

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 133**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 15/00 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2012 PCT/US2012/040126**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12177367**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2012 E 12803171 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2724146**

54 Título: **Citometría de flujo de exploración de espectro de absorción**

30 Prioridad:

24.06.2011 US 201161500707 P
08.11.2011 US 201161557334 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.06.2020

73 Titular/es:

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US

72 Inventor/es:

NORTON, PIERCE, O. y
CHEN, YONG, QIN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 767 133 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

Citometría de flujo de exploración de espectro de absorción

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere al campo del análisis óptico de partículas fluorescentes en corrientes de fluido.

Descripción de la técnica referida

Los analizadores de partículas de tipo flujo, tales como los citómetros de flujo, son herramientas analíticas bien conocidas que son capaces de realizar la caracterización de partículas en base a los parámetros ópticos, tales como la dispersión de la luz y la fluorescencia. En un citómetro de flujo, por ejemplo, las partículas, tales como moléculas, gotas unidas por analito, o células individuales, en una suspensión de fluido, son hechas pasar por una región de detección en la que las partículas son expuestas a una luz de excitación, típicamente procedente de uno o más láseres, y son medidas las propiedades de dispersión de luz y de fluorescencia de las partículas. Las partículas o los componentes de las mismas típicamente son marcadas con colores fluorescentes para facilitar la detección, y una multiplicidad de diferentes partículas o componentes pueden ser detectados de manera simultánea utilizando tintes fluorescentes espectralmente distintos para marcar las diferentes partículas o componentes. Típicamente, una multiplicidad de fotodetectores, uno para cada uno de los parámetros de dispersión que van a ser medidos, y uno para cada uno de los tintes distintivos que van a ser detectados. Los datos obtenidos comprenden las señales medidas para cada uno de los parámetros de dispersión de luz y las emisiones de fluorescencia.

Los citómetros comprenden además medios para registrar los datos medidos y analizar los datos. Por ejemplo, típicamente, el almacenamiento y análisis de los datos se realiza utilizando un ordenador conectado a los componentes electrónicos de detección. Los datos típicamente son almacenados de forma tabular, en donde cada fila corresponde a los datos de una partícula, y las columnas corresponden a cada uno de los parámetros medidos. El uso de formatos de archivo estándar, tales como el formato de archivo "FCS", para almacenar datos procedentes de un citómetro de flujo facilita el análisis de los datos utilizando programas y máquinas separados. Utilizando los métodos de análisis actuales, los datos típicamente son presentados en gráficos de dos dimensiones (2D) para facilitar su visualización, pero pueden ser utilizados otros métodos para visualizar los datos multidimensionales.

Los parámetros medidos utilizando un citómetro de flujo típicamente incluyen la luz de excitación que es dispersada por la partícula a lo largo de una dirección hacia delante principal, referida como dispersión hacia delante (FSC), la luz de excitación que es dispersada por la partícula en una dirección principalmente lateral, referida como dispersión lateral (SSC), y la luz emitida desde moléculas fluorescentes en uno o más canales (rango de frecuencias) del espectro, referidos como FL1, FL2, etc. o por tinte fluorescente que es detectado principalmente en ese canal. Diferentes tipos de células pueden ser identificados por los parámetros de dispersión y por las emisiones de fluorescencia que resultan de marcar las diversas proteínas de células con anticuerpos marcados con tinte.

Los citómetros de flujo están comercialmente disponibles de, por ejemplo, BD Biosciences (San Jose, CA). La citometría de flujo está descrita en gran medida en la literatura extensiva en este campo, incluyendo, por ejemplo, Landy et al. (eds.), "Clinical Flow Cytometry, Annals of the New York Academy of Sciences" Volumen 677 (1993); Bauer et al. (eds.), "Clinical Flow Cytometry: Principles and Applications", Williams y Wilkins (1993); Ormerod (ed.), "Flow Cytometry: A Practical Approach", Oxford Univ. Press (1997); Jaroszeski et al. (eds.), "Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology" N° 91, Humana Press (1997); y Shapiro, "Practical Flow Cytometry", 4ª ed., Wiley-Liss (2003); incorporadas todas en la presente memoria como referencia. Los datos obtenidos a partir de un análisis de células (u otras partículas) por la citometría de flujo multicolor son multidimensionales, en donde cada célula corresponde a un punto en un espacio multidimensional definido por los parámetros medidos. Las poblaciones de células o partículas están identificadas como grupos de puntos en el espacio de datos. La identificación de los grupos y, con ello, de las poblaciones se puede realizar manualmente dibujando un recinto alrededor de una población presentada en uno o más gráficos en dos dimensiones, referidos como "gráficos que dispersión" o "gráficos de puntos", de los datos. Alternativamente, los grupos pueden ser identificados y los recintos que definen los límites de las poblaciones, pueden ser determinados automáticamente. Un cierto número de métodos para realizar recintos automáticamente han sido descritos en la literatura. Véase, por ejemplo, los Números de Patente de Estados Unidos 4.845.653; 5.627.040; 5.739.000; 5.795.727; 5.962.238; 6.014.904; 6.944.338, cada uno incorporado en la presente memoria como referencia.

En un citómetro de flujo típico basado en láser, las longitudes de onda de excitación disponibles están limitadas por la disponibilidad de un láser adecuado. Las fuentes de excitación de longitud de onda seleccionable de una única longitud de onda han sido descritas para ser utilizadas en la citometría de flujo. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.609.286 (Sage) describe un citómetro de flujo que utiliza un prisma de dispersión para seleccionar una longitud de onda a partir de una fuente de luz espectralmente rica para utilizar como fuente de excitación. La fuente de luz es dispersada por un prisma de manera que la longitud de onda puede ser seleccionada utilizando una ranura para permitir que solo la luz de esencialmente una sola longitud de onda la atraviese, y bloquee el resto longitudes de onda. La longitud de onda deseada puede ser seleccionada moviendo físicamente la ranura para hacerla

corresponder con la longitud de onda deseada en el espectro.

Telford et al, 2009, Cytometry A 75(5):450-459, describe el uso de un láser de luz blanca supercontinuo como fuente de excitación en citometría de flujo. En láser de luz blanca supercontinuo emite continuamente en un intervalo de anchura de banda amplio desde luz ultravioleta hasta luz infrarroja, pareciendo de este modo blanca al ojo humano.

5 Telford et al. describen la interposición de un filtro acústico o un filtro de paso de banda revestido delante del rayo para aislar los rangos de longitud de onda particulares, permitiendo que el usuario seleccione anchuras de banda de interés del supercontinuo. La fuente de excitación resultante puede ser utilizada para seleccionar cualquier longitud de onda de excitación y anchura de banda utilizando un filtro con los requisitos de transmisión de color deseados.

10 En un citómetro de flujo típico, las emisiones de fluorescencia son medidas en una multiplicidad de canales de detección (definidos cada uno como un rango de frecuencias dentro del espectro), en donde las emisiones de cada canal son medidas utilizando un único fotodetector. De este modo, cada detector proporciona una única medida de un rango de frecuencias. Típicamente, los canales detectores son utilizados de tal manera que cada canal es optimizado para detectar emisiones procedentes de uno de los distintos tintes. Alternativamente, la luz de emisión puede ser medida utilizando una disposición de canales de detección, de manera que cada una de las emisiones de

15 tinte es medida en más de un canal.

Robinson et al., en "Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems III", editado por Tuan Vo-Dinh et al., Proc. de SPIE Vol. 5692 (SPIE, Bellingham, WA, 2005): 3579-365, describe un sistema de detección de citómetro de flujo en el que la luz emitida es dispersada mediante una rejilla de difracción en un detector PMT de 32 canales. De este modo, las emisiones de fluorescencia son medidas en 32 canales de detección adyacentes, estrechos, que juntos

20 abarcan una región del espectro. En lugar de un único valor de intensidad de fluorescencia para cada tinte, los datos obtenidos que utilizan este sistema comprenden, para cada cliente, valores de intensidad para una multiplicidad de canales de detección adyacentes. El conjunto de medidas obtenidas a partir de un tinte a través de una multiplicidad de canales de detección espectralmente adyacentes depende del espectro de emisión de un tinte.

Breve compendio de la invención

25 La presente invención proporciona sistemas y métodos para analizar el espectro de excitación de partículas fluorescentes en una corriente de flujo.

El sistema de la presente invención utiliza un láser de luz blanca y elementos ópticos de separación de color para proporcionar un sistema de excitación de espectro de color continuo, distribuido espacialmente que es utilizado para iluminar una región de una corriente de flujo. El espectro de la luz de excitación es extendido a lo largo de la longitud

30 de una corriente de flujo de manera que el espectro es extendido sobre una región que es significativamente más grande que el diámetro de una partícula que va a ser detectada. Una partícula que fluye a través de la región de detección, en cualquier punto, será excitada por solo un pequeño rango de longitudes de onda, pero estará expuesta a todo el espectro de la luz de excitación a medida que atraviesa toda la región de detección. A medida que una partícula fluorescente se desplaza a través del rayo de excitación y es por tanto excitada por una longitud de onda

35 continuamente cambiante de la luz de excitación, un detector mide las emisiones de fluorescencia desde la particular, que varían en intensidad de acuerdo con la eficiencia de excitación en cada longitud de onda. El resultado es una exploración del espectro de excitación de la partícula.

La expansión espacial (extensión) del espectro de luz de excitación se consigue haciendo pasar la luz a través de elementos ópticos de separación de color, por ejemplo, un elemento de dispersión de color, tal como un prisma o

40 una rejilla de difracción. Los elementos ópticos de separación de color están orientados de manera que el espectro se extiende a lo largo de la trayectoria de flujo, cubriendo una región de detección alargada. Una partícula que fluye en la corriente estará expuesta a la luz de longitud de onda continuamente cambiante cuando pasa a través de la región de detección.

En general, el espectro puede ser extendido a lo largo de la trayectoria de flujo de manera que una partícula en movimiento barrerá todo el espectro de luz de excitación desde la longitud de onda corta hasta la larga, o desde la longitud de onda larga hasta la corta. Preferiblemente, el espectro es extendido a lo largo de la trayectoria de flujo de manera que una partícula de movimiento barrerá el espectro de luz excitación desde la longitud de onda corta a la

45 larga.

En una realización, es utilizado un único detector de banda ancha para medir las emisiones procedentes de las partículas excitadas por el rayo de excitación de espectro continuo, a medida que la partícula pasa a través de la región de detección. De este modo, las emisiones de partículas son medidas de forma continua cuando la partícula es excitada secuencialmente por todo el espectro de luz de excitación. El rango de longitud de ondas detectadas por el detector único preferiblemente seleccionado para ser un rango en el que la partícula fluorescente emite, pero está fuera del espectro de excitación. Preferiblemente, el detector está configurado para medir todas las longitudes de

50 onda que son más largas que la longitud de onda de excitación más larga utilizando un filtro de paso largo apropiado.

