

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 750**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64	(2006.01)
A61B 5/00	(2006.01)
G01J 3/02	(2006.01)
G01J 3/28	(2006.01)
G01J 3/44	(2006.01)
A61B 5/1455	(2006.01)
A61B 5/1459	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2014 PCT/US2014/030610**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14145786**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014 E 14763125 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2972224**

54 Título: **Sistemas de espectroscopía de fluorescencia inducida por láser de resolución en el tiempo y sus usos**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361794741 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.10.2017

73 Titular/es:

**CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER (100.0%)
8700 Beverly Boulevard
Los Angeles, CA 90048, US**

72 Inventor/es:

**BUTTE, PRAMOD;
LAPCHAK, PAUL y
KITTLE, DAVID SCOTT**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 639 750 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

Sistemas de espectroscopía de fluorescencia inducida por láser de resolución en el tiempo y sus usos

Derechos del gobierno

5 La invención se realizó con el apoyo gubernamental bajo la subvención No. NS060685 concedida por los Institutos Nacionales de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a técnicas para caracterizar materiales biológicos analizando emisiones de luz inducidas por láser a partir de biomoléculas marcadas o no marcadas.

10 Antecedentes de la invención

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende el experto en la técnica al que pertenece esta invención. Allen et al., Remington: The Science and Practice of Pharmacy 22nd ed., Pharmaceutical Press (15 de septiembre de 2012); Hornyak et al., Introduction to Nanoscience and Nanotechnology, CRC Press (2008); Singleton y Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3ra ed., ed. revisada, J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2006); Smith, March's Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 7a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2013); Singleton, Dictionary of DNA and Genome Technology 3ra ed., Wiley-Blackwell (28 de noviembre de 2012); y Green y Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 4a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012), le proporcionan al experto en la técnica una guía general para muchos de los términos utilizados en la presente solicitud. Para Referencias sobre cómo preparar anticuerpos, véase Greenfield, Antibodies A Laboratory Manual 2da ed., Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor NY, 2013); Köhler y Milstein, Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, Eur. J. Immunol. Julio de 1976, 6(7):511-9; Queen y Selick, Humanized immunoglobulins, patente estadounidense No. 5.585.089 (diciembre de 1996); y Riechmann et al., Reshaping human antibodies for therapy, Nature, 24 de marzo de 1988, 332(6162): 323-7.

25 La espectroscopía de fluorescencia inducida por láser (LIFS) se ha aplicado extensivamente a sistemas biológicos complejos para diagnosticar enfermedades, tales como tumores o placas ateroscleróticas, y para analizar la composición química o bioquímica de materias orgánicas. El beneficio de la LIFS incluye su enfoque no invasivo para obtener información tanto cualitativa como cuantitativa de un sistema biológico *in vivo*. Las ventajas adicionales de la LIFS incluyen la capacidad de sintonización de la longitud de onda, la excitación de ancho de banda estrecho, la direccionalidad y la excitación de pulsos cortos. Además, la LIFS puede excitar de manera selectiva y eficiente los fluoróforos en la materia orgánica y mejorar en gran medida la selectividad y detectabilidad de la fluorescencia.

30 Las técnicas de resolución en el tiempo permiten registrar directamente la evolución en tiempo real de la emisión inducida por láser, lo que fue posible gracias a la disponibilidad de los láseres pulsados cortos (nanosegundos) y ultracortos (picosegundos), así como a los avances en electrónica de alta velocidad. Debido a que el proceso de emisión de luz se produce en un intervalo de tiempo muy corto después del evento estimulante (por ejemplo, el tiempo de decaimiento de la fluorescencia es del orden de los nanosegundos), la medición de resolución en el tiempo puede proporcionar información sobre las especies moleculares y las estructuras proteicas de la muestra. Por ejemplo, las técnicas de resolución en el tiempo permiten procesos "rápidos" (típicamente la excitación directa de estados de corta duración o reacciones posteriores muy rápidas) y procesos "lentos" (típicamente de estados de larga duración, excitación retardada por poblaciones de electrones persistentes o por reacciones que siguen al proceso de electrones original) que se "separan" en los datos medidos.

35 La medida resuelta en tiempo sólo obtiene un efecto integrado de una amplia gama de longitudes de onda y puede complementarse con información espectral en la emisión inducida por láser para revelar características adicionales de una muestra. Para resolver la emisión inducida por láser en las longitudes de onda de los componentes mientras aún se puede realizar una medición de resolución en el tiempo, algunas técnicas de LIFS existentes utilizan un monocromador de barrido para seleccionar longitudes de onda de una longitud de onda de emisión de banda ancha a la vez y dirigir el componente de longitud de onda seleccionado al fotodetector. Sin embargo, para resolver otra longitud de onda del espectro de emisión, la muestra tiene que ser excitada de nuevo para producir otra nueva emisión, mientras que el monocromador se sintoniza para seleccionar la nueva longitud de onda.

40 Estas técnicas existentes pueden tomar una cantidad de tiempo significativa para resolver múltiples componentes espectrales a partir de una emisión de luz de banda ancha. Aunque cada componente de longitud de onda se puede registrar en tiempo real, el tiempo de transición de uso de un monocromador para seleccionar otra longitud de onda puede tomar hasta unos segundos, lo que se convierte en el factor limitante en la realización de mediciones en tiempo real. Además, una medición total puede tomar una gran cantidad de tiempo si se tiene que medir un gran número de lugares de estimulación en la muestra. Por lo tanto, existe una necesidad por sistemas y métodos que faciliten el registro casi en tiempo real de información de resolución en el tiempo y en cuanto a longitud de onda de una emisión de luz provocada por una única excitación de una muestra.

El documento US 2010/067003 A1 (Marcu et al.; 2010-03-18) divulga un sistema para caracterizar una muestra biológica analizando la emisión de luz fluorescente de la muestra biológica tras la excitación de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1.

Sumario de la invención

5 La invención proporciona un sistema que caracteriza una muestra biológica analizando emisiones de luz procedentes de la muestra biológica en respuesta a una señal de excitación. El sistema irradia primero la muestra biológica con un pulso de láser para hacer que la muestra biológica produzca una respuesta de emisión de luz. El sistema utiliza entonces un dispositivo de división de longitud de onda para dividir la respuesta de emisión de luz en un conjunto de bandas espectrales de diferentes longitudes de onda centrales. Se aplican entonces los retrasos temporales al conjunto de
10 bandas espectrales de manera que cada banda espectral llega a un detector óptico en un instante de tiempo diferente, permitiendo de esta manera al detector óptico resolver temporalmente la respuesta de emisión de luz para cada banda espectral separadamente. Las bandas espectrales retardadas son entonces capturadas por el sistema dentro de una única ventana de detección del detector óptico. Las bandas espectrales capturadas se procesan posteriormente.

Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1 representa, de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención, (A) un esquema de espectroscopía de fluorescencia inducida por láser de resolución en el tiempo de excitación múltiple. BS: divisor de haz; FB: haz de fibras; OD: densidad óptica; LPFW: rueda de filtro de paso largo; ExF: fibra de excitación; CF: fibra colectora; PMT: tubo fotomultiplicador. (B) activación de sincronización.

20 La Figura 2 representa, de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención, un esquema de un ejemplo de diseño de desmultiplexador.

La Figura 3 representa, de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención, un esquema de la sonda.

La Figura 4 representa, de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención, emisiones de fluorescencia de diversos ejemplos de biomoléculas.

25 La Figura 5 representa, de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención, un esquema que muestra el uso de un monitoreo continuo de NADH en una muestra de cerebro *ex vivo*.

La Figura 6 representa, de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención, datos que demuestran las capacidades del aparato TR-LIFS para monitorear continuamente el nivel de NADH mientras las células están expuestas a Rotenona, un compuesto que interfiere con la producción de ATP dependiente de NADH.

30 La Figura 7 representa, de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención, (A) las áreas observadas por el sistema TR-LIFS; (B) la muestra de (A) se solapa tras el tratamiento con TTC; y (C) la intensidad de fluorescencia graficada para cada área (punto).

La Figura 8 representa, de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención, agar/gel con concentraciones variables de metotrexato.

35 La Figura 9 representa, de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención, (A) fluorescencia de MTX a diferentes concentraciones después de 20 minutos de exposición a luz con longitud de onda de 350 nm, y (B) un gráfico de la fluorescencia con el transcurso del tiempo durante 20 minutos indicando un aumento en la fluorescencia de MTX debido a la formación de una forma fluorescente activa.

Descripción detallada de la invención

40 A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Allen et al., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22^a ed., Pharmaceutical Press (15 de septiembre de 2012); Hornyak et al., Introduction to Nanoscience and Nanotechnology, CRC Press (2008); Singleton y Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3^a ed., ed. revisada, J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2006); Smith, March's
45 Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure, 7^a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2013); Singleton, Dictionary of DNA and Genome Technology 3^a ed., Wiley-Blackwell (28 de noviembre de 2012); y Green y Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY, 2012) proporcionan a un experto en la técnica una guía general para muchos de los términos utilizados en la presente solicitud. Para referencias sobre cómo preparar anticuerpos, véase Greenfield, Antibodies A Laboratory
50 Manual 2^a ed., Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor NY, 2013); Köhler y Milstein, Deprivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, Eur. J. Immunol. Julio de 1976, 6(7): 511-9; Queen y Selick, Humanized immunoglobulins, patente estadounidense No. 5.585.089 (diciembre de 1996); y Riechmann et al., Reshaping human antibodies for therapy, Nature, marzo 24 de 1988, 332 (6162): 323-7.

La siguiente descripción se presenta para permitir a cualquier persona experta en la técnica hacer y usar la invención, y se proporciona en el contexto de una aplicación particular y sus requisitos. Varias modificaciones de las realizaciones

descritas serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica y los principios generales definidos en la presente memoria se pueden aplicar a otras realizaciones y aplicaciones sin apartarse del alcance de la presente invención. Por lo tanto, la presente invención no se limita a las realizaciones mostradas, sino que se define en las reivindicaciones independientes 1 y 8.

- 5 La presente invención se refiere a técnicas para caracterizar materiales biológicos mediante el análisis de emisiones de luz inducidas por láser a partir de biomoléculas (marcadas o no marcadas). Más específicamente, la presente invención se refiere a un método y aparato para caracterizar materiales biológicos llevando a cabo un análisis de resolución en el tiempo y de resolución de la longitud de onda sobre emisiones de fluorescencia inducida por láser de los materiales biológicos.
- 10 El sistema descrito en la presente memoria puede usarse para caracterizar diversos estados fisiológicos y de enfermedad, incluyendo, pero sin limitarse a la evaluación de la viabilidad del tejido después de una lesión, la detección del tumor y del margen tumoral, el monitoreo continuo del metabolismo celular y el monitoreo del plasma sanguíneo para optimizar las terapias farmacológicas. El sistema puede adaptarse a diversas aplicaciones/ usos, dependiendo del sustrato/marcador que se esté ensayando.
- 15 El sistema
- La fuente de excitación es un láser 100 pulsado. Los pulsos de salida procedentes del láser pulsado se irradian sobre una muestra biológica a una longitud de onda predeterminada y un nivel de potencia que es adecuado para excitar una muestra 101 biológica sin causar daño a la muestra. El láser de pulso es controlado por un dispositivo controlador interno o externo de pulsos o un dispositivo de retardo digital o un dispositivo 102 activador, que proporciona una sincronización precisa a cada salida del pulso del láser. Esta sincronización precisa se comprueba en cada pulso utilizando un fotodiodo y se actualiza utilizando un dispositivo convertidor de analógico a digital, por ejemplo, NI PCIe-6220. En una realización, el láser pulsado emite pulsos de luz ultravioleta (UV) para excitar la muestra biológica. En otra realización, el láser pulsado emite pulsos de luz visible o del infrarrojo cercano para excitar la muestra biológica.
- 20 La emisión del láser procedente del láser pulsado puede acoplarse/enfocarse en una fibra óptica y guiarse hasta una localización específica en una muestra biológica a través ya sea de fibra 103 óptica (Figura 3) o un sistema de lentes. La excitación mediante un pulso láser hace que la muestra biológica produzca una respuesta de emisión de luz, tal como una emisión de fluorescencia, que típicamente tiene un amplio espectro que comprende muchas longitudes de onda. Esta emisión de luz inducida por láser es entonces recogida por una o más fibras o lentes recolectores de luz. En una realización de la presente invención, la fibra colectora de luz es un haz de fibras 103 multimodal. En otra realización, la recolección de luz se consigue usando una lente de objetivo.
- 25 La fibra que recoge luz a continuación conduce la luz emitida de banda ancha a un dispositivo 104 divisor de longitud de onda (Figura 2), que puede comprender una o más etapas de división de longitud de onda. La luz de emisión de banda ancha experimenta una serie de procesos de división de longitud de onda para que la señal de banda ancha pueda resolverse en una serie de bandas espectrales estrechas, cada una con una longitud de onda central distinta. Las bandas espectrales resueltas en longitud de onda se acoplan en un dispositivo 105 de retardo correspondiente que aplica un retardo temporal predeterminado a cada banda espectral a medida que se desplaza hacia un fotodetector 106. Las bandas espectrales temporalmente retardadas que salen del dispositivo de retardo se disponen sobre un tubo fotomultiplicador de respuesta rápida de manera que el perfil de decaimiento de fluorescencia de cada banda espectral resuelta en longitud de onda que incluya la luz láser pueda ser registrado individualmente y resuelto temporalmente. Los retardos aplicados a estas bandas espectrales permiten que cada señal óptica llegue al tubo fotomultiplicador de placa multicanal (MCP-PMT) en un momento diferente, lo que permite detectar el perfil de desintegración de cada banda espectral por el MCP-PMT separadamente, junto con la luz láser. En una realización, la salida de MCP-PMT puede ser registrada y visualizada usando un digitalizador 107 de alta velocidad. En otra realización, la salida de MCP-PMT puede ser registrada y visualizada usando un osciloscopio. En una realización, MCP-PMT es un MCP-PMT de compuerta controlado por un circuito de control de compuerta, de manera que MCP-PMT responde solamente a señales luminosas durante una ventana de detección estrecha cuando MCP-PMT está abierto. En una realización, el circuito de control de compuerta y el control de pulsos están sincronizados de manera que todos los perfiles de decaimiento de fluorescencia asociados con una única excitación inducida por láser pueden registrarse dentro de una única ventana de detección de MCP-PMT. En una realización, la sincronización de la abertura de compuerta del MCP-PMT se sincroniza con el pulso del láser cambiando el retardo entre el activador del láser y la compuerta del MCP-PMT usando una corrección basada en el retardo anterior. El retardo de activación en el láser (el retardo entre la señal de activación y el disparo real de la luz láser) se registra utilizando un fotodiodo. El retardo de activación medido se utiliza para corregir la sincronización entre la activación del láser y la compuerta del MCP-PMT. Otros fotodetectores, incluyendo, pero sin limitarse a fotodiodos de avalancha (APD), PMT de silicio, pueden ser usados en lugar de o además de los MCP-PMT. La ganancia del MCP-PMT puede ser controlada automáticamente. En una realización de la presente invención, el voltaje del MCP-PMT puede cambiarse dinámicamente con base en la señal de fluorescencia. En una realización de la presente invención, el cambio de voltaje se determina analizando la señal de fluorescencia y determinando la cantidad de cambio antes de registrar la señal.
- 30 35 40 45 50 55
- 60 El láser 103 pulsado tiene una luz láser generadora del retardo inherente después de que la unidad ha sido activada externamente. En un ejemplo de realización, el retardo en la generación de la luz láser después del retardo externo

