

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 622**

51 Int. Cl.:

**G02B 21/32** (2006.01)  
**B01L 3/00** (2006.01)  
**G03H 1/08** (2006.01)  
**G03H 1/22** (2006.01)  
**H05H 3/04** (2006.01)  
**G01N 15/14** (2006.01)  
**G03H 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2003 E 14192362 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2889879**

54 Título: **Sistema y método de clasificación de materiales usando dirección de láser holográfica**

30 Prioridad:

**31.07.2002 US 399386 P**  
**20.12.2002 US 435541 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.12.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 646 622 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Sistema y método de clasificación de materiales usando dirección de láser holográfica

- 5 La presente invención reivindica la prioridad de las solicitudes de patente provisionales de EE.UU. nº 60/399.386, presentada el 31 de julio de 2002, y nº 60/435.541, presentada el 20 de diciembre de 2002.

**Antecedentes de la invención**

- 10 La presente invención se refiere a un aparato y un método de examen de células. En cuanto a técnica anterior, véase pro ejemplo el documento WO 98/10267. En la industria estadounidense, existen gran cantidad de necesidades de clasificación y separación sin satisfacer relacionadas con materiales fabricados de partículas o unidades menores de 50 micrómetros. Estas necesidades varían en las industrias desde el dimensionado de las partículas y la preparación de muestras en los campos de la química especializada y los materiales, incluida la
- 15 fabricación de productos de nanotecnología, hasta la selección y purificación de proteínas en las industrias farmacéutica y biotecnológica. Otros ejemplos incluyen la clasificación y selección de células, en los sectores de la medicina, el diagnóstico y la agricultura.

- 20 Se puede observar la importancia de estas necesidades al examinar los gastos anuales en áreas donde se han desarrollado soluciones especializadas o parciales, así como al calcular el valor en el mercado de la producción clasificada/separada/purificada en áreas donde actualmente no existe ni siquiera una solución parcial. Como ejemplo de lo anterior, las industrias biotecnológica y farmacéutica gastan anualmente una enorme cantidad en equipos y suministros para la purificación de proteínas. Como ejemplo de esto último, actualmente en el sector de la agricultura no existe ninguna manera de seleccionar eficazmente el género de la descendencia de los animales de granja; no
- 25 obstante, se calcula que solo en el área del ganado vacuno, se añadiría valor al permitir dicha selección de esperma como parte del proceso de inseminación actual de uso extendido en la industria.

- 30 Fuera del mercado de la ganadería, actualmente el proceso de purificación de células de islote a partir de páncreas humanos es una gran preocupación de los científicos médicos que desarrollan nuevos métodos de tratamiento para la diabetes de tipo I. Se han hechos avances significativos en los métodos de trasplante de islotes, pero el problema de la purificación es uno de los escollos que quedan. Los métodos tradicionales para purificar células de islote son ineficaces y dan lugar a daños en las células.

- 35 El trasplante de células de islote es importante debido a que, en la forma de diabetes de tipo I, las células de islote existentes en el páncreas del paciente están dañadas y ya no producen la insulina necesaria para la supervivencia humana. El tratamiento actual para la diabetes de tipo I implica la inyección de insulina de 1 a 5 veces al día. A pesar del tratamiento, con frecuencia la enfermedad da lugar a complicaciones que incluyen ceguera, problemas de flujo sanguíneo que requieren amputaciones, insuficiencia renal y muerte. Se espera que una pureza mayor y la reducción de los contaminantes para las células de islote usadas en el trasplante reduzcan la aparición de estas
- 40 complicaciones.

- 45 Del millón aproximado de pacientes actuales de diabetes de tipo I en Estado Unidos, al menos 50.000 pacientes al año se someterían a un trasplante de células de islote si estuviera disponible. Tras la aceptación a gran escala del trasplante de células de islote como tratamiento eficaz, cabría esperar que los costes dieran un salto sustancial. El salto respondería a la dificultad de uso del método de tratamiento actual (inyecciones frecuentes) y las graves consecuencias incluso cuando el tratamiento se administra de forma adecuada.

- 50 Por tanto, la purificación de islotes no es más que un problema importante que requiere la clasificación altamente selectiva de células humanas de manera no perjudicial y no invasiva.

Otro problema que es necesario abordar es la purificación de células sanas a partir de células cancerosas de la médula ósea de personas sometidas a un tratamiento de radiación del cuerpo entero para el cáncer.

- 55 Otro más es la selección de células madre para la investigación sobre las causas de y los tratamientos para, enfermedades tales como la enfermedad de Parkinson.

Otra preocupación adicional es el desarrollo de nuevas maneras de estudiar grandes cantidades de células humanas y seleccionar las que tienen características que no se pueden someter a marcaje fluorescente, lo que ampliaría enormemente el alcance y la potencia de los diagnósticos médicos.

- 60 Una técnica convencional en la manipulación de objetos microscópicos es el atrapamiento óptico.

- 65 Una descripción aceptada del efecto del atrapamiento óptico es que la luz con enfoque estrecho, tal como la luz enfocada por una lente de microscopio de apertura numérica alta, tiene un gradiente de intensidad pronunciado. Las trampas ópticas usan las fuerzas del gradiente de un haz de luz para atrapar una partícula en función de su constante dieléctrica. "Partícula" se refiere a material biológico u otro material químico, incluidos, pero sin limitación,

oligonucleótidos, polinucleótidos, compuestos químicos, proteínas, lípidos, polisacáridos, ligandos, células, anticuerpos, antígenos, orgánulos celulares, lípidos, blastómeros, agregaciones celulares, microorganismos, péptidos, ADNc, ARN y similares.

5 Para reducir al mínimo su energía, una partícula con una constante dieléctrica mayor que la del medio circundante se moverá hacia la región de una trampa óptica donde el campo eléctrico sea más alto. Las partículas con al menos un pequeño diferencial de la constante dieléctrica con su entorno son sensibles a este gradiente y se ven atraídas o repelidas desde el punto de mayor intensidad de luz, es decir, hacia o desde el punto focal del haz de luz. Al construir una trampa óptica, se emplean las fuerzas del gradiente óptico de un solo haz de luz para manipular la  
10 posición de una partícula dieléctrica inmersa en un medio fluido con un índice de refracción menor que el de la partícula, pero también se pueden manipular partículas reflejantes, absorbentes y de constante dieléctrica baja.

La fuerza del gradiente óptico de una trampa óptica compite con la presión de la radiación, que tiende a desplazar la partícula atrapada a lo largo del eje del haz. Una trampa óptica se puede colocar en cualquier sitio dentro del volumen focal de una lente de objetivo mediante la selección aproximada de la dirección de propagación del haz de entrada y el grado de colimación. Un haz colimado que entra por la lente de la abertura trasera de un objetivo llega a un foco en el centro del plano focal de la lente, mientras que otro haz que entra con un ángulo llega a un foco descentrado. Un haz ligeramente divergente enfoca más allá del plano focal, mientras que un haz convergente enfoca más acá.

20 Cada uno de los múltiples haces que entran por la pupila de entrada de la lente simultáneamente, forma una trampa óptica en el volumen focal en una posición determinada por su ángulo de incidencia. La técnica de atrapamiento óptico holográfico usa un elemento difractivo óptico de modificación de fase para imponer el patrón de fase para múltiples haces sobre el frente de onda de un solo haz de entrada, transformando de este modo el haz individual en  
25 múltiples trampas.

En la creación de trampas ópticas se prefiere la modulación de la fase de un haz de entrada debido a que el atrapamiento se basa en los intersticios de los haces y no en sus fases relativas. Las modulaciones de la amplitud pueden desviar la luz de las trampas y disminuir su eficacia.

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

Una dificultad para aplicar la tecnología de atrapamiento óptico es que, en general, cada trampa que se va a generar requiere su propio haz de luz enfocado. Muchos sistemas de interés requieren múltiples trampas ópticas y se han desarrollado varios métodos para lograr configuraciones de trampas múltiples. Un método existente usa un solo haz de luz que se dirige entre ubicaciones de múltiples trampas para "compartir en el tiempo" el haz entre diversas trampas. No obstante, a medida que aumenta el número de trampas, se pueden alargar los intervalos durante los que cada trampa está en su estado "apagado" para que las partículas se alejen por difusión de la ubicación de la trampa antes de que la trampa se energice de nuevo. Todas estas preocupaciones han limitado las aplicaciones de este método a menos de aproximadamente 10 trampas por sistema.

45 Otro método tradicional de crear sistemas multitrapa se basa en el paso simultáneo de múltiples haces de luz a través de una sola lente de apertura numérica alta. Esto se hace usando múltiples láseres o usando uno o más divisores de haz en el haz de un solo láser. Un problema con esta técnica es que, a medida que aumenta el número de trampas, el sistema óptico se hace cada vez más complejo de forma progresiva. Debido a estos problemas, las aplicaciones conocidas de este método se limitan a menos de aproximadamente 5 trampas por sistema.

50 En un tercer enfoque para lograr un sistema multitrapa, se usa un elemento difractivo óptico (DOE) (p. ej., un holograma de desplazamiento de fase que utilice una geometría de transmisión o reflexión) para modificar el frente de onda de un solo haz de láser. Esta invención se divulga en la patente de EE.UU. n° 6.055.106 de Grier et al. El frente de onda se modifica de tal forma que el haz de láser posterior se convierte esencialmente en un número mayor de haces de láser individuales con posiciones relativas y direcciones de desplazamiento fijadas por la naturaleza exacta del elemento difractivo óptico. En efecto, la transformada de Fourier del DOE produce un conjunto de máximos de intensidad, cada uno de los cuales actúa como una trampa individual o "pinza".

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

65 Se ha usado un holograma fijo para demostrar el principio del atrapamiento óptico holográfico, pero el uso de una rejilla de cristal líquido como holograma permitió la 'fabricación' de un holograma independiente para cada nueva distribución de trampas. La modulación de la fase espacialmente variable impuesta sobre el láser de atrapamiento por la rejilla de cristal líquido se puede controlar fácilmente en tiempo real por un ordenador, permitiendo así una

variedad de manipulaciones dinámicas.

Otros tipos de trampas que se pueden usar para atrapar ópticamente partículas incluyen, pero sin limitación, vórtices ópticos, embudos ópticos, rotores ópticos y jaulas de luz. Un vórtice óptico produce un gradiente que rodea una zona de campo eléctrico cero que es útil para manipular partículas con constantes dieléctricas más bajas que la del medio circundante o que son partículas reflectoras o de otro tipo que son repelidas por una trampa óptica. Para reducir al mínimo esta energía, una partícula de este tipo se moverá a la región donde el campo eléctrico es más bajo, a saber la zona de campo eléctrico cero del punto focal de un haz de láser de forma apropiada. El vórtice óptico proporciona una zona de campo eléctrico cero muy parecida al agujero de un dónut (toroide). El gradiente óptico es radial con el campo eléctrico más alto de la circunferencia del dónut. El vórtice óptico detiene una partícula pequeña dentro del agujero del dónut. La detención se lleva a cabo deslizando el vórtice por encima de la partícula pequeña a lo largo de la línea de campo eléctrico cero.