En otra realización, la fuente de luz de excitación incluye un filtro de paso de banda de longitud de onda seleccionable, continuamente variable (filtro ajustable) situado entre la fuente de luz de excitación de láser de luz

blanca y los elementos ópticos de separación de color. El filtro permite seleccionar cualquier el rayo de excitación de color que esencialmente único (una banda estrecha de longitudes de onda) del rango de color proporcionado por el láser de luz blanca. El rayo de excitación esencialmente de un único color iluminará un único punto dentro de la región de detección. Debido a que el espectro es extendido sobre la región de detección por los elementos ópticos de separación de color, y el ángulo de dispersión depende del color de la luz, un cambio en el color de la luz de excitación seleccionada por el filtro también dará lugar a un cambio en la posición del punto de iluminación dentro de la región de detección.

El filtro de paso de banda de longitud de onda seleccionable, continuamente variable, está configurado para variar continuamente la longitud de onda de la luz de excitación desde un extremo del espectro al otro, lo que también da lugar a un barrido del punto de iluminación desde un extremo de la región de detección a otro. La velocidad del cambio del filtro está programada de tal manera que el punto de iluminación atravesado por la región de detección va a la misma velocidad que la partícula en la corriente de flujo. Iniciando el barrido espectral cuando la partícula entra en la región de detección, la partícula permanecerá iluminada mientras atraviesa la región de detección, pero con un color continuamente cambiante de la luz de excitación.

El barrido espectral continuamente cambiante que está alineado con el flujo de partícula hace posible el barrido a través del espectro utilizando el movimiento de partícula, pero limita la luz de excitación a solo la partícula y, quizás, una región circundante limitada. Esto minimiza que la cantidad de luz de excitación perdida que pueda dar lugar a un ruido de señal en el canal de detección.

En otra realización, son utilizados múltiples detectores de banda ancha para medir las emisiones procedentes de las partículas excitadas por rayos de excitación de espectro continuo cuando las partículas atraviesan la región de detección. Cada canal de detección (rango de frecuencias medido por un detector) es seleccionado de manera que cada uno está fuera de al menos una parte del espectro de excitación, con sucesivos canales de detección por etapas, de tal manera que cada uno empieza con una longitud de onda más larga y se superpone menos con el espectro de luz de excitación.

Las realizaciones que utilizan canales de detección por etapas, preferiblemente junto con la luz de detección filtrada de manera ajustable, hacen posible la detección de emisiones de partículas que están en longitudes de onda que se superponen con una parte del espectro de luz de excitación. Cuando una partícula se mueve a través de la región de detección y es iluminada con longitudes de onda progresivamente más largas, pueden ser utilizados canales de detección que miden la luz de una longitud de onda más larga que la longitud de onda de la luz de excitación para detectar emisiones de partículas. Cuando la longitud de onda de luz de excitación es alargada durante la exploración, de manera que recubre un canal de detección, ese canal de detección ya no es útil para medir la emisión debido a la interferencia causada por la luz de excitación. En ese punto, son detectadas emisiones por uno o más de los canales de detección restantes. De manera similar, cuando la longitud de onda de luz de excitación es alargada durante la exploración, de manera que recubre el segundo canal de detección, ese canal de detección ya no es útil para medir la emisión debido a la interferencia causada por la luz de excitación, y las emisiones son detectadas por uno o más de los canales de detección. El canal de detección final preferiblemente mide todas las longitudes de onda que son más largas que la longitud de onda de excitación más larga utilizando un filtro de paso largo apropiado.

En otra realización, son utilizados múltiples detectores de paso de banda para medir las emisiones procedentes de las partículas excitadas por el rayo de excitación de espectro continuo cuando la partícula pasa a través de la región de detección. Cada canal de detección (rango de frecuencias medido por un detector), que detecta la luz en una banda seleccionada de longitudes de onda, es seleccionado de manera que los canales de detección no se superponen. Preferiblemente, cada canal de detección corresponde con aproximadamente el máximo espectro de excitación del tinte fluorescente que está siendo utilizado para marcar las partículas, de manera que cada canal de detección mide principalmente las emisiones procedentes de uno de los tintes. Esto hace posible medidas relativamente independientes de los espectros de excitación de cada uno de los tintes utilizados para marcar una multiplicidad de partículas marcadas.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para analizar partículas fluorescentes utilizando los instrumentos de la invención.

Los métodos y los instrumentos presentes pueden ser utilizados para analizar partículas marcadas con uno o más tintes. Para una partícula marcada individualmente, el tinte puede ser identificado a partir del patrón de espectro de excitación, por ejemplo, haciendo coincidir el espectro de excitación medido con los espectros de excitación medidos anteriormente procedentes de los tintes que son utilizados en el ensayo. Para una partícula teñida de forma múltiple, los tintes pueden ser identificados a partir del patrón de espectro de excitación encajando el espectro de excitación medido en una combinación de espectros de excitación medidos anteriormente. Varios algoritmos conocidos de "bondad de ajuste" son adecuados para encajar un espectro medido con una combinación de espectros conocidos.

Breve descripción de las distintas vistas de dibujos

Las Figuras 1A, 1B y 1C muestran representaciones esquemáticas de elementos de sistema óptico de una

realización de un analizador de partículas de tipo flujo de la presente invención.

Las Figuras 2A, 2B, y 2C muestran el paso de una partícula fluorescente a través de un canal y la luz de excitación que ilumina la partícula.

5 Las Figuras 3A, 3B y 3C muestran representaciones esquemáticas de elementos del sistema óptico de otra realización del analizador de partículas de tipo flujo de la presente invención.

Las Figuras 4A, 4B, 4C y 4D muestran el paso de una partícula fluorescente a través de un canal de flujo y la luz de excitación que ilumina la partícula.

10 La Figura 5 muestra la relación entre los espectros de excitación y de emisión de una partícula fluorescente, el espectro de la fuente de luz de excitación utilizado para excitar la partícula, y el canal de detección utilizado para detectar las emisiones de partícula.

La Figura 6 muestra la relación entre los espectros de excitación y de emisión de una partícula fluorescente, el espectro de la fuente de luz de excitación utilizado para excitar la partícula y dos canales de detección superpuestos (por etapas) utilizados para detectar las emisiones de partícula.

15 La Figura 7 muestra la relación entre los espectros de excitación y de emisión de una partícula fluorescente, el espectro de la fuente de luz de excitación utilizado para excitar la partícula, y dos canales de detección que no se superponen utilizados para detectar emisiones de partículas, en donde cada canal de detección está seleccionado para corresponder aproximadamente con los máximos de excitación de un tinte diferente.

Descripción detallada de la invención

20 Las siguientes definiciones se proporcionan para una mayor claridad. A menos que se indique lo contrario, todos los términos son utilizados como es común en la técnica. Todas las referencias citadas en la presente memoria, tanto supra como infra, están incorporadas aquí como referencia.

25 Un "analizador de partículas de tipo flujo" se utiliza en la presente memoria para referirse a cualquier instrumento que analiza partículas suspendidas en una corriente de fluido que fluye haciendo pasar las partículas por uno o más de lectores ópticos, e incluye, por ejemplo, citómetros de flujo de análisis o clasificación, analizadores de hematología, y contadores de células. La corriente de fluido que contiene partículas (corriente de flujo) típicamente es hecha pasar a través de un canal en un tubo de ensayo óptico en el que se realizará el análisis óptico, aunque el análisis óptico se puede realizar en una corriente de fluido en aire, expulsada desde una boquilla. Al menos una parte, preferiblemente todo, el tubo de ensayo y el canal son ópticamente transparentes para hacer posible la detección óptica de partículas dentro de la corriente de flujo. Por ejemplo, en un citómetro de flujo típico, la detección óptica es realizada excitando de forma fluorescente partículas marcadas utilizando una luz de excitación procedente del exterior de un tubo de ensayo, y las emisiones de fluorescencia procedentes de las partículas son detectadas utilizando fotodetectores situados fuera del tubo de ensayo. La parte ópticamente transparente de un tubo de ensayo puede estar hecha de cualquier material adecuado, que incluye sílice fundida, cuarzo, cristal óptico, o un plástico de grado óptico.

35 Como se ha utilizado en la presente memoria, "sistema" e "instrumento" están destinados a englobar tanto los componentes del hardware (por ejemplo, mecánicos y electrónicos) como del software asociado (por ejemplo, programas de ordenador).

40 Un fotodetector, como se ha utilizado la presente memoria, se refiere generalmente al propio fotodetector y a cualesquiera elementos ópticos y/o electrónicos. Por ejemplo, la amplificación de señal (ganancia de fotodetector) puede ser proporcionada por un fotodetector solo o por un amplificador de señal separado que amplifica la salida del fotodetector. La luz medida por un fotodetector puede estar limitada por el uso de filtros, espejos, lentes, u otros elementos ópticos. Por esta razón, "fotodetector" se utiliza en la presente memoria para hacer referencia o bien a un fotodetector solo o bien a un fotodetector con amplificador(es) de señal y elementos ópticos incorporados, si están presentes.

45 Un "canal detector", "canal de detección", o "canal" se refiere al rango de longitudes de onda que es detectado por un fotodetector específico. El rango de longitudes de onda detectadas típicamente está determinado por el uso de filtros dependientes de frecuencia y/o espejos dicróicos, como es bien conocido en la técnica. Para una mayor claridad, en uso en la presente memoria del término "canal" se distingue de un uso secundario en el campo de la citometría de flujo para hacer referencia a una subdivisión discreta del rango de valores de intensidad detectables por único detector.

50 En algunas realizaciones, es utilizado un único canal detector, en donde el canal detector está definido o bien por un filtro de paso de banda que trasmite luz de longitudes de onda entre dos longitudes de onda umbrales, o bien por un filtro de paso largo que solo trasmite luz de longitudes de onda más largas que alguna longitud de onda umbral.

En otras realizaciones, es utilizada una pluralidad de canales detectores definidos por filtros de paso largo, en donde

cada uno trasmite luz de longitudes de onda más largas que la longitud de onda umbral diferente, de manera que los canales detectores se superponen parcialmente.

5 En otras realizaciones, una pluralidad de canales detectores que no se superponen, cada uno definido por filtro de paso de banda, es utilizada para facilitar la medida independiente de una pluralidad de tintes fluorescentes espectralmente distintos. Los tintes y los canales detectores son seleccionados de manera que, cuando sea factible, el máximo de emisión de cada tinte está dentro de un canal detector diferente, es decir, de manera que cada tinte es hecho coincidir con un canal detector optimizado para detectar luz procedente de ese tinte. Sin embargo, debido a la anchura de este espectro de emisión, la luz procedente de un tinte dado puede ser emitida dentro de uno o más de otros canales detectores. La luz emitida por un tinte dentro de un canal detector distinto del canal detector que más próximamente coincide con la máxima emisión del tinte está referida en la presente memoria como "desbordamiento". El canal detector que coincide más próximamente con el máximo de emisión de tinte está referido en la presente memoria, con referencia al tinte dado, como el canal de detección de tinte o canal primario. Todos los demás canales detectores están denominados, con referencia al un tinte dado, como canales de desbordamiento o canales secundarios. Un tinte y su canal de detección de tinte estarán denominados, "correspondientes" o "coincidentes". Con referencia a un canal de detección, el tinte que corresponde con el canal de detección está denominado como tinte primario; otros tintes que emiten desbordamiento en el canal de detección son denominados tintes secundarios.