puede ser hasta, pero no limitado a, 85 microsegundos. El retardo en la activación de la señal denominada en lo sucesivo "retardo de activación" puede variar entre cada pulso del láser. Con el fin de sincronizar la luz láser con la abertura de la compuerta del PMT, los inventores usan un fotodiodo para detectar la sincronización del pulso láser, compararlo con el disparador externo y luego corregir la sincronización del próximo disparo con base en el último retardo de activación (Figura 1B). En la figura 1B, t₀ es cuando se activa el láser, t₁ es cuando el láser se dispara, t₂ es cuando se activa el PMT y t₃ es cuando se enciende la compuerta del PMT. Al habilitar esta sincronización de disparo con base en la realimentación t₂ se ajusta dinámicamente para asegurar que la ganancia de voltaje en el MCP-PMT se 'encienda' cuando la señal fluorescente alcance el MCP-PMT. El digitalizador se activa a 'encendido' usando un segundo fotodiodo para garantizar un tamaño de datos más pequeño.

Un diagrama esquemático del sistema TR-LIFS se representa en la Figura 1. En diversas realizaciones, el sistema comprende: (i) fibras de excitación (ExF), (ii) fibras colectoras (CF), (iii) un desmultiplexador (desmuxer), un dispositivo divisor de onda que proporciona micromediciones acerca del tiempo de vida de la señal de fluorescencia, (es decir, el decaimiento exponencial de la señal de fluorescencia), (iv) un tubo fotomultiplicador (MCP-PMT, por ejemplo, un detector de alta ganancia (10⁶), de bajo ruido y de tiempo de subida rápido (~ 80 ps), tal como Photek 210), (v) un preamplificador opcional para proporcionar una ganancia adicional después del tubo fotomultiplicador antes de que la señal sea digitalizada, (vi) un digitalizador para digitalizar la señal recibida del tubo fotomultiplicador (por ejemplo a 6,4 G muestras/segundo), para realizar el análisis de datos (por ejemplo, dispositivos SP: 108ADQ Tiger), y (vii) un sistema informático para procesar y mostrar la señal.

La señal de fluorescencia del tejido biológico puede ser muy alta o baja con base en el fluoróforo en el sistema biológico. El fluoróforo emite una intensidad de emisión de fluorescencia basada en la eficiencia cuántica y/o absorción de la luz de excitación que puede bloquearse debido a ciertas condiciones tales como el tipo de muestra (por ejemplo, tejido, sangre, plasma). Con el fin de registrar adecuadamente los espectros de fluorescencia, la ganancia del PMT necesita ser ajustada de modo que el aumento de la emisión de fluorescencia no cause saturación de la señal y la baja emisión de fluorescencia no conduzca a muy baja relación de señal a ruido. Esto puede lograrse cambiando rápidamente el voltaje a través del MCP-PMT con base en los datos previamente registrados. En una realización, se promedia y analiza la luz de fluorescencia de dos pulsos de láser (por ejemplo, utilizando software) para determinar si la señal de fluorescencia es demasiado alta o demasiado baja, después de lo cual se cambia la tensión a través del MCP-PMT (responsable de controlar la ganancia del PMT) mediante la comunicación entre la fuente de alimentación de alta tensión y el ordenador. En caso de que la emisión de fluorescencia sea demasiado alta, se reduce la tensión y viceversa de forma repetitiva hasta que se alcance la cantidad correcta de relación señal a ruido. La señal verdadera se guarda y analiza sólo después de que se alcanza la SNR correcta.

En algunas realizaciones, la fibra de excitación (por ejemplo, un diámetro de 600 µm con 0,12 NA, fibra de núcleo de sílice de grado UV) conecta la fuente del láser a la muestra para excitar la muestra a una longitud de onda deseada. Las fibras colectoras (por ejemplo 12 fibras de 200 µm de diámetro con 0,22 NA, fibra de núcleo de sílice de grado UV) se empaquetan en un único haz; este haz conduce al desmultiplexador (Figura 3). Las 12 fibras se pueden combinar en una sola fibra utilizando una técnica de combinación de fibras multimodal en una sola fibra. (<http://www.ofsoptics.com/>). Tras la excitación de la muestra con un láser a una longitud de onda predeterminada, las fibras colectoras recogen la señal de fluorescencia de la muestra y transmiten la señal al desmultiplexador. Varios filtros de división de longitud de onda en el desmultiplexador dividen la señal entrante con base en las longitudes de onda de los dispositivos de división del haz, tales como, pero sin limitarse a, filtros o prismas, etc. El pulso de la señal de fluorescencia (después de excitación pulsada) se retransmite al sistema informático a través del fotomultiplicador, el preamplificador y el digitalizador, donde se calcula el decaimiento de la fluorescencia mediante la deconvolución del pulso láser (previamente registrado) del pulso de fluorescencia registrado.

Dispositivo de división de longitudes de onda

La Figura 2 muestra esquemas de dispositivos de división de longitudes de onda (desmultiplexadores, desmuxers). La señal de emisión de luz inducida por láser (que contiene una amplia gama de longitudes de onda) de la muestra biológica es recogida por una fibra colectora de luz, que lleva la señal emitida hacia el dispositivo de división de longitud de onda.

En un ejemplo de realización de la invención, la muestra biológica se excita a longitudes de onda de aproximadamente 337-350 nm. En una realización, el dispositivo de división de longitud de onda (desmultiplexador) representado en las Figuras 1 y 2 divide la señal entrante a longitudes de onda de: menos de 365 nm (longitud de onda de excitación), 365-410 nm, 410-450 nm, 450-480 nm, 500-550 nm, 550-600 nm, y de más de 600 nm. Como se muestra en la Figura 1, la señal luminosa entrante se dirige al primer dispositivo de división del haz del dispositivo de división de longitud de onda que divide la señal entrante a longitudes de onda mayores de aproximadamente 495 nm y menores de aproximadamente 495 nm. Después de pasar a través del primer dispositivo de división del haz, la señal con una longitud de onda mayor a 495 nm se enfoca utilizando una lente biconcava de longitud focal de 60 mm y luego pasa a través de un segundo dispositivo de división del haz que divide la señal en longitudes de onda de 500-560 nm y mayores a 560 nm, finalmente el tercer divisor del haz divide la luz en 560-600 nm y mayor a 600 nm. La señal con una longitud de onda de menos de 495 nm también pasa a través de una lente biconcava de longitud focal de 60 mm y se enfoca antes de pasar a través del cuarto dispositivo de división del haz que divide la señal luminosa de 495 nm a longitudes de onda de aproximadamente 410-480 nm y menos de 410 nm. La señal luminosa con la longitud de onda de

410-450 nm pasa a través de un quinto dispositivo de división del haz que divide la señal a longitudes de onda de aproximadamente 415-450 nm y 450-495 nm. Las señales luminosas de longitud de onda inferior a 410 nm pasan por un sexto divisor del haz y se dividen en longitudes de onda de 365-410 nm y longitudes de onda inferiores a 365 nm, que contiene la señal de excitación del láser. Registrando simultáneamente el láser con la fluorescencia, es posible asegurar una deconvolución precisa. Este diseño de desmultiplexador permite la detección de biomoléculas incluyendo, pero sin limitarse a la riboflavina mononucleótido de flavina (FMN), la riboflavina dinucleótido de flavina adenina (FAD), lipopigmentos, porfirina endógena, así como fluorescencia de moléculas tales como NADH y PLP-GAD en las señales entrantes. El dispositivo de división del haz descrito aquí puede ser, pero no está limitado a, un filtro dicróico, prisma y rejilla de difracción.

En otro ejemplo de realización de la invención, la muestra biológica se excita a longitudes de onda de aproximadamente 337-350 nm. En esta realización, el dispositivo de división de longitud de onda divide la señal entrante a longitudes de onda de: menos de 400 nm, 415-450 nm, 455-480 nm, 400-600 nm y mayor a 500 nm. Al salir de la fibra colectora de luz y antes de entrar en el dispositivo de división de longitud de onda, la luz emitida es primero colimada usando una lente de colimación. La lente de colimación puede incluir, pero no está limitada a, una lente de índice de gradiente (GRIN), o una lente esférica. El haz de luz colimado se dirige al primer dispositivo de división del haz del dispositivo de división de longitud de onda que divide la señal entrante a longitudes de onda mayores de aproximadamente 400 nm y menores de aproximadamente 400 nm. Después de pasar a través del primer dispositivo de división del haz, la señal con una longitud de onda superior a 400 nm pasa a través de un segundo dispositivo de división del haz que divide la señal en longitudes de onda de 400-500 nm y mayores de 500 nm. La señal con longitud de onda en el intervalo de 400-500 nm pasa a través de un tercer dispositivo de división del haz que divide la señal luminosa a longitudes de onda aproximadamente mayores a 450 nm y menores a 450 nm. En diversas realizaciones, la señal con longitudes de onda inferiores a 450 nm se analiza para determinar la actividad de las biomoléculas. Estas longitudes de onda son importantes para medir biomoléculas incluyendo, pero sin limitarse a, formas libres y unidas de NADH, PLP-GAD o combinaciones de las mismas.

Cambiando la configuración de los dispositivos de división del haz, pueden detectarse bandas espectrales de varias longitudes de onda. Se pueden conseguir otras bandas de longitud de onda utilizando diferentes conjuntos de filtros que serán evidentes para la persona experta en la técnica.

Dispositivo óptico de retardo temporal

Como se muestra en la Figura 1, cada componente de longitud de onda resuelta desde el dispositivo de división de longitud de onda se acopla a un dispositivo de retardo correspondiente y posteriormente se somete a una cantidad predeterminada de retardo en el dispositivo de retardo correspondiente. En diversas realizaciones, los dispositivos de retardo son fibras ópticas con diferentes longitudes L1, L2, L3, L4 y así sucesivamente. En una realización específica, las longitudes de las fibras ópticas pueden ser de aproximadamente 5 pies, 55 pies, 115 pies, 165 pies, 215 pies, 265 pies y 315 pies. Se pueden seleccionar otras longitudes de fibras ópticas basándose en el retardo requerido que será evidente para la persona experta en la técnica. Para separar temporalmente cada uno de los componentes de longitud de onda en el mismo detector óptico, cada componente de longitud de onda viaja a través de una longitud diferente de fibra óptica y, de este modo, experimenta una cantidad diferente de retardo. Eventualmente, cada uno de los componentes de longitud de onda llega al detector óptico en un momento diferente que permite que cada componente sea detectado por separado.

Además de la longitud de la fibra óptica, se utilizan también otras propiedades físicas de la fibra óptica, que incluyen, pero no se limitan a, el índice de refracción de la fibra para determinar la longitud de la fibra para alcanzar una cantidad especificada de retraso. Dado que, en el dominio del tiempo, cada componente espectral tiene un perfil de decaimiento que dura una cantidad de tiempo específica (por ejemplo, decenas de nanosegundos), el retardo temporal entre dos componentes espectrales adyacentes puede diseñarse para ser suficientemente largo para separar temporalmente los dos perfiles de decaimiento.