El embudo óptico difiere de un vórtice óptico en que tiene un campo eléctrico cero solo en el foco y un campo eléctrico distinto de cero en todas las demás direcciones que rodean al foco, en un extremo del vórtice. Un embudo óptico puede ser útil para atrapar átomos y nanoagrupaciones que pueden ser demasiado pequeños o demasiado absorbentes para atraparlos con un vórtice óptico o pinzas ópticas. (Véase J. Arlt y M.J. Padgett. "Generation of a beam with a dark focus surrounded by regions of higher intensity: The optical bottle beam", Opt. Lett. 25, 191-193, 2000). La jaula de luz (patente de EE.UU. nº 5.939.716) es, vagamente, un pariente macroscópico del vórtice óptico. Una jaula de luz forma un anillo promediado en el tiempo de trampas ópticas para rodear una partícula demasiado grande o reflectora para atraparla con constantes dieléctricas más bajas que la del medio circundante.

Cuando el haz de láser se dirige a través de o se refleja desde el elemento óptico de patrón de fase, el elemento óptico de patrón de fase produce una pluralidad de haces elementales que tienen un perfil de fase modificado. En función del número y el tipo de trampas ópticas deseadas, la modificación puede incluir difracción, conformación del frente de onda, desplazamiento de la fase, dirección, divergencia y convergencia. Basándose en el perfil de fase escogido, se puede usar el elemento óptico de patrón de fase para generar trampas ópticas en forma de trampas ópticas, vórtices ópticos, embudos ópticos, rotores ópticos, jaulas de luz y combinaciones de dos o más de estas formas.

Con respecto a la manipulación de materiales, se ha demostrado el pinzamiento de virus y bacterias además del pinzamiento de esferas dieléctricas. Además de los procariotas y los virus, se han pinzado satisfactoriamente una gran variedad de protistas tales como *Tetrahymena thermophila*. Además, se han atrapado y manipulado tanto células somáticas tales como leucocitos y células epiteliales de los carrillos, como células de línea germinal tales como espermatozoides.

Los investigadores han buscado métodos indirectos para manipular células, tales como marcar las células con micropartículas de diamante y pinzar después las partículas de diamante. Las manipulaciones de células han incluido la orientación de células para su análisis al microscopio, así como extender las células. También se han dispuesto las células de tejidos con pinzas in vitro en la misma distribución que in vivo.

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

También son posibles con pinzas ópticas una variedad de procesos de clasificación con fines biológicos.

Ya se han demostrado la clasificación celular usando atrapamiento óptico tradicional para ensayos y recogida de cromosomas y la clasificación para crear colecciones. También se han desarrollado ensayo celulares para cribado farmacológico.

En consecuencia, como ejemplo de nuevos tipo de clasificación usando trampas ópticas dirigidas por láser, se necesita un método de clasificación celular usando una técnica nueva que aisle células valiosas de otras células, tejidos y contaminantes. Además, es necesaria una manera de lograr una contribución única del atrapamiento óptico a las principales necesidades industriales de clasificación y purificación (de células). Aún más, existe la necesidad de separar células de esperma en el mercado de la ganadería.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un aparato y un método de examen de células como se definen mediante la materia de las reivindicaciones independientes. Antes de explicar al menos una realización consistente con la presente invención en detalle, se ha de entender que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y a las disposiciones de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. Los métodos y aparatos consistentes con la presente invención son susceptibles de otras realizaciones y de ser puestos en práctica y llevados a cabo de diversas maneras. También, se ha de entender que la fraseología y la terminología empleadas aquí, así como en el resumen incluido más adelante, tienen fines descriptivos y no se deben

considerar como limitantes.

Como tales, los expertos en la técnica apreciarán que la concepción en la que se basa esta divulgación puede utilizarse como una base para el diseño de otras estructuras, métodos y sistemas para llevar a cabo los diversos propósitos de la presente invención.

**Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 ilustra esquemáticamente un sistema de atrapamiento óptico holográfico.

Las figuras 2A y 2B son un diagrama esquemático en vista lateral y un diagrama esquemático en vista superior, respectivamente, que muestran una muestra que se está introduciendo en el soporte de muestras.

La figura 3 representa una micrografía de barrido electrónico de una cámara de muestras.

La figura 4 muestra una vista ampliada de la zona de trabajo de una muestra.

La figura 5 es un diagrama esquemático de un sistema de atrapamiento óptico holográfico para clasificar objetos.

La figura 6 ilustra un ejemplo de deflexión lateral para clasificación.

Las figuras 7A y 7B ilustran vistas esquemáticas frontal y lateral, respectivamente, de trampas de canalización de acuerdo con una realización consistente con la presente invención.

La figura 8 ilustra un clasificador de células con una base de disco giratorio.

La figura 9 ilustra el peristaltismo óptico.

**Descripción detallada de la invención**

En un aparato o sistema de atrapamiento óptico holográfico 100 como se ilustra en la figura 1, la luz incide desde un sistema de láser y entra como se muestra por la flecha descendente, para alimentar el sistema 100.

Preferentemente un elemento óptico de patrón de fase 101 es un elemento dinámico óptico (DOE), con una superficie dinámica, que también es un modulador de luz espacial solo de fase (SLM) tal como el "PAL-SLM serie X7665", fabricado por Hamamatsu de Japón, el "SLM 512SA7" o el "SLM 512SA15", fabricados ambos por Boulder Nonlinear Systems de Lafayette, Colorado. Estos elementos ópticos de patrón de fase 101 se controlan por ordenador para generar los haces elementales por un holograma codificado en el medio que se puede variar para generar los haces elementales y seleccionar la forma de los haces elementales. Un patrón de fase 1-2 generado en la parte inferior izquierda de la figura 1 produce las trampas 103 mostradas en la parte inferior derecha rellenas de esferas 104 de sílice de 1 μm de diámetro suspendidas en agua 105. Por tanto, el sistema 100 se controla por el holograma dinámico mostrado más abajo a la izquierda.

El haz de láser se desplaza a través de las lentes 106, 107, hasta un espejo dicróico 108. El divisor de haces 108 se construye de un espejo dicróico, un espejo de hueco de banda fotónica, un espejo omnidireccional u otro dispositivo parecido. El divisor de haces 108 refleja selectivamente la longitud de onda de la luz usada para formar las trampas ópticas 103 y transmite otras longitudes de onda. La porción de luz reflejada desde la zona del divisor de haces 108 se hace pasar después a través de una zona de un elemento óptico de patrón de fase de fase codificado dispuesto sustancialmente en un plano conjugado con una abertura trasera plana de una lente (objetivo) de enfoque 109.

En el atrapamiento óptico de haz individual (también llamado pinzas de láser u ópticas), se había pensado, antes de la presente invención, que para trampas ópticas aceptables era necesaria una lente de abertura numérica alta. Una base para esta creencia era que, para el atrapamiento óptico, se usa el gradiente del campo eléctrico de la luz que incide para atrapar la partícula. Con el fin de obtener una fuerza de atrapamiento grande, se ha creído necesaria la existencia de un gradiente del campo eléctrico (o densidad numérica de rayos) grande. La manera en que habitualmente se lleva a cabo esto es haciendo pasar el campo de luz a través de una lente de abertura numérica alta.

Una preocupación con la observación y el atrapamiento de muestras dentro de un campo de visión grande es que tales observación y atrapamiento implicarían una lente de objetivo con una abertura numérica baja. Al contrario que la enseñanza anterior, la presente divulgación proporciona una lente de abertura numérica baja como, por ejemplo, la lente de objetivo 109 de la figura 1. La capacidad de observar y atrapar en esta situación podría ser útil en cualquier aplicación donde fuese beneficioso un campo de visión grande dado por una lente de aumento pequeño, tal como colocar piezas fabricadas microscópicas o trabajar con grandes cantidades de objetos, tales como células, por ejemplo.

Como ejemplo, se atraparon esferas 104 de sílice de 3 micrómetros, suspendidas en agua 105 con lentes 109 con una abertura numérica baja sin precedentes. Las lentes 109 usadas eran fabricadas por Nikon:

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

(b) plan 10x con una AN de 0, 25.

Los elementos ópticos de patrón de fase adecuados se caracterizan como transmisores o reflectores en función de cómo dirigen el haz de luz enfocado u otra fuente de energía. Los elementos difractivos ópticos transmisores transmiten el haz de luz u otra fuente de energía, mientras que los elementos difractivos ópticos reflectores reflejan el haz.

El elemento óptico de patrón de fase 101 también se puede categorizar como de superficie estática o dinámica. Los ejemplos de elementos ópticos de patrón de fase adecuados incluyen aquellos con una o más regiones de superficie fijas, tales como rejillas, incluidas rejilla difractoras, rejillas reflectoras y rejillas transmisoras, hologramas, incluidos hologramas policromáticos, plantillas, filtros holográficos de conformación de la luz, hologramas policromáticos, lentes, espejos, prismas, placas de onda y similares. El elemento óptico de patrón de fase estático transmisor se caracteriza por una superficie fijada.

No obstante, en algunas disposiciones, el elemento óptico de patrón de fase 101 por sí mismo es móvil, permitiendo de este modo la selección de una o más de las regiones de superficie fija moviendo el elemento óptico de patrón de fase 101 con relación al haz de láser para seleccionar la región apropiada.

El elemento óptico de patrón de fase estático puede estar unido a un pivote y hacerse girar con un motor eléctrico controlado (no mostrado). El elemento óptico de patrón de fase estático tiene una superficie fija y regiones discretas. En otras disposiciones de elementos ópticos de patrón de fase estáticos, ya sean transmisores o reflectores, la superficie fija tiene una superficie no homogénea que contiene regiones que varían de forma sustancialmente continua, o una combinación de regiones discretas y regiones que varían de forma sustancialmente continua.

Los ejemplos de elementos ópticos de patrón de fase dinámicos adecuados que tienen un aspecto de su función dependiente del tiempo incluyen patrones de difracción generados por ordenador, materiales de desplazamiento de fase, matrices de cristal líquido de desplazamiento de fase, micromatrices de espejo, incluidas micromatrices de espejo de modo pistón, moduladores de luz espaciales, deflectores electro-ópticos, moduladores acusto-ópticos, espejos deformables, matrices reflectoras MEMS y similares. Con un elemento óptico de patrón de fase 101 dinámico, el medio 105 que comprende el elemento óptico de patrón de fase 101 codifica un holograma que se puede modificar para conferir un desplazamiento de fase de patrón al haz de luz enfocado que da lugar al cambio correspondiente en el perfil de la fase del haz de luz enfocado, tal como difracción o convergencia. Adicionalmente, se puede modificar el medio 105 para producir un cambio en la ubicación de las trampas ópticas 103. Una ventaja de los elementos ópticos de patrón de fase 101 dinámicos es que se puede modificar el medio 105 para mover independientemente cada trampa óptica 103.

En aquellas disposiciones en las que el perfil de fase de los haces elementales es menos intenso en la periferia y más intenso en regiones interiores a la periferia, resulta útil sobrecargar la abertura trasera en menos de aproximadamente el 15 por ciento para formar trampas ópticas con mayor intensidad en la periferia que las trampas ópticas formadas sin sobrecargar la abertura trasera.

En algunas disposiciones, la forma de una trampa óptica puede cambiar desde su forma original a la de una trampa óptica de punto, un vórtice óptico, un haz de Bessel, un embudo óptico, un rotor óptico o una jaula de luz. La trampa óptica se puede mover en dos o tres dimensiones. El elemento óptico de patrón de fase también es útil para impartir un modo topológico en particular a la luz de láser, por ejemplo, al convertir un modo gaussiano en un modo de Gauss-Laguerre. En consecuencia, se puede formar un haz elemental en un modo de Gauss-Laguerre al mismo tiempo que se puede formar otro haz elemental en un modo gaussiano. La utilización de modos de Gauss-Laguerre potencia enormemente el atrapamiento al reducir la presión de la radiación.