20 Como se ha utilizado en la presente memoria, el término "partículas" se refiere tanto partículas sintéticas, tales como micropartículas o gotas, como a partículas derivadas de fuentes biológicas, tales como células eucarióticas, bacterias, virus, o macromoléculas. Como se ha utilizado en la presente memoria, una "población" de partículas se refiere a un grupo de partículas que posee esencialmente las mismas propiedades ópticas con respecto a los parámetros que van a ser medidos, tales como células del mismo tipo (población de células), o gotas sinterizadas que, dentro de las tolerancias de fabricación prácticas, son del mismo tamaño, forma y composición.

25 Una partícula fluorescente se utiliza en la presente memoria como cualquier partícula que presenta una fluorescencia detectable. La partícula puede ser inherentemente fluorescente, o puede incluir al menos un componente que presente una fluorescencia detectable, o puede estar marcada con uno o más tintes fluorescentes. Por ejemplo, las células típicamente están marcadas con uno o más tintes fluorescentes utilizando conjugados de tinte-anticuerpo que se unen a los componentes celulares para hacer posible la detección y el análisis, y las células marcadas son ejemplos de partículas fluorescentes.

30 El término "MFI", como se ha utilizado la presente memoria, se refiere a la intensidad de fluorescencia media o intermedia de una población de partículas fluorescentes. Se entenderá que otras medidas estadísticas de la fluorescencia de la población, tal como la fluorescencia media truncada o intermedia truncada pueden ser utilizadas.

35 Un espectro se refiere a un continuo de color formado cuando un rayo de luz blanca (o fuente de luz de amplio espectro) es dispersado, tal como mediante el paso a través de un prisma, de manera que sus longitudes de ondas componentes son dispuestas en orden. Haciendo referencia a una fuente de excitación de amplio espectro o de luz blanca, tal como un láser de luz blanca, como se ha utilizado la presente memoria, el espectro se refiere al continuo de longitud de onda (color) que es emitido por la fuente de excitación. La "fuente de excitación", como se ha utilizado aquí, se refiere al componente de emisión de luz, tal como un láser, y a cualesquiera componentes con forma de rayo o de filtración asociados, si están presentes. El rango de longitudes de onda emitidas por la fuente de excitación como un todo puede ser modificado o restringido con relación al rango de longitudes de onda emitido por el componente de emisión de luz solo. Por ejemplo, el espectro emitido por un láser de luz blanca puede ser utilizado de forma no modificada, o el espectro puede ser restringido por el filtrado apropiado para proporcionar un espectro sobre un rango deseado de longitudes de onda.

45 Una tabla de correspondencias aproximadas de longitudes de onda y colores en el espectro visible se proporciona a continuación.

Tabla de color/Longitudes de onda

Longitudes de onda	Color
400 - 420 nm	Violeta
420 - 440 nm	Añil
440 - 490 nm	Azul
490 - 570 nm	Verde
570 - 585 nm	Amarillo
585 - 620 nm	Naranja
620 - 780 nm	Rojo

Fuente de excitación de luz blanca

Como se ha utilizado la presente memoria, una "fuente de excitación de luz blanca" se refiere a una fuente de luz que emite una luz esencialmente colimada, de banda ancha. Las fuentes de excitación de luz blanca preferidas para utilizar la presente invención son láseres de luz blanca supercontinuos.

5 Los láseres de luz blanca supercontinuos están disponibles de, por ejemplo, Fianium Ltd. (Southampton, UK). Ejemplos incluyen los sin láseres supercontinuos FemtoPower FP1060 y FP532, el Fianium SC450, el Fianium SC450-8-VE. El Fianium SC450 tiene una salida de láser total de 5 W y tiene un rango de emisión significativo comprendido entre aproximadamente 450 y 2000 nm. El láser supercontinuo Fianium SC450-8-VE tiene 8 W de potencia óptica total y más de 1,5 W en el rango de longitud de onda visible, en un rayo de modo único.

10 Ejemplos adicionales de láseres de luz blanca supercontinuos incluyen las series de láser de fibra supercontinuos SuperK EXTREME (NKT Photonics A/S, Birkerød, Dinamarca), que proporcionan un espectro de modo único de 400-2400 nm, y la fuente Koheras SuperK Extreme con salida de láser total de 5 W (Koheras A/S, Dinamarca), que proporciona un espectro de aproximadamente 450 a 2000 nm.

15 El rango máximo de longitudes de onda proporcionado por la fuente de excitación de luz blanca dependerá del rango de longitudes de onda emitidas por el láser. El rango real de longitudes de onda emitidas por la fuente de excitación de luz blanca puede estar más restringido utilizando filtros adicionales entre el láser y la célula de flujo.

Elementos ópticos de separación de color

20 La dispersión de la fuente de excitación de amplio espectro (luz blanca) en su espectro se consigue utilizando elementos ópticos de separación de color que incluyen, un elemento de dispersión, tal como un prisma o una rejilla de difracción, ambos de los cuales son bien conocidos en la técnica. La dispersión del rayo de excitación también da lugar a una expansión espacial (extensión) de la luz de excitación en una dirección, de manera que el espectro puede ser extendido sobre una región de detección que es significativamente más larga que una dimensión de la partícula.

25 En una realización preferida, son utilizados uno o más prismas para dispersar el rayo de excitación de luz blanca en su espectro de colores constituyente. Los prismas generalmente dispersarán la luz sobre una anchura de banda de frecuencia mucho más grande que las rejillas de difracción, haciendo que sean útiles es para la espectroscopia de amplio espectro. Además, los prismas, a diferencia de las rejillas, no sufren complicaciones que surgen de superponer órdenes espectrales.

30 Un prisma de dispersión adecuado se describe en la Patente de Estados Unidos No. 4.609.286, incorporada aquí como referencia.

35 En una realización preferida, el sistema de prismas es como se describe en la Publicación de Patente Europea EP01403632, incorporada en la presente memoria como referencia. Este sistema de elementos ópticos de excitación de citometría basada en prismas fue diseñado para trabajar con varios láseres de excitación de un único color separados. Un conjunto de prismas de dispersión dirige a los rayos de diferentes longitudes de onda, de manera que los rayos con entradas separadas emergen del prisma final superponiendo sustancialmente en posición casi paralelos entre sí. Sin embargo, como se ha utilizado la presente invención con un único rayo de excitación de amplio espectro, el sistema de elementos ópticos de excitación de citometría basado en prismas dispersará el rayo de amplio espectro en su espectro, extendido paralelo al canal de flujo.

Filtro Ajustable (TF)

40 Un filtro ajustable (TF) es un dispositivo cuya transmisión espectral puede ser controlada electrónicamente aplicando voltaje, señal acústica, etc. Una gran variedad de filtros ajustables son bien conocidos en la técnica. En una realización preferida, el filtro ajustable es un filtro ajusta hable Acustóptico (AOTF). Un filtro ajustable Acustóptico es un filtro de paso de banda electrónicamente ajustable, de estado sólido que utiliza la interacción acustóptica dentro de un medio anisótropo. La luz transmitida es controlada utilizando una frecuencia de radio frecuencia (RF) aplicada al transductor AOTF. La luz transmitida a través del AOTF puede ser variada sobre un espectro completo variando la frecuencia aplicada correspondiente al rango de longitud de onda.

50 Los AOTF están disponibles de, por ejemplo, Fianium Ltd. (Southampton, UK), Panasonic Industrial Company (Secaucus, NJ), y Crystal Technology, Inc. (Palo Alto, CA). Un AOTF preferido es el disponible como número de parte 97-02838-01 de Crystal Technology, Inc., que permite la transmisión seleccionable sobre un rango de longitudes de onda de 430-670 nm.

En realizaciones que incorporan un AOTF, el rango real de longitudes de onda emitidas por la fuente de excitación de luz blanca está restringida por filtros adicionales para que esté dentro del rango de frecuencias de transmisión seleccionables proporcionadas por el AOTF.

Generadores de frecuencia RF programables capaces de generar una señal de RF que varía rápidamente, adecuados para controlar un AOTF son bien conocidos en la técnica.

Descripción basada en las figuras

Figuras 1A-1C

5 Las Figuras 1A-1C muestran varias vistas de los componentes de un sistema de la presente invención. La Figura 1A muestra una vista lateral en ángulo, la Figura 1B muestra una vista lateral, y la Figura 1C muestra una vista superior. No todos los elementos son visibles en todas las vistas.

10 La partícula 1 (visible en las Figuras 1B y 1C) es portada a través de un canal de flujo en un tubo de ensayo 2. La luz procedente del láser de luz blanca supercontinuo 10 es hecha pasar a través de un prisma 12 y después focalizada sobre la corriente de fluido que fluye a través del canal de flujo del tubo de ensayo 2 enfocando la lente 14. El prisma dispersa la luz de excitación en su espectro de colores, de manera que la anchura del rayo es ensanchada en una dirección paralela al canal de flujo. De este modo, la longitud de onda de la luz de excitación que incide sobre la partícula 1 varía continuamente a medida que la partícula 1 se mueve a través de la región de detección (la región en el canal de flujo en el tubo de ensayo 2 que está expuesta a la luz del láser 10). El prisma no afecta a la anchura del rayo de luz de excitación transversal al canal de flujo, como se muestra en la vista superior de la Figura 1C.

15 Las emisiones de fluorescencia procedentes de la partícula son recogidas por la lente 16 y dirigidas hacia el fotodetector 20. El diámetro de la lente 16 es mayor que la longitud de la región de detección, de manera que las emisiones son recogidas independientemente de dónde esté la partícula dentro de la región de detección. Un filtro de paso largo 18 está orientado delante del fotodetector 20. El bloque de filtro de paso largo está seleccionado para dejar pasar solo longitudes de onda más largas que la longitud de onda más larga de la luz de excitación. De este modo, el filtro de paso largo bloquea la luz de excitación para que no sea medida por el fotodetector, y permite la medida de las emisiones de partícula esencialmente sin interferencia de la luz de excitación.

20 Los elementos ópticos de detección (lentes 16, filtro de paso largo 18, y fotodetector 20) están orientados para recoger y medir la luz fluorescente emitida en un ángulo recto desde la dirección del rayo de excitación. Debido a que la intensidad de la luz de excitación es típicamente mucho mayor que la intensidad de las emisiones de fluorescencia, y debido a que los filtros de paso largo, en general, no son 100% efectivos en el bloqueo de la luz fuera del rango seleccionado de longitudes de onda, una orientación en línea se vería afectada por un nivel indeseable de señal de fondo resultante de la luz de excitación que pasa a través del filtro de paso largo. Orientando los elementos ópticos de recogida de manera que solo las emisiones de fluorescencia en ángulo recto respecto a la trayectoria del rayo de excitación son medidas, este fondo se minimiza. En esta configuración, el filtro de paso de banda funciona principalmente para no dejar pasar la luz de excitación que es dispersada por la partícula en ángulos rectos, referida en citometría de flujo como dispersión lateral.