En una realización de la presente invención, el detector óptico es un MCP-MCP-PMT con compuerta que responde solamente a señales luminosas entrantes dentro de una ventana de detección corta controlada por un circuito de control de compuerta. Esta ventana con compuerta puede ser diseñada para ser suficientemente larga para que todos los componentes de longitud de onda resueltos y temporalmente separados lleguen al MCP-PMT dentro de la ventana con compuerta. Por lo tanto, el MCP-PMT con compuerta puede capturar todos los componentes de longitud de onda que son causados por una única emisión inducida por láser dentro de una ventana de detección. El dispositivo de retardo que se utiliza para separar temporalmente las bandas espectrales resueltas no está limitado a las fibras ópticas, y en general puede usarse cualquier dispositivo de retardo.

En diversas realizaciones, la muestra es una muestra biológica sólida, semisólida o líquida. En diversas realizaciones, la muestra es una o más de sangre, plasma, orina, tejido, microorganismos, parásitos, esputo, vómito, fluido cerebroespinal o cualquier otra muestra biológica a partir de la cual se pueda detectar la firma química.

En diversas realizaciones, el tejido puede ser uno o más de tejido de próstata, pulmón, riñón, cerebro, mucosa, piel, hígado, tracto GI, colon, vejiga, músculo, mama y/o cuello uterino.

El sistema descrito en la presente memoria puede utilizarse para detectar cualquier molécula que tenga una firma detectable (por ejemplo, emitida). En algunas realizaciones, la firma emitida es una emisión fluorescente. En algunas realizaciones, la firma es decaimiento de la emisión de fluorescencia.

5 El diseño del desmultiplexador descrito en este documento permite la detección de, por ejemplo, agentes terapéuticos (marcados o no marcados), anticuerpos (marcados o no marcados), toxina (marcada o no marcada), endotoxinas (marcadas o no marcadas), exotoxinas (marcadas o no marcadas), marcadores tumorales y/o una combinación de los mismos. En diversas realizaciones, las biomoléculas no marcadas tienen fluorescencia intrínseca.

10 El sistema descrito en la presente memoria permite la detección de biomoléculas, incluyendo, pero no limitado a la riboflavina mononucleótido de flavina (FMN), la riboflavina dinucleótido de flavina adenina (FAD), lipopigmentos, porfirina endógena, así como la fluorescencia de moléculas tales como NADH y PLP-GAD en las señales entrantes.

15 En diversas realizaciones, los agentes terapéuticos incluyen agentes quimioterapéuticos. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a paclitaxel unido a albúmina (nab-paclitaxel), actinomicina, alitretinoína, ácido todo trans-retinoico, azacitidina, azatioprina, bevacizumab, bexaroteno, bleomicina, bortezomib, carboplatino, capecitabina, cetuximab, cisplatino, clorambucilo, ciclofosfamida, citarabina, daunorrubicina, docetaxel, doxifluridina, doxorubicina, epirubicina, epotilona, erlotinib, etopósido, fluorouracilo, gefitinib, gemcitabina, hidroxiurea, idarrubicina, imatinib, ipilimumab, irinotecano, mecloretamina, melfalan, mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, ocrelizumab, ofatumumab, oxaliplatino, paclitaxel, panitumab, pemetrexed, rituximab, taflupósido, tenipósido, tioguanina, topotecano, tretinoína, valrubicina, vemurafenib, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, vorinostat, romidepsina, 5-fluorouracilo (5-FU), 6-mercaptopurina (6-MP), cladribina, clofarabina, floxuridina, fludarabina, pentostatina, mitomicina, 20 ixabepilona, estramustina o una combinación de los mismos. Como se describe en la presente memoria, los agentes quimioterapéuticos pueden marcarse o no marcarse (por ejemplo, agentes que tienen fluorescencia intrínseca). En algunas realizaciones, el marcador es un marcador fluorescente. Los ejemplos de marcadores fluorescentes que se pueden usar con los sistemas, aparatos y métodos descritos en el presente documento para marcar los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a verde de indocianina (ICG), curcumina, rodamina (tales como rodamina B, rodamina 123, rodamina 6G o variantes de las mismas), proteína fluorescente verde (GFP), luciferina, fluoresceína, puntos cuánticos o una combinación de los mismos.

25 En diversas realizaciones, los anticuerpos, incluyendo los anticuerpos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, 3F8, 8H9, abagovomab, abciximab, actoxumab, adalimumab, adecatumumab, aducanumab, afelimomab, afutuzumab, alacizumab pegol, ALD518, alemtuzumab, alirocumab, altumomab pentetato, amatuximab, anatumomab mafenatox, anifrolumab, anrukinzumab, apolizumab, arcitumomab, aselizumab, atinumab, atlizumab, atorolimomab, bapineuzumab, basiliximab, baviximab, bectumomab, belimumab, benralizumab, bertilimumab, besilesomab, bevacizumab, bezlotoxumab, biciromab, bimagrumb, bivatumab mertansina, blinatumomab, blosozumab, brentuximab vedotina, briakinumab, brodalumab, canakinumab, cantuzumab mertansina, cantuzumab ravtansina, caplacizumab, capromab pendetida, carlumab, catumaxomab, inmunoconjugado de cBR96-doxorubicina, cedelizumab, certolizumab pegol, 30 cetuximab, citatuzumab bogatox, cixutumumab, clazakizumab, clenoliximab, clivatuzumab tetraxetano, conatumumab, concizumab, crenezumab, dacetuzumab, daclizumab, dalotuzumab, daratumumab, demcizumab, denosumab, detumomab, dorlimomab aritox, drozitumab, duligotumab, dupilumab, dusigitumab, ecomeximab, eculizumab, edobacomab, edrecolomab, efalizumab, efungumab, eldelumab, elotuzumab, elsilimomab, enavatuzumab, enlimomab pegol, enokizumab, enoticumab, ensituximab, epitumomab cituxetano, epratuzumab, erlizumab, ertumaxomab, etaracizumab, etrolizumab, evolocumab, exbivirumab, fanolesomab, faralimomab, farletuzumab, fasinumab, FBTA05, felvizumab, fezakinumab, ficlatuzumab, figitumumab, flinvotumab, fontolizumab, foralumab, foravirumab, fresolimumab, fulranumab, futuximab, galiximab, ganitumab, gantenerumab, gavilimomab, gemituzumab ozogamicina, gevokizumab, girentuximab, glebatumumab vedotina, golimumab, gomiliximab, guselkumab, ibalizumab, ibritumomab tiuxetano, icrucumab, igovomab, IMAB362, imciromab, imgatuzumab, inclacumab, indatuximab ravtansina, infliximab, inolimomab, 40 inotuzumab ozogamicina, intetumumab, ipilimumab, iratumumab, itolizumab, ixekizumab, keliximab, labetuzumab, lambrolizumab, lampalizumab, lebrikizumab, lemalesomab, lerdelimomab, lexatumumab, libivirumab, ligelizumab, lintuzumab, lirilumab, lodelcizumab, lorvotuzumab mertansina, lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, margetuximab, maslimomab, matuzumab, mavrilimumab, mepolizumab, metelimomab, milatuzumab, minretumomab, mitumomab, mogamulizumab, morolimomab, motavizumab, moxetumomab pasudotox, muromonab-CD3, nacolomab tafenatox, namilumab, naptumomab estafenatox, narnatumab, natalizumab, nebacumab, necitumumab, nerelimomab, nesvacumab, nimotuzumab, nivolumab, nofetumomab merpentano, ocaratuzumab, ocrelizumab, odulimomab, ofatumumab, olaratumab, olokizumab, omalizumab, onartuzumab, ontuxizumab, oportuzumab monatox, oregovomab, orticumab, otelixizumab, otlertuzumab, oxelumab, ozanezumab, ozoralizumab, pagibaximab, palvizumab, panitumumab, pankomab, panobacumab, parsatuzumab, pascolizumab, pateclizumab, patritumab, pemtumomab, perakizumab, pertuzumab, pexelizumab, pidilizumab, pinatuzumab vedotina, pintumomab, placulumab, polatuzumab vedotina, penezumab, priliximab, pritoxaximab, pritumumab, PRO 140, quilizumab, racotumomab, radretumab, rafivirumab, ramucirumab, ranibizumab, raxibacumab, regavirumab, reslizumab, rilotumumab, rituximab, robatumumab, roledumab, romosozumab, rontalizumab, rovelizumab, ruplizumab, samalizumab, sarilumab, satumomab pendetida, secukinumab, seribantumab, setoxaximab, sevirumab, SGN-CD19A, SGN-CD33A, sibrotuzumab, sifalimumab, siltuximab, simtuzumab, sipilizumab, sirukumab, solanezumab, solitomab, sonopczumab, sontuzumab, stamulumab, sulesomab, suvizumab, tabalumab, tacatuzumab tetraxetano, tadocizumab, talizumab, tanezumab, taplitumomab paptox, 55 tefibazumab, telimomab aritox, tenatumomab, teneliximab, teplizumab, teprotumumab, TGN1412, ticilimumab

5 (tremelimumab), tigatuzumab tildrakizumab, TNX-650, tocilizumab (atlizumab), toralizumab,, tositumomab, tovetumab, tralokinumab, trastuzumab, trbs07, tregalizumab, tremelimumab, tucotuzumab celmoleukin, tuvirumab, ublituximab, urelumab, urtoxazumab, ustekinumab, vantictumab, vapaliximab, vatelizumab, vedolizumab, veltuzumab, vepalimomab, vesencumab, visilizumab, volociximab, vorsetuzumab mafodotina, votumumab, zalutumumab, zanolimumab, zatuximab, ziralimumab, zolimomab aritox. Como se describe aquí, los anticuerpos pueden marcarse o no marcarse. En algunas realizaciones, la marca es una marca fluorescente. Los ejemplos de marcadores fluorescentes que se pueden usar con los sistemas, aparatos y métodos descritos en el presente documento para marcar los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a verde de indocianina (ICG), curcumina, rodamina (tales como rodamina B, rodamina 123, rodamina 6G o variantes de las mismas), proteína fluorescente verde (GFP), luciferina, fluoresceína, puntos cuánticos o una combinación de los mismos.

10 En diversas realizaciones, las toxinas incluyen, pero no se limitan a toxina alfa, toxina de ántrax, toxina bacteriana, toxina de difteria, exotoxina, toxina de pertussis, toxina de shiga, toxina de tipo shiga, enterotoxinas termoestables, toxinas formadoras de canales, micotoxinas, toxina del cólera, veneno de escorpión, toxinas de clorotoxina y/o tétanos. Como se describe aquí, las toxinas pueden marcarse o no marcarse. En algunas realizaciones, la marca es una marca fluorescente. Los ejemplos de marcadores fluorescentes que se pueden usar con los sistemas, aparatos y métodos descritos en el presente documento para marcar los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a verde de indocianina (ICG), curcumina, rodamina (tales como rodamina B, rodamina 123, rodamina 6G o variantes de las mismas), proteína fluorescente verde (GFP), luciferina, fluoresceína, puntos cuánticos o una combinación de los mismos.

15 En algunas realizaciones, se pueden detectar proteínas (por ejemplo, proteínas de superficie celular) utilizando el sistema descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, las proteínas pueden detectarse usando anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos marcados o no marcados) que se unen a los marcadores de superficie celular. En algunas realizaciones, las proteínas pueden detectarse usando ARNpi (por ejemplo, ARNpi marcados o no marcados) que se unen a las proteínas de interés. Ejemplos de proteínas que pueden detectarse utilizando el sistema descrito en la presente memoria incluyen pero no se limitan a 4-1BB, 5T4, antígeno de adenocarcinoma, alfa-fetoproteína, anexina (por ejemplo, anexinas A1, A2, A5), BAFF, célula de linfoma B, antígeno C242, CA-125, anhidrasa carbónica 9 (CA-IX), CD320, CD4, CD40, CD446, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CEA, CNTO888, CTLA4, DR5, EGFR, EpCAM, CD3, FAP, el dominio extra B de la fibronectina, el receptor de folato 1, GD2, gangliósido GD3, glicoproteína 75, GPNMB, HER2/neu, HGF, receptor quinasa del factor de dispersión humano, receptor de IGF-1, IGF-1, IgG1, L1-CAM, IL-13, IL-6, receptor del factor I de crecimiento similar a la insulina, integrina $\alpha 5\beta 1$, integrina $\alpha v\beta 3$, MORAb-009, MS4A1, MUC1, mucina CanAg, ácido N-glicolilneuramínico, NPC-1C, PDGF-R α , PDL192, fosfatidilserina, células de carcinoma prostático, RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, TAG-72, tenascina C, TGF beta 2, TGF- β , TRAIL-R1, TRAIL-R2, antígeno tumoral CTAA16.88, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2 o vimentina. Otros ejemplos que incluyen compra no se limitan a AOC3 (VAP-1), CAM-3001, CCL11 (eotaxina-1), CD125, CD147 (basigina), CD154 (CD40L), CD2, CD20, CD23 (receptor de IgE), CD25 (cadena α del receptor de IL-2), CD3, CD4, CD5, IFN- α , IFN- γ , IgE, región Fc de IgE, IL-1, IL-12, IL-23, IL-13, IL-17, IL, IL-1, IL-1, IL-5, IL-6, receptor de IL-6, integrina $\alpha 4$, integrina $\alpha 4\beta 7$, Lama glama, LFA-1 (CD11a), MEDI-528, miostatina, OX-40, rhuMab $\beta 7$, esclerosina, SOST, TGF beta 1, TNF- α , VEGF-A, beta amiloide, MABT5102A, L-1 β , CD3, C5, miosina cardiaca, CD41 (integrina alfa-IIb), fibrina II, cadena beta, ITGB2 (CD18), esfingosina-1-fosfato, toxina de ántrax, CCR5, CD4, factor de aglutinación A, citomegalovirus, glicoproteína B de citomegalovirus, endotoxina, proteínas de Escherichia coli, antígeno de superficie de hepatitis B, virus de la hepatitis B, VIH-1, Hsp90, hemaglutinina de la Influenza A, ácido lipoteicoico, Pseudomonas aeruginosa, glicoproteína del virus de la rabia, virus sincitial respiratorio, TNF- α , antígenos de Lewis Y y CEA, Tag72, proteína de unión a folato o sus combinaciones. En algunas realizaciones, las proteínas están marcadas. En algunas realizaciones, la marca es una marca fluorescente. Los ejemplos de marcadores fluorescentes que se pueden usar con los sistemas, aparatos y métodos descritos en el presente documento para marcar los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a verde de indocianina (ICG), curcumina, rodamina (tales como rodamina B, rodamina 123, rodamina 6G o variantes de las mismas), proteína fluorescente verde (GFP), luciferina, fluoresceína, puntos cuánticos o una combinación de los mismos.

