

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 929 874**

51 Int. Cl.:

G02B 21/16 (2006.01)

G02B 21/36 (2006.01)

G02B 27/56 (2006.01)

G02B 27/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2017 PCT/GB2017/051034**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2017 WO17178823**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2017 E 17718592 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2022 EP 3443401**

54 Título: **Formación de imágenes de superresolución**

30 Prioridad:

12.04.2016 GB 201606268

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

02.12.2022

73 Titular/es:

**UNIVERSITETET I TROMSØ - NORGES
ARKTISKE UNIVERSITET (100.0%)
Hansine Hansens veg 18
9019 Tromsø, NO**

72 Inventor/es:

**AHLUWALIA, BALPREET SINGH y
SCHÜTTPELZ, MARK**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 929 874 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

Formación de imágenes de superresolución

5 Esta invención se refiere a un aparato y a métodos para realizar la formación de imágenes de muestras de superresolución. Más específicamente, pero no exclusivamente, se refiere a un aparato y a métodos para realizar la formación de imágenes de muestras de microscopía de reconstrucción óptica estocástica directa (dSTORM, del inglés *direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*).

10 Los microscopios ópticos se utilizan en histología, biología celular y campos relacionados para ver muestras biológicas, tales como células. Sin embargo, la capacidad de resolución de los microscopios ópticos está limitada debido al límite de difracción de la luz. Esta limitación restringe la resolución del microscopio de luz visible a aproximadamente 200 a 300 nm. A fin de superar este límite, en la técnica se han desarrollado varias técnicas, denominadas "nanoscopía", "formación de imágenes de superresolución" o "microscopía de superresolución".

15 Estas técnicas de formación de imágenes de superresolución permiten la formación de imágenes de una muestra biológica con una resolución de aproximadamente 20 a 50 nm. Se basan en procesar la luz emitida desde fluoróforos fotoconmutables o marcadores de puntos cuánticos que se han adherido o incrustado en la muestra biológica. Los ejemplos conocidos de tales técnicas de superresolución incluyen microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STORM, del inglés *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*), microscopía de reconstrucción óptica estocástica directa (dSTORM, del inglés *direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*), microscopía de localización fotoactivada (PALM, del inglés *Photoactivated Localization Microscopy*), formación de imágenes de fluctuación óptica de superresolución (SOFI, del inglés *SuperResolution Optical Fluctuation Imaging*) y formación de imágenes de superresolución basada en la entropía (ESI, del inglés *Entropy-Based Super-Resolution Imaging*).

25 La Figura 1 muestra una disposición ejemplar de la técnica anterior para la formación de imágenes de superresolución, tales como la formación de imágenes dSTORM. La disposición comprende una primera fuente de luz láser 140, una segunda fuente de luz 145, un primer divisor de haz 160, un segundo divisor de haz 150, una lente de objetivo 110 que tiene una resolución de aproximadamente 250 nm a las longitudes de onda relevantes (por ejemplo, una lente de objetivo 60x de alta AN), una muestra 170 y un detector CCD o sCMOS 190. La disposición también incluye medios para dirigir la luz desde la primera fuente de luz láser 140 al primer divisor de haz 160 y para dirigir la luz desde la segunda fuente de luz láser 145 al primer divisor de haz 160. El primer divisor de haz 160 combina la luz láser recibida desde la primera y la segunda fuentes de luz láser 140, 145 para formar un haz de excitación 130 y dirige el haz de excitación 130 al segundo divisor de haz 150. El segundo divisor de haz 150 dirige el haz de excitación 130 a la lente de objetivo 110.

40 Para obtener imágenes de una región particular de interés de la muestra, el haz de excitación se dirige sobre una región de interés de la muestra 170 a fin de excitar los fluoróforos en esa región. Al realizar la dSTORM pueden utilizarse dos longitudes de onda diferentes, como sabrán los expertos en la materia. Cuando los fluoróforos en la región de muestra emiten luz, esta se recoge y se procesa a fin de generar una imagen de la región de interés. Esto se consigue enfocando la lente de objetivo 110 sobre la región de interés de la muestra 170 para que el haz de excitación 130 pueda ser dirigido sobre la región de interés y para que pueda recogerse la luz que emana de la región de interés. El segundo divisor de haz 150 funciona para filtrar la luz recogida 120 desde la luz de excitación 170 y para dirigir la luz recogida 120 sobre el detector CCD 190. Por supuesto, puede realizarse un filtrado adicional. Un ordenador (no mostrado) recibe datos desde el detector CCD 190 y procesa los datos para determinar las posiciones de los fluoróforos mediante ajuste gaussiano (u otro método conocido), con una precisión mayor que la resolución de 250 nm de la lente de objetivo.

50 Un problema con el aparato que se utiliza típicamente para la formación de imágenes de superresolución en la actualidad es que puede ser caro, voluminoso y engorroso de configurar y operar.

Las disposiciones de formación de imágenes de superresolución utilizan típicamente una lente de objetivo con una alta apertura numérica (AN) para iluminar una muestra, ya sea con un campo evanescente (fluorescencia de reflexión interna total) o con una lámina óptica altamente inclinada y laminada (HILO).

55 Sin embargo, las lentes con altas aperturas numéricas (AN) son caras. También tienen un limitado campo de visión (FOV, del inglés *field of view*), que restringe el campo en el que puede recogerse luz fluorescente desde la muestra. Este campo de visión limitado tiene un tamaño de aproximadamente 50 a 250 micrómetros, que es más pequeño que el tamaño de las muestras biológicas típicas, por ejemplo, cultivos celulares y colonias grandes, o tejidos. Esto significa que puede ser necesario reposicionar y realinear el microscopio, con respecto a la muestra, durante la formación de imágenes, a fin de obtener una imagen completa de subresolución de toda la muestra biológica. Esto es particularmente problemático al obtener imágenes cultivos celulares vivos, puesto que no es posible obtener imágenes simultáneamente de movimientos que implican una primera parte del cultivo celular y una segunda parte del cultivo celular cuando la segunda parte del cultivo celular está fuera del campo de visión. Además, se requiere un procesado de imágenes complejo para coser entre sí las imágenes de subresolución adquiridas para formar una imagen de subresolución completa de toda la muestra biológica.

En la Patente WO 2016/006006 A1 se desvela un sistema de microscopía láser de alta resolución.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un aparato y métodos para realizar la formación de imágenes de superresolución que aborde de distintas maneras estos inconvenientes.

5 Desde un primer aspecto, la invención proporciona un aparato para la formación de imágenes de superresolución de una muestra según la reivindicación 1.

10 Desde un segundo aspecto, la invención proporciona un método para realizar la formación de imágenes de superresolución de una muestra localizada, al menos parcialmente, dentro de un campo de visión frontal de una lente de objetivo, según la reivindicación 10.

15 Por tanto, los expertos en la técnica advertirán que, según la invención, la luz se suministra a la muestra por medio de un componente de guía de ondas (que guía la luz a través de la reflexión interna total), en lugar de ser suministrada por la lente del objetivo. Por lo tanto, la lente de objetivo puede optimizarse para recoger luz desde la muestra, en lugar de requerir la misma lente de objetivo para suministrar luz de excitación a la muestra y para recoger la luz emitida por la muestra.

20 El uso de una guía de ondas para excitar una muestra para la formación de imágenes de superresolución proporciona una serie de beneficios sorprendentes, que incluyen permitir la utilización de una lente de objetivo de formación de imágenes con una apertura numérica más baja que la que se ha utilizado normalmente en la formación de imágenes de superresolución, lo que conduce a un campo de visión más amplio de la muestra y menores costes de equipos. Esto también evita la mayoría de complejidad en la alineación implicada en una configuración de superresolución tradicional, puesto que el componente de guía de ondas puede suministrar luz de excitación
25 directamente sobre la muestra, sin requerir componentes adicionales, tales como divisores de haz.

30 Preferentemente, el componente de guía de ondas recibe la luz de entrada desde una fuente de luz, tal como un láser, que está localizado preferentemente fuera del campo de visión de la lente de objetivo. El componente de guía de ondas puede recibir luz de entrada a través del aire o a través de algún otro medio, tal como un cable de fibra óptica acoplado al componente de guía de ondas. La longitud de onda de la luz de entrada puede cambiar a lo largo del tiempo, por ejemplo, por multiplexación temporal entre una pluralidad de diferentes longitudes de onda. Preferentemente, la luz de entrada no pasa a través de la lente de objetivo. También preferentemente, la luz de excitación no pasa a través de la lente de objetivo. Preferentemente, la lente de objetivo tiene una apertura numérica mayor a 0,4; y, preferentemente, menos de 1,49.

35 Preferentemente, la lente de objetivo tiene un eje óptico que no es paralelo con una dirección de un camino óptico a través de la guía de ondas. En algunas realizaciones, el eje óptico de la lente de objetivo es sustancialmente perpendicular a una dirección de un camino óptico a través de la guía de ondas, o a una capa plana de la guía de ondas.

40 Puede realizarse cualquier técnica de formación de imágenes de superresolución. Preferentemente, la formación de imágenes de superresolución es tal que, para al menos una longitud de onda en la luz recogida, la resolución de formación de imágenes es más fina que la resolución de la lente de objetivo a esa longitud de onda. La resolución de la lente de objetivo estará limitada, por supuesto, por el límite de difracción de las lentes. Preferentemente, la luz
45 recogida comprende luz fluorescente emitida por la muestra; preferentemente, la formación de imágenes de superresolución es mediante microscopía de fluorescencia. La formación de imágenes de superresolución puede comprender un método de localización de una sola molécula o una técnica de superresolución basada en un campo de luz fluctuante. La formación de imágenes de superresolución puede seleccionarse entre el grupo que consiste en: microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STORM); microscopía de reconstrucción óptica estocástica directa (dSTORM); microscopía de localización fotoactivada (PALM); formación de imágenes de fluctuación óptica de superresolución (SOFI); y formación de imágenes de superresolución basada en la entropía (ESI). Un conjunto preferido de realización utiliza dSTORM.

50 El componente de guía de ondas puede tomar cualquier forma adecuada. En algunas realizaciones, comprende una o más capas planas. El componente de guía de ondas puede comprender una estructura de guía de ondas de bloque, una estructura de guía de ondas de costilla, una estructura de guía de ondas de franja o una estructura de guía de ondas de excitación de múltiples núcleos. En un conjunto de realizaciones preferido, la guía de ondas comprende una estructura de guía de ondas integrada monolíticamente sobre un sustrato, que puede ser un sustrato plano. El sustrato puede ser silicio. Preferentemente, el sustrato tiene un grosor máximo de menos de 200 micrómetros, tal como de 160 a 170 micrómetros. En algunas realizaciones, el sustrato puede ser transparente, para
60 permitir que la luz sea recogida desde la muestra a través del sustrato.

65 El componente de guía de ondas está dispuesto preferentemente para emitir la luz de excitación desde una cara de salida, estando la cara de salida al menos parcialmente dentro del campo de visión de la lente de objetivo. La cara de salida es preferentemente plana. Puede ser paralela a una dirección de un camino tomado por la luz dentro del componente de guía de ondas (por ejemplo, cuando se dirige la luz de excitación sobre la muestra como un campo

evanescente), o puede estar inclinada (preferentemente perpendicular) a una dirección de un camino tomado por la luz dentro del componente de guía de ondas (por ejemplo, cuando se dirige la luz de excitación sobre la muestra desde una faceta de salida como un haz o una lámina).