Figuras 2A-2C

25 Las Figuras 2A-2C muestran el uso del sistema de la Figura 1 para explorar el espectro de excitación de una partícula. Como se muestra, la dirección de la partícula 1 (visible las Figuras 2B y 2C) a medida que pasa a través de un canal de flujo en el tubo de ensayo 2 es desde la parte inferior a la parte superior de la figura. El rayo de excitación que ha sido dispersado por el prisma en el espectro de colores intersecta el canal de flujo en una cierta longitud del canal referida como región de detección. Para fines ilustrativos, el rayo de excitación, mostrado como el área sombreada entre las líneas discontinuas, se muestra expandido en un espectro que abarca desde la luz azul a la luz roja. El rango real de longitudes de onda dependerá del rango de longitudes de onda emitidas por la fuente de excitación. Para facilitar la descripción, están indicados cuatro colores discretos dentro del rayo de excitación, aunque el rayo de excitación realmente varía continuamente desde el extremo azul de su espectro en el límite inferior del rayo hasta el extremo rojo en su espectro en el límite superior del rayo. De este modo, la partícula 1, a medida que pasa a través de la región de detección del canal de flujo, está expuesta a todo el espectro de la luz de excitación desde el azul hasta el rojo.

30 La Figura 2A muestra el inicio de la exploración espectral de una partícula fluorescente. La partícula acaba de entrar en la región de detección y está expuesta a una longitud de onda de luz que está en el extremo azul del espectro del rayo de excitación.

35 La Figura 2B muestra una etapa intermedia de la exploración espectral. La partícula se ha movido parcialmente a través de la región de detección, de manera que está expuesta a la longitud de onda de luz que está entre el amarillo y el verde.

40 La Figura 2C muestra el final de la exploración espectral. La partícula se ha movido de tal manera que está a punto de salir del rayo de excitación. En este punto, está expuesta a una longitud de onda de la luz que está en el rojo.

45 A medida que la partícula se desplaza a través de la región de detección y es excitada por la longitud de onda del rayo de excitación que varía continuamente, las emisiones de fluorescencia desde la partícula, medidas en una banda estática de longitudes de onda de detección, son recogidas por la lente 16 y dirigidas hacia el fotodetector 20

(ambos elementos mostrados en la Figura 1). Los datos resultantes proporcionan una medida del espectro de excitación de la partícula sobre el rango de longitudes de onda en el rayo de excitación.

En cualquier posición dada dentro de la región de detección, la partícula 1 estará expuesta a un pequeño rango de longitudes de onda que depende del tamaño de la partícula, el tamaño de la región de detección, y el rango de la longitud de onda emitida por el rayo de excitación. Preferiblemente, el espectro de rayo de excitación será extendido sobre una región de detección que es significativamente más grande que el tamaño de la partícula. Por ejemplo, si del rayo de excitación es extendido por un prisma para cubrir una región de detección de 1 mm, una célula que sea de 10 μm de diámetro estará expuesta a una banda de longitudes de onda que es 1/100 del espectro de excitación total que es dispersado sobre la región de detección. En la práctica, esto puede ser tratado como excitación de longitud de onda esencialmente única.

La anchura de la banda de longitudes de onda a la que está expuesta la partícula en cualquier posición puede ser calculada en base al tamaño de la partícula y a la velocidad de cambio de la longitud de onda de excitación por unidad de distancia. Siendo P el tamaño de la partícula, siendo D la longitud de la región de detección que corresponde con la dimensión del rayo de excitación expandido, y siendo F1 y F2 la longitud de onda más corta y más larga emitida por la fuente de excitación, respectivamente. El espectro cubre un rango de longitudes de onda de igual al valor absoluto de la diferencia, $|F1-F2|$, extendida sobre una distancia D, y la velocidad de cambio de la longitud de onda de excitación por unidad de distancia es $|F1-F2|/D$. De este modo, la partícula en una ubicación dada dentro de la región de detección está expuesta a un rango de longitudes de onda que es $|F1-F2|/D * P$. Por ejemplo, si el espectro cubre un rango de 200 nm, que está extendido sobre una región de detección de 1 mm, una partícula de 10 nm estará expuesta a solo un rango de 2 nm de luz de excitación en un punto cualquiera de la región de detección.

Figuras 3A-C

Las Figuras 3A-C muestran varias vistas de componentes en una realización alternativa de un sistema de la presente invención. La Figura 3A muestra una vista lateral, en ángulo, la Figura 3B muestra una vista lateral, y la Figura 3C muestra una vista superior. Los componentes que son idénticos a los componentes mostrados en las Figuras 1A-C están marcados con los mismos números. Al igual que en la Figura 1, no todos los elementos son visibles en todas las vistas.

La partícula 1 (visible las Figuras 3B y 3C) es portada a través de un canal de flujo en el tubo de ensayo 2. La luz procedente del láser de luz blanca supercontinuo 10 es hecha pasar a través de un prisma 12 y después enfocada sobre una corriente de fluido que fluye a través del canal de flujo en el tubo de ensayo 2 enfocando la lente 14. El prisma dispersa la luz de excitación en su espectro de colores, de manera que la longitud de onda de la luz de excitación que incide sobre la partícula 1 varía continuamente a medida que la partícula 1 se mueve a través de la región de detección (la región del canal de flujo en el tubo de ensayo 2 que está expuesta a la luz procedente del láser 10).

Las emisiones de fluorescencia procedentes de la partícula son recogidas por la lente 16 y dirigidas hacia el fotodetector 20. El diámetro de la lente 16 es más grande que la longitud de la región de detección, de manera que las emisiones son recogidas independientemente de dónde esté la partícula dentro de la región de detección. Un filtro de paso largo 18 está orientado delante del fotodetector 20. El bloque de filtro de paso largo es seleccionado para dejar pasar solo longitudes de onda más largas que la longitud de onda más larga de la luz de excitación. De este modo, el filtro de paso largo bloquea la luz de excitación para que no sea medida por el fotodetector, y permite la medida de las emisiones de partículas.

El sistema de la Figura 3 comprende además un mecanismo desencadenante que permite la detección cuando una partícula está a punto de entrar en la región de detección. El láser 40 emite un rayo que es reflejado por el espejo 42 para ser esencialmente paralelo a, pero aguas arriba de, el rayo de excitación emitido por el láser de luz blanca 10. El láser 40 preferiblemente emite una longitud de onda de luz que está fuera del espectro del láser 10, por ejemplo una longitud de onda más corta, pero puede, alternativamente, emitir una longitud de onda que esté dentro del espectro del láser 10. Una partícula que está a punto de entrar en la región de detección es primero expuesta a la luz procedente del láser 40. El fotodetector 47 está situado para medir la luz dispersada hacia delante. La disposición de fotodetector 46 está situada para medir la luz dispersada lateralmente y las emisiones de fluorescencia procedentes de las partículas excitadas por el láser 40.

Como se muestra la vista superior (Figura 3C), la dispersión lateral y las emisiones de fluorescencia procedentes de una partícula iluminada por el láser 40 son recogidas por la lente 16 y reflejadas hacia la disposición de detector 46 utilizando el espejo 44. El espejo 44 preferiblemente refleja el 100% de la luz, pero está situado de manera que solo son reflejadas emisiones que se originan desde la intersección del rayo procedente del láser 40 con la corriente de flujo. La luz procedente de la región de detección de exploración espectral se pierde en el espejo y es detectada por el fotodetector 20. Alternativamente, el espejo 44 puede ser un espejo dicróico que refleja la luz de un rango dado de longitudes de onda.

La disposición de detector 46 comprende uno o más detectores separados que son capaces de detectar la luz de dispersión lateral y/o las emisiones de fluorescencia. Por ejemplo, en una realización preferida, la disposición del detector 46 comprende los elementos ópticos de detección descritos en la Patente de Estados Unidos N° 7.129.505 y 6.683.314, ambas incorporadas como referencia.

- 5 La disposición de detector 46 está configurada para medir emisiones utilizando canales de detector que son distintos de, que se superponen parcialmente, o que se superponen con el rango de frecuencias proporcionado por el láser de luz blanca. Debido a que los dos sistemas de excitación/detector están separados espacialmente, son esencialmente independientes. De este modo, en general, la exploración espectral de la presente invención puede ser implementada junto con la excitación estándar y los elementos ópticos de detección utilizados en un citómetro de flujo típico, que pueden incluir múltiples láseres de excitación y múltiples disposiciones de detector.

El desencadenante es utilizado para programar la entrada de la partícula en la región de detección. Preferiblemente, el desencadenante está basado en un parámetro de dispersión, por ejemplo, dispersión hacia delante, pero en la práctica, cualquier señal distinguible, tal como una señal de fluorescencia, aguas arriba de la región de detección es adecuada para el desencadenante.

- 15 Un filtro ajustable Acustóptico (AOTF) 30 está situado en la trayectoria del rayo de excitación entre láser 10 y el prisma 12. El AOTF 30 está operativamente conectado al controlador 32. El AOTF 30 es un filtro de paso de banda que puede seleccionar y transmitir una banda estrecha seleccionada de longitudes de onda desde la luz entrante, bajo el control de una frecuencia de RF aplicada al AOTF por el controlador 32. Para simplificar la explicación, el AOTF puede ser descrito como un elemento que selecciona una longitud de onda particular, aunque se entenderá que el AOTF realmente selecciona una banda estrecha de longitudes de onda. El controlador 32 está configurado para proporcionar una frecuencia de RF variable al AOTF, controlando de este modo la longitud de onda seleccionada.

- 25 La anchura del rayo de excitación dispersado filtrado a una banda estrecha de longitudes de onda corresponde con una fracción de la anchura del rayo de excitación dispersado de espectro total. De este modo, en una banda estrecha seleccionada dada de longitudes de onda, solo un pequeño punto dentro de la región de detección está iluminado, y la ubicación del punto es determinada mediante el ángulo de dispersión por el prisma. Como cada longitud de onda es dispersada por el prisma en un ángulo diferente, la variación de la banda estrecha seleccionada de longitudes de onda de un extremo del espectro al otro da lugar a un movimiento concomitante del punto iluminado desde un extremo de la región de detección al otro. El controlador 32 está configurado para cambiar la banda estrecha de longitudes de onda seleccionada por el AOTF en sincronía con el movimiento de la partícula a través del canal de flujo, de manera que la partícula es iluminada continuamente a medida que pasa a través de la región de detección, si bien es cierto que con una longitud de onda constantemente variable de luz de excitación.

- 35 Para sincronizar el cambio en la longitud de onda seleccionada por el AOTF con el movimiento de la partícula a través del canal de flujo, la selección de longitud de onda debe ser sincronizada con la entrada de la partícula en la región de detección, y la velocidad del cambio de la selección de longitud de onda debe estar sincronizada con la velocidad de la partícula a través de la región de detección. La entrada de una partícula en la región de detección está cronometrada por la señal desencadenante (por ejemplo, la dispersión hacia delante) obtenida desde la partícula que pasa a través del rayo láser desencadenante aguas arriba de la región de detección. La señal desencadenante es enviada desde el detector 47 o 46 (dependiendo de cuál sea utilizado como señal desencadenante) al controlador 32, que inicia un barrido a través de la señal de RF que controla el barrido de AOTF a través de las longitudes de onda seleccionadas. El tiempo desde la detección del desencadenante hasta la iniciación del barrido espectral depende de la velocidad de flujo y la distancia desde la región de detección desencadenante hasta la región de detección de exploración espectral. En la práctica, el sistema puede ser calibrado empíricamente.

- 45 El controlador 32 está configurado para cambiar la longitud de onda seleccionada por el AOTF de tal manera que el movimiento del punto iluminado con la región de detección se mueve a la misma velocidad que la partícula. La velocidad de la partícula (es decir, la velocidad de la corriente de flujo a través del tubo de ensayo 2) depende del instrumento, y puede ser determinada empíricamente utilizando métodos que son estándar en el campo de la citometría de flujo.

