

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 835**

21 Número de solicitud: 200930002

51 Int. Cl.:
G01N 21/64 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **18.03.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **13.07.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
13.07.2012

71 Solicitante/s:
**UNIVERSIDAD DE MURCIA
AVDA. TENIENTE FLORESTA S/N
30003 MURCIA, ES**

72 Inventor/es:
IGLESIAS CASARRUBIOS, JOSÉ IGNACIO

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA EL REGISTRO DE IMÁGENES EN TOMOGRAFÍA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA Y SISTEMA DE APLICACIÓN.**

57 Resumen:

Procedimiento para el registro de imágenes en tomografía óptica de fluorescencia y sistema de aplicación.

Permite determinar la distribución tridimensional de una muestra (M) que contiene moléculas o partículas fluorescentes que se excitan mediante la iluminación con un haz de barrido alargado en la dirección axial (Z) y compacto en la dirección transversal.

Para cada posición de barrido (X, Y), la luz de fluorescencia procedente de la excitación de los emisores se analiza utilizando una matriz de microlentes (MML) situada en un plano transversal, paralelo al plano (X, Y), y acoplada a un sensor de imagen (S). Este último, está conectado a un ordenador en donde se ejecuta un algoritmo que encuentra la distribución de la concentración de emisores en función de la coordenada (Z) cuya emisión de luz mejor se corresponde con la imagen registrada. Finalmente se dispone de un conjunto de datos sobre la distribución de concentración de emisores tridimensional.

De utilidad especial como técnica de microscopía en biología y biomedicina.

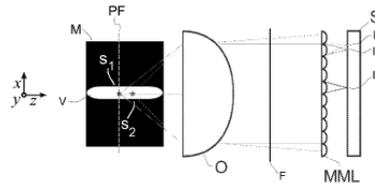


FIG. 1

ES 2 384 835 A1

DESCRIPCION

PROCEDIMIENTO PARA EL REGISTRO DE IMÁGENES EN TOMOGRAFÍA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA Y SISTEMA DE APLICACIÓN

OBJETO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un sistema para la obtención de imágenes tomográficas de la distribución de concentración de marcadores ópticos fluorescentes especialmente indicado para el estudio de muestras de interés biológico en la escala milimétrica o micrométrica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La microscopia de fluorescencia pretende determinar la distribución de marcadores ópticos en muestras biológicas. Estos marcadores consisten en moléculas (endógenas o exógenas) o nano-partículas con la propiedad de que, cuando son excitados con luz con una cierta longitud de onda, emiten luz incoherente en otra (fluorescencia) gracias a procesos de absorción-emisión mono o
15 multifotónicos. Los marcadores exógenos son especialmente interesantes debido a que, una vez funcionalizados, sirven para señalar, a nivel molecular, procesos o estados en interior de los tejidos o las células. El conocimiento derivado puede ser fundamental tanto en investigación básica como aplicada en el desarrollo de nuevos fármacos para estudiar el tráfico, localización final y actividad en los tejidos de
20 moléculas o nano-partículas a diferentes escalas, desde la milimétrica a la micrométrica.

 Los tejidos y las células son estructuras tridimensionales donde la localización espacial de determinados agentes es fundamental en numerosos procesos. Es interesante por lo tanto, contar con instrumentos que proporcionen información
25 tomográfica de la concentración de marcadores fluorescentes. Sin embargo, este tipo de instrumentación conlleva una mayor complejidad en comparación con los sistemas básicos de microscopía que proporcionan solamente imágenes planas de proyecciones o secciones.

 El microscopio confocal (véase por ejemplo el documento US 3013467), ha
30 sido la herramienta tradicionalmente utilizada para resolver microestructuras tridimensionales. En este sistema, la información tomográfica se obtiene registrando diferentes imágenes de barrido correspondientes a diferentes posiciones axiales de un detector puntual en correspondencia con el foco del haz de excitación en el interior de

la muestra, cuando el proceso de fluorescencia es lineal, o solo desplazando la posición del foco cuando se trata de procesos multifotónicos. En cualquier caso, la adquisición completa de un volumen de tejido es lenta comprometiendo el estudio de procesos de corta duración.

5 Alternativamente, se han propuesto técnicas basadas en la tomografía computerizada de rayos-x (empleada en imagen médica) tras ser adaptada al uso de luz en muestras en la escala micro y milimétrica (véase Kikuchi, S., K. Sonobe, et al. (1996), "Three-dimensional microscopic computed tomography based on generalized Radon transform for optical imaging systems", Opt. Comm. 123: 725-733; así como,
10 Sharpe, J., U. Ahlgren, et al. (2002), "Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies", Science 296: 541-545 y también Fauver, M., E. J. Seibel, et al. (2005), "Three-dimensional imaging of single isolated cell nuclei using optical projection tomography", Opt. Express 13(11): 4210-4223).