5 El componente de guía de ondas puede estar dispuesto para guiar la luz de entrada hacia la muestra a lo largo de un camino óptico cuyo ancho, en al menos una dimensión, aumenta en una dirección hacia la muestra. Esto puede ser útil en la iluminación de un área mayor de la muestra con luz de excitación, tanto indirectamente con un campo evanescente como directamente. Preferentemente, este ancho aumenta adiabáticamente, por lo que puede mantenerse una condición de un solo modo de la guía de ondas (lo que puede ser útil para ciertas técnicas de formación de imágenes de superresolución).

15 En un conjunto de realizaciones, el componente de guía de ondas está dispuesto para dirigir únicamente luz de excitación consistente en un campo evanescente sobre la muestra. Preferentemente, la muestra está en contacto con el componente de guía de ondas. El componente de guía de ondas puede comprender una primera región de núcleo y una primera región de revestimiento en contacto con la primera región de núcleo, teniendo la primera región de núcleo un índice de refracción más alto que la primera región de revestimiento y estando dispuesto para definir un primer camino óptico del primer núcleo a través de la guía de ondas, en donde la primera región de revestimiento está conformada para definir un pocillo de muestra para contener la muestra.

20 El pocillo de muestra puede comprender una o más paredes, en particular, cuatro paredes laterales planas. El pocillo de muestra puede estar recubierto con una capa biocompatible que comprende, por ejemplo, moléculas de BSA (albúmina de suero bovino), PEG (polietilenglicol) o PLL (poli-L-lisina).

25 En otro conjunto de realizaciones, el componente de guía de ondas está dispuesto para emitir la luz de excitación desde una faceta de borde del componente de guía de ondas. La muestra puede estar en contacto con la faceta de borde, o puede haber un medio, tal como un espacio de aire y/o una solución tampón celular (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, PBS), entre la faceta de borde y la muestra. De nuevo, el componente de guía de ondas puede definir un pocillo de muestra para contener la muestra. Este pocillo de muestra puede comprender una o más paredes laterales. Al menos una de estas paredes laterales puede comprender al menos una capa de guía de ondas. La faceta de borde puede formar al menos parte de una pared lateral del pocillo de muestra. En consecuencia, una muestra recibida puede ser iluminada en una dirección transversal, preferentemente perpendicular al eje óptico de la lente de objetivo. La faceta de borde puede estar recubierta con una capa biocompatible que comprenda, por ejemplo, moléculas de BSA (albúmina de suero bovino), PEG (polietilenglicol) o PLL (poli-L-lisina).

35 Tales disposiciones permiten ventajosamente que los fluoróforos se exciten más allá de una región de la superficie de la muestra, por ejemplo, a una profundidad superior a un micrómetro en la muestra.

40 Tales disposiciones también permiten que los fluoróforos se exciten eficientemente a una potencia relativamente alta, para una fuente de láser dada, en comparación con técnicas de iluminación basadas en campo evanescente conocidas, en las que las potencias de excitación son relativamente bajas, típicamente menores de aproximadamente el 10 % de la potencia de luz de entrada total.

45 La luz de excitación de la faceta de borde tiene preferentemente forma de una lámina de luz. Preferentemente, la lámina de luz interseca preferentemente la muestra en un plano transversal, preferentemente perpendicular, a la dirección principal del campo de visión frontal de la lente de objetivo. Al generar una lámina de luz, preferentemente, puede iluminarse toda la sección transversal una muestra. La luz también puede formarse como un haz divergente en el plano transversal más que paralelo a un eje óptico de la lente de objetivo, o como un haz que tenga una divergencia uniforme.

50 El grosor de un haz de luz o una lámina de luz que emana de la faceta de borde es preferentemente menor de 500, 1000 o 2000 nanómetros. Para facilitar esto, la capa de guía de ondas puede depositarse como una película fina transmisora de luz de material transparente. Esta película fina puede tener un grosor de menos de 1 micrómetro.

55 La faceta de borde puede posicionarse lateral a un área superficial sobre la que puede colocarse la muestra.

60 La divergencia de la luz de excitación desde la faceta de borde puede controlarse, al menos, en un plano paralelo a un eje óptico de la lente de objetivo. Preferentemente, al menos en este plano, se controla la divergencia para que sea más pequeña que la divergencia natural debida a la forma y la sección transversal de la faceta de borde, que, preferentemente, es plana. Dicho control puede proporcionarse por medio de la propia faceta de borde o por un área de la capa de guía de ondas muy próxima a la faceta de borde.

65 El haz también puede ser convergente hacia un punto focal o un foco lineal dentro de la muestra, preferentemente en el eje óptico. La convergencia en un plano paralelo a la dirección del eje óptico y la divergencia transversal al eje óptico pueden establecerse simultáneamente.

El componente de guía de ondas puede comprender una lente lenticular, una rejilla estática o una rejilla acústica dispuesta para enfocar la luz de excitación. Esto puede permitir un mayor control sobre qué porción de la muestra se excita. Por la misma razón, el componente de guía de ondas puede disponerse para guiar la luz de entrada hacia la muestra a lo largo de un camino óptico que se estrecha en al menos una dimensión para formar una lente para enfocar la luz de excitación. La lente puede ser una lente axicón. Puede utilizarse una lente axicón para generar un pseudo-haz de Bessel cuyo núcleo central es delgado y no difractante para una cierta distancia. El estrechamiento puede ser rotacionalmente simétrico, por ejemplo cónico, pero es preferentemente con forma de cuña o piramidal, puesto que tales formas pueden ser más fáciles de fabricar, por ejemplo utilizando litografía. La lente está situada preferentemente en la faceta de salida.

Una limitación con las técnicas de superresolución conocidas es que solo puede excitarse, y, por tanto, formarse imágenes, de una pequeña región de la muestra. El componente de guía de ondas en las realizaciones de la presente invención puede comprender:

una primera región de núcleo y una primera región de revestimiento en contacto con la primera región de núcleo, teniendo la primera región de núcleo un índice de refracción más alto que la primera región de revestimiento y estando dispuesto para definir un primer camino óptico del primer núcleo a través del componente de guía de ondas;

y
una segunda región de núcleo y una segunda región de revestimiento en contacto con la segunda región de núcleo, teniendo la segunda región de núcleo un índice de refracción más alto que la segunda región de revestimiento y estando dispuesto para definir un camino óptico del segundo núcleo a través del componente de guía de ondas,

en donde la primera región de núcleo está dispuesta para dirigir la luz de excitación sobre una primera región de la muestra, y en donde la segunda región de núcleo está dispuesta para dirigir la luz de excitación sobre una segunda región de la muestra, diferente de la primera región.

De esta manera, pueden obtenerse imágenes de una muestra en múltiples regiones (por ejemplo, cortes paralelos a lo largo de la muestra), excitando de forma selectiva los fluoróforos en las regiones respectivas. El componente de guía de ondas puede comprender, por supuesto, regiones adicionales de núcleo y revestimiento, para poder dirigir la luz sobre tres, cuatro o más regiones de la muestra. En consecuencia, puede ser posible que la disposición de procesamiento genere un modelo tridimensional (3D) de la muestra.

El componente de guía de ondas puede comprender un pocillo u otra disposición de contención para contener la muestra.

El aparato puede comprender un sistema electrónico de control del camino óptico dispuesto para hacer que la luz de entrada siga un primer camino óptico dentro del componente de guía de ondas en un primer momento, y para seguir un segundo camino óptico dentro del componente de guía de ondas, diferente del primer camino óptico, en un segundo momento, diferente del primer momento. Preferentemente, la luz de entrada no sigue el primer camino óptico en el segundo momento. Preferentemente, la luz de entrada no sigue el segundo camino óptico en el primer momento. En una realización de múltiples núcleos, este primer y segundo caminos ópticos pueden corresponder al camino óptico del primer núcleo y al camino óptico del segundo núcleo, respectivamente; como alternativa, pueden ser caminos diferentes dentro de un solo núcleo. El primer momento y el segundo momento pueden estar ambos dentro de un periodo de exposición de un solo cuadro, es decir, el tiempo de exposición para un solo cuadro (por ejemplo, cuando se utiliza una técnica de localización de una sola molécula, tal como STORM o dSTORM). Como alternativa, el primer momento puede estar dentro de un periodo de exposición para un primer cuadro, y el segundo momento puede estar dentro de un periodo de exposición para un segundo cuadro, diferente del primer cuadro (por ejemplo, cuando se utiliza una técnica basada en un campo de luz fluctuante, tal como ESI o SOFI). Se ha descubierto que esto es particularmente ventajoso en realizaciones dispuestas para excitar la muestra con un campo evanescente, ya que el primer y segundo caminos ópticos pueden corresponder a diferentes modos ópticos respectivos dentro del componente de guía de ondas. Por lo tanto, el patrón del campo evanescente diferirá entre los modos ópticos. Al generar múltiples de tales patrones dentro de un periodo de exposición de un solo cuadro, puede conseguirse una excitación promedio más uniforme de la muestra durante el periodo de exposición cuando se usa una técnica de localización de una sola molécula, en comparación con la utilización de un solo modo en todo momento. Si la muestra no es excitada de manera uniforme durante el periodo de exposición de un solo cuadro, la imagen de superresolución resultante puede perder detalles importantes o contener artefactos, tales como patrones de franjas. Como alternativa, al generar diferentes patrones en los periodos de exposición de diferentes cuadros respectivos, puede conseguirse una fluctuación adecuada en la iluminación para su uso con una técnica de superresolución basada en campo de luz fluctuante. En este caso, cada patrón (modo) es preferentemente constante durante un periodo de exposición de un solo cuadro dado.

La disposición de procesamiento está preferentemente configurada para generar un cuadro utilizando luz recogida durante un periodo de exposición que tiene una duración de aproximadamente 1, 5, 10, 100, 1000 o 10.000 milisegundos. Un cuadro puede ser almacenado en una memoria de la disposición de procesamiento (por ejemplo, como una matriz), como le resultará familiar a un experto en la materia.

La disposición de procesamiento está preferentemente configurada para generar una pluralidad de cuadros, por

ejemplo, 100, 1000, 10.000 o más, y para utilizar éstos para generar una o más imágenes o animaciones de salida de superresolución (por ejemplo, utilizando una técnica de superresolución convencional, como se ha mencionado anteriormente). Dicha imagen o animación de salida puede ser almacenada en una memoria y/o mostrada en una pantalla, tal como un monitor de ordenador. Preferentemente, todos los cuadros tienen la misma duración de periodo de exposición.

La disposición de procesamiento puede comprender cualquier medio de procesamiento adecuado, tal como uno cualquier o más de: un microprocesador, un microcontrolador, un ASIC, un FP-GA, un DSP, una memoria y una memoria que contenga instrucciones de software. Este puede comprender un dispositivo local, tal como un PC de sobremesa, o un dispositivo remoto, tal como un servidor, o puede estar distribuido, tal como comprendiendo una nube de servidores. Desde otros aspectos, la invención comprende software y un medio tangible que contiene un software, que comprende instrucciones para instruir a un dispositivo de procesamiento para que lleve a cabo cualquiera de las etapas descritas en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, controlar a fuente de luz y/o controlar un dispositivo inyector de luz y/o generar una imagen de superresolución utilizando luz recogida de la muestra.