Métodos

50 Con base en la combinación de las longitudes de onda de excitación y los dispositivos de división del haz para división en longitudes de onda en el desmuxe, se puede analizar la fluorescencia de diversas moléculas (Figura 4). Por ejemplo, con excitación de la muestra a una longitud de onda de 350 nm y dispositivos de división del haz para división en longitudes de onda apropiados en el desmuxe, la fluorescencia de biomoléculas incluyendo, pero sin limitarse a PLG-GAD (piridoxal-5'-fosfato (PLP), ácido glutámico descarboxilasa)), NADH enlazada y NADH libre, pueden ser ensayados. O, con una excitación de la muestra a una longitud de onda de 440 nm y dispositivos de división del haz para división en longitudes de onda apropiadas en el desmuxe, se puede ensayar la fluorescencia de biomoléculas tales como FAD (dinucleótido de flavina adenina), FMN (mononucleótido de flavina) y porfirinas.

60 La invención proporciona métodos para determinar la viabilidad del tejido después de la lesión en un sujeto que lo necesite, utilizando el sistema TR-LIFS descrito en el presente documento. El método incluye usar el sistema aquí descrito para medir la fluorescencia emitida a partir de biomoléculas (por ejemplo, estado redox de NADH) en el que una alteración en la señal de fluorescencia es indicativa de la viabilidad del tejido. En algunas realizaciones, una alteración en la señal de fluorescencia de biomoléculas es un aumento en la señal de fluorescencia de biomoléculas en el sujeto

en relación con el sujeto de control (normal). En algunas realizaciones, una alteración en la señal de fluorescencia de biomoléculas es una disminución en la señal de fluorescencia de biomoléculas en el sujeto en relación con el sujeto de control (normal). En una realización, una alteración en el estado redox de NADH es indicativa de la viabilidad del tejido. En una realización, un aumento en la fluorescencia de NADH en un sujeto es indicativo de la acumulación de NADH y de la mala viabilidad tisular.

La invención también proporciona métodos para monitorear el metabolismo celular en un sujeto que lo necesite, utilizando el sistema descrito en la presente memoria. El método incluye el uso del sistema TR-LIFS aquí descrito para medir la fluorescencia emitida por biomoléculas (por ejemplo, estado redox de NADH) en el que una alteración en la señal de fluorescencia es indicativa del metabolismo celular. En algunas realizaciones, una alteración en la señal de fluorescencia de biomoléculas es un aumento en la señal de fluorescencia de biomoléculas en el sujeto en relación con el sujeto de control (normal). En algunas realizaciones, una alteración en la señal de fluorescencia de biomoléculas es una disminución en la señal de fluorescencia de biomoléculas en el sujeto en relación con el sujeto de control (normal). En una realización, la fluorescencia de NADH puede usarse para monitorear el metabolismo celular. El metabolismo celular puede monitorearse continuamente o periódicamente. En diversas realizaciones, el monitoreo continuo del metabolismo celular permite, por ejemplo, la evaluación de la viabilidad y vulnerabilidad de las células en condición isquémica, los efectos de los fármacos (por ejemplo, durante el desarrollo del fármaco o para optimizar ventanas terapéuticas) sobre el metabolismo celular y/o monitoreo simultáneo del pH y de los niveles de oxígeno para determinar el estado metabólico de la célula.

Como se describe en la presente memoria, la invención también proporciona métodos para detecciones de tumores utilizando sistemas TR-LIFS descritos en la presente memoria.

Ejemplos

Ejemplo 1

Monitoreo continuo del metabolismo celular

Los sistemas descritos en el presente documento permiten el monitoreo continuo de los cambios en el nivel de NADH a escalas muy minuciosas para determinar cambios en el estado metabólico en respuesta al agotamiento de oxígeno, efecto de fármacos neuroprotectores, etc. (Figuras 1 y 5).

La nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) está implicada en la reacción redox para la producción de ATP en la respiración aeróbica. NADH se produce en las mitocondrias durante el ciclo de glicólisis y ácido cítrico (TCA). NADH se oxida a NAD⁺ en la membrana mitocondrial que produce ATP en el proceso. Este proceso se interrumpe en condiciones que incluyen, pero no se limitan a la isquemia debida a accidente cerebrovascular. En una condición de oxígeno bajo, NADH se acumula en la célula, y el agotamiento persistente de oxígeno puede resultar en la muerte celular, llevando a la ruptura completa de NADH. Estas variaciones en el nivel de NADH permiten evaluar la viabilidad y la vulnerabilidad de las células en condiciones isquémicas. Las fluctuaciones en los niveles de NADH pueden evaluarse midiendo la emisión de fluorescencia de NADH. NAD⁺ y NADH ambos tienen una fuerte absorción en el espectro UV, pero difieren en sus características de fluorescencia. NADH demuestra una fuerte fluorescencia en la banda violeta/azul alrededor de 440/460 nm de longitud de onda dependiendo de su estado enlazado (al citocromo) frente al estado libre. Medir esta fluorescencia en tiempo real permite monitorear los cambios en el nivel de NADH, evaluando el estado metabólico de NADH, monitoreando así el metabolismo celular.

Con el fin de excitar el tejido, se utilizó un láser Nd:YAG de conmutación Q que emite a una longitud de onda de 350 nm, funcionando a 1 KHz con un ancho de pulso (FWHM) de 400 ps (Teem Photonics PNV02510). La energía total por pulso no excedió 5 μ J lo que impidió el fotoblanqueo de NADH. La luz de excitación se suministró al tejido usando una sonda óptica trifurcada hecha a medida. La sonda constaba de una fibra central de 600 micras para suministrar la luz de excitación rodeada por doce fibras de 200 micras para recoger la fluorescencia (Figura 3). Cada una de las otras fibras de las doce fibras colectoras se agruparon formando dos canales. Un canal/haz de recolección conectado a un espectrómetro (Ocean Optics, Maya), que mide el espectro de fluorescencia cada 100 ms y el otro canal/haz conectado a un divisor de haz (desmultiplexador). El divisor de haz a 452 nm de longitud de onda separó la fluorescencia significativa libre y ligada, que se registró mediante MCP-PMT y un espectrómetro.

El cerebro de conejo se retiró después de sacrificar el animal en el OR y se transportó en una solución fría de Krebs-Ringer rica en oxígeno al laboratorio. La corteza se separó y se colocó en solución de Krebs-Ringer con burbujeo continuo de la mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ para mantener vivo el tejido. La sonda se ajustó en el tejido con el fin de registrar la fluorescencia como se muestra en la Figura 5. Se registró un NADH basal (unido y libre) hasta que la fluorescencia del tejido se equilibró y estabilizó. Después de aproximadamente 30 minutos, se añadió una dosis medida de rotenona 50 nM, que bloquea la unión de NADH al citocromo en la mitocondria. Se añadieron concentraciones adicionales de rotenona cada 10 min.

Se registró el efecto de varias concentraciones de rotenona en el tejido cerebral de conejo (Figura 6). Los resultados mostraron que las concentraciones de ambos NADH, libre y ligado se puede asignar en tiempo real (cada 100 ms) y se registró la respuesta a los estímulos externos. La Figura 6 muestra un gráfico continuo del nivel de fluorescencia de NADH durante un periodo de más de 2 horas. Al añadir la concentración de 50 nM de rotenona a la solución, se observó

5 un aumento en el nivel de NADH como se esperaba debido al bloqueo en el consumo de NADH y la acumulación posterior. A medida que la concentración de rotenona aumentó, la fluorescencia de NADH aumentó como se esperaba. A los 80 minutos, el gas que estaba burbujeando continuamente a través del líquido se detuvo y luego se reinició permitiendo la evaluación del efecto de la hipoxia sobre la acumulación de NADH en el tejido y su consumo subsiguiente una vez que el suministro de oxígeno fue restaurado. Esto demostró la capacidad del sistema TR-LIFS descrito en la presente memoria para monitorear el estado metabólico en tiempo real.

Ejemplo 2

Determinación de la viabilidad del tejido después de la lesión

10 El registro de los niveles de NADH sobre una gran área de cerebro después de un accidente cerebrovascular isquémico permite la evaluación del número de células viables que pueden estar en estado de shock debido a la falta de oxígeno, pero pueden no haber sufrido apoptosis y, por tanto, ser salvables. Estas células forman el grueso de la región conocida como la penumbra y un objetivo importante del tratamiento de accidente cerebrovascular es reducir el tamaño de la penumbra mientras se salvan tantas neuronas como sea posible. El seguimiento del NADH en toda la región de la penumbra permite evaluar la eficacia de varias intervenciones diseñadas para el mismo.

15 Con el fin de excitar el tejido, se utilizó un láser Nd:YAG de conmutación Q que emitía a una longitud de onda de 350 nm, funcionando a 1 KHz con un ancho de pulso (FWHM) de 400 ps (Teem Photonics PNVM02510). La energía total por pulso no excedió de 5 μ J lo que impidió el fotoblanqueo de NADH. La luz de excitación se suministró al tejido usando una sonda óptica trifurcada hecha a medida. La sonda consistió en una fibra central de 600 micras para suministrar la luz de excitación rodeada por doce fibras de 200 micras para recoger la fluorescencia. Cada una de las
20 otras fibras de las doce fibras colectoras se agruparon formando dos canales. Un canal/haz de recolección conectado a un espectrómetro (Ocean Optics, Maya), que mide el espectro de fluorescencia cada 100 ms y el otro canal /haz conectado a un divisor de haz (desmultiplexador).

25 Se usó un modelo de accidente cerebrovascular de conejo en el cual se produjo un accidente cerebrovascular en el cerebro de conejo inyectando un coágulo en la arteria cerebral. El conejo fue sacrificado después de la prueba de daño neurológico. Se extrajo el cerebro y se transportó al laboratorio en solución fría de Krebs-Ringer saturada con O₂. En el laboratorio, la corteza infartada se separó del resto del cerebro y se colocó en la solución de Krebs-Ringer burbujeando una mezcla de 95% de O₂ al y 5% de CO₂. Se registró una sola lectura desde el borde de la corteza y la sonda se movió sobre la superficie de la corteza como se muestra en la Figura 7. La intensidad de fluorescencia se registró a partir de la muestra de tejido. La muestra de tejido se sumergió en la solución de TTC (2,3,5-trifenil tetrazolio) que
30 cuando es tomada por las células viables vuelven a las células rojas. TTC es actualmente un estándar dorado para probar la viabilidad de las células. El tejido teñido con TTC se comparó con la intensidad de fluorescencia registrada.

35 Se observó un gradiente suave en la autofluorescencia de NADH a partir de tejido sano (área teñida de rojo en la Figura 7) hasta el tejido muerto (área no teñida en la Figura 7). También se observó que en lugar de un cambio abrupto del tejido cerebral viable con respecto al muerto como se observa con tinción con TTC, la intensidad de fluorescencia (Figura 7) cambió gradualmente, indicando la presencia de células viables en la región indicada como muerta.

Ejemplo 3

Uso de fluorescencia para determinar el nivel de fármaco/metabolito en plasma

40 Algunos fármacos contra el cáncer son tóxicos a altas dosis y pierden su eficacia a dosis más bajas. Esta concentración óptima en plasma del fármaco en el que el fármaco es más eficaz (ventana terapéutica) varía entre los pacientes debido a la variación en altura, peso, metabolismo y origen étnico. A pesar de estas variaciones, actualmente las dosis de fármaco se calculan basándose en el peso del paciente y en un perfil farmacocinético normalizado. Un método rápido y económico para determinar el nivel de fármaco en plasma permite la optimización de dosis para pacientes individuales. El nivel en plasma de los fármacos puede detectarse usando espectroscopía de fluorescencia. Se sabe que algunos de
45 los fármacos contra el cáncer, tales como el metotrexato, tienen propiedades fluorescentes. Los solicitantes muestran en la presente memoria que el uso de los sistemas TR-LIFS descritos en el presente documento, variando las concentraciones de metotrexato (MTX) en agar (Figura 8) dio como resultado un cambio correspondiente en la fluorescencia de MTX.

50 Con el fin de excitar el gel de agar, se utilizó un láser Nd:YAG de conmutación Q que emite a una longitud de onda de 350 nm, funcionando a 1 KHz con un ancho de pulso (FWHM) de 400 ps (Teem Photonics PNVM02510). La energía total por pulso no excedió de 5 μ J, lo que impide el fotoblanqueo de NADH. La luz de excitación se suministró al gel usando una sonda óptica trifurcada hecha a medida. La sonda consistió en una fibra central de 600 micras para suministrar la luz de excitación rodeada por doce fibras de 200 micras para recoger la fluorescencia. Cada una de las
55 otras fibras de las doce fibras colectoras se agruparon formando dos canales. Un canal/haz de recolección va al espectrómetro (Ocean Optics, Maya), que mide el espectro de fluorescencia cada 100 ms y el otro canal /haz conectado a un divisor de haz (desmultiplexador).