## 1. Sistema de formación de imágenes

El presente diseño de instrumento usa una cámara CCD de alta resolución para el sistema de formación de imágenes 110 principal. La mayor ventaja de la cámara CCD (véase el número de referencia 511 de la figura 5) es la favorable relación de coste/rendimiento, dado que esta es una tecnología madura.

Otra ventaja de las cámaras CCD es su amplio intervalo dinámico y la facilidad para generar resultados digitales.

Las imágenes se visualizan en un monitor de ordenador (véase el número de referencia 510 de la figura 5) para proporcionar un marco de referencia tanto para seleccionar la ubicación de las trampas como para reducir al mínimo la posibilidad de la exposición accidental del operario al láser.

2. Interfaz del usuario

a. Presentación de los objetos La interfaz del usuario consiste en un monitor de ordenador que presenta el campo de visión tomado por la cámara CCD. El usuario indica los sitios de las trampas con un ratón. También existe una opción para suprimir una ubicación.

Como se describe con más detalle a continuación, el usuario también puede especificar la potencia por trampa con el fin de evitar que se dañe la muestra. Además, es deseable poder variar la potencia de la trampa debido a que el atrapamiento depende de la diferencia entre el índice refracción de la muestra y el medio de suspensión, que cabe esperar que varíen de una muestra a otra.

b. El holograma

El propósito de indicar los sitios de las trampas es proporcionar datos de entrada para el cálculo del holograma. En esencia, el holograma es una función cuya transformada de Fourier produce la matriz de trampas deseada. No obstante, en el caso de la pantalla de cristal líquido, esta función es un objeto de fase (es decir, un objeto que cambia la fase del frente de onda sin absorber energía alguna).

c. Métodos de elección

El conjunto de trampas cuando se necesitan un gran número de trampas, el tiempo para indicar su ubicación con un ratón de ordenador puede ser desmesuradamente alto. Por lo tanto, existen varias opciones para reducir el tiempo necesario.

Con frecuencia, se desea usar las trampas para mover un objeto en una dirección en particular. Esto se puede llevar a cabo usando el ratón para crear una línea (arrastrando). El programa de ordenador interpreta una línea como una petición para desplegar una serie de trampas de forma secuencial y lo suficientemente próximas entre sí como para mover el objetivo en pequeñas etapas sin perder el bloqueo del objetivo.

La presente divulgación también incluye la capacidad de cambiar la altura de las trampas. Si un haz de láser está paralelo al eje óptico de la lente de objetivo 109, entonces se forma una trampa a la misma altura que el plano focal de la lente 109. El cambio de la altura de una trampa se lleva a cabo mediante el ajuste del holograma de modo que el haz de luz que forma la trampa converge (o diverge) ligeramente cuando entra en la lente de objetivo 109 del microscopio. Se puede ajustar la altura de una trampa usando lentes, pero solo un atrapamiento óptico holográfico (HOT) permite ajustar la altura de cada trampa individual independientemente de cualquier otra trampa. Esto se lleva a cabo por el ajuste del programa de ordenador de la modulación de la fase provocada por el holograma de cristal líquido.

3. Soporte de muestras

a. General La cámara de muestras 200 (véanse las figuras 2A y 2B) es barata y desechable. Aunque se describe la cámara de muestras 200 a continuación, otro objeto de la presente invención es un diseño flexible que se puede cambiar para aplicaciones diferentes.

La cámara de muestras 200 descansa sobre la superficie de un portaobjetos 201 de microscopio. La cámara de muestras 200 contiene una serie de canales 203 para introducir muestras u objetos. Los canales 203 están conectados a depósitos de suministro y recogida por un tubo fino 204 (disponible comercialmente). Las muestras u objetos estarán suspendidos en un medio líquido y se introducirán en la zona de trabajo a través de los canales 203. La cámara de muestras 200 está cubierta por un cubreobjetos 205.

b. Fabricación de la cámara de muestras

En una disposición, para fabricar la cámara 200 se usa una resina de poli (dimetilsiloxano) (PDMS). El proceso implica crear el patrón de canales 203 deseado en un ordenador usando métodos ordinarios de CAD/CAM y transferir el patrón a una fotomáscara usando técnicas convencionales de fotorresistencia/grabado. Después se usa la fotomáscara como máscara negativa para crear un patrón inverso de los canales que se graban sobre una oblea de silicio. La profundidad de los canales 203 se controla mediante el tiempo de grabado. La oblea de silicio es una réplica negativa de la cámara de muestras 200 real. La etapa final consiste en crear la cámara de muestras 200 positiva vertiendo PDMS sobre la oblea y polimerizándolo. Esto da lugar a un molde de PDMS que se une a un portaobjetos 201 de vidrio y se cubre con un cubreobjetos 205. La unión del vidrio al PDMA se efectúa con un grabado con oxígeno que activa las superficies expuestas.

Para garantizar una calidad consistente son necesarias una serie de etapas adicionales. Por ejemplo, se mantiene la solución de PDMS/endurecedor a vacío con el fin de evitar la formación de burbujas. Se silaniza la oblea de silicio para evitar que el PDMS se pegue a la oblea. Existen una variedad de etapas que implican limpiar las réplicas y mantener los controles ambientales apropiados. Representan la tecnología ordinaria.

Los canales 203 se conectan al tubo 204 de calibre microscópico usando agujas 206 de jeringuilla pequeñas sujetas usando pegamento 214, que se insertan a través del molde de PDMS dentro de pocillos 207 circulares pequeños que conectan con cada canal 203. Las soluciones de muestra se introducen en el canal 203 usando microbombas 208.

La figura 2B muestra un diagrama de una disposición típica para la introducción de una muestra a través de la bomba 208 de la jeringuilla en 210. El medio se introduce en 211 y los desechos se recogen en 21 y las colectas deseadas en 213.

La figura 3 presenta una representación de una micrografía de barrido electrónico del diagrama de la figura 2B como se creó realmente a partir del proceso descrito anteriormente. Los canales tienen aproximadamente 50 micrómetros de anchura y 50 micrómetros de profundidad. La figura 4 presenta una representación de una micrografía de barrido electrónico del volumen 'de trabajo' donde se producirían las manipulaciones de la muestra en estudio. Los diagramas muestran claramente que los canales 203 son lisos y están limpios.

Aunque los canales 203 son de sección transversal rectangular, también pueden preverse otras formas. Los canales 203 están diseñados para permitir que se hagan fluir las muestras hacia la "zona de trabajo", cuya forma se puede diseñar a medida de los requisitos experimentales.

#### c. Trampas ópticas holográficas

A diferencia de las trampas ópticas escaneadas, que dirigen múltiples puntos de atrapamiento en secuencia y por tanto, son de tiempo compartido, las trampas ópticas holográficas iluminan cada una de sus trampas de forma continua. Para que una trampa óptica escaneada logre la misma fuerza de atrapamiento que una trampa iluminada de forma continua, debe proporcionar al menos la misma intensidad promediada en el tiempo. Esto significa que la trampa escaneada debe tener un máximo de intensidad mayor en un factor proporcional a al menos el número de regiones de atrapamiento. Este máximo de intensidad mayor aumenta las oportunidades de daño inducido ópticamente en el material atrapado. Este daño puede surgir por al menos tres mecanismos: (1) absorción monofotónica que da lugar a calentamiento local, (2) absorción monofotónica que da lugar a transformaciones fotoquímicas y (3) absorción multifotónica que da lugar a transformaciones fotoquímicas. Los acontecimientos (1) y (2) se pueden mitigar escogiendo una longitud de onda de la luz que el material de atrapamiento y el medio fluido circundante absorban débilmente. El acontecimiento (3) es un problema más general y se mitiga en parte trabajando con luz de mayor longitud de onda. Así, las trampas ópticas holográficas pueden manipular materiales delicados más suavemente con mayor eficacia mediante la distribución de cantidades más pequeñas de fuerza continuamente entre una serie de puntos sobre un objeto en lugar de dañar potencialmente el objeto al ejercer la fuerza total sobre un solo punto o a una intensidad mayor durante un periodo de tiempo.

En una disposición, el diseño es flexible en cuanto que se puede diseñar cualquier patrón de canales 203 deseado con un programa de ordenador de CAD/CAM ordinario. La complejidad del patrón no es un factor siempre que los canales 203 estén lo suficientemente separados como para no se invadan entre sí. Como se puede ver en las figuras 2B y 3, se pueden acomodar fácilmente múltiples conjuntos de canales 203 de modo que se puede usar un solo chip para más de un experimento. Además, una vez que se fabrica un molde, se puede usar para fabricar miles de cámaras de muestras, de modo que la metodología se adapta fácilmente a las técnicas de producción en masa. Se calcula que el coste marginal de una sola cámara sería del orden de unos pocos céntimos cuando se produce en masa.

### 4. Sistema óptico

#### a. Síntesis del holograma

Las primeras versiones de las trampas ópticas holográficas usaban hologramas fijados fabricados a partir de una variedad de materiales. Eran adecuados para demostrar el principio del uso de hologramas para crear varios cientos de trampas. No obstante, el principal defecto de estos hologramas era que eran estáticos y que se tardaba horas en fabricar un solo holograma. Con la llegada de los equipos para crear pantallas de cristal líquido controladas por ordenador capaces de formar hologramas muchas veces por segundo, el uso de trampas ópticas como un dispositivo dinámico se ha convertido en una realidad en la práctica. El principio para calcular el holograma se describe a continuación.

#### b. El microscopio

El sistema óptico 110 consiste en un microscopio óptico de alta calidad ordinario. El objetivo es una lente 109 de abertura numérica alta acoplada con una lente condensadora de distancia de trabajo larga. La lente de objetivo 109 de abertura numérica alta se usa para el atrapamiento. Aunque la lente condensadora de distancia de trabajo larga puede reducir en cierta medida la resolución de las imágenes, no pone en riesgo el atrapamiento y proporciona espacio extra cerca del portaobjetos de la muestra para acomodar tuberías y receptáculos. Se pueden mover los



objetos sujetándolos con trampas y moviendo la platina del microscopio vertical o lateralmente.

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

El atrapamiento depende del gradiente del índice de refracción, de modo que los materiales con índices de refracción próximos al del medio circundante necesitan trampas con niveles de potencia mayores. Además, la tolerancia de los materiales al daño variará con la potencia de las trampas, de modo que es deseable que el operario pueda controlar este parámetro. El usuario puede aumentar el nivel de potencia de cualquier trampa en particular usando un regulador de potencia que se muestra en la interfaz gráfica.

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

El modulador de luz espacial 108 es esencialmente una matriz de cristal líquido controlada por un campo electrostático que, a su vez, se puede controlar por un programa de ordenador. La matriz de cristal líquido tiene la propiedad de que retarda la fase de la luz en cantidades diferentes en función de la fuerza del campo eléctrico aplicado.

