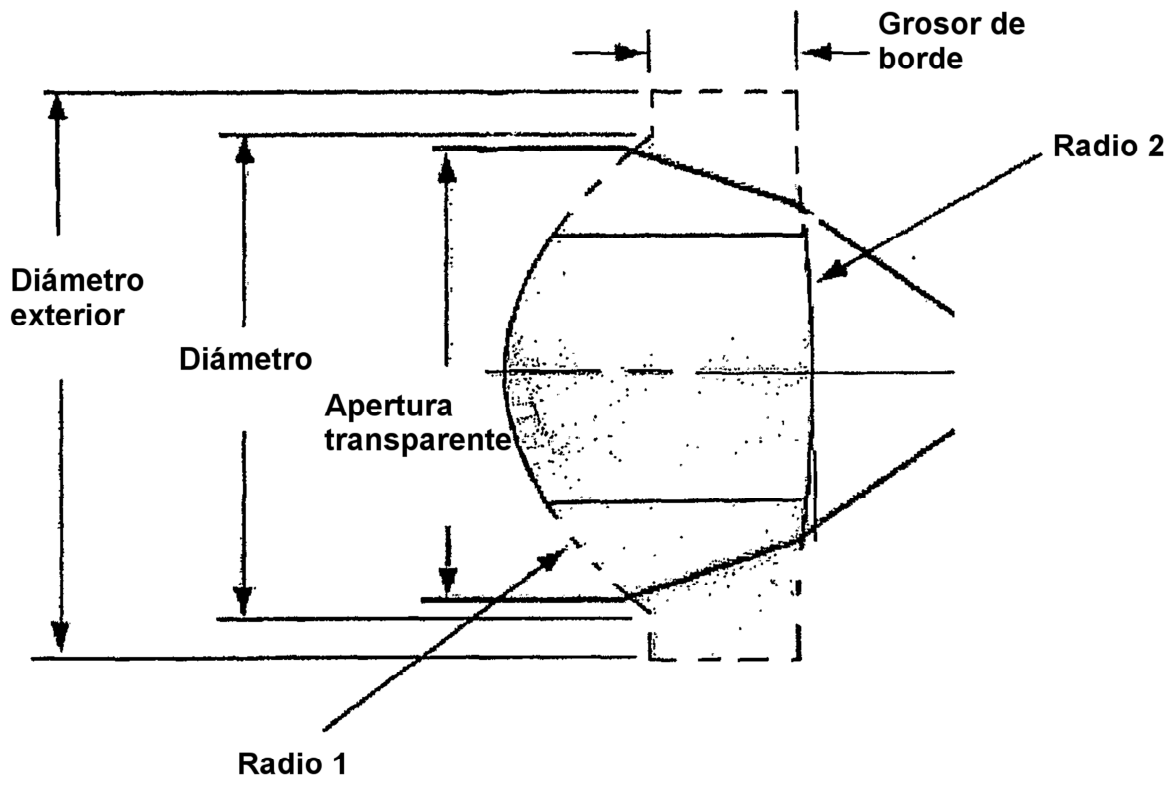


FIGURA 2

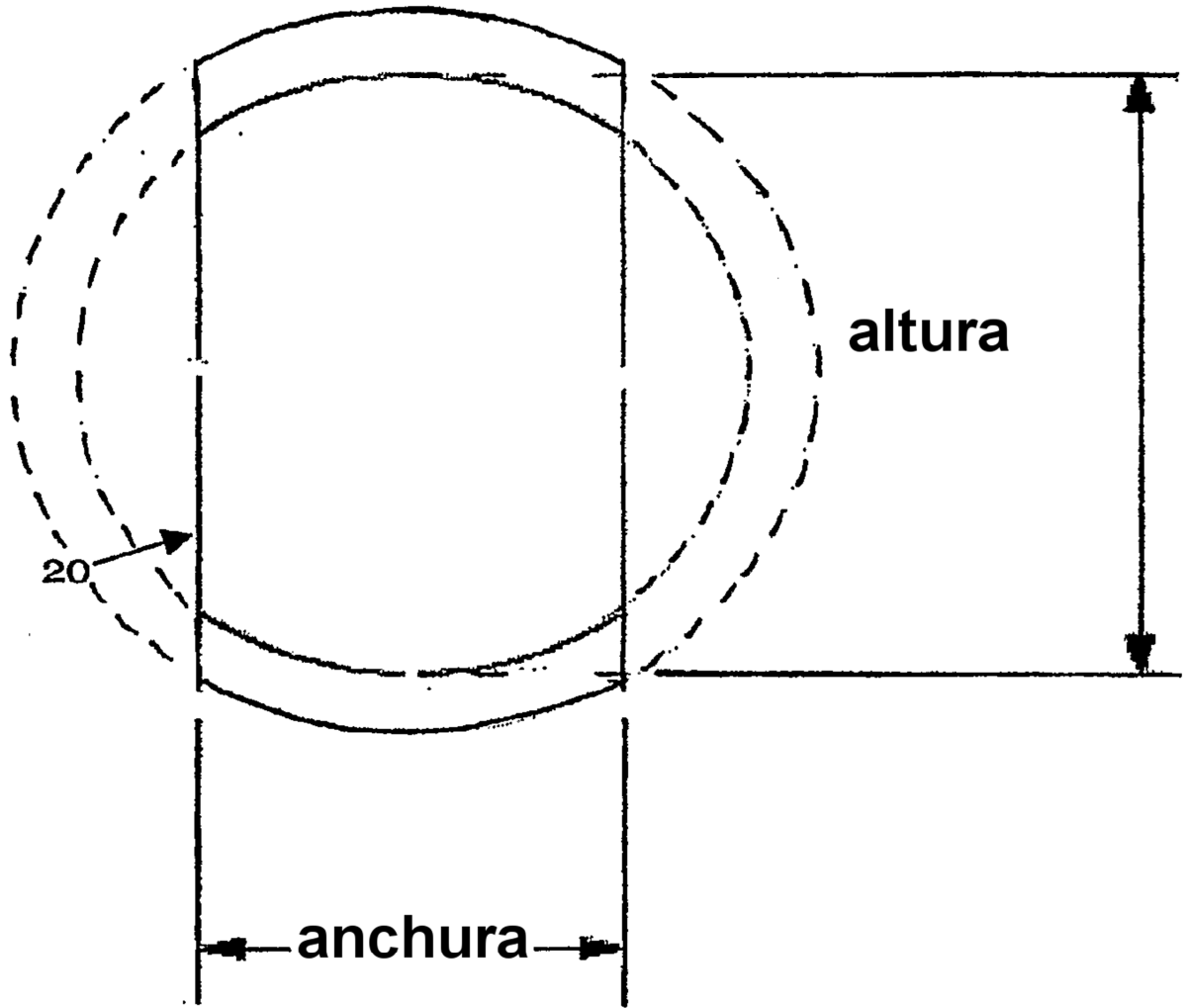