El sistema de control del camino óptico puede disponerse para hacer que la luz de entrada se desplace entre el primer y segundo caminos ópticos (y, opcionalmente, otros caminos ópticos) varias veces dentro del periodo de exposición para un solo cuadro, por ejemplo, dos, diez, cien o más veces. Esto es beneficioso cuando se utilizan ciertas técnicas de superresolución, por ejemplo, en experimentos dSTORM en chip, permite excitar más de un modo dentro de un solo cuadro de imagen. Para técnicas de superresolución basadas en campos de luz fluctuante, puede ser, en cambio, preferible tener un modo por cuadro de imagen.

El aparato puede comprender un dispositivo inyector de luz dispuesto para inyectar luz de entrada en el componente de guía de ondas, tal como un cable de fibra óptica, una lente o un espejo. El dispositivo inyector de luz puede ser controlado por medio de la disposición de procesamiento. El sistema de control del camino óptico puede comprender un accionador dispuesto para mover el dispositivo inyector de luz con respecto al componente de guía de ondas durante un periodo de exposición de un solo cuadro, o desde un periodo de exposición de un solo cuadro al siguiente, para cambiar una posición o un ángulo en el cual la luz de entrada entre en el componente de guía de ondas (por ejemplo, en una faceta de entrada del componente de guía de ondas). Mover una parte de una lente o una lente entera de objetivo puede conducir a diferentes desplazamientos paralelos, diferentes ángulos de incidencia o diferentes posiciones de enfoque en el tiempo. El accionador puede comprender un accionador piezoeléctrico o un motor de vibración, tal como una etapa piezoeléctrica vibratoria, que puede acoplarse al dispositivo inyector de luz. El accionador puede comprender una rejilla acústico-óptica, que puede extenderse en un plano paralelo a una dirección de propagación de la luz de entrada, por ejemplo en una superficie superior, inferior o lateral de una guía de ondas que sirve para acoplar luz en el componente de guía de ondas; cambiando la frecuencia de una señal de modulación, pueden generarse diferentes rejillas y diferentes desviaciones, moviendo así el haz de luz de entrada con respecto a una faceta de entrada del componente de guía de ondas.

El sistema de control del camino óptico puede comprender una disposición para cambiar una o más de la polarización, fase o longitud de onda de la luz de entrada durante un periodo de exposición de un solo cuadro, o de un periodo de exposición de un solo cuadro al siguiente. Puede comprender, por ejemplo, un polarizador giratorio o un dispositivo de cambio de fase, tal como un disco giratorio o un bloque móvil que tiene diferentes grosores en diferentes ubicaciones para proporcionar una longitud de camino óptico variable. El sistema de control del camino óptico puede comprender un elemento de cambio de temperatura para cambiar la temperatura dentro del componente de guía de ondas, por tanto, cambiar un índice de refracción dentro del componente de guía de ondas durante un periodo de exposición de un solo cuadro o desde un periodo de exposición de un solo cuadro al siguiente.

El solicitante también ha ideado otra manera de conseguir un campo de excitación variable a partir de un campo evanescente, que no requiere hacer cambios en la luz de entrada dentro o entre los periodos de exposición de un solo cuadro. Esto se consigue dirigiendo la luz para que siga simultáneamente un primer camino óptico a través del componente de guía de ondas y un segundo camino óptico a través del componente de guía de ondas, correspondiendo el primer camino óptico a un primer modo óptico del componente de guía de ondas y correspondiendo el segundo camino óptico a un segundo modo óptico del componente de guía de ondas, para hacer que interfieran el primer y el segundo modos ópticos. Esta interferencia hace que la intensidad de la luz de excitación evanescente se module mientras tiene lugar la formación de imágenes. Se ha descubierto que dicha iluminación se adapta bien al análisis de superresolución basado en iluminación fluctuante, tal como SOFI y ESI.

Las características de cualquier aspecto o realización descritos en el presente documento pueden aplicarse, cuando sea adecuado, a cualquier otro aspecto o realización descritos en el presente documento. Cuando se hace referencia a diferentes realizaciones o conjuntos de realizaciones, debe entenderse que éstas no son necesariamente distintas, sino que pueden solaparse.

Ahora se describirán ciertas realizaciones preferidas de la invención, únicamente a modo de ejemplo, haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

la Figura 1 es una representación esquemática de una configuración de la técnica anterior para realizar microscopía de fluorescencia;

la Figura 2 es una representación esquemática de una configuración para realizar microscopía de fluorescencia según la presente invención;

la Figura 3 es una sección transversal de un componente de guía de ondas según la presente invención;

la Figura 4 es una vista plana del componente de guía de ondas de la Figura 3;

las Figuras 5a, 5b y 5c son vistas en planta de componentes de guía de ondas según la presente invención;

las Figuras 6a, 6b y 6c son perfiles de sección transversal de tres estructuras de guía de ondas alternativas, todas según la presente invención;

la Figura 7 es un perfil lateral de un componente de guía de ondas de múltiples núcleos, en un extremo de la guía de ondas, según la presente invención; y

las Figuras 8a y 8b son vistas en planta de diferentes disposiciones de faceta de borde en dos componentes de guía de ondas según la presente invención.

La Figura 2 muestra un aparato para realizar microscopía de fluorescencia, que incluye una lente de objetivo 4, tal como una lente de objetivo Plan N 20x/0.4 Olympus™, que tiene un campo de visión frontal 30 frente a un componente de guía de ondas 1. También incluye un dispositivo inyector de luz 40 acoplado ópticamente a una faceta de entrada del componente de guía de ondas 1, y una muestra 2 situada en el componente de guía de ondas 1 dentro del campo de visión frontal 30 de la lente de objetivo 4. El aparato también incluye una disposición de procesamiento 20 configurada para recibir y procesar la luz recogida por la lente de objetivo 4 dentro del campo de visión frontal 30.

La muestra en este ejemplo es una célula orgánica incrustada con fluoróforos, aunque, por supuesto, pueden utilizarse otras muestras.

El dispositivo inyector de luz 40 comprende una lente de objetivo 10 para inyectar luz en el componente de guía de ondas 1, un accionador 12 y tres fuentes de luz 8. Los tres haces de luz de las tres fuentes de luz tienen longitudes de onda de 405 nanómetros, 488 nanómetros y 647 nanómetros, respectivamente. La lente de objetivo 10 recibe los tres haces de luz y enfoca los haces de luz para inyectarlos en el componente de guía de ondas 1. La luz inyectada forma la luz de entrada para la guía de ondas. Una luz de entrada que tiene una o más longitudes de onda diferentes permite la formación de imágenes de superresolución de localización de una sola molécula de la muestra 2, por ejemplo, utilizando dSTORM.

El accionador 12 puede mover la lente de objetivo 10 con respecto al componente de guía de ondas 1 para inyectar luz en diferentes posiciones en el componente de guía de ondas 1 y/o a diferentes ángulos en el componente de guía de ondas 1. Cambiar la posición y/o el ángulo en el que se inyecta luz en el componente de guía de ondas 1 permite ajustar de manera precisa el acoplamiento óptico entre el dispositivo inyector de luz 40 y el componente de guía de ondas 1. Además, esto permite inyectar luz en el componente de guía de ondas en diferentes posiciones y/o a diferentes ángulos, durante los procesos de formación de imágenes, para variar el camino óptico a lo largo del cual la luz inyectada se propaga a lo largo del componente de guía de ondas. El camino óptico a lo largo del cual la luz inyectada se propaga dentro del componente de guía de ondas corresponde a un camino óptico definido por un modo óptico del componente de guía de ondas 1.

Como se ilustra en las Figuras 3 y 4, el componente de guía de ondas 1 comprende una estructura de guía de ondas formado sobre un sustrato 201. Las capas de la estructura de guía de ondas incluyen una capa de guiado óptico 203 (algunas veces denominada en el presente documento como una capa de núcleo 203), intercalada entre una capa de revestimiento superior 204 y una capa de revestimiento inferior 202. La capa de revestimiento inferior 202 está dispuesta entre el sustrato 201 y una primera cara 208 de la capa de núcleo 203. La capa de revestimiento superior 204 está dispuesta en una segunda cara 209 de la capa de núcleo 203 que es opuesta a la primera cara 208 de la capa de núcleo 203. La capa de núcleo 203 tiene un índice de refracción más alto que las capas de revestimiento y guía la luz inyectada en el componente de guía de ondas 1.

En este ejemplo, la estructura de guía de ondas es una guía de ondas de bloque (según se ilustra en las Figuras 3 y 6a) pero, como se expone más adelante, el componente de guía de ondas podría comprender, en cambio, una estructura de guía de ondas de costilla (por ejemplo según se ilustra en la Figura 6b), de franja (por ejemplo según se ilustra en la Figura 6c) o de excitación de múltiples núcleos (por ejemplo según se ilustra en la Figura 7).

La estructura de guía de ondas de bloque de las Figuras 3, 4 y 6a se forma preferentemente sobre un sustrato de silicio o transparente y comprende una capa de núcleo fina (preferentemente mes de 500 nm) de pentóxido de tantalio Ta₂O₅ o nitruro de silicio Si₃N₄ 203, una capa de revestimiento inferior de dióxido de silicio SiO₂ 202, y una capa de revestimiento superior de dióxido de silicio SiO₂ 204. Como alternativa, los revestimientos superior e inferior pueden ser de un material que tenga un índice de refracción que coincida estrechamente con el índice de refracción del medio de muestra utilizado para la formación de bioimágenes (es decir, $n = 1,38$).

La luz inyectada en el componente de guía de ondas 1 se propaga a lo largo de la estructura de guía de ondas 1 con

una porción de la luz inyectada propagándose fuera de la región de núcleo de la guía de ondas. Esta porción de luz se conoce como campo evanescente. La intensidad en el campo evanescente puede aumentar haciendo delgadas las guías de ondas y utilizando un contraste de índice de refracción alto entre el núcleo y el revestimiento. Por tanto, se prefiere tener un material con un índice de refracción alto para el núcleo y un material con un índice de refracción menor para el revestimiento (lo ideal es que coincida con el medio de la muestra). Además, el material del núcleo y del revestimiento debe tener una baja pérdida por absorción y una baja autofluorescencia.

El componente de guía de ondas 1 también incluye un muelle hecho para sujetar la muestra 206 de modo que se solape con el campo evanescente que se propaga en la estructura de guía de ondas. El solapamiento con el campo evanescente asegura que al menos una porción de la luz inyectada sea dirigida sobre una muestra 206 contenida en el muelle. En el presente documento, la luz dirigida sobre la muestra 206 se denomina luz de excitación. La cara de la estructura de guía de ondas desde la cual la luz de excitación es dirigida sobre la muestra 206 se denomina en el presente documento cara de salida.

En la estructura de guía de ondas de bloque, el muelle comprende un hueco en la capa de revestimiento superior 204 que define un pocillo de muestra 207 que se solapa con el campo evanescente. El pocillo de muestra 207 se extiende al menos parcialmente a lo largo de la longitud y el ancho del componente de guía de ondas 1.

La disposición de procesamiento 20 incluye un dispositivo de detección de fluorescencia 5 para detectar la luz desde la muestra, tal como una cámara CCD o sCMOS y una unidad de control electrónico 6 para controlar el dispositivo de detección de fluorescencia 5 y procesa la luz detectada para producir una imagen de superresolución de la muestra 206 utilizando técnicas conocidas de formación de imágenes de superresolución.