En dichos sistemas, la reconstrucción se realiza mediante algoritmos
15 matemáticos que procesan la información obtenida midiendo la intensidad de la luz que emana de la muestra para diferentes proyecciones rotando la muestra o el sistema de registro. Sin embargo, de la misma forma que en microscopía confocal, el instrumento debe realizar operaciones adicionales a las requeridas para el registro de imágenes bi-dimensiones que pueden llegar a ser muy complejas (especialmente en
20 microscopía) e involucran un aumento del tiempo total de registro.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El sistema de iluminación y adquisición de datos para tomografía óptica que la invención propone, resuelve, de forma plenamente satisfactoria, la problemática anteriormente expuesta en los distintos aspectos comentados. En particular: simplifica
25 el procedimiento de adquisición limitándolo al barrido de la muestra y, por tanto, el tiempo total de registro.

Para ello, la invención se basa en la utilización de un sistema convencional de barrido de un haz de luz especialmente construido para excitar la emisión de fluorescencia de marcadores a través de procesos mono o multifotónicos generando
30 en el interior de la muestra, para cada posición transversal, una fuente de luz incoherente aproximadamente unidimensional con un patrón de emisión dependiente de la distribución axial de concentración de moléculas o partículas emisoras en cada punto.

Para conseguirlo, el haz de excitación se concentra en el interior de la muestra mediante componentes ópticos de manera tal que se transporte energía suficiente para la excitación sólo a un volumen en la muestra estructurado, de forma que quede restringido transversalmente y extendido axialmente, utilizando, entre otras
 5 posibilidades, un objetivo con una apertura anular, una lente cilíndrica o mediante la incorporación de un axicón para generar un haz de Bessel.

La luz que emana de la muestra, excitada de la forma anteriormente indicada, se filtra espectralmente para seleccionar la componente de fluorescencia que es analizada con el fin de obtener la información necesaria para encontrar la distribución
 10 que genera la emisión.

En particular, el procedimiento de análisis propuesto se basa en el modelado de la luz de fluorescencia como una superposición incoherente de ondas esféricas divergentes con una distribución de orígenes dependiente de la distribución tridimensional de emisores.

Tomando como base este modelo, se sigue el siguiente procedimiento: una vez filtrada, la luz de fluorescencia se hace pasar por un objetivo –cuya focal se sitúa en el espacio donde se emplaza la muestra– y posteriormente por una matriz de microlentes orientada perpendicular al eje axial. Este componente proporciona, gracias al uso de un sensor opto-electrónico acoplado, una imagen relacionada con la
 15 concentración de emisores en el volumen de excitación que, en virtud su particular estructura, está unívocamente relacionada con la concentración axial.

El proceso anterior se repite para diferentes coordenadas transversales procesándose cada imagen obtenida mediante un ordenador para obtener la distribución axial en cada punto. Una vez finalizado el barrido, se dispone de la
 20 información necesaria para componer una imagen tomográfica de la concentración de emisores en todo el volumen de la muestra.

De forma más concreta, la invención describe un procedimiento de iluminación y adquisición de datos en tomografía óptica de moléculas o partículas fluorescentes embebidas en muestras, que emiten luz de fluorescencia debido a procesos de
 30 excitación-emisión incoherente mono o multifotónicos. Las características principales del procedimiento son que:

- se ilumina una muestra mediante el uso de una óptica que genera un volumen de excitación, alargado en la dirección axial y compacto en direcciones

transversales;

- se selecciona la luz de fluorescencia mediante un filtro y se conduce utilizando un sistema óptico para hacerla pasar finalmente a través de una matriz de microlentes acoplada a un sensor que sirve para registrar imágenes que son procesadas por un ordenador.

5

Así, el volumen de excitación se desplaza en el interior de la muestra barriendo diferentes coordenadas transversales (X, Y) mientras que permanece orientado paralelo al eje perpendicular (Z). La incorporación de esa capacidad en el haz de luz que genera el volumen de excitación y en la óptica de adquisición se consigue solo en el haz que genera el volumen de excitación, o bien a través del desplazamiento controlado transversal de la muestra.

10

La invención también describe un sistema de iluminación y adquisición de datos para tomografía óptica según dicho procedimiento, en el que se utiliza un volumen de excitación alargado.

15

En una configuración alternativa, se utiliza como sistema de excitación un haz alargado utilizando una apertura anular.

En otra configuración alternativa, se utiliza como sistema de excitación un haz alargado utilizando un prisma con simetría de rotación o axición para generar un haz de Bessel.

20

En otra configuración alternativa, se utiliza un volumen de excitación alargado utilizando una lente cilíndrica.

En otra configuración alternativa, se utiliza una matriz de microlentes para analizar la estructura de la luz de fluorescencia con el fin de encontrar la distribución tridimensional de emisores que la genera.

25

En otra configuración alternativa, se utiliza un sensor de frente de onda para obtener información de la distribución tridimensional de emisores.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se realiza y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica del mismo, se acompaña, como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

30

La figura 1 muestra de forma esquemática el principio general del instrumento que se propone.