Se preparó una dilución en serie de MTX (25 μ g/mL a 25 ng/mL) en gel de agar. MTX cuando se expone a la luz UV se convierte en una forma más fluorescente. Tras la exposición a la luz UV la forma fluorescente se acumula. Con el fin de

detectar la forma fluorescente, se permitió que tuviera lugar la conversión desde baja fluorescencia hasta la forma fluorescente hasta alcanzar un nivel de saturación. Se registró la intensidad de fluorescencia final y se comparó con la concentración. La intensidad de fluorescencia de MTX después de 20 minutos de exposición a la luz UV es un buen indicador de la concentración de MTX en el gel de agar como se muestra en la Figura 9.

5 Ejemplo 4

Detección de tumores

La espectroscopía de fluorescencia inducida por láser (LIFS) representa una nueva técnica adyuvante prometedora para el diagnóstico *in vivo*. La espectroscopía de fluorescencia consiste en excitar los fluoróforos endógenos (libres de marcadores) dentro de los tejidos y registrar la emisión. La espectroscopía de fluorescencia puede emplearse de dos maneras, espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario o de resolución en el tiempo. La medición de resolución en el tiempo resuelve el decaimiento de la intensidad de fluorescencia en términos de tiempos de vida y, por tanto, proporciona información adicional acerca de la dinámica subyacente del decaimiento de la intensidad de fluorescencia. Las mediciones de resolución en el tiempo también son independientes de factores tales como absorción por fluoróforos endógenos de tejidos (por ejemplo, sangre), fotoblanqueo o cualquier otra condición que pueda afectar la intensidad de fluorescencia. Al medir las características de decaimiento de la fluorescencia, que reflejan las diferencias en la dinámica de relajación de moléculas fluorescentes distintas, las mediciones de resolución en el tiempo tienen una capacidad para resolver espectros solapantes y mejorar la especificidad de la medición de fluorescencia.

Los solicitantes muestran que, en pacientes, los sistemas TR-LIFS descritos en el presente documento pueden discriminar tumores de glioma (tanto de alto como de bajo grado) del tejido cerebral normal circundante intraoperativamente. Este trabajo es establecer el potencial de TR-LIFS para mejorar la capacidad del equipo de neurocirujano-neuropatólogo para distinguir rápidamente entre un tumor y un cerebro normal durante la cirugía.

Instrumentación: Se llevaron a cabo experimentos con una configuración de instrumento, que permitió mediciones de tiempo de vida de fluorescencia resueltas espectralmente. En la Figura 1 se muestra un esquema de la disposición óptica y electrónica del aparato. En resumen, consistió en: a) un láser Nd:YAG de conmutación Q (Teem Photonics, modelo Teem Photonics PNV02510, $\lambda = 350$ nm, ancho de pulso = 400 ps FWHM, frecuencia de pulso = 1 KHz) que se utilizó como fuente de excitación, (b) una sonda de fibra óptica trifurcada esterilizable hecha a medida (Fiberguide, NJ), c) un tubo fotomultiplicador de placa multicanal de compuerta (MCP-PMT Photek, RU, modelo 210, tiempo de subida = 80 ps) con un preamplificador rápido opcional Photek, RU, modelo PA200-10, 2 GHz), e) un digitalizador (ADQ-108, SPDevices, Sveden, 7Gmuestras/s), y f) un ordenador portátil, g) un desmuxer como se muestra en la Figura 1 y electrónica periférica. El instrumento permitió la movilidad ya que estaba contenida en un carro endoscópico estándar ($70 \times 70 \times 150$ cm³) internamente modificado para acomodar los dispositivos individuales. Para garantizar un nivel de ruido muy bajo de la electrónica utilizada, como una fuente de alimentación de alta tensión y una alimentación de preamplificador, todos los instrumentos están protegidos de la fuente de alimentación principal utilizando un transformador de aislamiento de grado médico (Toroid® ISB-170A).

Catéter de suministro: El suministro y recolección de luz se implementó con una sonda esterilizable bifurcada hecha a medida. La sonda consistió en fibras de índice de paso de sílice/sílice no solarizante de abertura numérica 0,11 (NA) (Fiberguide, New Jersey, NJ). Tenía una fibra de excitación central de 600 μ m de diámetro central, rodeada por un anillo de recolección de doce fibras de diámetro central de 200 μ m. Todas las fibras colectoras se agruparon y se combinaron en una única fibra de 600 micras. La separación de centro a centro entre las fibras de excitación y de recolección fue de 480 μ m. La sonda era flexible a lo largo de toda su longitud (3 metros) excepto de una parte distal de 7 cm que consistía en un tubo rígido de acero inoxidable. Esto facilitó el montaje y la micromanipulación de la sonda. Se añadió un espaciador con dos aberturas en los lados opuestos en frente del extremo distal de la sonda. Esto permitió que la sonda estuviera en contacto con el tejido manteniendo una distancia fija desde el tejido. Las dos aberturas en el espaciador le permitieron al cirujano aplicar un tubo de succión para mantener un campo claro. La luz láser se acopló en el canal de iluminación de la sonda con un conector SMA estándar, mientras que el extremo distal del canal de recolección se formó en una línea recta para facilitar el acoplamiento con el espectrógrafo. Después de la excitación del tejido, la luz de fluorescencia emitida se recogió y se dirigió a la abertura de entrada del desmuxer por el haz uno y el espectrómetro a través del haz dos. La señal fue entonces detectada por el MCP-PMT, amplificada por el preamplificador rápido, y finalmente digitalizada a 8 bits de resolución por el osciloscopio digital. La resolución total en el tiempo de los sistemas fue de aproximadamente 150 ps.

La sonda de fibra óptica se colocó a 3 mm por encima de la muestra de tejido cerebral expuesta con la ayuda de un espaciador para optimizar la eficiencia de la recolección de luz por la sonda según se informó previamente y para estabilizar la sonda sobre el tejido. La emisión de resolución en el tiempo de cada muestra se registró en siete bandas de longitud de onda separadas (355 (<365 nm)), 365-410 nm, 415-450 nm, 450-490 nm, 500-560 nm, 560-600 nm y > 600 nm) del rango espectral. La salida de energía del láser (en la punta de la fibra) para la excitación de la muestra se ajustó a 5,0 μ J/pulso. Después del análisis espectroscópico, se tomó una biopsia de tejido en el sitio exacto y se envió para investigación patológica.

Cada muestra de biopsia se fijó en formalina regulada al 10%. Las muestras de tejido se fijaron en los portaobjetos y se tñieron con H&E. Todos los especímenes de biopsia fueron estudiados por el patólogo y correlacionados con los

5 resultados de las mediciones de espectroscopía de fluorescencia original. Histológicamente, los gliomas se clasificaron en bajo grado: oligodendroglioma, oligodendroastrocitoma, astrocitoma difuso (WHO grado II), grado intermedio: astrocitoma anaplásico (WHO grado III) y grado alto: oligodendroglioma anaplásico, oligoastrocitoma anaplásico y glioblastoma multiforme (grado III-IV) con base en la calificación de la WHO. Para el propósito de la clasificación espectroscópica en este estudio los gliomas se agruparon como glioma de grado bajo (LGG) (grado I y II) y glioma de alto grado (HGG) (grado III y IV).

10 Análisis de Datos de TR-LIFS: En el contexto de TR-LIFS, las funciones intrínsecas de respuesta de pulso de fluorescencia (IRF), $h(n)$, describen la dinámica real del decaimiento de fluorescencia. El IRF se recupera mediante la deconvolución numérica del pulso láser de entrada medido a partir de los transientes medidos de respuesta a la fluorescencia. Se utilizó técnica de expansión de Laguerre para la deconvolución. La técnica de expansión de Laguerre se seleccionó sobre la adaptación de curvas multiexponenciales más convencional por un conjunto de razones. Permite una deconvolución más rápida de la fluorescencia IR. Como la base de Laguerre es ortonormal, proporciona una expansión única y completa de la función de decaimiento. Esta técnica también no paramétrica no requiere una asunción prioritaria de la forma funcional de la desintegración. En consecuencia, esto permite la aproximación de los sistemas de fluorescencia con dinámica de relajación desconocida y compleja, como la de los tejidos biológicos. Este método permite una recuperación directa de las propiedades intrínsecas de un sistema dinámico a partir de los datos experimentales de entrada-salida. La técnica utiliza las funciones de Laguerre ortonormales para expandir la IRF y estima los coeficientes de expansión de Laguerre (LEC). Los espectros de fluorescencia normalizados se obtuvieron dividiendo los valores de intensidad discretos con el valor de intensidad en la emisión máxima. Además, para caracterizar la dinámica temporal del decaimiento de fluorescencia, se usaron dos conjuntos de parámetros: 1) el tiempo de vida media (τ_{λ}) calculado como el tiempo interpolado en el cual la IRF decae hasta su valor máximo; y 2) el valor normalizado de los correspondientes LEC. Por lo tanto, una descripción completa de la fluorescencia de cada muestra como una función de longitud de onda de emisión, λ_E , fue dada por la variación de un conjunto de parámetros espectroscópicos a distintas longitudes de onda (intensidad de emisión - I_{λ} , tiempo de vida medio de o emisión de fluorescencia - τ_{λ} , y coeficientes de Laguerre LEC_i). Este enfoque analítico para caracterización del decaimiento de fluorescencia fue recientemente desarrollado por nuestro grupo de investigación y descrito aquí en detalle en otra parte. Los solicitantes son capaces de recuperar los valores del tiempo de vida y del coeficiente de Laguerre.

30 Los diversos métodos y técnicas descritos anteriormente proporcionan varias maneras de llevar a cabo la solicitud. Por supuesto, debe entenderse que no necesariamente todos los objetivos o ventajas descritas se pueden lograr de acuerdo con cualquier realización particular descrita en la presente memoria. Por lo tanto, por ejemplo, los expertos en la técnica reconocerán que los métodos pueden llevarse a cabo de una manera que consiga u optimice una ventaja o grupo de ventajas como se enseña en la presente memoria sin necesariamente alcanzar otros objetivos o ventajas tal como se enseña o sugiere en el presente documento. En este documento se describen una diversidad de alternativas. Debe entenderse que algunas realizaciones preferidas incluyen específicamente una, otra o varias características, mientras que otras excluyen específicamente una, otra o varias características, mientras que incluso otras mitigan una característica particular mediante la inclusión de una, otra o varias características ventajasos.

40 Además, el experto en la técnica reconocerá la aplicabilidad de diversas características de diferentes realizaciones. De manera similar, los diversos elementos, características y etapas discutidos anteriormente, así como otros equivalentes conocidos para cada uno de tales elementos, características o etapas, pueden emplearse en diversas combinaciones por un experto en la materia para llevar a cabo métodos de acuerdo con los principios descritos en la presente memoria. Entre los diversos elementos, características y etapas, algunos se incluirán específicamente y otros se excluirán específicamente en diversas realizaciones.

45 Aunque la solicitud se ha descrito en el contexto de ciertas realizaciones y ejemplos, los expertos en la técnica entenderán que las realizaciones de la solicitud se extienden más allá de las realizaciones descritas específicamente a otras realizaciones y/o usos y modificaciones alternativas.

50 En algunas realizaciones, los términos "un" y "uno, una" y "el, la" y referencias similares usados en el contexto de describir una realización particular de la solicitud (especialmente en el contexto de algunas de las reivindicaciones siguientes) se pueden interpretar para cubrir tanto el singular como el plural. La mención de intervalos de valores en la presente memoria se pretende simplemente servir como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si estuviera mencionado individualmente en la presente memoria. Todos los métodos descritos en la presente memoria descriptiva pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que de otro modo se contradiga claramente con el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o un ejemplo de expresión (por ejemplo, "tal como") proporcionado con respecto a ciertas realizaciones en la presente memoria se pretende meramente ilustrar mejor la solicitud y no plantea una limitación al alcance de la solicitud reivindicada de otro modo. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como indicando cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la solicitud.

60 Las realizaciones preferidas de esta solicitud se describen aquí, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la solicitud. Las variaciones en esas realizaciones preferidas resultarán evidentes para los expertos en la técnica al leer la descripción anterior. Se contempla que los expertos en la técnica puedan emplear tales

5 variaciones según sea apropiado, y la solicitud se puede poner en práctica de manera distinta a la descrita específicamente en la presente memoria. Por consiguiente, muchas realizaciones de esta solicitud incluyen todas las modificaciones de la materia descritas en las reivindicaciones adjuntas a la presente, tal como lo permite la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos anteriormente descritos en todas sus posibles variaciones está comprendida en la solicitud a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o de otro modo claramente sea contradicha por el contexto.

10 Debe entenderse que las realizaciones de la solicitud descritas en la presente invención son ilustrativas de los principios de las realizaciones de la solicitud. Otras modificaciones que pueden emplearse pueden estar dentro del alcance de la solicitud. Así, a modo de ejemplo, pero no de limitación, se pueden utilizar configuraciones alternativas de las realizaciones de la solicitud de acuerdo con las enseñanzas de la presente memoria. Por consiguiente, las realizaciones de la presente solicitud no se limitan a aquella exactamente como se muestra y describe.