Al principio de un periodo de exposición de un solo cuadro de superresolución, que dura, por ejemplo, 10 milisegundos, el accionador 12 coloca el dispositivo inyector de luz 40 en una primera posición de inyección de luz. En la primera posición de inyección de luz, el dispositivo inyector de luz inyecta una primera luz de entrada en el componente de guía de ondas 1 para que siga un primer camino óptico (o un primer conjunto de caminos ópticos) dentro de la estructura de guía de ondas de bloque. Al menos una porción de la luz inyectada que sigue al primer camino o caminos ópticos se propaga como un primer campo evanescente fuera de la región de núcleo 203 y se dirige al interior del pocillo de muestra 207. La primera luz evanescente dirigida al pocillo de muestra 207 forma un primer patrón de excitación. El primer patrón de excitación ilumina la muestra 206 en el pocillo de muestra 207 durante un periodo de aproximadamente 1 milisegundo.

Después de 1 milisegundo desde el inicio del periodo de exposición de un solo cuadro de superresolución, el accionador 12 coloca el dispositivo inyector de luz 40 en una segunda posición de inyección de luz. En la segunda posición de inyección de luz, el dispositivo inyector de luz inyecta la segunda luz de entrada en el componente de guía de ondas 1 para que siga un segundo camino óptico (o un segundo conjunto de caminos ópticos) dentro de la estructura de guía de ondas de bloque. Al menos una porción de la luz inyectada que sigue al segundo camino o caminos ópticos se propaga como un segundo campo evanescente fuera de la región de núcleo 203 y se dirige al interior del pocillo de muestra 207. El segundo campo evanescente dirigido al pocillo de muestra 207 forma un segundo patrón de excitación. El segundo patrón de excitación ilumina la muestra 206 en el pocillo de muestra 207 durante un periodo de aproximadamente 1 milisegundo.

Después de 2 milisegundos desde el inicio del periodo de exposición de un solo cuadro de superresolución, el accionador 12 coloca el dispositivo inyector de luz 40 en una tercera posición de inyección de luz. En la tercera posición de inyección de luz, el dispositivo inyector de luz inyecta una tercera luz de entrada en el componente de guía de ondas 1 para que siga un tercer camino óptico (o un tercer conjunto de caminos ópticos) dentro de la estructura de guía de ondas de bloque. Al menos una porción de la luz inyectada que sigue al tercer o terceros caminos ópticos se propaga como un tercer campo evanescente fuera de la región de núcleo 203 y se dirige al interior del pocillo de muestra 207. El tercer campo evanescente dirigido al pocillo de muestra 207 forma un tercer patrón de excitación. El tercer patrón de excitación ilumina la muestra 206 en el pocillo de muestra 207 durante un periodo de aproximadamente 1 milisegundo.

Después, el accionador 12 coloca el dispositivo inyector de luz 40 de nuevo en la primera posición de inyección de luz y el proceso se repite cíclicamente hasta que finaliza el periodo de exposición de 10 milisegundos.

Los patrones de excitación primero, segundo y tercero que iluminan la muestra 206 estimulan fluoróforos en la muestra para que emita fluorescencia y luz. La lente de objetivo 4 recoge la luz emitida desde los fluoróforos durante todo el periodo de exposición de un solo cuadro. La luz recogida durante el periodo de exposición de un solo cuadro por la lente de objetivo 4 es dirigida al dispositivo de detección de fluorescencia 5. El dispositivo de detección de fluorescencia 5 detecta la luz recibida como señales eléctricas y transmite las señales eléctricas a la unidad de control electrónico 6. La unidad de control electrónico 6 procesa las señales eléctricas utilizando el método de localización de una sola molécula dSTORM para producir una primera imagen de la muestra.

La unidad de control electrónico 6 puede comprender cualquier medio de procesamiento adecuado, tal como uno o más de microprocesadores, microcontroladores, ASIC, FPGA, DSP, una memoria y una memoria que contiene

instrucciones de software; puede comprender un solo dispositivo, tal como un PC de sobremesa, o puede distribuirse como un servidor remoto o una nube de servidores.

5 La primera imagen de la muestra corresponde a un primer cuadro en la técnica de formación de imágenes de superresolución dSTORM. Después de producirse el primer cuadro, el aparato produce otros 10.000 cuadros o más de la muestra. En cada uno de los siguientes cuadros, la muestra es de nuevo iluminada con un ciclo de los tres patrones de excitación por turnos para el siguiente periodo de exposición de un solo cuadro, y así sucesivamente.

10 La unidad de control electrónico 6 registra el primer cuadro y cada uno de los cuadros posteriores en la memoria. Después de haberse capturado todos los cuadros, la unidad de control electrónico 6 produce una imagen de superresolución final de la muestra basándose en todos los cuadros que utilizan técnicas de formación de imágenes de superresolución dSTORM conocidas.

15 Los inventores han descubierto que cambiando el solapamiento y la dirección de la luz de excitación con respecto a la muestra 206 durante un periodo de exposición de un solo cuadro proporciona una uniformidad mejor de la luz de excitación durante el periodo de exposición de un solo cuadro. En particular, han descubierto que, en comparación con un camino óptico estático, los caminos ópticos variables promedian la intensidad de la luz de excitación que se solapa con la muestra. Una mejor uniformidad de la luz de excitación da como resultado imágenes de superresolución de mejor calidad que tienen una mejor resolución, menos artefactos, contrastes más agudos y una mejor gama de intensidad. En algunos casos, puede no ser posible del todo la formación de imágenes de superresolución basada en guía de ondas sin esta característica, puesto que el patrón de iluminación de demasiado poco uniforme (por ejemplo, teniendo franjas a una escala similar a la estructura que está siendo visualizada).

20 En este ejemplo, se apreciará que la segunda cara 209 de la capa de núcleo 203 que se solapa con el pocillo de muestra 207 forma una cara de salida desde la cual la luz es dirigida sobre la muestra.

25 Los caminos ópticos primero, segundo y tercero (o conjuntos de caminos) pueden corresponder a diferentes caminos definidos por diferentes modos ópticos de la estructura de guía de ondas. Por ejemplo, el primer camino óptico puede corresponder al modo fundamental de la estructura de guía de ondas de bloque y el segundo camino óptico puede corresponder a un modo de primer orden de la estructura de guía de ondas de bloque. Como otro ejemplo, el primer conjunto de caminos ópticos puede corresponder a un primer conjunto de modos (por ejemplo, el modo fundamental y un modo de primer orden) de la estructura de guía de ondas de bloque y el segundo conjunto de caminos ópticos puede corresponder a un segundo conjunto de modos (por ejemplo, un modo de primer orden y un modo de segundo orden) de la estructura de guía de ondas de bloque.

30 Por tanto, la figura 2 muestra una configuración para realizar microscopía de fluorescencia, tales como, por ejemplo, dSTORM. El componente de guía de ondas 1 soporta una muestra 2 situada dentro del campo de visión de la lente de objetivo 4. El componente de guía de ondas 1 forma una estructura de guía de ondas en la que se inyecta la luz. La luz inyectada es guiada por medio de reflexión total a lo largo de la estructura de guía de ondas y al menos una porción de la luz inyectada se propaga como un campo de luz evanescente. La guía de ondas dirige al menos una porción de la luz inyectada sobre la muestra 2.

35 Opcionalmente, el accionador 12 que controla el movimiento de la lente de objetivo 10 con respecto al componente de guía de ondas 1 es controlado por un controlador electrónico. Por ejemplo, el accionador puede ser una etapa piezoeléctrica controlada por el controlador piezoeléctrico BPC303 de Thorlabs™.

40 Como alternativa, en lugar de utilizar una lente de objetivo 10 para inyectar luz en el componente de guía de ondas 1, el dispositivo inyector de luz 40 puede inyectar luz en el componente de guía de ondas 1 con una fibra óptica 11. Por ejemplo, el dispositivo inyector de luz 40 puede comprender un acoplador de fibra óptica 10 dispuesto para recibir los haces de luz desde cada fuente de luz, y una fibra óptica 11 acoplada ópticamente entre el acoplador de fibra óptica 10 y el componente de guía de ondas 1. El acoplador de fibra óptica multiplexa los diferentes haces de luz a lo largo de la fibra óptica 11 y enfoca la luz en el componente de guía de ondas 1. Opcionalmente, en este ejemplo, el dispositivo inyector de luz 40 puede comprender un accionador 12 en conexión con la fibra óptica 11 y, como con la disposición del accionador en conexión con la lente de objetivo 10, el accionador 12 puede mover la posición y/o el ángulo de la fibra óptica 11 con respecto al componente de guía de ondas 1. Adicionalmente o como alternativa, el componente de guía de ondas 1 puede estar conectado a un accionador 13 para ajustar la posición del dispositivo inyector de luz 40 con respecto al componente de guía de ondas 1. En consecuencia, este accionador puede utilizarse para inyectar luz de entrada en el componente de guía de ondas 1 para que siga un primer y/o un segundo camino óptico dentro de la estructura de guía de ondas durante un periodo de exposición de un solo cuadro, de acuerdo con los ejemplos de la presente divulgación. El accionador 13 puede ser, por ejemplo, una etapa piezoeléctrica vibratoria.

45 Opcionalmente, el dispositivo inyector de luz 40 puede comprender cualquier número de fuentes de luz 8 o una sola fuente de luz 8, tal como una fuente de luz de una sola longitud de onda o de longitud de onda sintonizable. Cada fuente de luz puede emitir luz adecuada para la excitación de fluoróforos, por ejemplo, dentro del espectro visible (de 400 a 800 nanómetros) o cerca del IR (de 800 a 1500 nanómetros). Además, cada fuente de luz puede ser a fuente

de luz láser, tales como un láser de estado sólido, láser de fibra o láser de diodo. Adicionalmente o como alternativa, cada una de las fuentes de luz 8 puede ser una fuente de luz LED o cualquier otra fuente de luz adecuada para microscopía de superresolución.

5 Adicionalmente o como alternativa, la luz de entrada puede tener una sola longitud de onda o múltiples longitudes de onda. Por ejemplo, la luz de entrada puede comprender luz de 647 nanómetros y luz de 488 nanómetros (las dos longitudes de onda utilizadas más comúnmente para la formación de imágenes de fluorescencia).

10 Como alternativa, el dispositivo inyector de luz puede inyectar una primera, segunda y tercera luces de entrada en el componente de guía de ondas 1 al mismo tiempo para seguir a los caminos ópticos primero, segundo y tercero (o conjuntos de caminos ópticos), respectivamente. En este ejemplo, los caminos ópticos primero, segundo y tercero corresponden a los caminos ópticos definidos por un modo óptico primer, segundo y tercero de la estructura de guía de ondas en el componente de guía de ondas 1. Cada uno de los modos ópticos primero, segundo y tercero son diferentes entre sí. Propagar simultáneamente los modos ópticos primero, segundo y tercero a través del

15 componente de guía de ondas 1 hace que los modos ópticos primero, segundo y tercero interfieran entre sí. En la técnica, la interferencia de diferentes modos de propagación se conoce como batido de modos. Batir los modos primero, segundo y tercero modula la luz de excitación dirigida sobre la muestra desde el componente de guía de ondas 1. Los inventores han descubierto que modular la luz de excitación de esta manera permite obtener imágenes de la muestra en las técnicas de formación de imágenes de superresolución adaptadas para la luz de excitación que

20 varía temporalmente.