Se usan dispositivos de cristal líquido nemático para pantallas o aplicaciones donde es necesaria una profundidad grande de modulación solo de fase (211 o mayor). Las moléculas de cristal líquido nemático se encuentran habitualmente paralelas a la superficie del dispositivo, dando el retardo máximo debido a la birrefringencia del cristal líquido. Cuando se aplica un campo eléctrico, las moléculas se inclinan paralelas al campo eléctrico. A medida que aumenta el voltaje, disminuyen eficazmente el índice de refracción a lo largo del eje extraordinario y por tanto, la birrefringencia, provocando una reducción del retardo del dispositivo.

d. El láser

Los láseres útiles incluyen láseres de estado sólido, láseres bombeados por diodos, láseres gaseosos, láseres de tinte, láseres de alejandrita, láseres de electrones libres, láseres VCSEL, láseres de diodos, láseres de Ti-zafiro, láseres YAG dopados, láseres YLF dopados, láseres YAG bombeados por diodos y láseres YAG bombeados por lámparas de destellos. Se prefieren los láseres de Nd:YAG bombeados por diodos que funcionan a entre 10 mW y 5 W. Las longitudes de onda preferidas del haz de láser usadas para formar matrices para investigar material biológico incluyen las longitudes de onda del infrarrojo, infrarrojo cercano, rojo visible, verde y azul visible, siendo las más preferidas longitudes de onda desde aproximadamente 400 nm hasta aproximadamente 1060 nm.

## 5. Método de funcionamiento

En una disposición, un sistema de atrapamiento óptico 500 (véase la figura 5) (tal como el sistema BioRyx comercializado por Arryx, Inc., Chicago, Illinois) incluye un microscopio 501 de la serie TE 2000 de Nixon en el que se ha dispuesto una montura para formar las trampas ópticas usando una unidad de atrapamiento óptico holográfico 505. El portaobjetivos 502 al que se une un alojamiento, encaja directamente en el microscopio 501 por medio de la montura. Para la formación de imágenes, se dispone una fuente de iluminación 503 por encima de la lente de objetivo 504 para iluminar la muestra 506.

En una disposición, el sistema 100 de trampas ópticas (véanse las figuras 1 y 5) incluye un extremo del primer canal de luz, que está muy próximo al elemento óptico y el otro extremo del primer canal de luz, que corta con y comunica con un segundo canal de luz formado perpendicular al mismo. El segundo canal de luz está formado dentro de una base de una torre de montaje de lentes de microscopio o "portaobjetivos". El portaobjetivos está adaptado para encajar en un microscopio de la serie TE 200 de Nixon. El segundo canal de luz comunica con un tercer canal de luz que también es perpendicular al segundo canal de luz. El tercer canal de luz atraviesa desde la superficie superior del portaobjetivos a través de la base del portaobjetivos y es paralelo a una lente de enfoque de la lente de objetivo 109. La lente de enfoque 109 tiene unas partes superior e inferior que forman una abertura trasera. Interpuesto en el tercer canal de luz entre el segundo canal de luz y la abertura trasera de la lente de enfoque se encuentra un divisor de haz 108 de espejo dicróico.

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

Para generar las trampas ópticas, se dirige un haz de láser desde un láser 507 (véase la figura 5) a través de un colimador y a través de un extremo de fibra óptica 508 y se refleja desde la superficie dinámica del elemento difractivo óptico 509. El haz de luz que sale del extremo de colimador de la fibra óptica se difracta por la superficie dinámica del elemento difractivo óptico en una pluralidad de haces elementales. Se puede controlar y variar el número, tipo y dirección de cada haz elemental modificando el holograma codificado en el medio de superficie dinámica. Los haces elementales se reflejan después desde el primer espejo a través del primer conjunto de ópticos de transferencia hacia abajo del primer canal de luz a través del segundo conjunto de ópticos de referencia hacia el segundo espejo; y se dirigen al espejo dicróico 509 hasta la abertura trasera de la lente de objetivo 504, convergen a través de la lente de objetivo 504, produciendo de este modo las condiciones de gradiente óptico necesarias para formar las trampas ópticas. Esa porción de la luz que se divide a través del espejo dicróico 509, para la formación de imágenes, pasa a través de la parte inferior del tercer canal de luz formando una corriente de datos ópticos (véase la figura 1).

La espectroscopía de una muestra de material biológico se puede llevar a cabo con una fuente de iluminación 503 para formación de imágenes adecuada para espectroscopía inelástica o retrodispersión de luz polarizada, siendo la anterior útil para evaluar la identidad química y siendo la última adecuada para medir dimensiones de estructuras internas tales como el tamaño del núcleo. Con el uso de estos métodos espectroscópicos, en algunas realizaciones, se estudian las células. Se puede usar un ordenador 510 para analizar los datos espectrales y para identificar células portadoras de un cromosoma X o Y, o tipos celulares que se sospecha que son cancerosos, precancerosos y/o no cancerosos. El programa de ordenador puede aplicar después la información a dirigir trampas ópticas para que contengan tipos celulares seleccionados. Después, se pueden identificar las células contenidas basándose en la reacción o la unión de las células contenidas con compuestos químicos.

Los presentes método y sistema se prestan a un proceso semiautomático o automático para rastrear el movimiento y el contenido de cada trampa óptica. Se puede realizar un seguimiento del movimiento por medio de una cámara de vídeo 511, espectros o una corriente de datos ópticos y que proporciona un programa de ordenador que controla la selección de las células y la generación de trampas ópticas. En otras disposiciones, el movimiento de las células se rastrea basándose en el movimiento predeterminado de cada trampa óptica originado por la codificación del elemento óptico de patrón de fase. Adicionalmente, en algunas disposiciones, se usa un programa de ordenador para llevar un registro de cada célula contenida en cada trampa óptica.

Después, la corriente de datos ópticos se puede visualizar, convertir en una señal de vídeo, monitorizar o analizar por inspección visual de un operario, espectroscópicamente y/o por seguimiento en vídeo. La corriente de datos ópticos también se puede procesar por un fotodetector para realizar un seguimiento de la intensidad, o cualquier dispositivo adecuado para convertir la corriente de datos ópticos en una corriente de datos digitales adaptados para su uso por un ordenador.

En un enfoque que no emplea un SLM, se lleva a cabo el movimiento mediante la transferencia de los objetos desde un primer conjunto de trampas ópticas hasta un segundo, un tercero y después un cuarto, etc. Para mover los objetos desde la primera posición hasta una segunda posición, se gira un elemento óptico de patrón de fase estático alrededor de un pivote para alinear el haz de láser con una segunda región que genera el segundo conjunto de trampas ópticas a un correspondiente segundo conjunto de posiciones predeterminadas. Al construir el segundo conjunto de trampas ópticas a la proximidad apropiada de la primera posición, se pueden hacer pasar las sondas desde el primer conjunto de trampas ópticas hasta el segundo conjunto de trampas ópticas. La secuencia puede continuar pasando las sondas desde el segundo conjunto de posiciones predeterminadas hasta un tercer conjunto de posiciones predeterminadas, desde el tercer conjunto de posiciones hasta un cuarto conjunto de posiciones predeterminadas y desde el cuarto conjunto de posiciones predeterminadas y así sucesivamente, mediante la rotación del elemento óptico de patrón de fase para alinear la región apropiada correspondiente a la posición deseada. El intervalo de tiempo entre la finalización de un conjunto de trampas ópticas y la generación del siguiente es de una duración que garantice que se transfieren las sondas al siguiente conjunto de trampas ópticas antes de que se desvíen.

En un movimiento escalonado de los objetos desde una proximidad amplia hasta una estrecha, el movimiento escalonado de las células se produce de una forma parecida. No obstante, a medida que los objetos pasan desde un primer conjunto de trampas ópticas hasta un segundo conjunto y se mueven a una segunda posición y subsiguientes, la disposición escalonada de las trampas permite un empaquetado denso de los objetos sin colocar un conjunto de trampas demasiado próximo a dos objetos al mismo tiempo, lo que podría hacer que los objetos estuvieran contenidos en la trampa óptica equivocada: Una vez que un objeto o célula ha interactuado con una trampa, se pueden usar métodos espectrales para estudiar la célula. El espectro de las células que tuvieron resultados positivos (es decir, las células que reaccionaron con o se unieron a una marca) se puede obtener mediante el uso de iluminación para formación de imágenes tal como la adecuada para espectroscopía inelástica o retrodispersión de luz polarizada. Un ordenador puede analizar los datos espectrales para identificar los objetivos deseados y dirigir el elemento óptico de patrón de fase para separar esos objetivos deseados. Después de finalizar el ensayo, se puede realizar la selección, por ordenador o por un operario, de qué células descartar y cuáles recoger.

El peristaltismo óptico (véase la figura 9) es un proceso existente que emplea líneas paralelas de trampas 400 en un microcanal fluídico 401 dispuestas de modo que el espaciado entre las líneas permite que las partículas 402 atrapadas en una línea se absorban en trampas de la otra línea cuando se apaga la primera línea de trampas. El peristaltismo óptico se puede usar como alternativa a y junto con marcas fluorescentes (como se describe después con referencia a las aplicaciones). El proceso funciona sincronizando la extinción de las líneas de trampas sincronizadas de modo que las partículas se mueven en las direcciones deseadas especificadas por la disposición de las líneas de trampas. Al escoger si una línea de trampas de un lado o el otro de una partícula están encendidas o apagadas, se puede mover la partícula hacia delante o atrás en una dirección. Por tanto, al emplear grandes cantidades de trampas, se pueden mover grandes cantidades de partículas conjuntamente en una dirección dada. Así, se pueden mover las partículas atraídas a las trampas hacia una zona dada y si se desea, recogerlas allí.

Análogamente, al reducir de forma gradual el espaciado entre las trampas de las líneas hacia una dirección dada y/o al variar la curvatura de las líneas de trampas, se pueden barrera las partículas en un patrón de enfoque para concentrarlas. La inversión de este patrón dispersaría las partículas.

El espaciado entre líneas puede ser relativamente mayor para acelerar el movimiento de las partículas, o relativamente más estrecho para ralentizarlas. Análogamente, también se puede emplear la variación de la intensidad de trampas o líneas seleccionadas y por tanto, su efecto sobre las partículas. Al hacer converger o divergir los flujos, se pueden combinar o separar partículas. Además, se puede combinar el peristaltismo óptico con efectos diferenciales de arrastre viscoso o campos eléctricos para producir conjuntos complejos y específicos de valores de parámetros para separar materiales con precisión, por ejemplo. Al oponer las fuerzas de atrapamiento y otras, el punto de equilibrio de las dos fuerzas determina si una partícula se mueve con la trampa o con la otra fuerza.

En una disposición, se puede aplicar el peristaltismo óptico con un sistema holográfico que realiza un ciclo a través de una secuencia de patrones de fase para aplicar una secuencia correspondiente de patrones de atrapamiento óptico holográfico. Estos patrones se pueden codificar en el relieve de la superficie de elementos difractivos ópticos reflectores montados sobre la cara de un prisma, en la que un motor gira cada patrón a su sitio. Análogamente, se pueden colocar elementos difractivos ópticos transmisores sobre el perímetro de un disco y hacerlos girar para que realicen un ciclo a través de los patrones. También se pueden usar rejillas de fase conmutable y hologramas de fase codificados sobre películas.

Para partículas conducidas más allá de una matriz rectilínea por una fuerza externa oblicua, tal como el flujo de fluido, cuando la fuerza de atrapamiento es considerablemente mayor que la fuerza externa directriz, quedan atrapadas las partículas. Cuando la fuerza oblicua es mayor, las partículas fluyen más allá de la matriz.