REFERENCIAS

15 Butte, P. V, Fang, Q., Jo, J. A., Yong, W. H., Pikul, B. K., Black, K. L., & Marcu, L. (n.d.). Intraoperative delineation of primary brain tumors using time-resolved fluorescence spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 15(2), 027008. doi:10.1117/1.3374049

Butte, P. V, Pikul, B. K., Hever, A., Yong, W. H., Black, K. L., & Marcu, L. (2005). Diagnosis of meningioma by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 10(6), 064026. doi:10.1117/1.2141624

Butte, P. V., Mamelak, A. N., Nuno, M., Bannykh, S. I., Black, K. L., & Marcu, L. (2010). Fluorescence lifetime spectroscopy for guided therapy of brain tumors. *NeuroImage*, 54, S125-S135. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.11.001

20 Marcu, L., Jo, J. a, Butte, P. V, Yong, W. H., Pikul, B. K., Black, K. L., & Thompson, R. C. (2004). Fluorescence lifetime spectroscopy of glioblastoma multiforme. *Photochemistry and Photobiology*, 80, 98-103. doi:10.1562/2003-12-09-RA-023.1

25 Yong, W. H., Butte, P. V, Pikul, B. K., Jo, J. A., Fang, Q., Papaioannou, T., ...Marcu, L. (2006). Distinction of brain tissue, low grade and high grade glioma with time-resolved fluorescence spectroscopy. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 11(4), 1255-63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368511>

Jo, J. a, Fang, Q., Papaioannou, T., & Marcu, L. (2004). Fast model-free deconvolution of fluorescence decay for analysis of biological systems. *Journal of Biomedical Optics*, 9(4), 743-52. doi:10.1117/1.1752919

Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy* (3rd ed., p. xxvi, 954 p.). New York: Springer. Retrieved from <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0824/2006920796-b.html>

30 Pogue, B. W., Pitts, J. D., Mycek, M. a, Sloboda, R. D., Wilmot, C. M., Brandsema, J. F., & O'Hara, J. a. (2001). In vivo NADH fluorescence monitoring as an assay for cellular damage in photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 74(6), 817-24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11783938>

Schneckenburger, H. (1992). Fluorescence decay kinetics and imaging of NAD(P)H and flavins as metabolic indicators. *Optical Engineering*, 31(7), 1447. doi:10.1117/12.57704

35 Sun, Y., Phipps, J., Elson, D. S., Stoy, H., Tinling, S., Meier, J., ...Marcu, L. (2009). Fluorescence lifetime imaging microscopy: in vivo application to diagnosis of oral carcinoma. *Opt Lett*, 34(13), 2081-2083. doi:183277 [pii]

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para caracterizar una muestra (101) biológica analizando la emisión de luz fluorescente de la muestra biológica (101) tras la excitación, que comprende:
- 5 (i) una fuente de láser (100) conectada a una muestra biológica (101) a través de fibras de excitación (ExF), en la que el láser (100) está configurado para irradiar la muestra biológica (101) con un pulso de láser a una longitud de onda predeterminada para causar que la muestra biológica (101) produzca una señal correspondiente de fluorescencia;
- (ii) fibras colectoras (CF), donde las fibras colectoras (CF) recogen la señal de fluorescencia de la muestra biológica (101), y retransmiten la señal de fluorescencia a un desmultiplexador (104);
- 10 (iii) un desmultiplexador (104) que está configurado para dividir la señal de fluorescencia de las fibras colectoras (CF) a longitudes de onda predeterminadas; y
- (iv) un dispositivo de retardo óptico (105);
- caracterizado porque el desmultiplexador (104) está configurado para dividir la señal de fluorescencia de las fibras colectoras (CF) a longitudes de onda predeterminadas para obtener bandas espectrales de <365 nm, 365-410 nm, 410-450 nm, 450-495nm, 500-560 nm, 560-600 nm y >600 nm, donde el desmultiplexador (104) comprende un primer dispositivo de división de longitud de onda a aproximadamente >495 nm, un segundo dispositivo de división de longitud de onda a aproximadamente 560 nm, un tercer dispositivo de división de longitud de onda a aproximadamente 600 nm, un cuarto dispositivo de división de longitud de onda a aproximadamente 410 nm, un quinto dispositivo de división de longitud de onda a aproximadamente 450 nm, y un sexto dispositivo de división de longitud de onda a aproximadamente 365 nm, donde la señal de fluorescencia de las fibras colectoras (CF) es dividida por el primer dispositivo divisor de longitud de onda en una señal <495 nm y una señal >495 nm, la señal >495 nm es dividida por el segundo dispositivo divisor de longitud de onda en una señal de 500-560 nm y una señal >560 nm, la señal >560 nm es dividida por el tercer dispositivo divisor de longitud de onda en una señal de 560-600 nm y una señal >600 nm, la señal <495 nm es dividida por el cuarto dispositivo divisor de longitud de onda en una señal <410 nm y una señal de 410-480 nm, la señal de 410-480 nm es dividida por el quinto dispositivo divisor de longitud de onda en una señal de 410-450 nm y una señal de 450-495 nm, y la señal <410 nm es dividida por el sexto dispositivo divisor de longitud de onda en una señal <365 nm y una señal de 365-410 nm.
- 15
- 20
- 25
2. El sistema de la reivindicación 1, en el que el dispositivo (105) de retardo óptico está adaptado para acoplar las bandas espectrales desde el desmultiplexador (104) al dispositivo (105) de retardo óptico, permitir que las bandas espectrales viajen a través del dispositivo (105) de retardo óptico e introducir un retardo de tiempo controlado a medida que las bandas espectrales viajan a través del dispositivo (105) de retardo óptico, con el fin de capturar múltiples longitudes de onda en un solo disparo.
- 30
3. El sistema de la reivindicación 1, en el que las fibras colectoras (CF) forman un único haz.
4. El sistema de la reivindicación 1, que comprende además un tubo (106) fotomultiplicador configurado para detectar la señal recibida del dispositivo (105) de retardo óptico.
- 35
5. El sistema de la reivindicación 4, que comprende además un digitalizador (107) configurado para digitalizar la señal recibida del tubo (106) fotomultiplicador.
6. El sistema de la reivindicación 5, que comprende además un preamplificador configurado para amplificar la señal recibida desde el tubo (106) fotomultiplicador antes de que la señal sea digitalizada por el digitalizador (107).
- 40
7. El sistema de la reivindicación 5, que comprende además un sistema informático configurado para procesar y visualizar la señal recibida del digitalizador (107).
8. Un método para caracterizar una muestra biológica analizando la emisión de una señal de fluorescencia de la muestra biológica tras la excitación que comprende:
- (i) irradiar la muestra biológica con un pulso de láser a una longitud de onda predeterminada para hacer que la muestra biológica produzca una señal correspondiente de fluorescencia;
- 45 (ii) recoger la señal de fluorescencia de la muestra biológica;
- (iii) dividir la señal de fluorescencia a longitudes de onda predeterminadas para obtener bandas espectrales de <365 nm, 365-410 nm, 410-450 nm, 450-495nm, 500-560 nm, 560-600 nm y >600 nm, donde la señal de fluorescencia se divide en una señal <495 nm y una señal >495 nm, la señal >495 nm se divide en una señal de 500-560 nm y una señal >560 nm, la señal >560 nm se divide en una señal de 560-600 nm y una señal >600 nm, la señal <495 nm se divide en una señal <410 nm y una señal de 410-480 nm, la señal de 410-480 nm se divide en una señal de 410-450 nm y una señal de 450-495 nm, y la señal <410 nm se divide en una señal <365 nm y una señal de 365-410 nm;
- 50 (iv) pasar las bandas espectrales a través de un mecanismo de retardo de tiempo;

(v) obtener las bandas espectrales temporalmente retardadas; y

(vi) procesamiento de las bandas espectrales temporalmente retardadas.

9. El método de la reivindicación 8, en el que la señal de fluorescencia es emitida por una biomolécula.

5 10. Método de la reivindicación 9, en el que la biomolécula es una o más de PLP-GAD (ácido piridoxal-5'-fosfato (PLP) glutámico descarboxilasa (GAD)), NADH, NADH libre, riboflavina mononucleótido de flavina (FMN), riboflavina dinucleótido de flavina adenina (FAD), lipopigmentos, porfirinas endógenas o una combinación de las mismas.

11. Un método para determinar la viabilidad del tejido que comprende analizar la emisión de señales de fluorescencia de biomoléculas en una muestra biológica mediante el método de la reivindicación 8, en el que un aumento de las señales de fluorescencia en la muestra biológica con respecto a una muestra normal es indicativo de una pobre viabilidad tisular.

10 12. Un método para monitorear continuamente el metabolismo celular que comprende analizar la emisión de una señal de fluorescencia por el método de la reivindicación 8.

13. Un método para determinar un nivel de fármaco o metabolito en plasma que comprende analizar la emisión de una señal de fluorescencia de una biomolécula por el método de la reivindicación 8.

14. El método de la reivindicación 13, en el que la biomolécula es NADH.

15 15. El método de la reivindicación 14, en el que NADH está en forma libre, en forma unida o en una combinación de los mismos.

16. El método de la reivindicación 8, en el que el procesamiento de las bandas espectrales retardadas en el tiempo comprende detectar las bandas espectrales retardadas en el tiempo.

17. El método de la reivindicación 16, que comprende además digitalizar la señal detectada.

20 18. El método de la reivindicación 17, que comprende además amplificar la señal detectada antes de digitalizar la señal detectada.

19. El método de la reivindicación 17, que comprende además procesar y mostrar la señal digitalizada con un sistema informático.

Figura 1

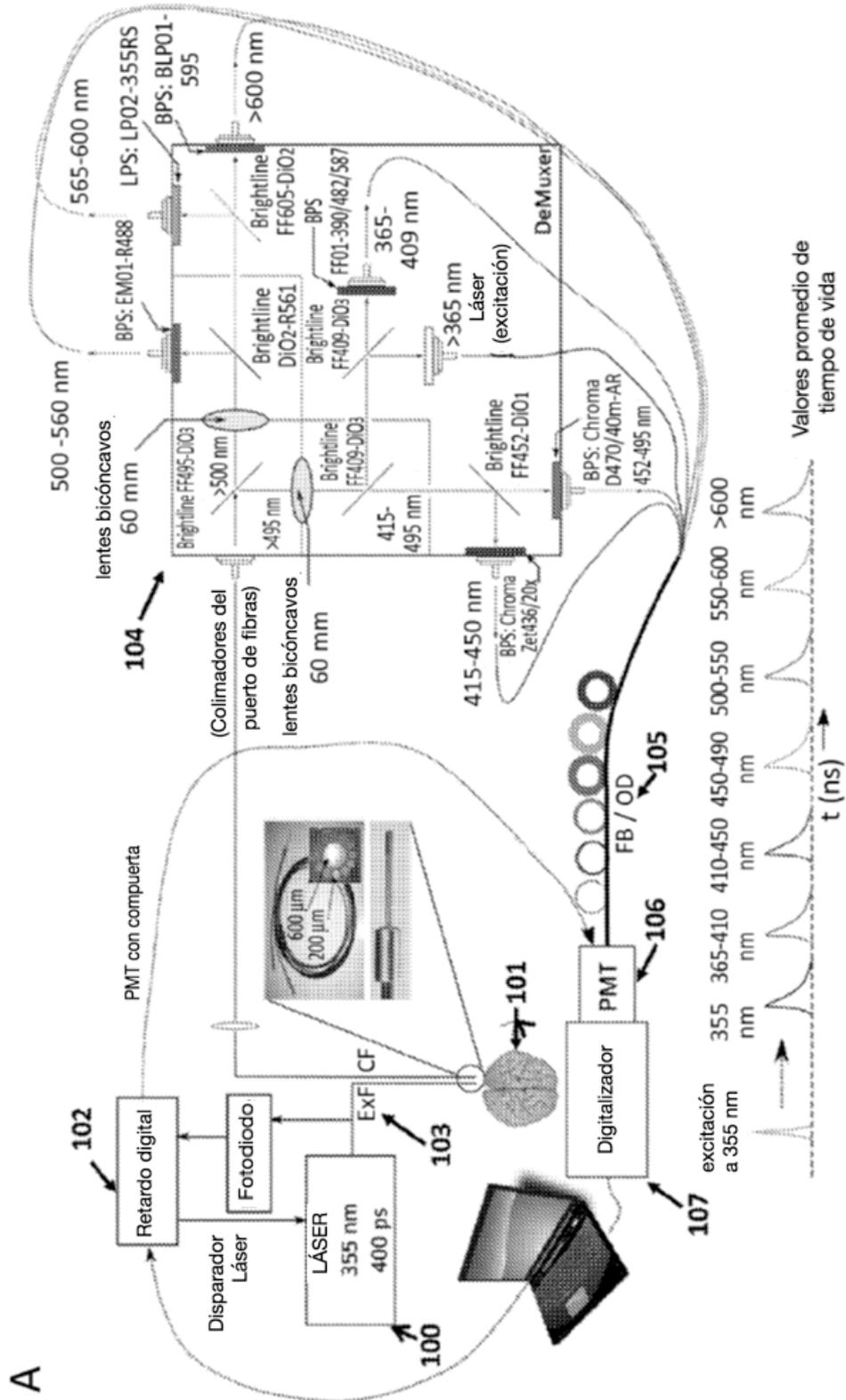
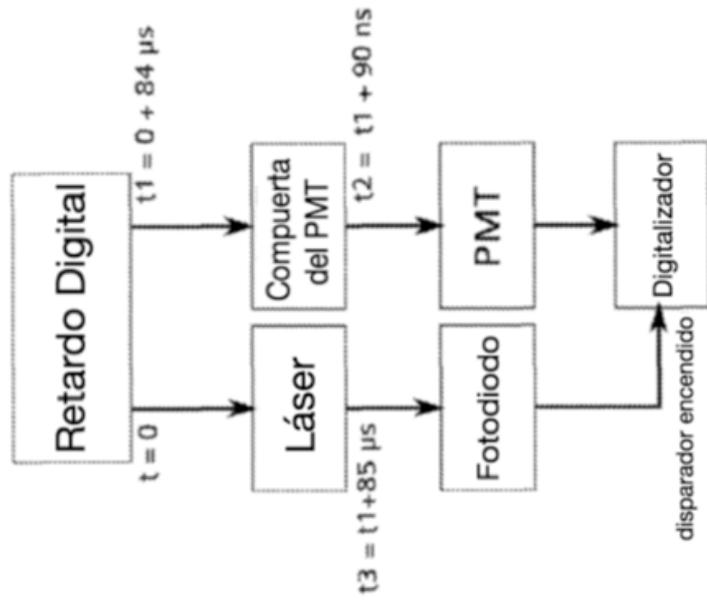