Opcionalmente, el batido de modos puede realizarse con cualquier número de modos ópticos que se propagan en la estructura de guía de ondas para modular la luz de excitación. Por ejemplo, el batido de modos puede realizarse solo con un primer y un segundo modos ópticos que se propaguen en la estructura de guía de ondas al mismo tiempo.

25

Opcionalmente, la formación de imágenes de subresolución puede realizarse en una muestra que comprenda puntos cuánticos en lugar de fluoróforos. En este ejemplo, la luz de excitación dirigida sobre la muestra simula los puntos cuánticos para emitir luz para la formación de imágenes de superresolución.

30

Opcionalmente, la disposición de procesamiento 20 puede incluir también uno o más filtros, tales como un filtro de banda para filtrar la luz recogida por la lente de objetivo 4. Por ejemplo, el filtro puede estar configurado para bloquear luz correspondiente a la luz de excitación y transmitir la luz correspondiente a la luz emitida por los fluoróforos.

35

Las figuras 6a, 6b y 6c muestran una sección transversal de las capas en tres posibles estructuras de guiado de ondas diferentes.

La figura 6a muestra una sección transversal de las capas en la estructura de guía de ondas de bloque 200 ya descrita anteriormente con referencia a las figuras 3 y 4, pero en una región alejada del pocillo de muestra 206.

40

La figura 6b muestra una variante opcional en la que se proporciona un guiado óptico lateral al tener una cresta graba en la capa de revestimiento superior 204 de la estructura de guía de ondas para definir una estructura de guía de ondas de costilla 300. En una estructura de guía de ondas de costilla 300, la cresta está grabada parcialmente a través de la capa de revestimiento superior 204, pero no a través de la capa de núcleo 203. El guiado óptico lateral en la estructura de guía de ondas de costilla 300 aumenta la intensidad del campo evanescente dirigido fuera de la capa de núcleo 203. En consecuencia, en comparación con una estructura de guía de ondas de bloque 200, se aumenta la intensidad del campo evanescente que se solapa con un pocillo de muestra 207 definido en una estructura de guía de ondas de costilla 300, aumentando de este modo la intensidad de la luz de excitación que interactúa con la muestra 206. Aumentar la intensidad de la luz de excitación produce una fluorescencia más fuerte.

45

50

La Figura 6c muestra una variante adicional en la que se proporciona una mejora adicional de la intensidad del campo evanescente dirigido sobre una muestra 206 al tener la cresta grabada adicionalmente a través de la capa de núcleo 203 de una estructura de guía de ondas para definir una estructura de guía de ondas de franja 400. El guiado óptico lateral en la estructura de guía de ondas de franja 400 aumenta la intensidad del campo evanescente dirigido fuera de la capa de núcleo 203. En consecuencia, en comparación con una estructura de guía de ondas de bloque 200 y una estructura de guía de ondas de costilla 300, se aumenta la intensidad del campo evanescente que se solapa con un pocillo de muestra 207 definido en una estructura de guía de ondas de franja 300, aumentando de este modo la intensidad de la luz de excitación que interactúa con la muestra 206. Aumentar la intensidad de la luz de excitación produce una fluorescencia más fuerte.

55

60

En general, una guía de ondas de costilla reduce las pérdidas de propagación debidas a una rugosidad reducida de la pared lateral. Las guías de onda de costilla también extienden los parámetros de la guía de ondas (tales como el grosor y el ancho) para condiciones de modo único. Sin embargo, la luz está confinada más estrechamente dentro de una guía de ondas de franja, permitiendo curvas y giros más pronunciados y reduciendo la huella de la estructura de guía de ondas. Además, las guías de onda de franja tendrán una intensidad mayor en el campo evanescente que

65

las guías de onda de costilla para una potencia guiada similar dentro de ambas guías de ondas. Además, normalmente para parámetros dados de guía de ondas, una guía de ondas de franja soportará más modos que una guía de ondas de costilla, a menos que ambas guías de ondas estén hechas de un solo modo. Dependiendo de las condiciones de formación de imágenes, pueden utilizarse geometrías de guía de ondas de bloque, costilla o franja.

5 Se prefiere utilizar guías de ondas de costilla si se requiere una potencia mayor en el campo evanescente (a medida que las pérdidas de propagación aumentan significativamente para la longitud de onda visible utilizada para formación de bioimágenes); sin embargo, se prefiere una guía de ondas de franja para técnicas de formación de imágenes basadas en campo de luz fluctuante, puesto que puede soportar más modos. Sin embargo, las estructuras de guía de ondas de bloque, costilla o franja pueden ser todas utilizadas para cualquier técnica de formación de imágenes de superresolución.

Los anchos de la estructura de guía de ondas de bloque 200, la estructura de guía de ondas de costilla 300 y la estructura de guía de ondas de franja 400 varían preferentemente de 1 micrómetro a 100 micrómetros.

15 Opcionalmente, una estructura de guía de ondas de costilla o franja puede ensancharse a lo largo de su longitud para aumentar la anchura de un pocillo de muestra 207 definido en la capa de revestimiento superior 204. El aumento del ancho de la estructura de guía de ondas amplía el ancho del campo de luz óptica que se propaga a lo largo de la estructura de guía de ondas y permite un pocillo de muestra 207 más grande para contener una muestra 206. Un pocillo de muestra 207 más grande combinado con un campo de luz de excitación más amplio permite ventajosamente tomar imágenes de un área de muestra más grande para la formación de imágenes de subresolución.

Las Figuras 5a, 5b, 5c ilustran vistas en planta respectivas de tres disposiciones alternativas en las que se forma un pocillo de muestra 207 en la capa de revestimiento superior 204 de una estructura de guía de ondas de costilla 300.

25 En la Figura 5a y la Figura 5b, el ancho de una estructura de guía de ondas de costilla 300 se incrementa adiabáticamente para definir un área de muestra más grande 207 y ampliar el ancho de campo de luz óptica que se propaga a lo largo de la estructura de guía de ondas. Los inventores han descubierto que aumentar adiabáticamente el ancho de la estructura de guía de ondas puede mantener el perfil del modo óptico de la luz óptica que se propaga en la región anterior a la región adiabática 450. Por ejemplo, la estructura adiabática 450 mantiene el perfil de modo fundamental de luz óptica que se propaga en la estructura de guía de ondas que conduce a la estructura adiabática.

Opcionalmente, el ancho de una estructura de guía de ondas de costilla o de franja puede reducirse después de la región del pocillo de muestra 207, como se ilustra en la región 460 de la Figura 5b.

35 El componente de guía de ondas 1 que comprende una estructura de guía de ondas de bloque puede fabricarse utilizando técnica estándar de fabricación de semiconductores. Por ejemplo, la estructura de guía de ondas de bloque puede fabricarse: pulverizando en primer lugar la capa inferior de SiO₂ 202 sobre el sustrato de silicio; en segundo lugar, pulverizar la capa de núcleo 203 de Ta₂O₅ sobre la capa inferior de SiO₂ 202; y después, en tercer lugar, pulverizar la capa superior de SiO₂ 204 sobre la capa de núcleo 203. El pocillo de muestra 207 puede formarse utilizando fotolitografía y grabado en húmedo para definir un hueco en la capa superior 204.

El componente de guía de ondas 1 que comprende una estructura de guía de ondas de costilla puede fabricarse por medio de fresado de haces de iones de la capa de revestimiento superior 204 para definir una cresta. La capa de revestimiento superior 204 se graba preferentemente a una profundidad de 200 nm por encima de la capa de núcleo 203. El fresado de haces de iones reduce ventajosamente la rugosidad de la pared lateral de la guía de ondas y, por lo tanto, la pérdida de propagación óptica dentro de la estructura de guía de ondas.

Opcionalmente, la estructura de guía de ondas y el pocillo de muestra 207 pueden estar integrados monolíticamente en el sustrato 201 del componente de guía de ondas 1.

50 Opcionalmente, el componente de guía de ondas 1 puede comprender una pluralidad de estructuras de guía de ondas. Cada estructura de guía de ondas puede recibir luz de entrada y luz de excitación directa en un pocillo de muestra 207. Adicionalmente o como alternativa, la estructura de guía de ondas puede comprender una pluralidad de estructuras de guía de ondas y cada estructura de guía de ondas puede recibir luz de entrada y luz de excitación directa en una o más de la pluralidad de estructuras de guía de ondas.

60 Antes de colocar la muestra 206 en el pocillo de muestra 207, el componente de guía de ondas 1 puede limpiarse sumergiendo el componente de guía de ondas 1 en Hellmanex™ al 5 % (v/v) (de Sigma Aldrich™) durante 10 minutos a 70 °C. Posteriormente, el Hellmanex™ puede retirarse sumergiéndolo en primer lugar en agua desionizada, en segundo lugar en isopropanol (de Sigma Aldrich™) y en tercer lugar de agua desionizada.

65 El pocillo de muestra 207 puede contener una biocapa 205 dispuesta sobre la guía de ondas capa de núcleo 203, según se ilustra en la Figura 3. La biocapa evita la unión no específica de fluoróforos en la muestra a la guía de ondas capa de núcleo 203 y puede comprender BSA o PEG. Además, la biocapa 205 facilita el cultivo de una muestra directamente dentro del pocillo de muestra 207. La biocapa 205 es preferida pero no obligatoria. También, el grosor de la biocapa se selecciona para garantizar que el campo evanescente todavía se solape con la muestra

en el pocillo de muestra 207 y típicamente es inferior a 20 nm.

Opcionalmente, las muestras pueden prepararse directamente en el pocillo de muestra 207 del componente de guía de ondas 1 siguiendo protocolos estándar, tales como, por ejemplo, protocolos conocidos utilizados para la unión de células a cubreobjetos de vidrio.

La pared lateral de la cresta 410 en la estructura de guía de ondas de franja 400 puede definir un muelle 207 para contener la muestra 206. Es decir, la pared lateral de la cresta puede definir un pocillo de muestra 207. En este ejemplo, es el campo evanescente que se propaga fuera de la capa de núcleo 203 en el lado de la cresta que se dirige a la muestra 206 y se solapa con el pocillo de muestra 207. Disponer el pocillo de muestra junto a la pared lateral de la cresta también se beneficia de un campo evanescente de mayor intensidad que interactúa con la muestra de acuerdo con la presente divulgación. En otras palabras, una pared lateral de una estructura de guía de ondas puede soportar una muestra y, por lo tanto, formar un pocillo de muestra 207 para recibir una muestra. El componente de guía de ondas puede incluir otra estructura para contener la muestra.

En una disposición alternativa, una faceta final de la estructura de guía de ondas define un muelle 207 para contener la muestra 206. Es decir, la faceta final de la estructura de guía de ondas puede definir un pocillo de muestra 207. En este ejemplo, la luz de entrada guiada a lo largo del componente de guía de ondas 1 que sale de la faceta final del componente de guía de ondas 1 se dirige hacia la muestra 206. El pocillo de muestra 207 puede definirse terminando la estructura de guía de ondas hacia abajo o a través de la capa de sustrato. Típicamente, la estructura de guía de ondas puede terminarse grabando o escindiendo la estructura de guía de ondas.

La Figura 7 muestra un ejemplo de una disposición de iluminación de faceta final. El componente de guía de ondas 1 comprende una estructura de guía de ondas de múltiples núcleos formada en un sustrato 201 y un pocillo de muestra 207 definido por una faceta final 250 de la estructura de guía de ondas. La faceta final 250 de la estructura de guía de ondas define una pared del pocillo de muestra 207 y proporciona un soporte sobre el que puede apoyarse una muestra 206.