Entre estos extremos, la fuerza oblicua supera la fuerza de atrapamiento en diferente medida para diferentes fracciones de las partículas, haciendo que las partículas salten de trampa a trampa a lo largo de la dirección del eje principal de la matriz. Cuando se gira la matriz a  $45^\circ$  se puede observar una deflexión de red cero porque: (1) se producen desplazamientos positivos y negativos con igual probabilidad; o (2) las partículas se bloquean en la dirección [11], saltando en diagonal a través de la matriz.

Las partículas afectadas en mayor medida por una matriz se pueden desviar con ángulos mayores que las partículas afectadas en mayor medida por la fuerza oblicua. La fuerza de gradiente óptico ejercida sobre las partículas varía aproximadamente como  $a^3$ , donde  $a$  = radio. El arrastre de Stokes sobre las partículas varía como " $a$ ". Por tanto, las partículas mayores se ven afectadas de forma desproporcionada por las matrices de trampas, mientras que las partículas más pequeñas experimentan una deflexión menor. Al orientar la matriz cerca del ángulo de deflexión óptima y ajustar la intensidad se colocan las partículas mayores en condiciones de salto y por tanto, con una deflexión mayor que las partículas más pequeñas. Las partículas con diferentes deflexiones se pueden recoger o fraccionar más mediante matrices adicionales posteriores a la primera.

Algunas técnicas convencionales para el fraccionamiento logran la separación en la dirección de una fuerza aplicada. No obstante, estas técnicas funcionan sobre lotes de muestras en lugar de continuamente.

Otras técnicas convencionales para el microfraccionamiento emplean tamices microfabricados que consisten en un entramado bidimensional de obstáculos o barreras. Por ejemplo, una disposición asimétrica de barreras rectifica el movimiento browniano de las partículas que pasan a través del tamiz, haciendo que las partículas sigan trayectorias que dependen de los coeficientes de difusión de las partículas. No obstante, los entramados microfabricados usados se obstruyen y no se pueden adaptar al tamaño y tipo de partícula.

En la figura 6, se ejemplifica un ejemplo de clasificación de partículas. Aunque el ejemplo ilustrado ejemplifica la deflexión lateral, en el mismo sistema se puede obtener el peristaltismo óptico. Una representación de una imagen de vídeo muestra la separación de material basada en la luz, en este caso adaptada para separar objetos en función del tamaño de partícula. El flujo del canal superior izquierdo contiene partículas de 1, 2,25 y 4,5  $\mu\text{m}$  y desde el inferior izquierdo entra otro flujo. Las líneas superpuestas indican respectivamente el flujo de cada canal cuando la alimentación del sistema de láser está apagada. Cuando la alimentación del láser está encendida, la luz de la región

de interacción (indicada por la caja verde superpuesta), extrae las partículas de 4,5 Lni del flujo superior y las lleva al canal inferior derecho como indica la trayectoria blanca superpuesta.

6. Aplicación en la clasificación de esperma

5

a. Antecedentes

En una aplicación, se pone en práctica una clasificación de células de alto rendimiento de alta resolución mediante el uso de tecnología de atrapamiento óptico. La necesidad de poner en práctica esta tecnología como nueva base para la clasificación de células se evidencia por el fracaso de los citómetros de flujo tradicionales al realizar las determinaciones de alta resolución de las características celulares necesarias en muchos problemas de clasificación. En este ejemplo de separación de espermatozoides portadores de cromosomas X e Y entre sí en la industria ganadera, se escalan los caudales sustancialmente a partir de las velocidades actuales de los sistemas del estado de la técnica. El motivo es que la citometría de flujo tradicional es mejor para realizar una determinación de fluorescencia/no fluorescencia y en este modo, puede funcionar a velocidades que proporcionan resultados de 30.000 células/segundo. Dado que el problema está en discriminar entre diferentes niveles de fluorescencia (como lo es en el problema de separación del esperma), estos métodos se vuelven muy ineficaces. En el problema de separación del esperma, cuando los espermatozoides portadores de cromosomas X e Y difieren en la fluorescencia en aproximadamente el 4 %, la velocidad se ralentiza a aproximadamente 4.000 células de resultado por segundo (véase J.L. Schenk, et al., Proceedings, The Range Beef Cow Symposium XVI, 1999).

b. Clasificación usando trampas ópticas holográficas

El método de aplicación de la clasificación de células de alto rendimiento de alta resolución, tiene los siguientes componentes: desarrollo microfluídico, desarrollo de un sistema de trampas ópticas (componente de atrapamiento para el sistema de canalización y el componente de trampa para el sistema de separación), medida de fluorescencia de alta resolución, control del sistema (incluido el cálculo del holograma) y diseño mecánico.

El primer componente es una celda de flujo que tiene un canal de entrada de fluido, que lleva la muestra de entrada y dos canales de salida que llevan células separadas fuera del canal de entrada. El segundo componente es un conjunto de trampas que realizan la función de "canalización" (esta "función de canalización" es el equivalente de la boquilla que forma el flujo de gotitas en un citómetro de flujo tradicional). El tercer componente es el sistema de detección y finalmente, el cuarto componente es el sistema de clasificación. Las figuras 7A-7B ilustran la relación entre estos cuatro componentes.

En este ejemplo, se usa esperma como objetivo de muestra para la separación. El método tradicional de diferenciación entre espermatozoides portadores de cromosomas X e Y emplea Hoechst 33342, un tinte que se une específicamente al ADN de tal forma que la fluorescencia total presente es una medida del ADN total presente. La medida de esta fluorescencia proporciona una estimación de la naturaleza de la carga cromosómica subyacente. (Schenk, 1999; también, Erik B. van Munster, Cytometr y, volumen 47, página 192, 2002).

El rasgo esencial que permite esta realización propuesta de la presente invención alcanzar rendimientos altos es su capacidad inherente para desplazar material en líneas paralelas simultáneamente y próximas entre sí. Para esta aplicación inicial, se crea un sistema de flujo con 10 líneas de entrada 300, separadas unas de otras por 10 micrómetros. Esto determina una anchura total para el flujo desde el depósito de entrada de 110 micrómetros. Los canales de salida 302, 303 tienen cada uno los mismos 110 micrómetros de ancho que el canal de entrada 301 y discurren paralelos al canal de entrada 301 como se muestra en las figuras 7A y 7B. Dentro de los "canales de salida" 302, 303 se encuentra una solución tamponadora que se introduce en estos canales al mismo caudal que se mantiene en el canal de entrada 301. Estos tres canales 301, 302, 303 están diseñados para mantener el flujo laminar en los intervalos de flujo de interés. En la región de clasificación, donde se transfieren células específicas desde el canal de entrada 301 a uno de los canales de salida 302, 303, los tres flujos son adyacentes, sin separación mecánica entre ellos. Los flujos laminares mantienen cualquier material en su flujo correspondiente a menos que se introduzca una fuerza externa específica para transferir ese material desde un canal de flujo a otro.

Las trampas de canalización 305 actúan sobre las células de entrada 306 de modo que ambas se desplazan en líneas de flujo bien definidas y por tanto, las células de entrada 306 están separadas entre sí por una distancia mínima 306 que debe fijar el operario. Los caudales de los canales 301, 302, 303 se fijan por esta distancia mínima 306, por la velocidad de "actualización" del dispositivo que realiza la función de separación y por la velocidad global de procesamiento de las células deseada. Suponiendo que la distancia mínima en el caso de la presente muestra es de 20 micrómetros (suficiente para separar completamente las cabezas del esperma, pero una distancia que permitirá un solapamiento sin consecuencias de las colas) y una velocidad de procesamiento de 1.500 células/segundo, este sistema usa un caudal de 3 mm/segundo [(15.000 células/segundo) x (20 micrómetros/línea de células) (10 líneas)].

El sistema de canalización se compone de un patrón de trampas 305 de baja intensidad establecido por un conjunto de hologramas estáticos que están montados en una rueda giratoria de modo que el patrón cambia como función del

patrón de rotación. Las trampas de canalización más posteriores son de intensidad y posición fijas, por lo que solo sirven para mantener la separación entre las líneas de flujo de células. Las trampas más anteriores 305 pueden cambiar tanto de intensidad como de posición con el tiempo para actuar de modo que alteren el flujo en células agrupadas y pasen a través de células individuales, no agrupadas.

5 La medida tras la cual se realiza la determinación de la clasificación se puede producir en la región posterior a las trampas de canalización 305 o se puede producir en una región más allá del sistema de canalización. Para este sistema inicial, la medida consistirá en la detección de fluorescencia de alta resolución. No obstante, en el futuro se pueden aplicar otros criterios de clasificación activa, tales como medidas de dispersión, o se pueden emplear técnicas pasivas tales como las que usan la deflexión óptica como se explica anteriormente.

15 El componente final del dispositivo es el sistema de separación en el que los criterios de clasificación se utilizan para desviar las células hacia uno de los canales de salida 302, 303 o para dejar que permanezcan en el flujo del canal de entrada 301. El parámetro crucial para este componente es el campo de visión de la lente de objetivo 304 de apertura numérica alta usada para aplicar la matriz de trampas dinámicas 305 que controlan la separación. La anchura de este campo de visión son los mismos 110 micrómetros de las anchuras de los canales individuales. La longitud, no obstante, depende de los caudales, las profundidades de los canales y las velocidades de actualización del dispositivo óptico usado para controlar estas trampas.

20 En la actualidad, una disposición incluye moduladores de luz espaciales para crear máscaras de fase que son muy eficaces para dirigir sistemas de atrapamiento óptico. Estos dispositivos tienen velocidades de actualización de 30 Hz o más. Con una profundidad de los canales estimada de 10 micrómetros y suponiendo que las células de esperma se deberían mover en etapas de 1 micrómetro, se emplean 10 actualizaciones del modulador de luz espacial para mover una célula desde el centro del canal de entrada 301 hasta el centro de cualquiera de los canales de salida 302, 303. Con un valor de actualización de 30 Hz, la aplicación de estas 10 etapas se producirá en 1/3 de segundo. A un caudal de 3 mm/segundo, estas 10 etapas se aplican en una longitud de 1 mm en la dirección del flujo. Por lo tanto la lente de objetivo 304 para el componente de separación tendría un área de trabajo de 110 micrómetros x 1000 micrómetros. Un área de desarrollo importante de este proyecto es el diseño de este montaje de lente. En general, la compensación del diseño de la lente está entre el campo de visión y la apertura numérica. Es decir, para un montaje de lente de una complejidad en particular, un aumento significativo del rendimiento de una de estas áreas llevará consigo una disminución del rendimiento en la otra área. Este es el motivo de que las lentes de alto rendimiento usadas en áreas tales como la producción litográfica de alta resolución de productos electrónicos con circuitos integrados sean bastante complejas. No obstante, la presente divulgación, está en niveles de rendimiento significativamente inferiores a los de estos montajes de lentes.