Figura 1

B

Retardo Fijo



Sincronización de Retardo Dinámico

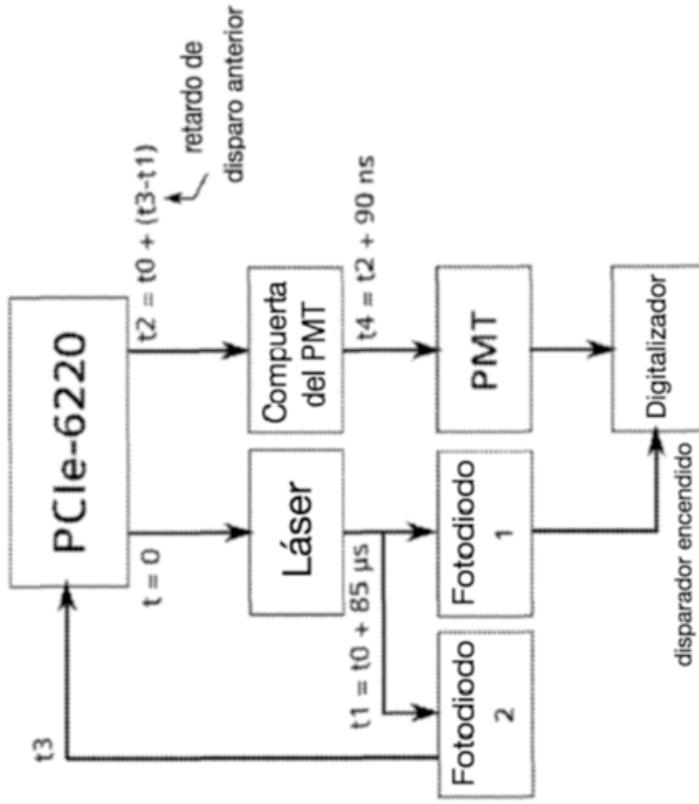


Figura 2

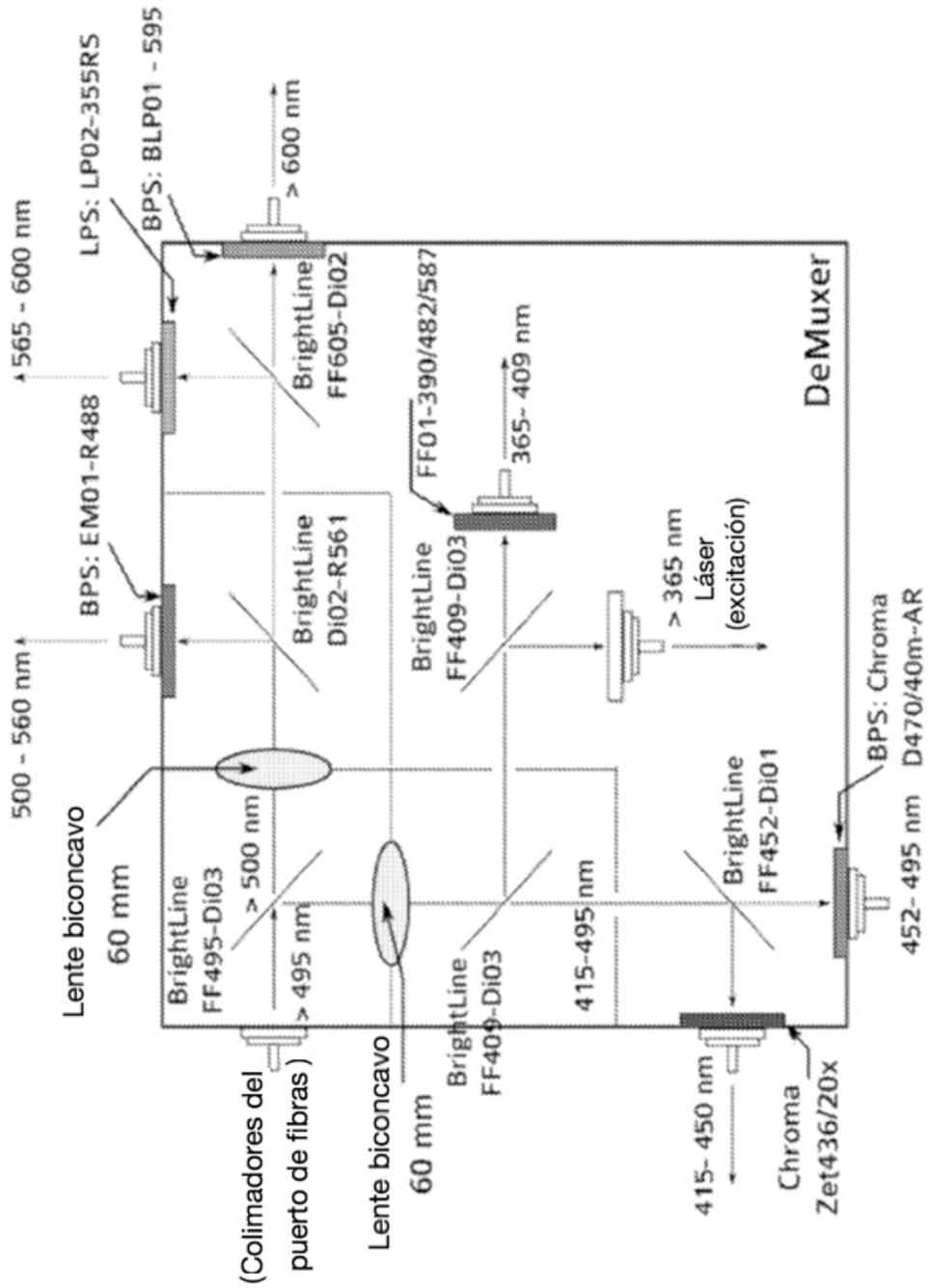


Figura 3

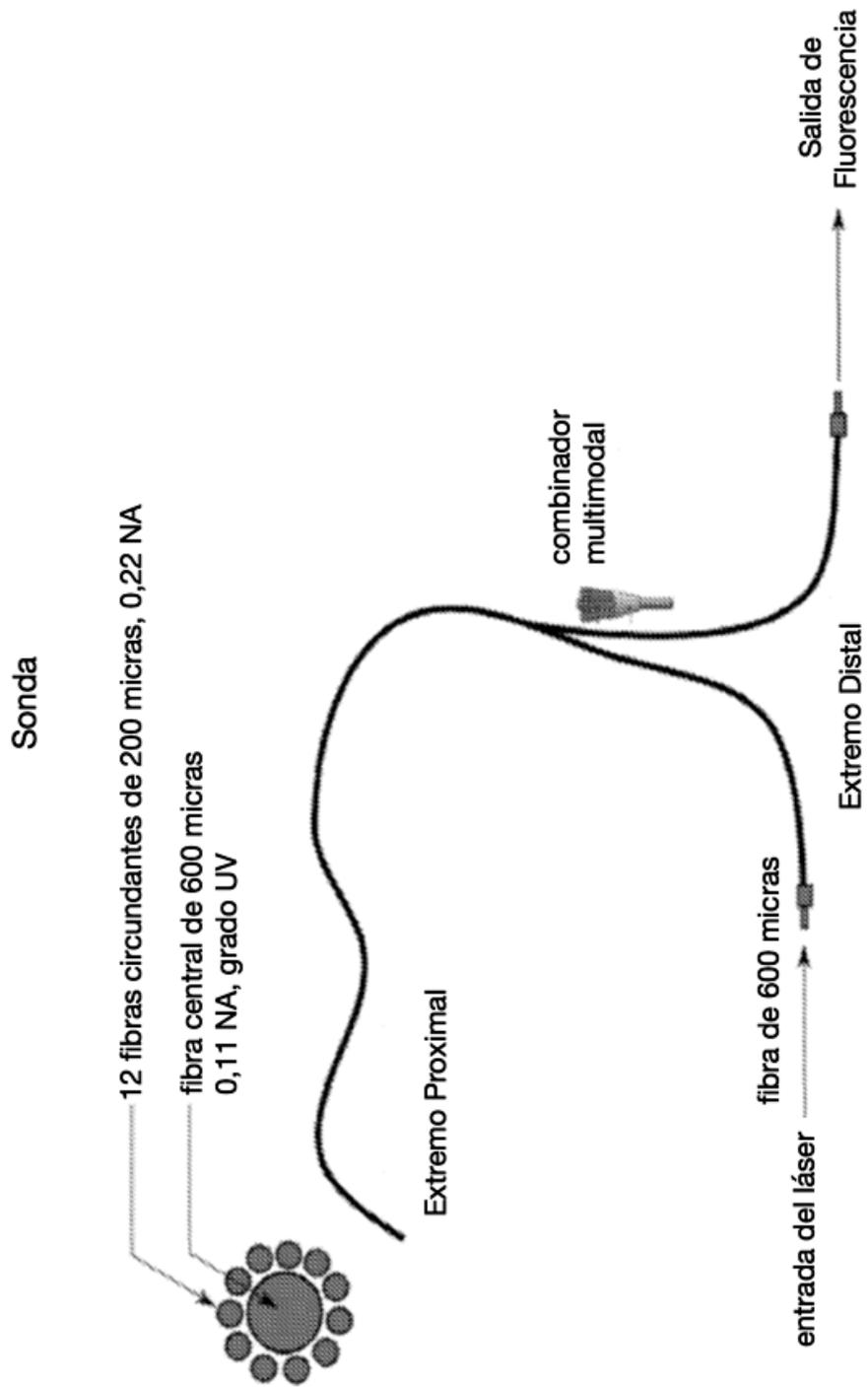


Figura 4