Las capas de la estructura de guía de ondas de múltiples núcleos incluyen una primera capa de guiado óptico 203a y una segunda capa de guiado óptico 203b (o primera capa de núcleo 203a y segunda capa de núcleo 203b). La primera capa de núcleo 203a está intercalada entre una capa de revestimiento superior 204 y una capa de revestimiento inferior 202. La capa de revestimiento inferior 204 está dispuesta entre el sustrato 201 y la primera capa de núcleo 203a. La segunda capa de núcleo 203b está intercalada entre la capa de revestimiento superior 204 y una capa de revestimiento superior 214. La primera capa de núcleo 203a tiene un índice de refracción más alto que las capas de revestimiento superior 204 e inferior 202. La segunda capa de núcleo 203b tiene un índice de refracción más alto que las capas de revestimiento superior 204 y superior 214.

El pocillo de muestra y la faceta final están formados por un hueco grabado en la estructura de guía de ondas de múltiples núcleos hasta la capa de sustrato 201, de modo que la luz de entrada pueda ser guiada fuera de la estructura de guía de ondas y hacia el espacio libre, o hacia una muestra, desde cada uno de los núcleos.

En un primer momento durante la formación de imágenes de superresolución, el accionador 12 coloca el dispositivo inyector de luz 40 en una primera posición de inyección de luz. En la primera posición de inyección de luz, el dispositivo inyector de luz inyecta luz de entrada en el componente de guía de ondas 1 para guiar la luz de entrada a través del primer núcleo 203a de la estructura de guía de ondas de múltiples núcleos. La primera capa de núcleo 203a dirige la luz inyectada fuera de la estructura de guía de ondas a una primera altura y a través de una primera región del pocillo de muestra 207.

En un segundo momento durante la formación de imágenes de superresolución, después del primer momento, el accionador 12 coloca el dispositivo inyector de luz 40 en una segunda posición de inyección de luz. En la primera posición de inyección de luz, el dispositivo inyector de luz inyecta luz de entrada en el componente de guía de ondas 1 para guiar la luz de entrada a través del segundo núcleo 203b de la estructura de guía de ondas de múltiples núcleos. La segunda capa de núcleo 203b dirige la luz inyectada fuera de la estructura de guía de ondas a una segunda altura y a través de una segunda región del pocillo de muestra 207. La segunda altura está definida por la posición de la segunda capa de núcleo 203b con respecto a la primera región de núcleo 203a. La primera región 510 a través del pocillo de muestra 207 está separada de la segunda región 520 por una región de separación hacia la que no se dirige la luz de excitación.

La luz dirigida fuera de la estructura de guía de ondas simula fluoróforos en la muestra por fluorescencia y emitir luz. Sustancialmente, solo los fluoróforos en la primera región 510 de la muestra son estimulados por la luz de excitación que emana de la primera capa de núcleo del 203a. De un modo similar, solo los fluoróforos en la segunda región 520 de la muestra son estimulados por la luz de excitación que emana de la segunda capa de núcleo del 203b. El volumen excitado en la muestra 206 se limita esencialmente al volumen de la luz de excitación que emana de la faceta de borde 250 de la estructura de guía de ondas.

La luz emitida es recogida y procesada para proporcionar la formación de imágenes de superresolución como se

- describe con referencia a la Figura 2. Dirigiendo la luz de excitación a través de diferentes regiones del pocillo de muestra, la estructura de múltiples núcleos permite ventajosamente diferentes regiones de una muestra 206 en el pocillo de muestra 207 sean estimuladas con la luz de excitación. En particular, la guía de ondas de múltiples núcleos permite que se estimulen fluoróforos situados a diferentes alturas dentro de la muestra y, de esta manera, emitir luz desde diferentes profundidades de la muestra. Recoger la luz emitida desde diferentes profundidades de la muestra permite la formación de imágenes de superresolución a diferentes profundidades de muestra. (Se apreciará que las referencias en el presente documento a alturas, profundidades, anchuras, etc. no deben entenderse como una limitación del funcionamiento del aparato en una orientación particular, a menos que el contexto lo requiera.)
- 5 En resumen, en este ejemplo, la propia faceta final 250 es parte de la pared lateral del pocillo de muestra 207 y está en contacto con la muestra 206. Por ejemplo, la luz se acopla a la capa de guiado de ondas respectiva desde el lado izquierdo de la Figura 6 utilizando una técnica de acoplamiento adecuada, por ejemplo con una lente de objeto que enfoca la luz que va a acoplarse en la cara de entrada opuesta a la faceta final 250.
- 10 En disposiciones en las que la luz de excitación dirigida hacia la muestra 206 emana de una faceta de borde 25 de la estructura de guía de ondas, la capa de revestimiento superior 204 de la estructura de guía de ondas puede ser aire. Es decir, las capas de la estructura de guía de ondas pueden comprender una región de revestimiento inferior 202 dispuesta sobre el sustrato 201 y una región de núcleo 203 dispuesta sobre la región de revestimiento inferior 202.
- 15 Aunque no se muestra en la Figura 7, la muestra 206 en el pocillo de muestra puede colocarse fuera de contacto con la faceta final 250 de la estructura de guía de ondas en lugar de en contacto con la faceta final 250. En esta disposición, la luz de excitación se propaga en el espacio libre desde la faceta final 250 a la muestra 206.
- 20 Opcionalmente, el pocillo de muestra 207 en esta disposición puede comprender una biocapa 205 depositada en la parte inferior del pocillo en la parte superior del sustrato 201. La biocapa 205 evita la unión no específica de fluoróforos en la muestra a la capa de sustrato 201 y puede comprender BSA, PEG o PLL. Además, la biocapa facilita el cultivo de una muestra directamente dentro del pocillo de muestra 207. La biocapa 205 es preferida pero no obligatoria.
- 25 Opcionalmente, la faceta de borde 250 de la estructura de guía de ondas es plana.
- 30 La luz de excitación que emana de la faceta de borde 250 de la estructura de guía de ondas puede ser ligeramente divergente. La divergencia de la luz de excitación depende del ancho de la estructura de guía de ondas en la faceta de borde 250. Para reducir la divergencia de luz de excitación dirigida fuera de una faceta final de una estructura de guía de ondas, el ancho de la estructura de guía de ondas se puede estrechar a lo largo de su longitud para formar una lente para enfocar la luz de excitación.
- 35 La Figura 8a muestra una estructura de guía de ondas de franja 400 cuyo ancho se estrecha a lo largo de su longitud para formar una faceta final cónica 650. Opcionalmente, la altura de la guía de ondas también puede estrecharse a lo largo de su longitud para definir una faceta final que se estrecha en dos dimensiones. Los inventores han descubierto que estrechando la faceta final 650 de una región de guía de ondas para definir una lente de axicón en al menos una dimensión es particularmente ventajoso para reducir la divergencia de la luz dirigida fuera de la estructura de guía de ondas sobre la muestra 206 (es decir, la luz de excitación). La formación de una región final de la estructura de guía de ondas como una punta cónica 650 crea una lente de axicón para conformar el haz.
- 40 La lente de axicón proporciona un enfoque lineal a lo largo de la dirección de propagación de la luz de entrada a través de la estructura de guía de ondas.
- 45 El ancho de la estructura de guía de ondas se puede reducir utilizando fresado con haz de iones o cualquier otra técnica de grabado adecuada para dar forma a la faceta final de la guía de ondas para formar una lente de acuerdo con una máscara adecuada. Como alternativa, el ancho de la estructura de guía de ondas puede estrecharse utilizando un recrecimiento y un crecimiento selectivo o cualquier otra técnica epitaxial adecuada para dar forma a la faceta final de la guía de ondas para formar una lente. La altura de la estructura de guía de ondas también puede reducirse (por ejemplo, hasta un punto) utilizando procesos de grabado adecuados.
- 50 Adicionalmente o como alternativa, puede proporcionarse una rejilla 660 para enfocar la luz en la faceta final de una estructura de guía de ondas para reducir la divergencia de la luz de excitación dirigida fuera de una faceta final de una estructura de guía de ondas.
- 55 La Figura 8b muestra una rejilla 660 dispuesta en una faceta final de una estructura de guía de ondas de franja. En este ejemplo, la rejilla 660 se superpone a la luz de excitación y refleja la luz de excitación hacia adentro para reducir la divergencia de la luz de excitación y enfocar la luz de excitación sobre la muestra 206. La rejilla 660 se puede grabar en una o más capas de la estructura de guía de ondas y/o sustrato utilizando técnicas de grabado estándar.
- 60 La región final de la estructura de guía de ondas puede definir una rejilla acústica estática o programable 660 para desviar la luz de excitación que emana de la estructura de guía de ondas en un plano perpendicular a la capa de sustrato 201 y paralelo con el eje óptico 3 de la lente de objetivo 4. En consecuencia, la altura del haz de la luz de
- 65

excitación que emana de la estructura de guía de ondas puede controlarse ajustando la rejilla acústica programable 660.

5 Los expertos en la técnica apreciarán que la invención se ha ilustrado describiendo varias realizaciones específicas de la misma, pero no es limitada a estas realizaciones. Son posibles muchas variaciones y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