35 7. Divulgación sobre pinzamiento de vórtice de campo amplio

El pinzamiento con un campo de visión amplio implica lentes de objetivo de microscopio que tienen una apertura numérica relativamente baja. La capacidad de atrapar ópticamente objetos en la dirección axial se basa en enfocar un haz de luz hacia abajo de manera que tenga los mayores gradientes en la dirección axial. Esto implica que se forme un cono de luz con el radio más amplio posible. El radio del cono viene determinado directamente por la apertura numérica del objetivo, es decir, una apertura numérica alta significa un radio de cono amplio. Esto está en conflicto directo con los requisitos de campos de visión amplios. Tradicionalmente, esto ha dificultado el pinzamiento con un campo de visión amplio en la dirección axial. Una de las principales contribuciones a la dificultad del pinzamiento axial es la presión de la radiación del haz de luz enfocado. Especialmente para partículas que tienen una buena combinación de densidad con el medio circundante, por ejemplo, microesferas de poliestireno, la presión de la radiación puede expulsar las partículas de la trampa. Con un objetivo de apertura numérica baja, es difícil superar la presión de la radiación con una fuerza de pinzamiento suficiente en la dirección axial. No obstante, las trampas ópticas holográficas tienen la capacidad de formar modos inusuales de luz que reducen enormemente la presión de la radiación del haz de luz. Las trampas de vórtice, por ejemplo, tienen un centro oscuro debido a que las fases variables de la luz se anulan en el centro de la trampa. Este centro oscuro significa que dejan de existir la mayoría de los rayos de luz que se desplazan hacia abajo por el centro del haz. Son exactamente estos haces los que albergan la mayor parte de la presión de la radiación de la luz, de modo que su eliminación mitiga enormemente la dificultad en el atrapamiento axial. Otros modos, p. ej., modos de donut, tienen la misma ventaja.

55 La manipulación (empuje, dirección, clasificación) de objetos o células en general se hace más segura al tener disponibles múltiples haces. Como un lecho de pinchos, las múltiples pinzas garantizan que se introduce menos potencia en cualquier punto de la célula en particular. Esto elimina los puntos calientes y reduce el riesgo de daño. Cualquier proceso bifotónico destructor se beneficia enormemente, dado que la absorción es proporcional al cuadrado de la potencia del láser. La simple adición de una segunda pinza reduce la absorción bifotónica en un punto en particular en un factor de cuatro. Las células grandes, como las de Tetrahymena, que se mantienen en su sitio mediante una matriz de pinzas, implican una gran cantidad de potencia de láser para un atrapamiento eficaz. La disposición de la potencia en una sola trampa provocaría un daño inmediato a la célula.

65 Por último, la manipulación incluso de una sola célula se potencia enormemente por la utilización de atrapamiento óptico holográfico. Se puede manipular una sola célula epitelial de carrillo mediante una línea de pinzas, que

levantan la célula a lo largo del perímetro de un lado. La rotación resultante permite una visión de la célula de 360 grados. Además de la ventaja para ver las muestras biológicas, también existe la capacidad de orientar las muestras de forma estable, lo que tiene un beneficio claro para estudios tales como experimentos de dispersión que tienen una gran dependencia de la orientación de la muestra.

5

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

Debido a la gran cantidad de esperma de una eyacuación bovina típica y la pequeña cantidad de tiempo disponible antes de que el esperma deje de ser funcional, para un clasificador de esperma comercialmente viable se clasifica una gran cantidad de esperma por segundo (del orden de un millón). La clasificación con trampas ópticas holográficas confiere una enorme a través de su capacidad para procesar en paralelo una gran cantidad de células.

10

La tecnología para usar láseres para acceder a una gran cantidad de sitios rápidamente ya existe en forma de disco láser giratorio, reproductor de CD o reproductor de DVD. Estos dispositivos combinan el movimiento rotacional del disco con el movimiento radial del láser para acceder a sitios a velocidades increíblemente altas. Por ejemplo, el reproductor de DVD típico puede acceder a aproximadamente 4.000 millones de "bits" independientes en el disco en aproximadamente dos horas. La combinación de este enfoque de disco giratorio con el atrapamiento óptico (véase la figura 8) permite acceder a las células a velocidades parecidas y el atrapamiento óptico holográfico aumenta estas velocidades en factores de 100 o incluso mayores.

15

20

Como se muestra en la figura 8, se introducen los objetos o células en la entrada de muestras 700 y mediante el uso de un sistema de administración de muestras 701 apropiado, se disponen las células en el disco de distribución de muestras 702 que se hace rotar por el control de un motor. El sistema de atrapamiento y formación de imágenes 703, que está conectado a un sistema de control y análisis 704, clasifica las células y se recogen en las cámaras de muestras 705 y 706.

25

Existen muchos mecanismos para distribuir las células por toda la superficie del disco. Las cámaras de fluidos que alojan células individuales, geles que inmovilizan las células, superficies pegajosas o cerosas que unen las células, o incluso la congelación de las células en una masa sólida, son métodos que se pueden emplear. Una vez que las células están situadas de forma que mantienen sus posiciones relativas, se pueden medir correctamente. Se puede usar entonces el atrapamiento óptico para liberar las células deseadas o las no deseadas de la superficie o volumen. En situaciones donde se desea clasificar en más de dos grupos, se puede liberar cada grupo en un solo paso y se pueden ejecutar múltiples pasos.

30

#### 9. Clasificación de células y material no biológico mediante el uso de sustratos fundibles

Las tecnologías tales como la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), aunque bien establecidas, padecen el hecho de que son métodos de procesamiento en serie. Debido a la ubicuidad de los tintes marcadores en biología, es posible la clasificación basada en estos tintes. Frecuentemente, estos tintes crean una diferencia de absorción de alguna longitud de onda o intervalo de longitudes de onda entre muestras teñidas y sin teñir, suponiendo que los grupos que se han de clasificar no presentan ya de forma inherente esta diferencia de absorción. Se pueden usar entonces trampas ópticas holográficas tanto para calentar como para manipular la muestra en un sustrato que se funde por la temperatura elevada de la muestra. La muestra que se incrusta se puede liberar después con un aumento de la temperatura de la masa. Además, es posible un método de procesamiento aún más paralelo más rápido en el que se iluminan las células con una fuente de luz amplia de potencia alta que procesa toda la matriz de muestras simultáneamente. El mismo conjunto de métodos se pueden aplicar a muestras no biológicas que difieren en los espectros de absorción, o se pueden preparar selectivamente para tal fin.

40

45

#### 10. Clasificación basada en gel

Las trampas de láser ópticas holográficas suponen una gran ventaja para la manipulación de objetos en cuanto que pueden acceder a y mover objetos en tres dimensiones. A medida que avanzan las aplicaciones de clasificación biológica, es necesario clasificar cantidades mayores de muestras, frecuentemente en cantidades de tiempo pequeñas. El acceso tridimensional de las trampas ópticas holográficas significa que se pueden realizar estas aplicaciones de clasificación. Se pueden clasificar eficazmente cantidades de células y otras muestras de interés biológico que serían engorroso o imposible clasificar en serie o en un sustrato bidimensional.

50

55

Una aplicación de esta clasificación tridimensional se basa en un proceso de gelificación reversible. Se gelifican las células en una red y después se extraen del gel las células deseadas o las no deseadas usando trampas ópticas holográficas. Se puede usar el calor de las trampas para fundir el gel y proporcionar trayectorias de salida.

60

De forma alternativa, se destruyen células de forma selectiva, basándose en algún criterio, las trampas de láser ópticas holográficas. Después, se funde el gel entero y se separan las células vivas de las muertas. En lugar de destruirlas simplemente, se puede generar una explosión térmica más destructiva, que desintegra la célula en componentes mucho más pequeños y después se puede efectuar la clasificación basándose en el tamaño, agrupando o conectando determinadas células juntas de nuevo.

65

11. Destrucción de muestras biológicas

- 5 Una gran variedad de aplicaciones se benefician de la capacidad de destruir muestras biológicas de forma selectiva. Una de estas aplicaciones es la eliminación de patógenos de la sangre. Otra aplicación es la clasificación de células. Se identifican las células, se destruyen uno o más grupos de células y después se eliminan las células muertas. La destrucción se lleva a cabo por la energía lumínica de los propios láseres y no requiere necesariamente trampas ópticas para realizar esta función.
- 10 Esencialmente, se calientan las células o el medio que rodea las células con el haz de láser, dañando y destruyendo la célula. Las trampas ópticas holográficas, debido a su versatilidad y control tridimensional, permiten la destrucción de células paralela masiva selectiva.

12. Fijación de componentes electrónicos

- 15 Obsérvese que muchas de las técnicas anteriores se pueden usar para mover componentes electrónicos pequeños o para fijar componentes electrónicos en su sitio.
- 20 Aunque la invención se ha mostrado en particular con referencia a las realizaciones anteriores, se entenderá por los expertos en la técnica que se pueden hacer en ellas diversos otros cambios en la forma y en los detalles sin salir del alcance de esta invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de examen de células, que comprende:
- 5 introducir una pluralidad de células (104) a través de un canal de entrada (301) dispuesto entre dos canales tamponadores (302, 303);
- 10 hacer fluir solución tamponadora a través de dichos dos canales tamponadores (302, 303);
- 15 mantener flujo laminar en dicho canal de entrada (301) y en dichos dos canales tamponadores (302, 303) en líneas paralelas de flujo; y
- 20 examinar cada una de dicha pluralidad de células (104) en una región de interrogación de dicho canal de entrada (301), para determinar al menos una identidad química de cada una de dicha pluralidad de células (104) de acuerdo con un análisis de datos espectrales de cada una de dicha pluralidad de células (104);
- 25 iluminar dicha pluralidad de células usando una fuente de iluminación de formación de imágenes;
- 30 caracterizado porque dicha pluralidad de células son células de esperma portadoras de cromosoma X y de cromosoma Y y se usa un tinte para enlazar a ADN de cada una de dicha pluralidad de células de tal manera que una fluorescencia total presente es una medida de un ADN total presente; porque las células de esperma de cromosoma X se distinguen de las células de esperma de cromosoma Y en base a su fluorescencia; y porque dicha pluralidad de células de esperma se destruyen selectivamente en base a algún criterio predeterminado.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho canal de entrada y dichos canales tamponadores están dispuestos en un clasificador de células.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que no hay ninguna separación mecánica en dicho flujo laminar en dicho canal de entrada (301) y en dichos dos canales tamponadores (302, 303).
4. El método de la reivindicación 1, la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que destruir dicha pluralidad de células comprende generar una explosión térmica que desintegra dicha pluralidad de células.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dañar y destruir dicha pluralidad de células (104) se consigue usando un láser.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dañar y destruir dicha pluralidad de células se basa en análisis de datos espectrales.
7. El método de la reivindicación 6, en el que se usa un ordenador para realizar dicho análisis de datos espectrales.
8. El método de la reivindicación 5, o de la reivindicación 6 o la reivindicación 7 cuando dependen de la reivindicación 5, que comprende además retirar células muertas destruidas mediante dicho láser.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además generar trampas ópticas que atrapan cada una de dicha pluralidad de células, para examen.
10. Un aparato dispuesto para examinar células, que comprende:
- 50 un canal de entrada (301) dispuesto de tal manera que se pueden introducir una pluralidad de células a través del canal de entrada (301) y dos canales tamponadores (302, 303) dispuestos de tal manera que se puede introducir solución tamponadora a través de los canales tamponadores (302, 303), estando dicho canal de entrada (301) dispuesto entre dichos dos canales tamponadores (302, 303) y siendo dicha pluralidad de células células de esperma portadoras de cromosoma X y de cromosoma Y distinguibles en base a su fluorescencia, y estando enlazado un tinte a ADN de cada una de dicha pluralidad de células de tal manera que una fluorescencia total presente es una medida de un ADN total presente, y dispuesto de tal manera que se puede mantener flujo laminar en dicho canal de entrada (301) y en dichos dos canales tamponadores (302, 303) en líneas paralelas de flujo;
- 55 un analizador de datos espectrales que está configurado para realizar un análisis de datos espectrales de cada una de dicha pluralidad de células (104) en una zona de interrogación de dicho canal de entrada (301), para determinar al menos una identidad química de cada una de dicha pluralidad de células (104);
- 60 una fuente de iluminación de formación de imágenes dispuesta para iluminar dicha pluralidad de células; y
- 65 un láser dispuesto para dañar y destruir células seleccionadas de dicha pluralidad de células (104) en base a algún



criterio predeterminado.