FIGURA 3



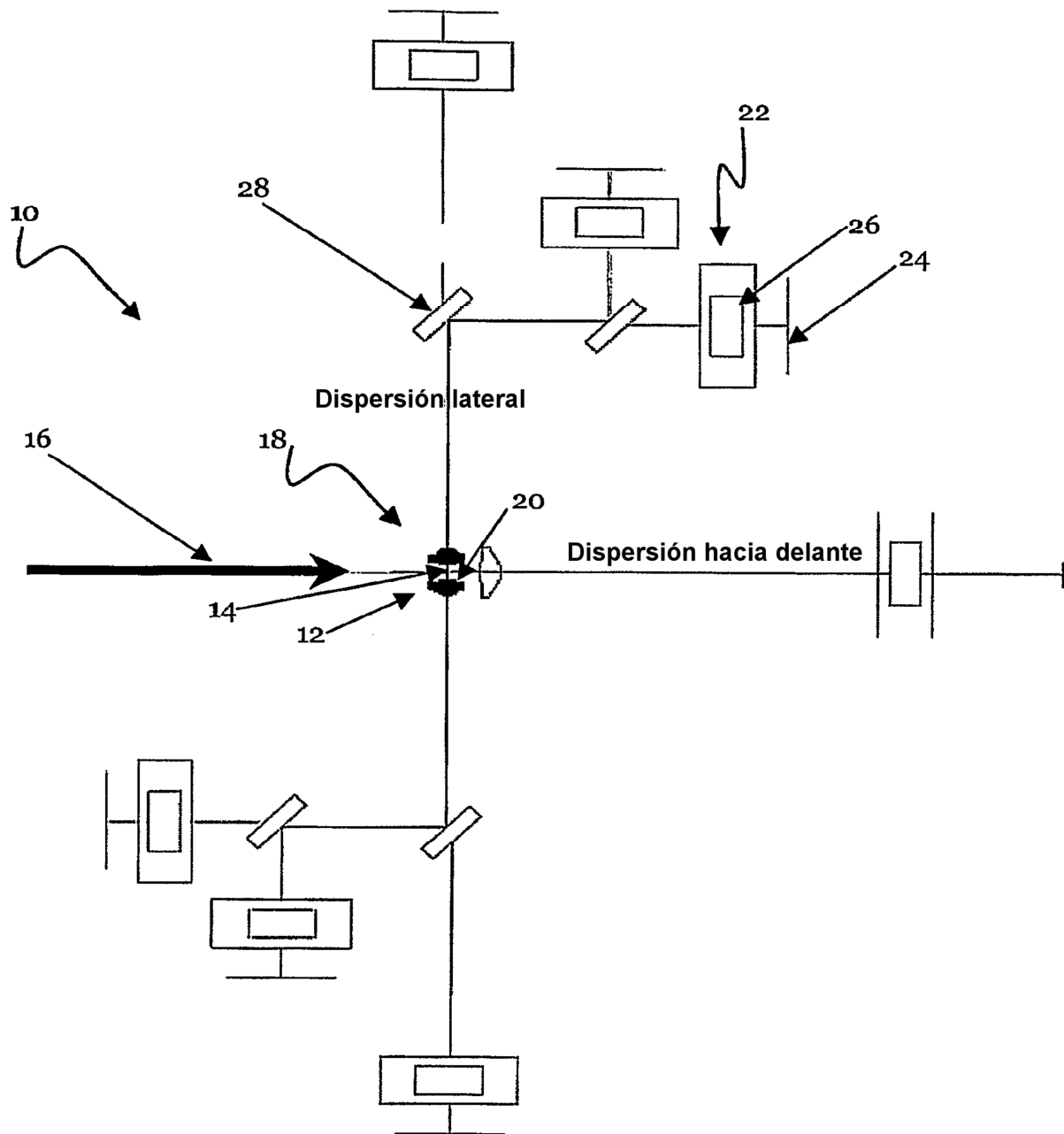


FIGURA 4