- 50 Los segundos elementos ópticos de detección (44, 46, 47) incluyen un filtro que no deja pasar la luz de longitudes de onda que cubren el rango de longitudes de onda proporcionado por el espectro de luz de excitación que está dirigido sobre la región de detección.

- Alternativamente, los segundos elementos ópticos (44, 46, 47) comprenden una pluralidad de fotodetectores (46), conteniendo cada fotodetector (46) un filtro que no deja pasar la luz de longitudes de onda que se superponen con el rango de longitudes de onda proporcionadas en el espectro de luz de excitación que está dirigido sobre la región de detección.

Alternativamente, los segundos elementos ópticos de detección (44, 46, 47) comprenden una pluralidad de fotodetectores (46), cada uno configurado para medir un rango de longitudes de onda que son más largas que al

menos, o parte de, las longitudes de onda en el espectro de luz de excitación que está dirigido sobre la región de detección.

5 Alternativamente, los segundos elementos ópticos de detección (44, 46, 47) comprenden una pluralidad de fotodetectores (46), configurado cada uno para medir un rango de longitudes de onda definido por un filtro de paso de banda, en donde los rangos de longitudes de onda medidos por dicha pluralidad de fotodetectores (46) no se superponen.

Figuras 4A-D

10 Las Figuras 4A-D muestran el uso del sistema de la Figura 3 para explorar el espectro de excitación de una partícula. Como se muestra, la dirección de la partícula 1 cuando pasa a través del canal de flujo en el tubo de ensayo 2 es desde la parte inferior a la parte superior de la figura. El rayo de excitación que ha sido dispersado por el prisma en el espectro de colores intersecta con el canal de flujo en una cierta longitud del canal referida como región de detección. Para fines de ilustración, el rayo de excitación se muestra expandido en un espectro que abarca desde una luz azul hasta una luz roja. El rango real de longitudes de onda dependerá del rango de longitudes de onda emitidas por la fuente de excitación. Para facilitar la descripción, están indicados cuatro colores discretos dentro del rayo de excitación, aunque el rayo de excitación realmente varía de forma continua desde el extremo azul de su espectro en el límite inferior del rayo hasta el extremo rojo de su espectro en el límite superior del rayo. De este modo, la partícula 1, a medida que pasa a través de la región de detección del canal de flujo, es expuesta a todo el espectro del rayo de excitación desde el azul hasta el rojo.

20 La Figura 4A muestra la detección de la partícula por el detector hacia delante 47. La detección de la partícula por el detector de dispersión hacia delante proporciona el desencadenante que indica que la partícula 1 está a punto de entrar en la región de detección de exploración espectral.

25 La Figura 4B muestra inicio de la exploración espectral de la partícula fluorescente. La partícula acaba de entrar en la región espectral y está expuesta a una longitud de onda de luz que está en el extremo azul del espectro del rayo de excitación. El rayo de excitación completo es filtrado por un filtro ajustable Acustóptico (AOTF) 30 para proporcionar una banda estrecha de luz de excitación en la longitud de onda más corta (aproximadamente azul) en el espectro del rayo de excitación total. La banda estrecha del rayo de excitación filtrado se muestra en el área sombreada entre las líneas discontinuas. Debido a que el extremo azul del espectro de rayo de excitación está dispersado en el ángulo más grande y forma el límite de la región de detección, la banda estrecha intersecta la corriente de flujo en el inicio de la región de detección.

30 La Figura 4C muestra una etapa intermedia de la exploración espectral. La partícula se ha movido parcialmente a través de la región de detección, de manera que está situada en la región de detección en donde una longitud de onda de luz que está entre el amarillo y el verde intersecta la corriente de flujo. La banda estrecha de longitudes de onda seleccionadas por AOTF ha sido cambiada en sincronía con del movimiento de la partícula, de manera que la partícula es iluminada con una longitud de onda dentro de esta banda estrecha, y las otras longitudes de onda dentro del espectro completo del rayo de excitación han sido filtradas.

40 La Figura 4D muestra el final de la exploración espectral. La partícula se ha movido de manera que está a punto de salir del rayo de excitación. En este punto, la partícula está situada en la región de detección en donde la longitud de onda de luz que es aproximadamente roja intersecta con la corriente del flujo. La banda estrecha de longitudes de onda seleccionadas por el AOTF ha sido cambiada en sincronía con el movimiento de la partícula, de manera que la partícula es iluminada con una longitud de onda dentro de esta banda estrecha, y las otras longitudes de onda dentro del espectro completo del rayo de excitación han sido filtradas.

45 De este modo, como se ha descrito anteriormente, a medida que la partícula se desplaza a través de la región de detección, es excitada por el rayo de excitación que varía continuamente que tiene una banda estrecha de longitudes de onda. El rayo de excitación estrecho rastrea la partícula a través de la región de detección. El movimiento físico del rayo de excitación resulta de la dispersión dependiente de la longitud de onda por el prisma y la selección de longitud de onda continuamente cambiante por el AOTF.

50 A medida que la partícula se desplaza a través de la región de detección es excitada por la longitud de onda de rayo de excitación continuamente cambiante, las emisiones de fluorescencia procedentes de la partícula, medidas en una banda estática de longitudes de onda de detección, son recogidas por la lente 16 y dirigidas hacia el fotodetector 20 (ambos elementos mostrados en la Figura 3). Los datos resultantes proporcionan una medida del espectro de excitación de la partícula en el rango de longitudes de onda en el rayo de excitación.

Figura 5

55 La Figura 5 muestra el espectro de rayo de excitación y el canal detector de una realización de la presente invención, junto con los espectros de excitación y emisión de una partícula fluorescente a modo de ejemplo, denominada en la presente memoria FP1. El espectro de excitación 510 y el espectro de emisión 520 de FP1 se muestran únicamente con fines ilustrativos, para ayudar a entender la invención, y no significa que representen los espectros de ningún tinte fluorescente particular. El eje x es la longitud de onda, y el eje y es una escala arbitraria

utilizada para ejemplificar los espectros normalizados. En este ejemplo, a la partícula fluorescente presenta un pico de excitación en aproximadamente 550 nm y un pico de emisión en aproximadamente 625 nm (desplazamiento de Stokes de 75 nm).

5 Los límites del espectro de rayo de excitación (rango de longitudes de onda emitidas por la fuente de excitación) y del canal de detección (rango de longitudes de onda utilizadas para la detección de fluorescencia de partícula) se muestran esquemáticamente como barras a lo largo del eje x. En este ejemplo, se supone que el espectro del rayo de excitación está comprendido entre 450 y 600 nm, lo que corresponde con un rango de color desde un azul hasta un naranja (véase la tabla, anterior). El canal detector, que está definido por el rango de transmisión de un filtro de paso largo (por ejemplo, el filtro 18, mostrado en las Figuras 1 y 3), detecta emisiones de longitud de onda más largas que aproximadamente 630 nm.

10 Como se puede ver en la Figura 5, el canal detector mide las emisiones sobre una parte significativa del espectro de emisión total de la partícula fluorescente, FP1. A medida que la partícula se mueve a través del canal de flujo y es excitada por la longitud de onda de excitación constantemente cambiante, las emisiones procedentes de la partícula son medidas en el canal detector. En este ejemplo, el barrido a través del espectro de la fuente de excitación proporciona esencialmente una exploración del espectro de excitación completo de FP1, dado que el espectro de excitación de FP1 está en gran medida englobado dentro del rango de longitudes de onda proporcionadas por la fuente de rayo de excitación.

15 El uso de un filtro de paso largo típicamente es preferible a la utilización de un filtro de paso de banda debido a que maximiza la cantidad de emisión de fluorescencia medida, aunque el otro puede ser utilizado.

20 El filtro de paso largo que define el canal de detección no permite que la luz de excitación alcance el detector. Debido a que el canal detector está claramente separado de los espectros de rayo de excitación, el rayo de excitación puede estar en el en todo momento. De este modo, la realización mostrada en la Figura 5 puede ser utilizada tanto con el instrumento como con los métodos mostrados en las Figuras 1 y 2, o con el instrumento y los métodos mostrados en las Figuras 3 y 4.

25 **Figura 6**

La Figura 6 muestra el espectro de rayo de excitación y el canal detector de otra realización de la presente invención, junto con los espectros de excitación y de emisión de una segunda partícula fluorescente a modo de ejemplo, referida aquí como FP2. El espectro de excitación 610 y el espectro de emisión 620 de FP2 se muestran únicamente con fines ilustrativos, para ayudar a entender la invención, y no significa que representen los espectros de ningún tinte fluorescente particular. El eje x es la longitud de onda, y el eje y es una escala arbitraria utilizada para ejemplificar los espectros normalizados. En este ejemplo, la partícula fluorescente presenta un pico de excitación de aproximadamente 510 nm y un pico de emisión de aproximadamente 585 nm (desplazamiento de Stoke de 75 nm).

30 Los límites del espectro de rayo de excitación (rango de longitudes de onda emitidas por la fuente de excitación) y el canal de detección (rango de longitudes de ondas utilizadas para la detección de fluorescencia de partícula) se muestran esquemáticamente como barras a lo largo del eje x, debajo de los espectros de partícula. En este ejemplo, se supone que el espectro de rayo de excitación está comprendido entre 450 y 600 nm. El primer canal de detección 640 es idéntico al de la Figura 5 y detecta las emisiones de longitud de onda más larga que aproximadamente 630 nm. Un segundo canal de detección 630 definido por un segundo filtro de paso largo, detecta todas las emisiones de longitudes de onda más largas de aproximadamente 550 nm. De este modo, el segundo filtro de paso largo no deja pasar solo la luz de excitación por debajo de 550 nm en longitud de onda para que no alcance el detector.

35 Como se puede observar en la Figura 6, el máximo de emisión de FP2 está bien a la izquierda del límite de longitud de onda para el canal detector 640, y la fracción de la emisión total de FP2 que cae dentro del canal detector 640 es solo una pequeña parte del espectro de emisión total de FP2. Aunque la emisión procedente de FP2 puede ser medida utilizando el canal detector 640, se espera que la sensibilidad de detección sea reducida debido a que la mayoría de la emisión procedente de FP2 está bloqueada por el filtro de paso largo.

40 El segundo canal detector 630 detecta emisiones de longitud de onda más largas que aproximadamente 550 nm, y está configurado para detectar casi toda la luz emitida por FP2. Sin embargo, el canal de detección 630 cubre el espectro de emisión del rayo de excitación. De este modo, si todo el espectro del rayo de excitación estuviera iluminando continuamente el canal de flujo, la dispersión procedente de la parte del espectro de rayo de excitación que recubre el canal de detección 630 interferiría con la detección de la fluorescencia de FP2 en ese canal.