- 5 11. El aparato de la reivindicación 10, en el que dicho canal de entrada y dichos canales tamponadores están dispuestos en un clasificador de células.
- 10 12. El aparato de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que no hay ninguna separación mecánica en dicho flujo laminar en dicho canal de entrada (301) y en dichos dos canales tamponadores (302, 303).
- 10 13. El aparato de la reivindicación 10, reivindicación 11 o la reivindicación 12, que comprende además unos medios dispuestos para generar una explosión térmica que desintegra dicha pluralidad de células en base a algún criterio predeterminado.
- 15 14. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, dispuesto de tal manera que células muertas destruidas por dicho láser son retirables de dicho canal de entrada.
- 15 15. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, que comprende además un aparato de atrapamiento óptico accionable para generar trampas ópticas que, en uso, atrapan cada una de dicha pluralidad de células, para examen.

FIG. 1

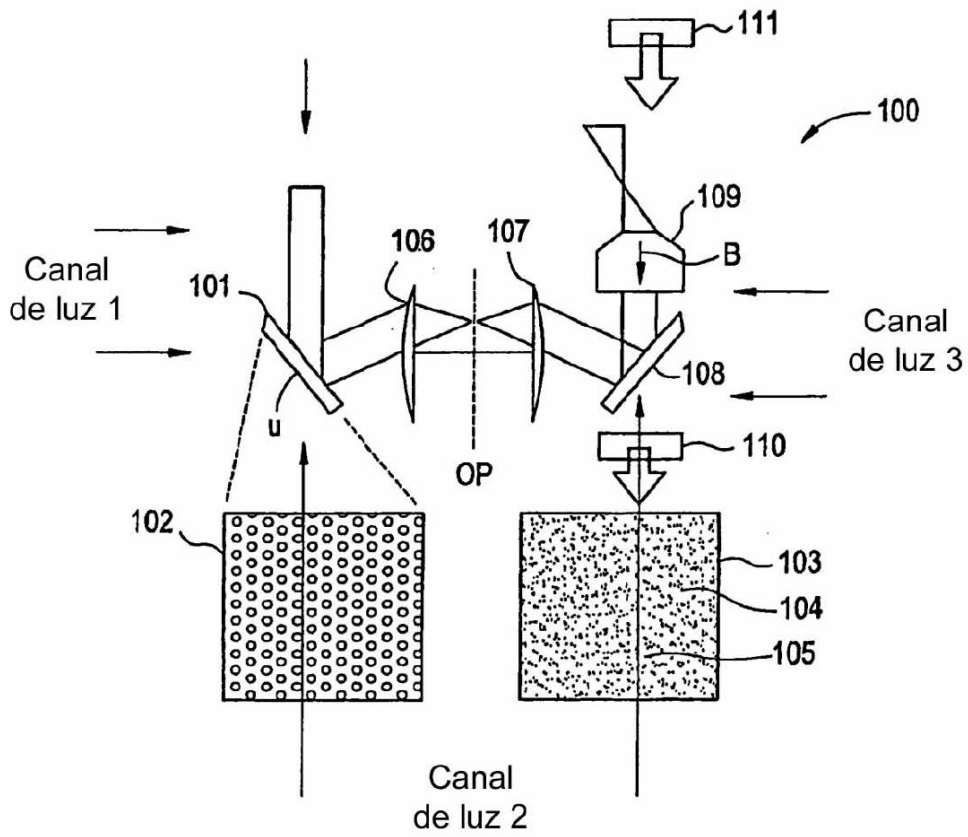


FIG. 2A

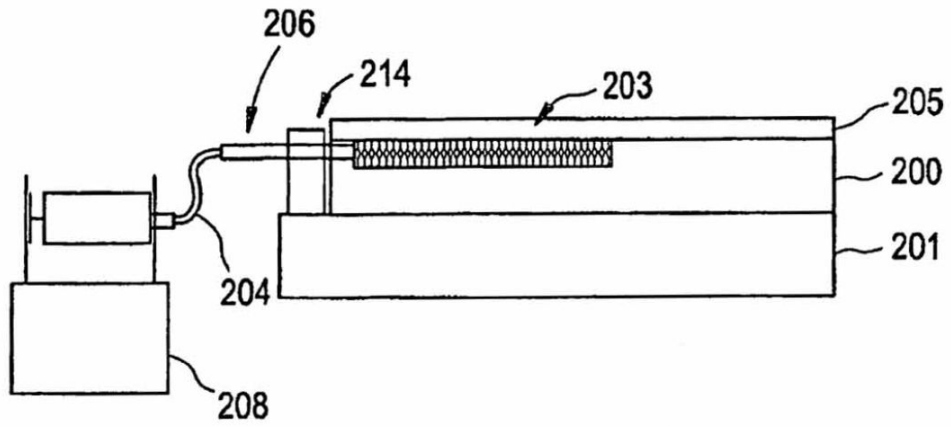


FIG. 2B

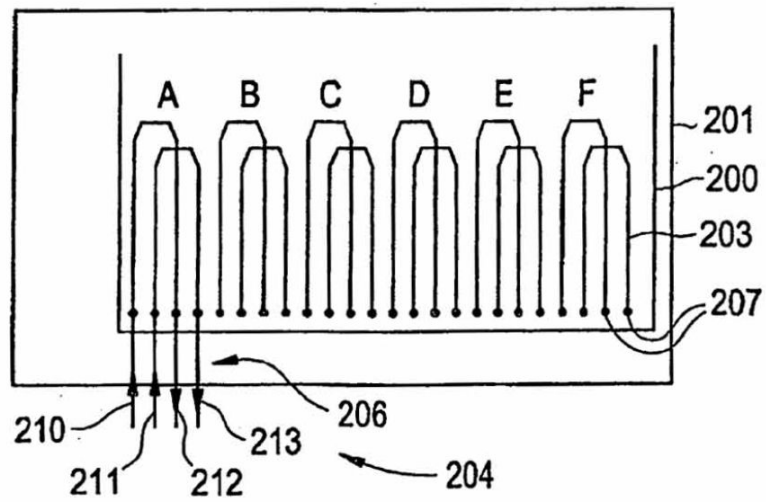


FIG. 3

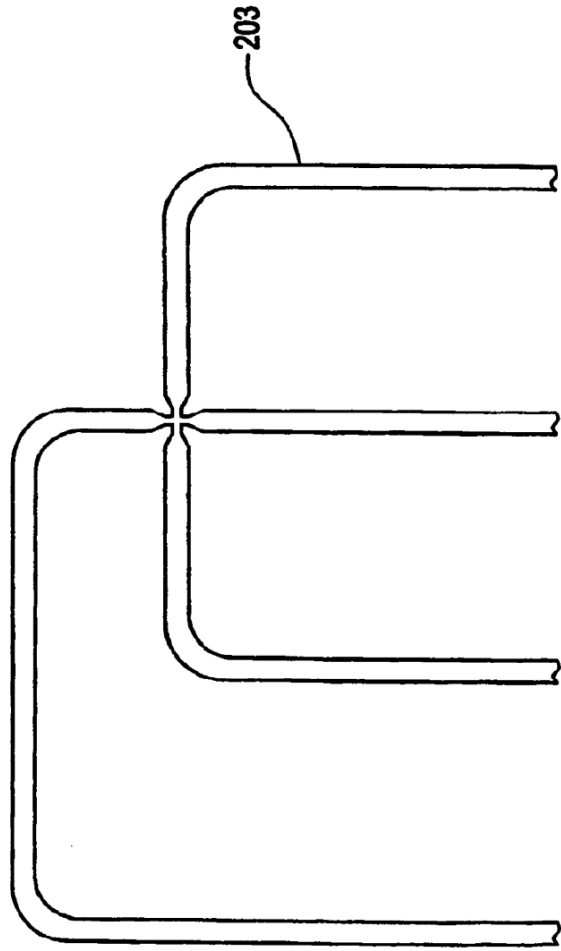


FIG. 4

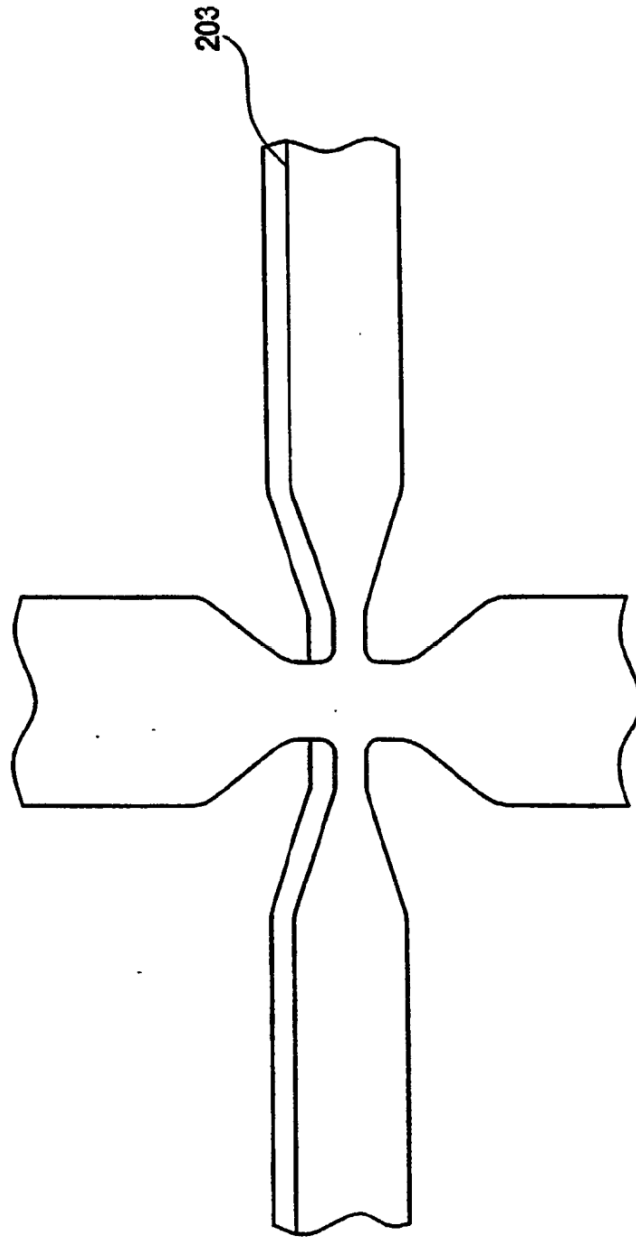


FIG. 5

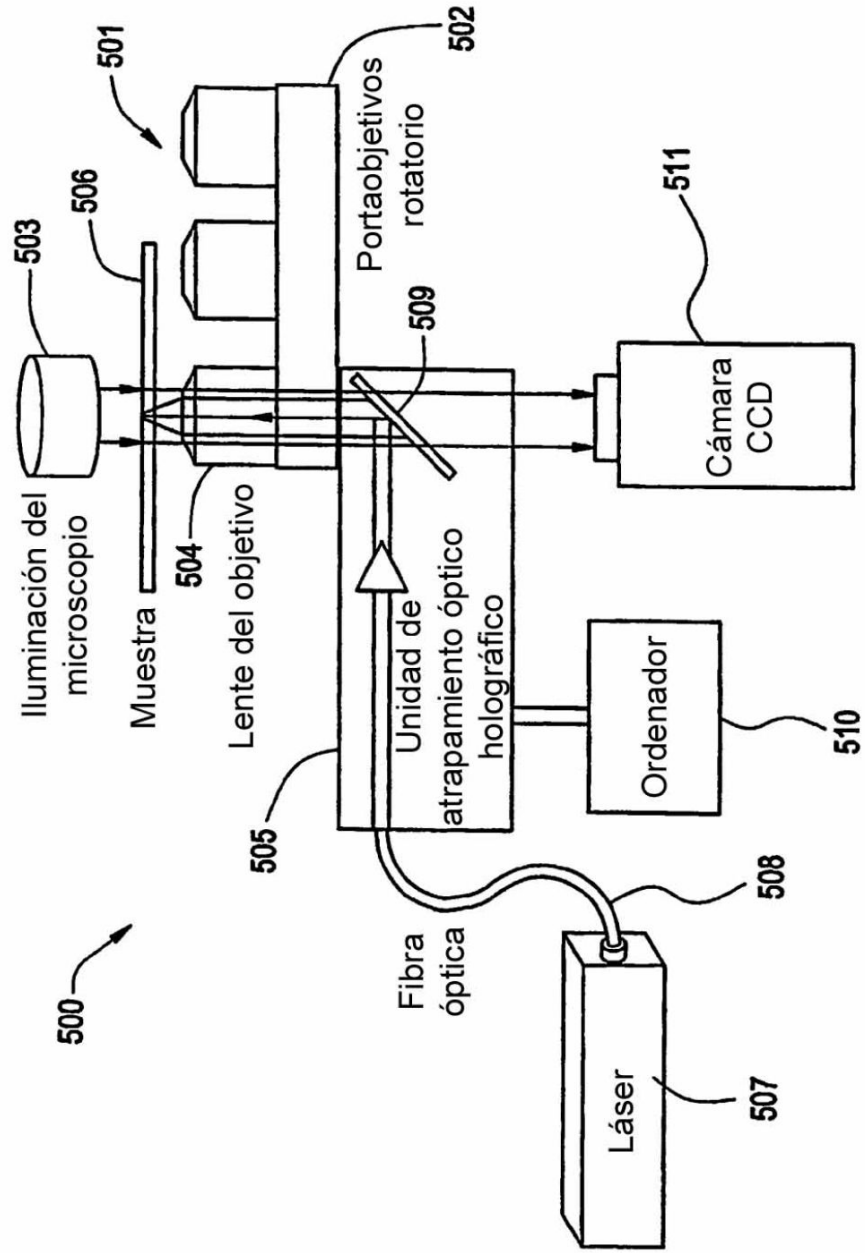


FIG. 6

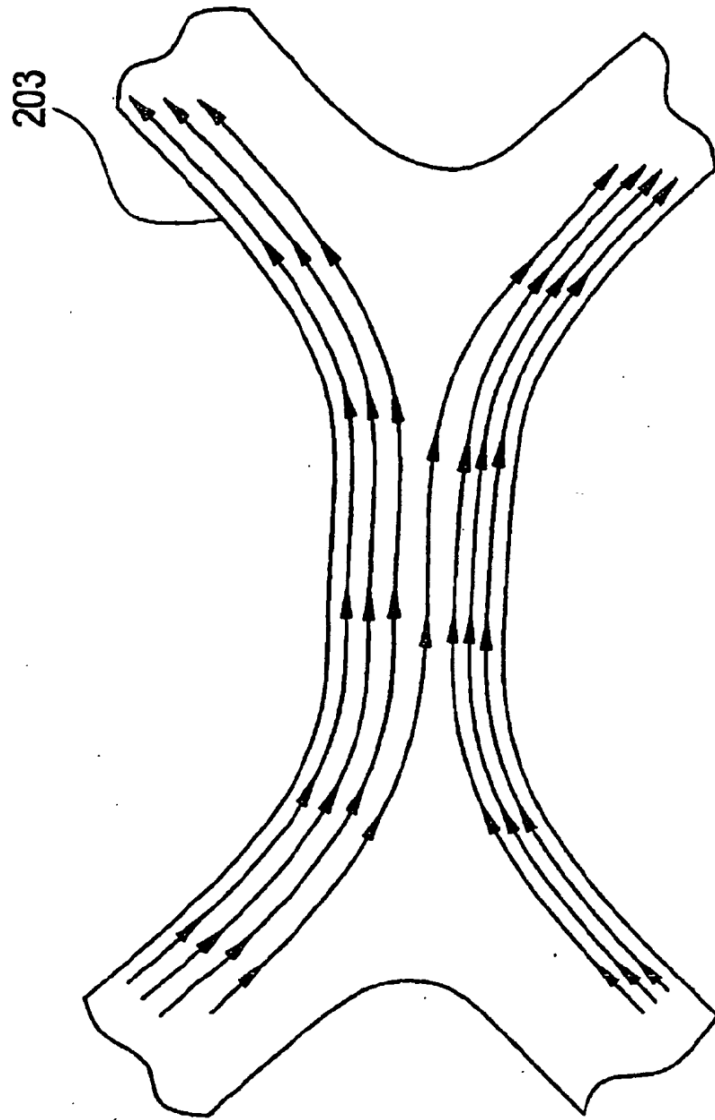


FIG. 7A

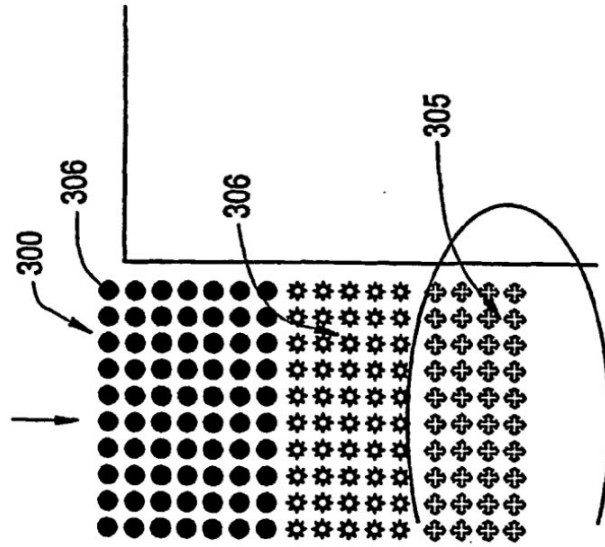


FIG. 7B

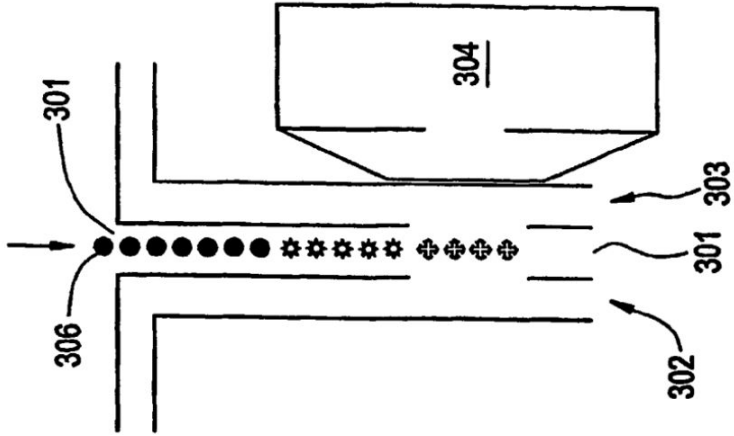




FIG. 8

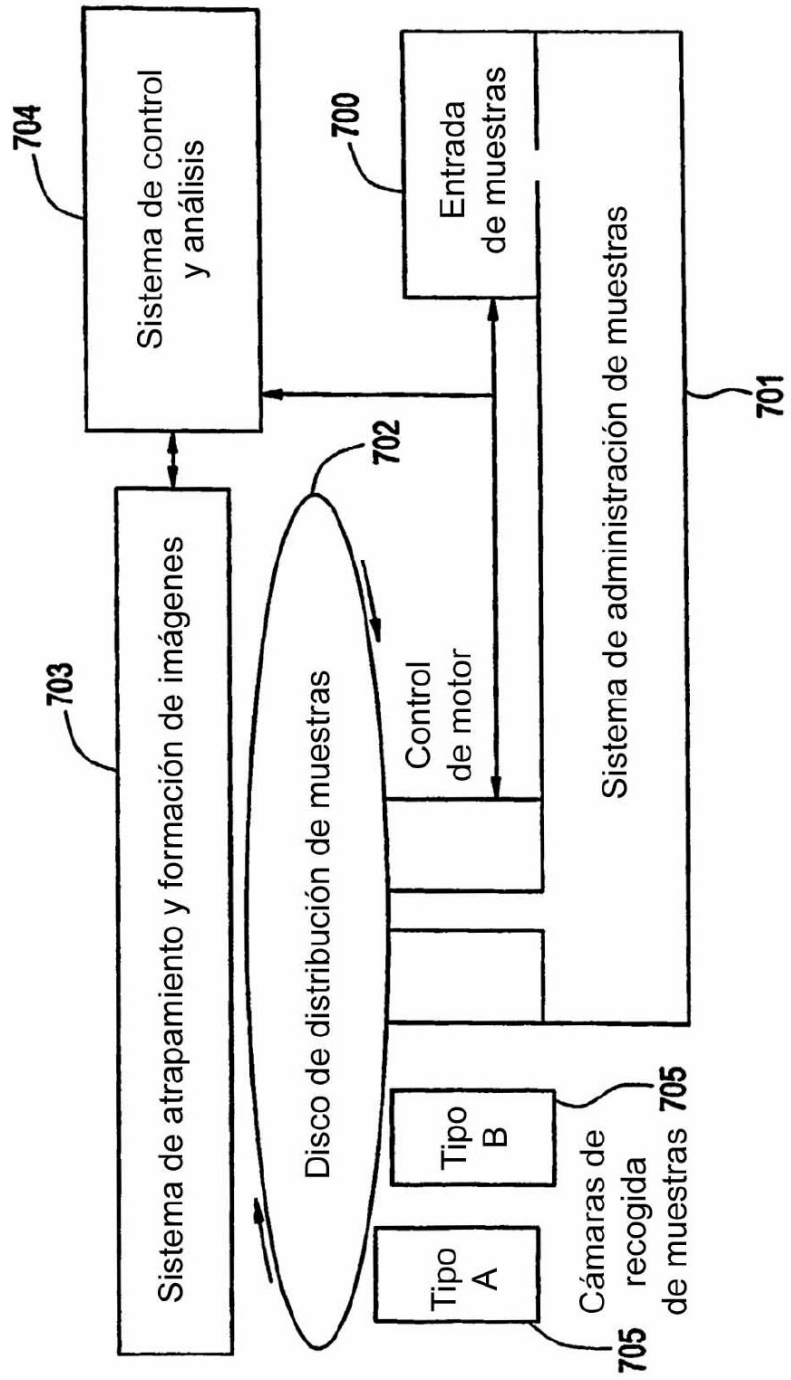


FIG. 9