10 Cualquier referencia al estado de la técnica contenida en este documento no constituye una admisión de que dicha técnica forme parte de conocimiento general común en cualquier país del mundo. La palabra "comprenden", y variantes de la misma, tales como "comprende" y "que comprende", se utilizan en un sentido inclusivo o abierto (es decir, para no impedir la presencia o la adición de otras características), excepto cuando el contexto requiera lo contrario debido a un lenguaje explícito o una implicación necesaria.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato para la formación de imágenes de superresolución de microscopía de fluorescencia de una muestra, comprendiendo el aparato:
- 5 una lente de objetivo que tiene un campo de visión frontal, estando dispuesta la lente de objetivo para recoger la luz que emana de la muestra dentro del campo de visión frontal;
una disposición de procesamiento dispuesta para realizar la formación de imágenes de superresolución de microscopía de fluorescencia de la muestra con la luz recogida;
- 10 un componente de guía de ondas situado delante de la lente de objetivo y dispuesto para (i) recibir luz de entrada desde el exterior del campo de visión, y (ii) usar reflexión interna total dentro del componente de guía de ondas para dirigir la luz de excitación sobre la muestra; y
un sistema electrónico de control del camino óptico dispuesto para:
- 15 hacer que la luz de entrada de una primera longitud de onda siga, en un primer momento, un primer camino óptico correspondiente a un primer modo óptico dentro del componente de guía de ondas, para iluminar la muestra con un primer patrón de excitación; y
hacer que la luz de entrada de dicha primera longitud de onda siga, en un segundo momento, un segundo camino óptico correspondiente a un segundo modo óptico dentro del componente de guía de ondas, en donde el segundo momento es diferente del primer momento, y en donde el segundo modo óptico es diferente del primer modo óptico,
- 20 para iluminar la muestra con un segundo patrón de excitación, diferente del primer patrón de excitación.
2. Un aparato, según la reivindicación 1, en donde el primer momento y el segundo momento están dentro de un periodo de exposición para un primer cuadro de la formación de imágenes de superresolución, de modo que el aparato está configurado para proporcionar una excitación promedio más uniforme de la muestra, durante el primer cuadro, de lo que sería proporcionado solo por el primer patrón de excitación.
- 25 3. Un aparato, según la reivindicación 1, en donde el primer momento está dentro de un periodo de exposición para un primer cuadro de la formación de imágenes de superresolución, y el segundo momento está dentro de un periodo de exposición para un segundo cuadro de la formación de imágenes de superresolución, diferente del primer cuadro.
- 30 4. Un aparato, según cualquier reivindicación precedente, en donde la formación de imágenes de superresolución comprende un método de localización de una sola molécula.
- 35 5. Un aparato, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la formación de imágenes de superresolución comprende un método de superresolución basado en campos de luz fluctuante.
6. Un aparato, según cualquier reivindicación anterior, en donde el componente de guía de ondas comprende una estructura de guía de ondas de costilla o de franja.
- 40 7. Un aparato, según cualquier reivindicación anterior, en donde el componente de guía de ondas comprende una primera región de núcleo, y en donde el primer y segundo caminos ópticos son caminos diferentes dentro de dicha primera región de núcleo.
- 45 8. Un aparato, según cualquier reivindicación anterior, en donde el componente de guía de ondas comprende una primera región de núcleo y una primera región de revestimiento en contacto con la primera región de núcleo, teniendo la primera región de núcleo un índice de refracción más alto que la primera región de revestimiento y estando dispuesto para guiar la luz a través del componente de guía de ondas a lo largo de uno o más caminos ópticos, en donde la primera región de revestimiento está conformada para definir un pocillo de muestra para contener la muestra.
- 50 9. Un aparato, según cualquier reivindicación anterior, en donde el componente de guía de ondas comprende una estructura de guía de ondas integrada monolíticamente sobre un sustrato.
- 55 10. Un método para realizar la formación de imágenes de superresolución de microscopía de fluorescencia de una muestra localizada, al menos parcialmente, dentro de un campo de visión frontal de una lente de objetivo, comprendiendo el método:
- 60 recibir luz de entrada desde el exterior del campo de visión en un componente de guía de ondas situado delante de la lente de objetivo;
dirigir la luz de entrada de una primera longitud de onda para que siga, en un primer momento, un primer camino óptico correspondiente a un primer modo óptico dentro del componente de guía de ondas, para iluminar la muestra con un primer patrón de excitación;
- 65 dirigir la luz de entrada de dicha primera longitud de onda para que siga, en un segundo momento, un segundo camino óptico correspondiente a un segundo modo óptico dentro del componente de guía de ondas, en donde el segundo momento es diferente del primer momento, y en donde el segundo modo óptico es diferente del primer

- modo óptico, para iluminar la muestra con un segundo patrón de excitación, diferente del primer patrón de excitación;
utilizar reflexión interna total dentro del componente de guía de ondas para dirigir la luz de excitación hacia la muestra;
- 5 recoger la luz fluorescente de la muestra con la lente de objetivo; y
generar una imagen de microscopía de fluorescencia de superresolución con la luz recogida.
- 10 11. Un método, según la reivindicación 10, en donde el primer momento y el segundo momento están dentro de un periodo de exposición para un primer cuadro de la imagen de superresolución, de modo que el primer y el segundo patrones de excitación proporcionan una excitación de la muestra promedio más uniforme, durante el primer cuadro, de la que sería proporcionada solo por el primer patrón de excitación.
- 15 12. Un método, según la reivindicación 10, en donde el primer momento está dentro de un periodo de exposición para un primer cuadro de la imagen de superresolución, y el segundo momento está dentro de un periodo de exposición para un segundo cuadro de la imagen de superresolución, diferente del primer cuadro.
- 20 13. Un método, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende generar la imagen de superresolución utilizando un método de localización de una sola molécula.
14. Un método, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende generar la imagen de superresolución utilizando un método de superresolución basado en campos de luz fluctuante.
- 25 15. Un método, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, que comprende dirigir luz de entrada de dicha primera longitud de onda a lo largo de una estructura de guía de ondas de costilla o de franja en el componente de guía de ondas.

Fig. 1

(Técnica anterior)