45 El esquema de detección mostrado en la Figura 6 preferiblemente es utilizado con el instrumento y los métodos mostrados en las Figuras 3 y 4. Como se ha descrito anteriormente, a medida que la partícula se mueve a través del canal de flujo y es excitada por una longitud de onda de excitación continuamente cambiante, solo una longitud de onda esencialmente única está brillando en la partícula en un momento cualquiera. El rayo de excitación barre desde una longitud de onda de aproximadamente 450 nm a la aproximadamente 600 nm, rastreando el movimiento de la partícula. Durante este barrido, aunque el rayo de excitación está bajo el límite de longitud de onda del canal de detección 630, no hay luz de rayo de excitación que se pueda dispersar ni completar con la detección de la

fluorescencia de FP2. De este modo, el canal de detección 630 puede ser utilizado para detectar la emisión procedente de FP2 durante una exploración del espectro de excitación de FP2 en un rango de 450-550 nm.

Una vez que el rayo de excitación ha alcanzado el umbral del canal de detección 630, el canal de detección 630 ya no es utilizado para medir las emisiones procedentes de FP2. Sin embargo, el canal de detección 640 todavía se puede utilizar para detectar las emisiones procedentes de FP2. La señal procedente de las emisiones de FP2 se mide en el canal de detección 640 y son preferiblemente amplificadas para compensar la sensibilidad de detección baja. De este modo, el espectro de excitación de FP2 puede ser explorado sobre el espectro de rayo de excitación completo, medido o bien en el canal de detección 640 (con sensibilidad menor), o mediante una porción utilizando el canal de detección 630 (con elevada sensibilidad) en el rango de 450-550 nm, seguido de la finalización de la exploración utilizando el canal de detección 640 (con sensibilidad más baja).

La Figura 6 describe un esquema de detección que utiliza dos canales detectores que se superponen para hacer posible que los espectros de excitación de exploración tengan especificidad más elevada en un rango más amplio. Claramente, se pueden utilizar canales detectores adicionales. Cada canal de detección puede incrementar el rango de la exploración del espectro de excitación que es realizada con detección altamente eficiente de las emisiones.

Los canales detectores múltiples no necesitan ser superpuestos. Por ejemplo, el canal detector 630 podría también estar definido por un filtro de paso de banda que trasmite luz entre 550 y 630 nm, que es el inicio del siguiente canal detector.

El esquema de detección mostrado en la Figura 6 es también adecuado para medir el espectro de excitación de otras partículas fluorescentes, tales como FP1, descrito anteriormente y mostrado en la Figura 5. Para medir el espectro de excitación de FP1, el canal de detección 630 o bien puede ser ignorado, o bien puede ser utilizado para mejorar la medida de la emisión de FP1 durante la primera parte de la exploración de excitación. En general, proporcionando un conjunto de canales de detección por etapas, el espectro de excitación de cualesquiera partículas fluorescentes que tiene un espectro de excitación que se superpone con el espectro de láser de luz blanca puede ser medido. La información procedente de los canales de detección separados preferiblemente es combinada para tener la medida más sensible de las emisiones de tinte mientras la luz de excitación es variada través del espectro.

Figura 7

La Figura 7 muestra el espectro de rayo de excitación y los canales detectores de otra realización de la presente invención, junto con los espectros de excitación y de emisión de una segunda partícula fluorescente a modo de ejemplo referida aquí como FP2, y los espectros de excitación y emisión de una tercera partícula fluorescente a modo de ejemplo, referida aquí como FP3. El espectro de excitación 710 y el espectro de emisión 720 de FP2 y el espectro de excitación 715 y el espectro de emisión 725 de FP3 se muestran únicamente con fines ilustrativos, para ayudar a entender la invención, y no significa que representen los espectros de ningún tinte fluorescente particular. El eje x es la longitud de onda, y el eje y es una escala arbitraria utilizada para ejemplificar los espectros normalizados. En este ejemplo, la partícula fluorescente FP2, presenta un pico de excitación en aproximadamente 510 nm y un pico de emisión en aproximadamente 585 nm (desplazamiento de Stoke de 75 nm), y la partícula fluorescente FP3 presenta un pico de excitación en aproximadamente 550 nm y un pico de emisión en aproximadamente 625 nm (desplazamiento de Stoke de 75 nm).

Los límites del espectro de rayo de excitación (rango de longitudes de onda emitidas por la fuente de excitación) y del canal de detección (rango de longitudes de onda utilizadas para la detección de la fluorescencia de partícula) se muestran esquemáticamente como barras a lo largo del eje x, debajo del espectro de partícula. En este ejemplo se supone que el espectro del rayo de excitación está comprendido entre 450 y 600 nm. El primer canal de detección 730 definido por un filtro de paso de banda, detecta las emisiones de longitudes de onda en un rango de aproximadamente 560-590 nm. Este primer canal de detección corresponde aproximadamente al máximo de emisión de FP2, con el límite de longitud de onda superior seleccionado para evitar englobar emisión significativa procedente de FP3. Este primer canal de detección también está denominado como el canal de FP2. El segundo canal de detección 740, definido por un segundo filtro de paso de banda, detecta emisiones de longitud de onda en un rango de aproximadamente 625-710 nm. Este segundo canal de detección corresponde aproximadamente con el máximo de emisión de FP3, con el límite de longitud de onda inferior seleccionado de manera que se evita englobar emisión significativa procedente de FP2. Este segundo canal de detección también está denominado como el canal de FP3.

Como se puede observar en la Figura 7, el canal de FP2 mide una fracción significativa de las emisiones de FP2, pero mide una pequeña fracción de las emisiones de FP3.

De manera similar, el canal FP3 mide una fracción significativa de las emisiones de FP3, pero mide sobre una pequeña fracción de las emisiones de FP2. La selección de los dos canales de detección para que correspondan con los dos máximos de excitación de tinte hace posible la medida relativamente independiente de las dos emisiones de tinte, lo que además hace posible la medida relativamente independiente de los dos espectros de excitación del tinte.

El esquema de detección mostrado en la Figura 7 preferiblemente es utilizado con el instrumento y con los métodos mostrados en las Figuras 3A-C y 4A-D. Como se ha descrito anteriormente, a medida que la partícula se mueve a través del canal de flujo y es excitada por una longitud de onda de excitación constantemente cambiante, solo una longitud de onda esencialmente única está brillando en la partícula en un momento cualquiera. El rayo de excitación barre desde una longitud de onda de aproximadamente 450 nm hasta aproximadamente 600 nm, rastreando el movimiento de la partícula. Durante este barrido, aunque la longitud de onda del rayo de excitación está por debajo de la longitud de onda del canal de detección 730 de FP2, no hay luz de rayo de excitación que pueda dispersarse y finalizar la detección de la fluorescencia de FP2. De este modo, el canal de detección 730 de FP2 puede ser utilizado para detectar la emisión procedente de FP2 durante una exploración del espectro de excitación de FP2 en un rango de 450-560 nm, lo que representa la mayoría del rango de longitudes de onda sobre el que FP2 presenta excitación significativa.

Debido a que el canal de FP3 está fuera del rango de longitudes de onda de luz de excitación, no se detecta luz de rayo de excitación dispersada en el canal de FP3. De este modo, el canal de detección 740 de FP3 puede ser utilizado para detectar la emisión procedente de FP3 durante una exploración del espectro de excitación de FP3 sobre un barrido total de las longitudes de onda de luz de excitación. Debido a que el espectro de excitación de FP3 se extiende más allá de un rango de longitudes de onda de luz de excitación, esto proporciona una parte significativa, pero no toda, del espectro de excitación de FP3.

La Figura 7 describe un ejemplo de un esquema de detección que utiliza canales detectores que están emparejados con los tintes particulares que serán utilizados en el ensayo. La selección de los canales de detección que corresponden con los máximos de excitación hace posible la medida relativamente independiente de las emisiones de tinte, lo que además hace posible la medida relativamente independiente de los espectros de excitación. Aunque la Figura 7 se muestra dos tintes, este esquema de detección puede ser aplicado al análisis de un número más elevado de tintes espectralmente distintos utilizando un correspondiente número elevado de canales de detección, cada uno emparejado con las emisiones de un tinte particular.

Una ventaja de esta realización de la invención es que facilita el análisis de partículas marcadas con múltiples tintes. Por ejemplo, como es típicamente el caso en análisis celular mediante citometría de flujo, una célula puede ser marcada con un cierto número de tintes distintos, cada uno unido a una proteína celular diferente. La célula marcada de forma múltiple presentará un espectro excitación total que resulta de la combinación de los tintes. Utilizando detectores que están emparejados con los tintes individuales y, por tanto, son posibles medidas relativamente independientes de las emisiones de tinte, el espectro de excitación puede ser separado más fácilmente en sus componentes correspondientes con el espectro de excitación de cada uno de los tintes en la combinación.

Los métodos para separar matemáticamente (desunir) un espectro, que es la unión de una pluralidad de espectros en espectros de componente, se conoce la técnica (véase, por ejemplo, Robinson et al. *supra*). Tales métodos pueden ser utilizados para calcular la contribución de cada uno de los tintes de componente en los presentes métodos y, de este modo, identificar los marcos presentes en una partícula, tal como una célula.

REIVINDICACIONES

1. Un analizador de partículas de tipo flujo para medir el espectro de excitación de partículas fluorescentes en una corriente de fluido, que comprende:
 - a) una fuente de luz de excitación (10) que emite un rayo de luz de excitación de amplio espectro colimado,
 - 5 b) elementos ópticos de excitación (12, 14) que enfocan y dirigen el rayo de luz de excitación sobre una región de detección en dicha corriente de fluido, en donde dichos elementos ópticos de excitación (12, 14) incluyen un elemento de dispersión (12) que dispersa el espectro de rayo de luz de excitación, y en donde dicho elemento de dispersión (12) está orientado de manera que el espectro resultante de longitudes de onda continuamente cambiantes es dispersado sobre una región de detección de dicha corriente de fluido, de manera que una partícula
 - 10 (1) que fluye a través de dicha región de detección atravesará el espectro dispersado del rayo de luz de excitación a través de las longitudes de onda cambiantes; y
 - c) elementos ópticos de detección (16, 18, 20) que miden la luz emitida desde las partículas (1) en la región de detección.
2. El analizador de partículas de tipo flujo de la reivindicación 1, que comprende además un tubo de ensayo óptico
 - 15 (2) que tiene un canal de tubo de ensayo que se extiende a través de dicho tubo de ensayo (2), en donde dicha corriente de fluido es hecha pasar a través de dicho canal del tubo de ensayo, y en donde dicha región de detección en la corriente de fluido está dentro de dicho canal de tubo de ensayo.
3. El analizador de partículas de tipo flujo de la reivindicación 1, en donde dichos elementos ópticos de detección
 - 20 (16, 18, 20) comprenden un fotodetector (20) configurado para medir un rango de longitudes de onda que son más largas que las longitudes de onda en el espectro de luz de excitación que está dirigido sobre la región de detección.
4. El analizador de partículas de tipo flujo de la reivindicación 1, que comprende además:
 - a) una segunda fuente de excitación (40) que emite un segundo rayo que intersecta la corriente de flujo aguas arriba de la región de detección;
 - 25 b) segundos elementos ópticos de detección (44, 46, 47) que miden la luz emitida procedente de la intersección de dicho rayo y dicha corriente de flujo, configurados para detectar partículas (1) en base a la luz emitida y proporcionar una señal desencadenante cuando una partícula es detectada;
 - c) un filtro ajustable (30) situado en el rayo de luz de excitación entre la fuente de luz de excitación (10) y el elemento de dispersión (12), configurado para permitir que la selección de una banda estrecha de longitudes de onda pase por el filtro (30), en donde dicha selección está bajo el control de una señal de control;
 - 30 d) un controlador (32) configurado para recibir dicha señal desencadenante y para proporcionar una señal de control a dicho filtro ajustable (30), de manera que la banda estrecha seleccionada de longitudes de onda que es hecha pasar por el filtro (30) es cambiada a través del espectro de la fuente de luz de excitación (10) cuando una partícula está pasando a través de dicha región de detección.
5. El analizador de partículas de tipo flujo de la reivindicación 1 o 4, en donde dicha fuente de luz de excitación (10)
 - 35 contiene un láser de luz blanca.
6. El analizador de partículas de tipo flujo de la reivindicación 5, en donde dicha fuente de luz de excitación (10) contiene además elementos de filtro que restringen el rango de longitudes de onda emitidas por el láser de luz blanca.
7. El analizador de partículas de tipo flujo de la reivindicación 4, en donde dichos segundos elementos de detección
 - 40 ópticos (44, 46, 47) incluyen un filtro que no deja pasar la luz de longitudes de onda que se superponen con el rango de longitudes de onda proporcionado en el espectro de luz de excitación que está dirigido sobre la región de detección.
8. El analizador de partículas de tipo flujo de la reivindicación 4, en donde dichos segundos elementos ópticos de
 - 45 detección (44, 46, 47) comprenden una pluralidad de fotodetectores (46), conteniendo cada fotodetector (46) un filtro que no deja pasar la luz de longitudes de onda que se superponen con el rango de longitudes de onda proporcionado en el espectro de luz de excitación que está dirigido sobre la región de detección.
9. El analizador de partículas de tipo flujo de la reivindicación 4, en donde dichos segundos elementos ópticos de
 - 50 detección (44, 46, 47) comprenden una pluralidad de fotodetectores (46), cada uno configurado para medir un rango de longitudes de onda que son más largas que, al menos, o parte de las longitudes de onda en el espectro de luz de excitación que está dirigido sobre la región de detección.