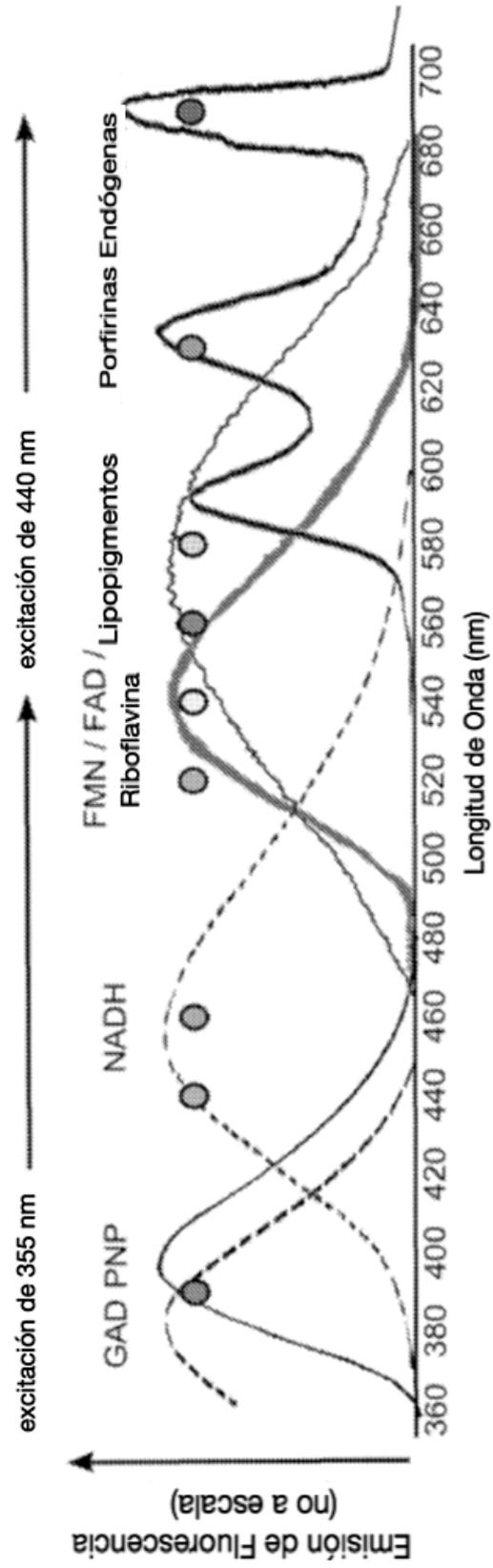


Figura 5

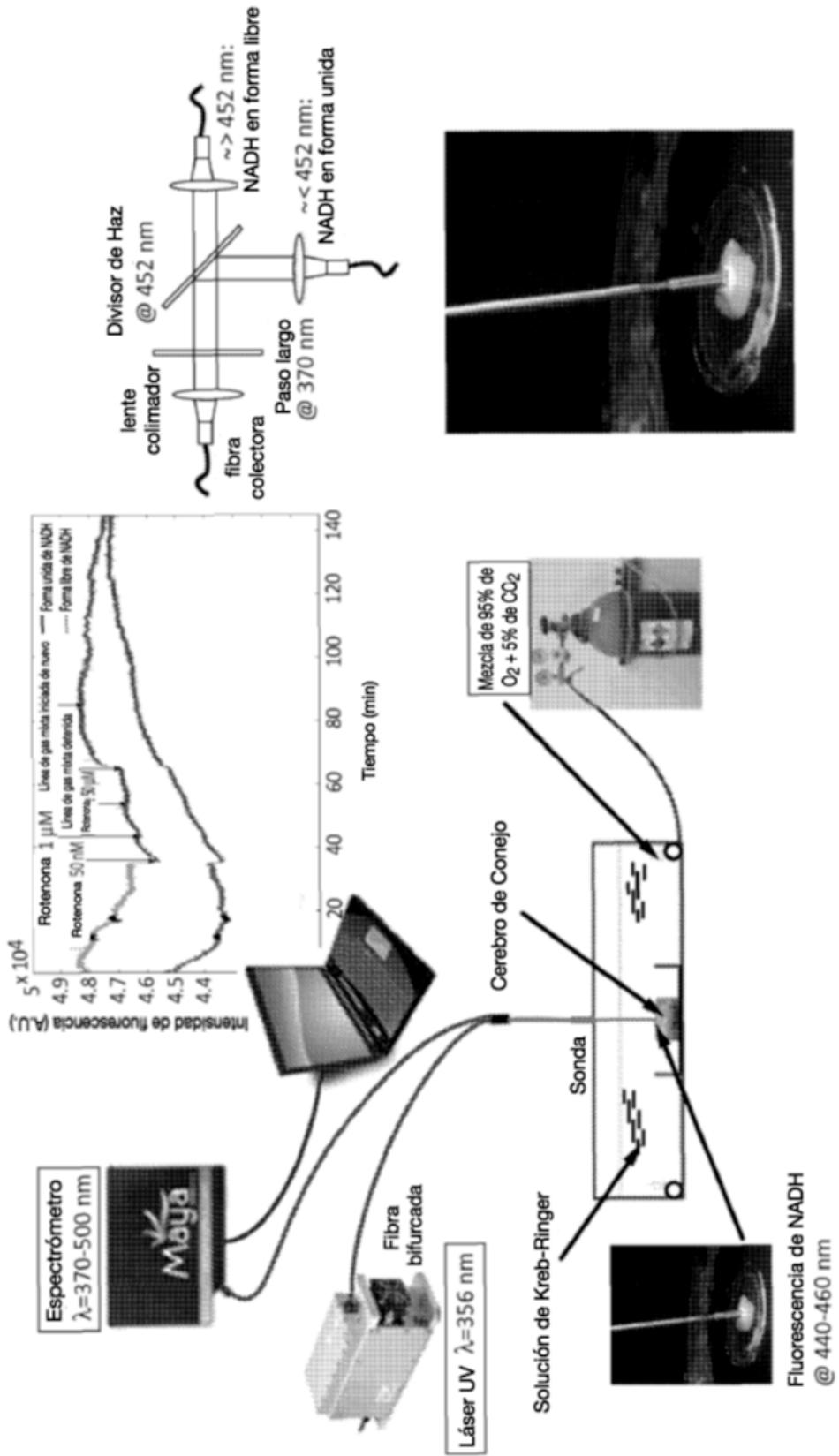


Figura 6

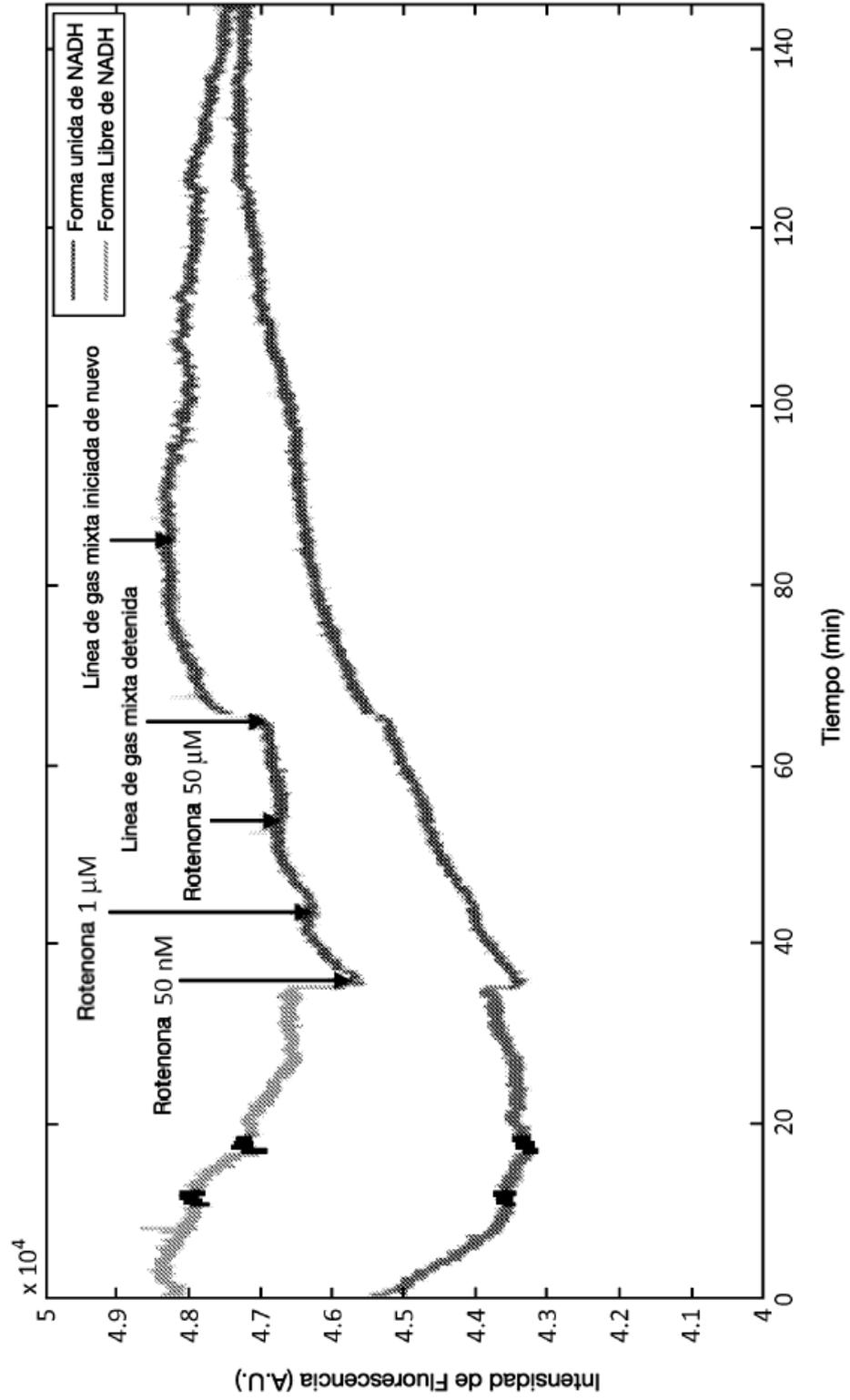


Figura 7

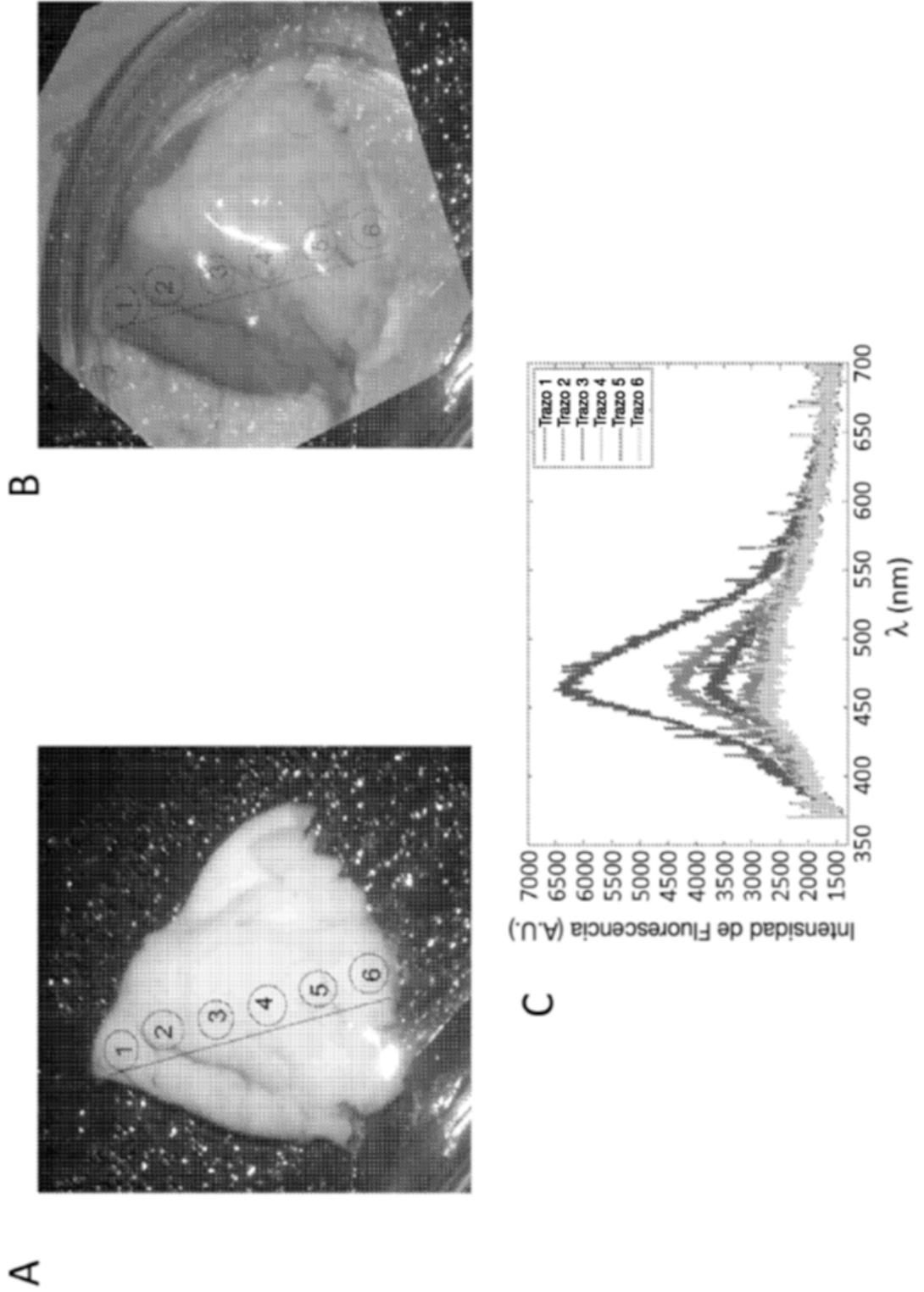


Figura 8

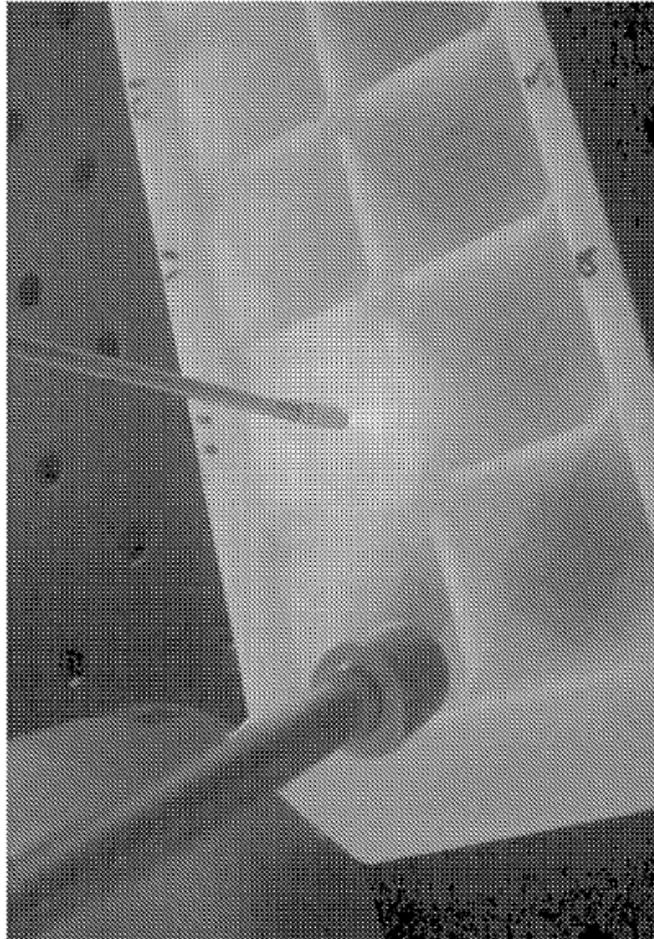


Figura 9