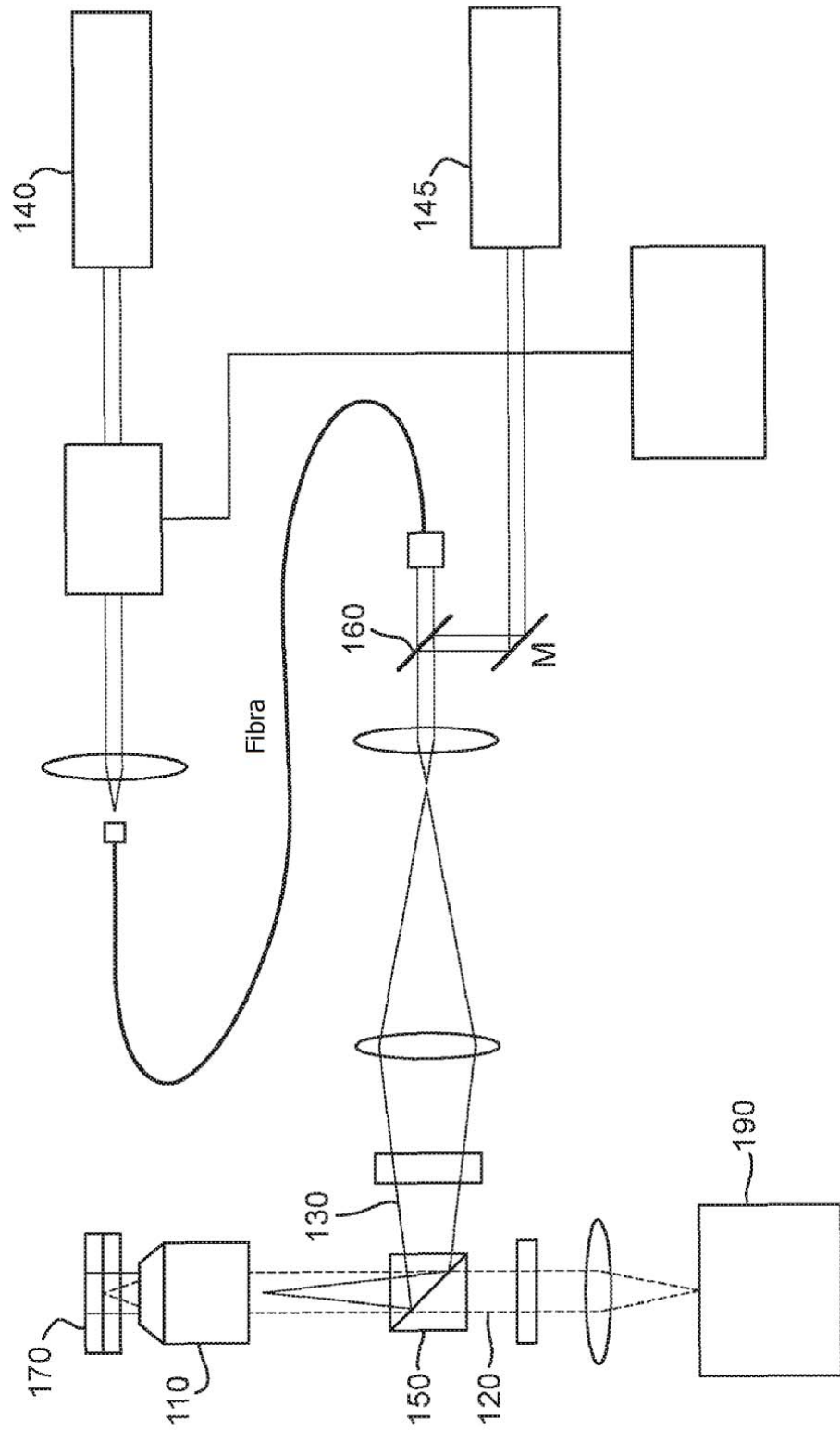


Fig. 2

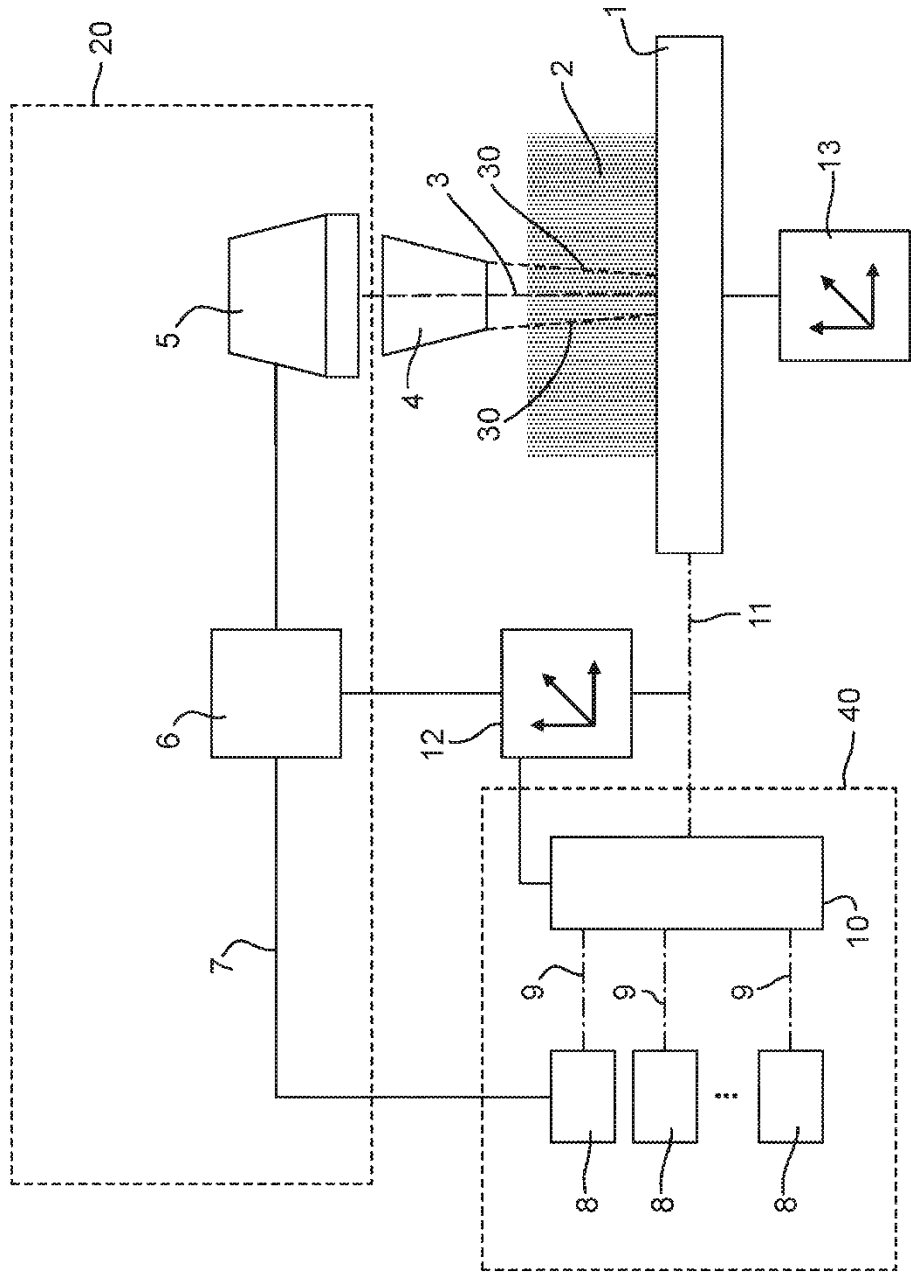


Fig. 3

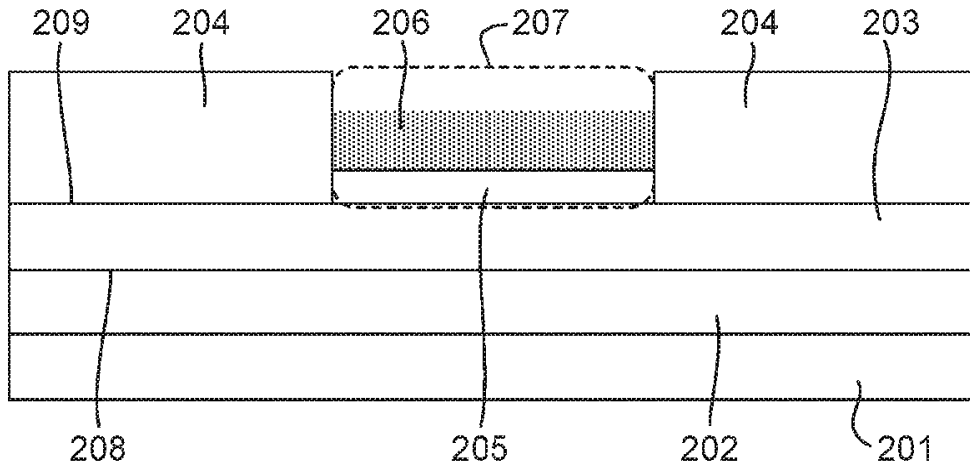


Fig. 4

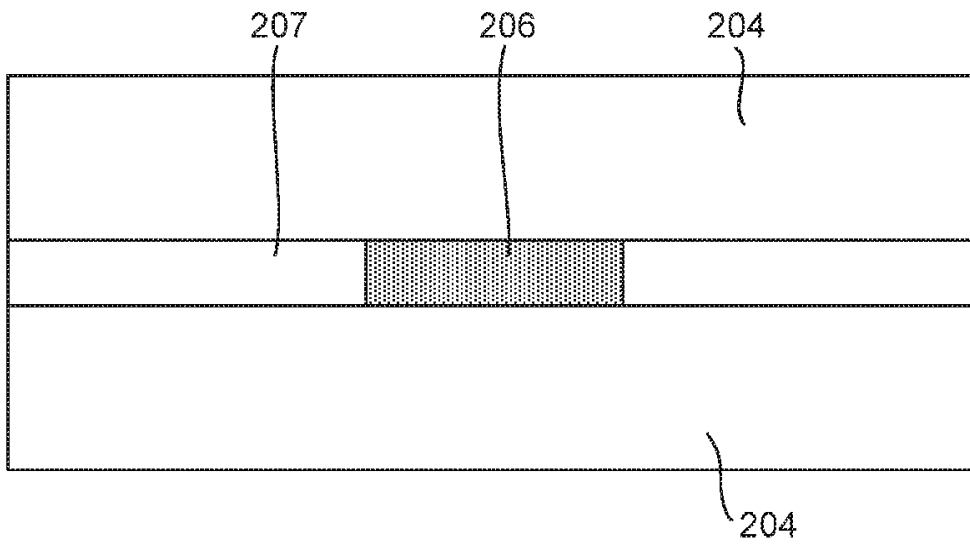


Fig. 5a

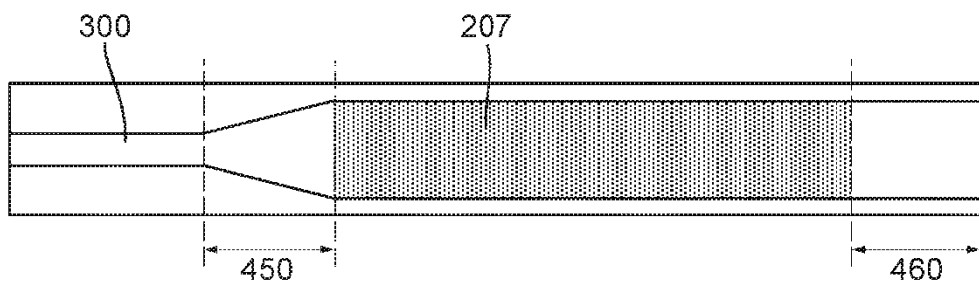


Fig. 5b

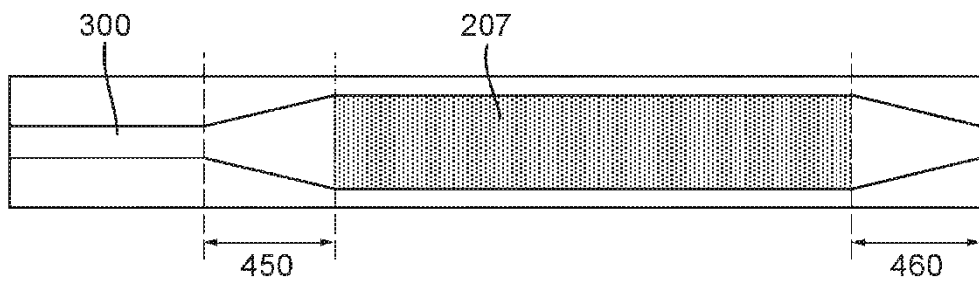


Fig. 5c

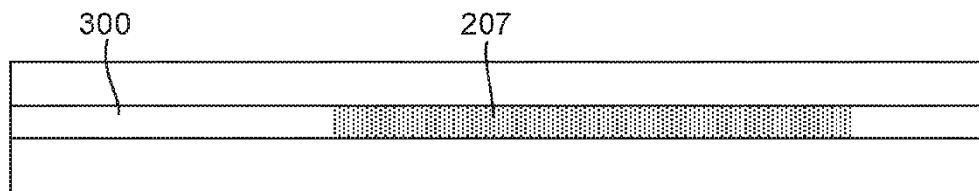


Fig. 6a

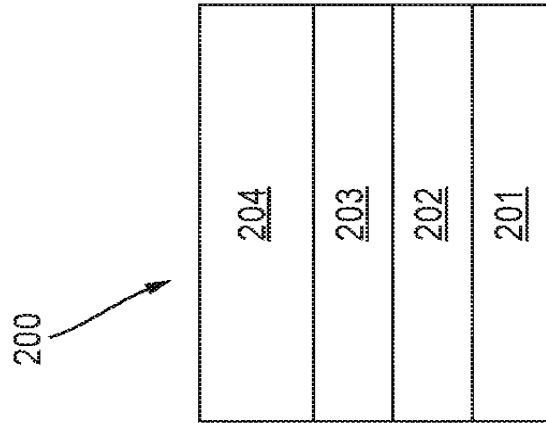


Fig. 6b

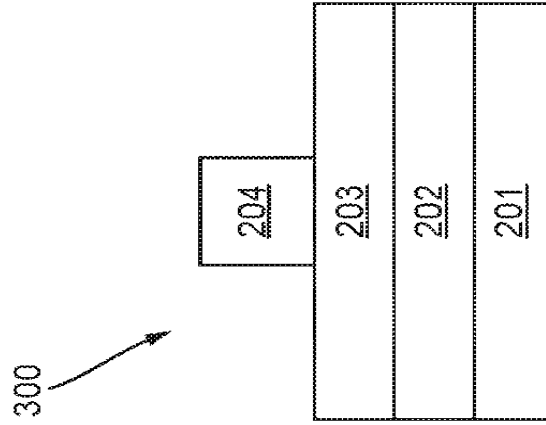


Fig. 6c

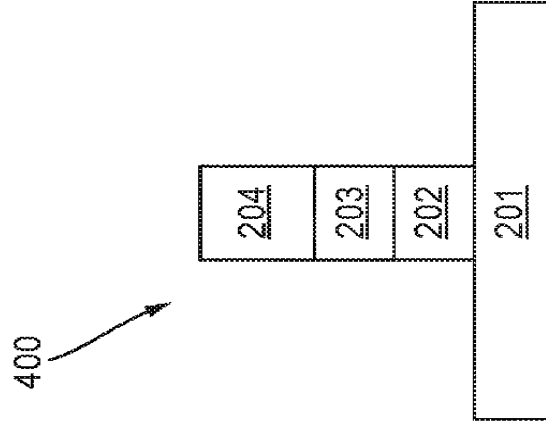


Fig. 7

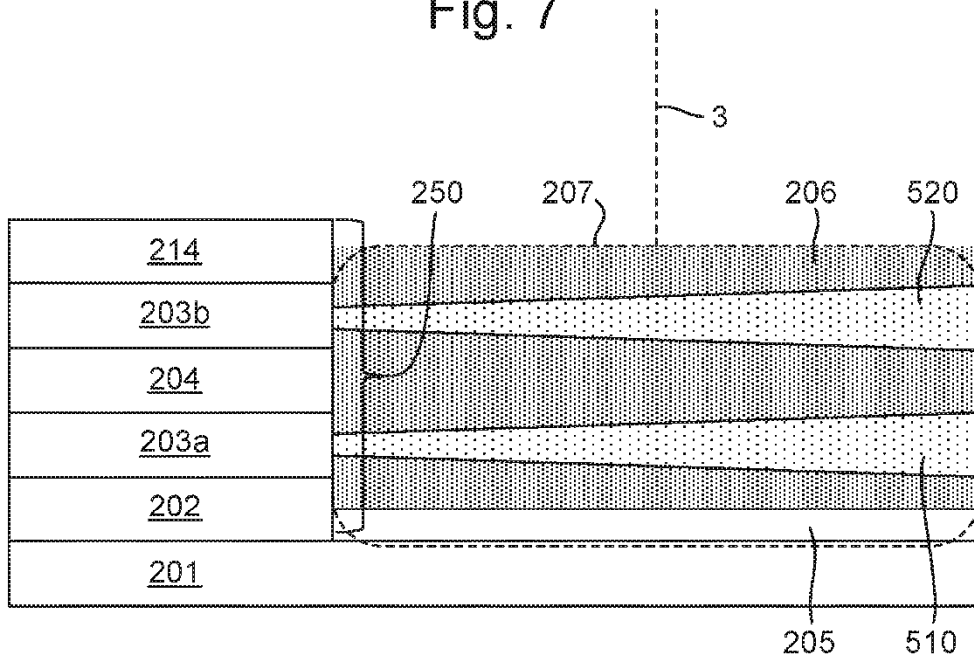


Fig. 8a

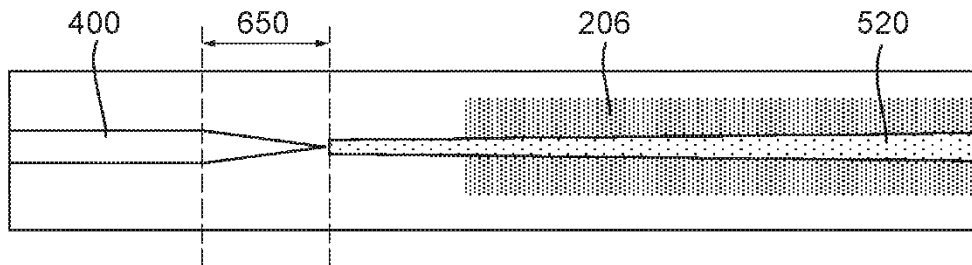


Fig. 8b