10. El analizador de partículas de tipo flujo de la reivindicación 4, en donde dichos segundos elementos ópticos de retención (44, 46, 47) comprenden una pluralidad de fotodetectores (46), configurado cada uno para medir un rango de longitudes de onda definido por un filtro de paso de banda, en donde los rangos de longitudes de onda medidas por la pluralidad de fotodetectores (46) no se superponen.
- 5 11. Un método para utilizar un analizador de partículas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, utilizando canales de detección por etapas, preferiblemente junto con la luz de excitación filtrada de forma ajustable, para hacer posible la detección de emisiones de partículas en longitudes de onda que se superponen con una parte del espectro de luz de excitación.
- 10 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, mediante el cual cuando una partícula se mueve a través de la región de detección y es iluminada con longitudes de onda progresivamente más largas, los canales de detección que miden la luz de una longitud de onda más larga que la longitud de onda de la luz de excitación son utilizados para detectar las emisiones de partículas.
- 15 13. El método de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, mediante el cual cuando la longitud de onda de la luz de excitación es alargada durante la exploración, de manera que se superpone con un canal de detección, ese canal de detección ya no es útil para medir la emisión debido a la interferencia producida por la luz de excitación, con lo que las emisiones son detectadas por uno o más de los restantes canales de detección.
- 20 14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, mediante el cual cuando la longitud de onda de la luz de excitación es alargada durante la exploración, de manera que se superpone con el segundo canal de detección, ese canal de detección ya no es útil para medir la emisión debido a la interferencia producida por la luz de excitación, y las emisiones son detectadas por uno o más de los canales de detección restantes.
15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, mediante el cual el canal de detección final preferiblemente mide todas las longitudes de onda que son más largas que la longitud de onda de excitación más larga utilizando un filtro de paso largo apropiado.

Fig. 1A

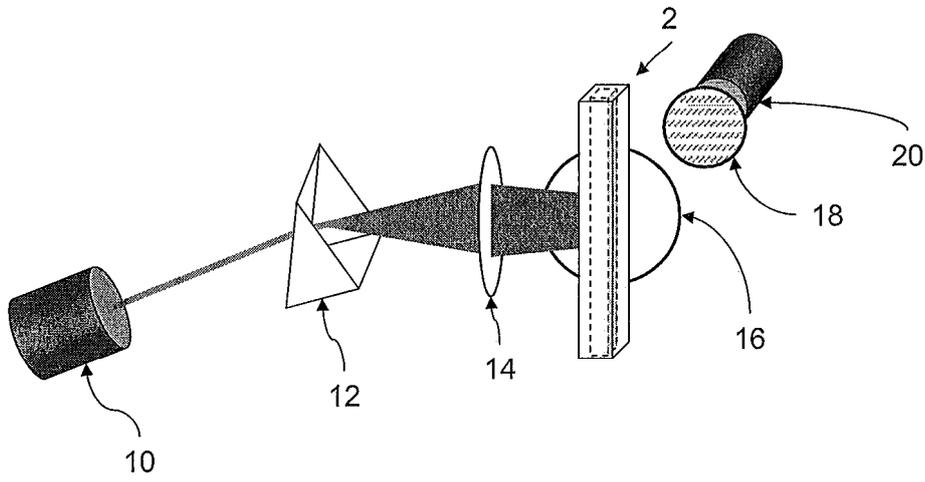


Fig. 1B

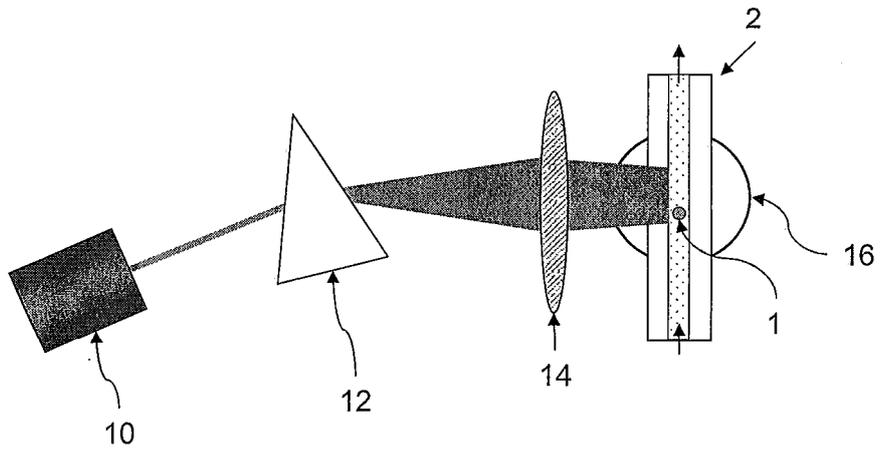


Fig. 1C

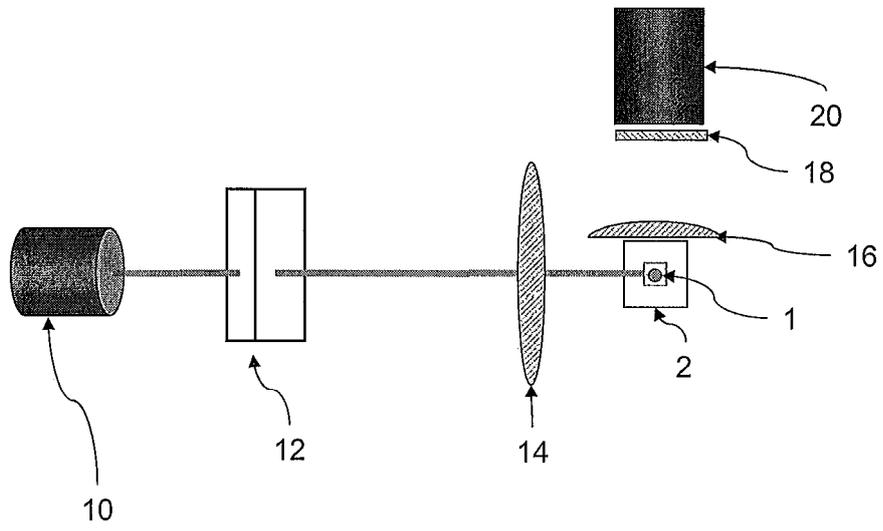


Figura 2A

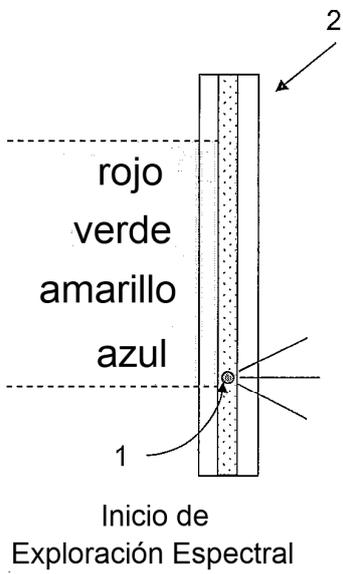


Figura 2B

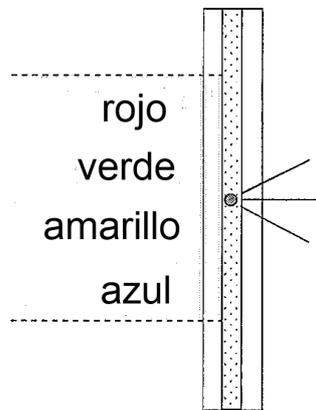


Figura 2C

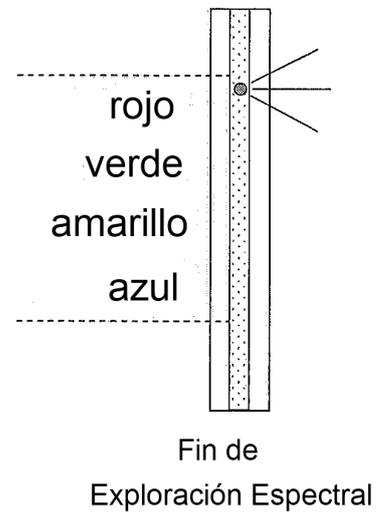


Fig. 3A

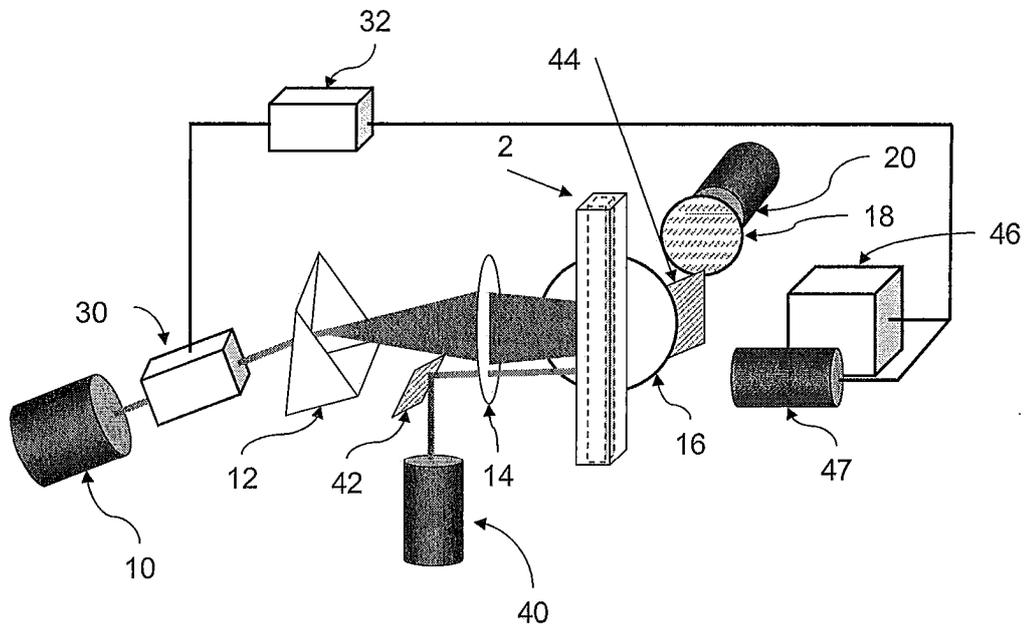


Fig. 3B

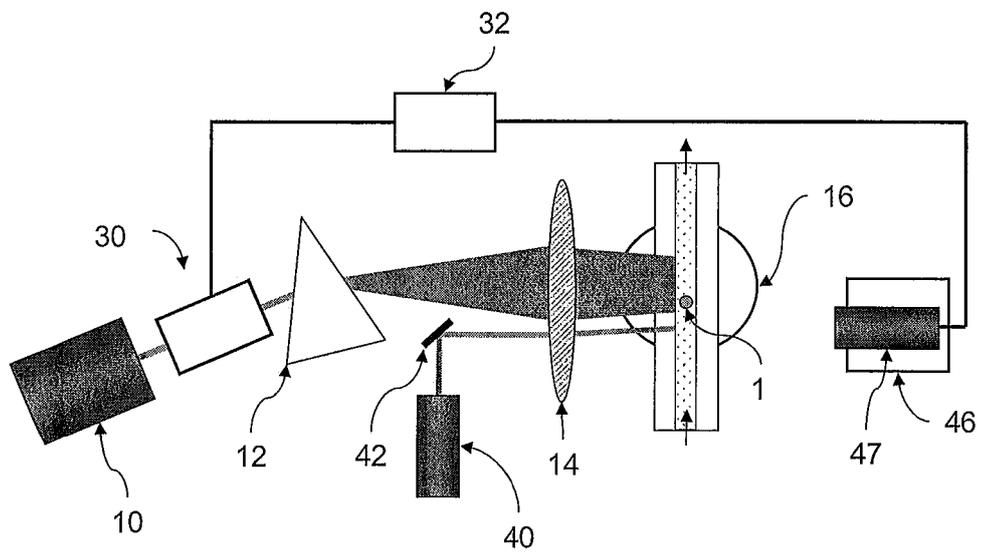


Fig. 3C

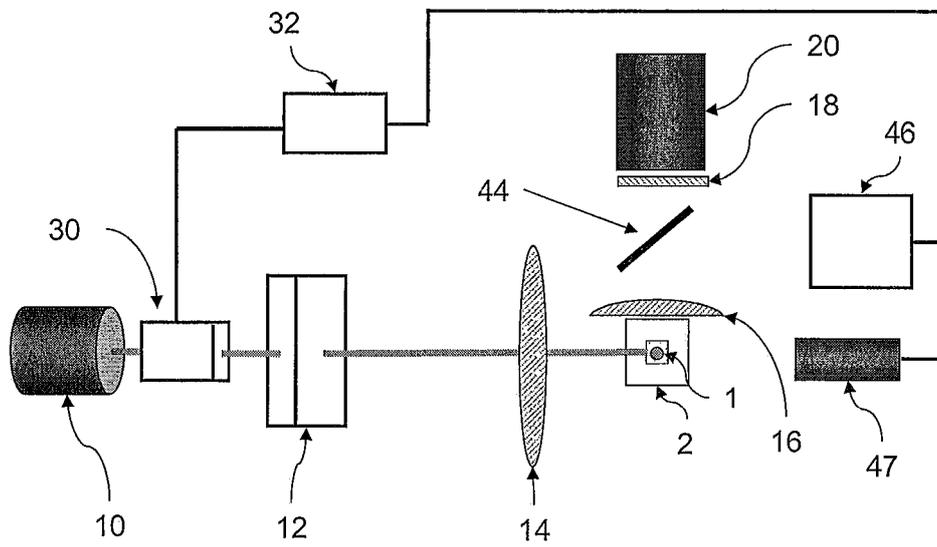


Figura 4A

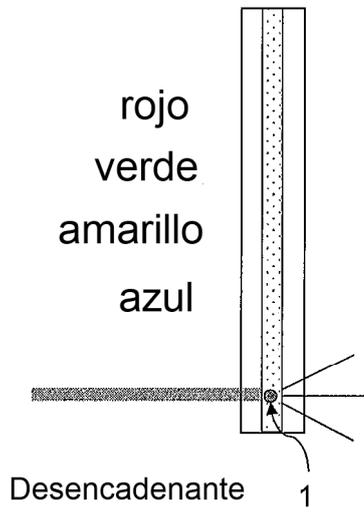


Figura 4B

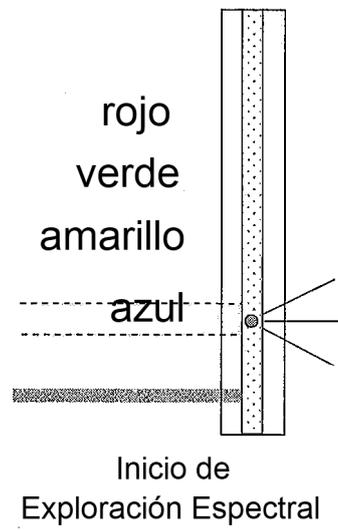


Figura 4C

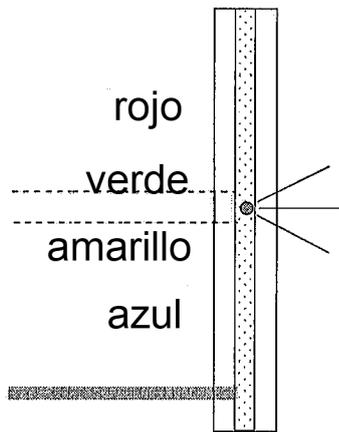
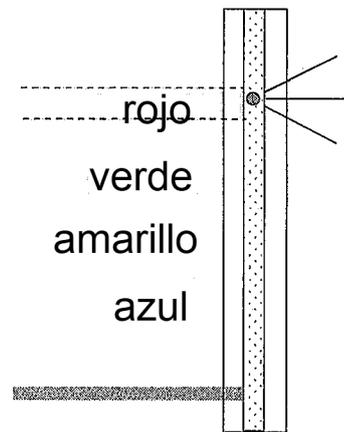


Figura 4D



Fin de
Exploración Espectral

Figura 5

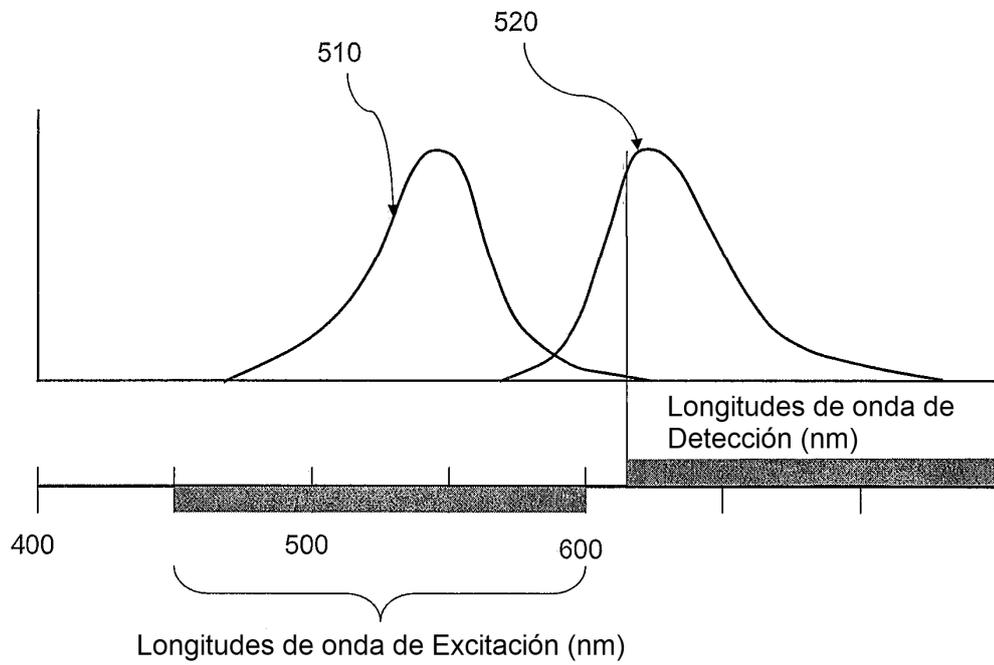


Figura 6

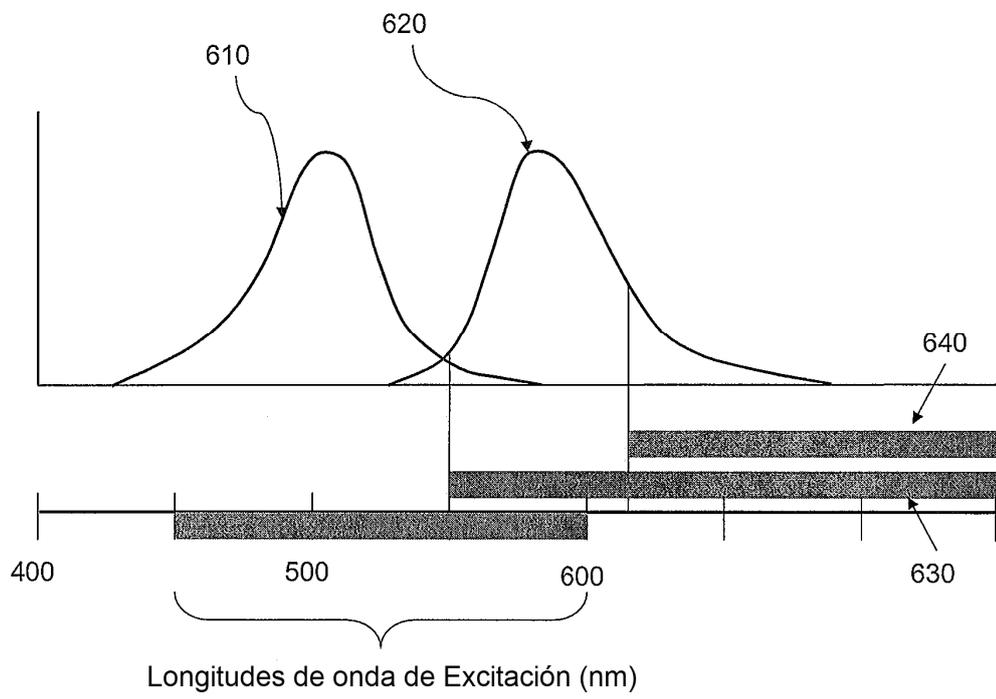


Figura 7