La figura 2 representa el tipo de imágenes que pueden obtenerse para cada posición de barrido de la muestra y, de forma esquemática, el proceso de
5 reconstrucción de la distribución de marcadores a partir de dichas imágenes.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

A la vista de las figuras reseñadas puede observarse cómo el procedimiento de la invención se basa en la utilización de un sistema óptico para generar un volumen de excitación de forma aproximadamente cilíndrica y de un sistema optoelectrónico de
10 análisis que incluye una matriz de micro lentes acoplada a un detector que genera una imagen que es finalmente procesada por un ordenador.

Primeramente, un sistema óptico de iluminación genera un volumen alargado en la dirección axial donde se genera suficiente energía como para excitar la muestra. La luz, producto de la excitación, se emite desde diferentes puntos del volumen.
15 Aquella procedente de emisores emplazados en el plano focal de un sistema óptico de registro, presentará un frente de onda plano o de referencia una vez lo haya atravesado. La luz emitida desde otras posiciones presentará, después del sistema óptico de registro, cierta curvatura en correspondencia con su posición en el volumen iluminado. Además, un filtro elimina la componente de excitación dejando que solo la
20 luz generada en la muestra mediante excitación llegue a una matriz de microlentes. Este componente, produce una imagen sobre un detector que dependerá de la distribución de curvaturas e intensidades de la luz.

Tal como se representa en la figura 1, se ilumina una muestra (M) situada en un soporte que permita su desplazamiento según los ejes X e Y, con un haz
25 estructurado de tal forma que solo exista intensidad significativa en un volumen (V) aproximadamente cilíndrico estrecho con eje mayor en la dirección Z. Como ejemplo, se muestran dos emisores puntuales (S1) y (S2) situados en diferentes puntos respecto al plano focal (PF) de un sistema óptico (O). Por la forma de generación, la luz emitida por cada uno es mutuamente incoherente. La luz compuesta por las
30 contribuciones de todos los emisores, se recoge con un objetivo o sistema óptico (O). Un filtro (F), selecciona solo la componente espectral correspondiente a la luz excitada. En un plano posterior, se sitúa una matriz de microlentes (MML) que produce una imagen sobre un sensor (S). Como ejemplo del funcionamiento, la fuente (S1), situada en el plano (PF) genera sub-imágenes puntuales, entre otras, en las

posiciones indicadas como (I1) e (I2). De forma diferente, la fuente (S2) produce imágenes puntuales, entre otras, en las posiciones (I3) e (I2), pero no en (I1). Dado que (S1) y (S2) son emisores independientes en virtud del proceso físico de absorción-emisión de fotones, las imágenes formadas por la luz procedente de cada uno se superpondrán linealmente sobre el sensor (S) para formar una única imagen que se envía a un ordenador.

La imagen registrada depende de la distribución axial de emisores. Para ilustrar el proceso de formación de imágenes en el sensor y de la reconstrucción tomográfica, en la figura 2, se ha representado una muestra (M) que contiene una distribución simple embebida de marcadores. La imagen (IM1) se corresponde con el registro efectuado cuando se excita la muestra en un punto de coordenadas (x_1, y_1) y la imagen (IM2) cuando se excita en el punto (x_2, y_2) . El ordenador utiliza un procedimiento minimización del error para ajustar la mejor distribución discreta de emisión en función del eje Z a la imagen, obteniendo, en el ejemplo, la distribución (D1) en un caso y (D2) en el otro. Estas distribuciones sirven para asociar un valor de concentración de marcadores a cada voxel (elemento de volumen) de una distribución tridimensional (R) que ocupa el volumen de la muestra.

REIVINDICACIONES

1^a.- Procedimiento de iluminación y adquisición de datos en tomografía óptica de moléculas o partículas fluorescentes embebidas en muestras, que emiten luz de fluorescencia debido a procesos de excitación-emisión incoherente mono o multifotónicos, **caracterizado** por que,

- ilumina una muestra (M) mediante el uso de una óptica que genera un volumen (V) de excitación, alargado en la dirección axial (Z) y compacto en direcciones transversales sobre el plano (X, Y);
- se selecciona la luz de fluorescencia mediante un filtro (F) y se conduce utilizando un sistema óptico (O) para hacerla pasar finalmente a través de una matriz de microlentes (MML) acoplada a un sensor (S) que sirve para registrar imágenes que son procesadas por un ordenador;

donde el volumen de excitación se desplaza en el interior de la muestra barriendo diferentes coordenadas transversales (X, Y) mientras que permanece orientado paralelo al eje (Z), de manera que la incorporación de esa capacidad en el haz de luz que genera el volumen de excitación y en la óptica de adquisición se consigue sólo en el haz que genera el volumen de excitación, o bien a través del desplazamiento controlado transversal de la muestra.

2^a.- Sistema de iluminación y adquisición de datos para tomografía óptica que emplea el procedimiento de la reivindicación 1^a, **caracterizado** por que se utiliza un volumen de excitación alargado.

3^a.- Sistema de iluminación y adquisición de datos para tomografía óptica que emplea el procedimiento de la reivindicación 1^a, **caracterizado** por que se utiliza como sistema de excitación un haz alargado utilizando una apertura anular.

4^a.- Sistema de iluminación y adquisición de datos para tomografía óptica que emplea el procedimiento de la reivindicación 1^a, **caracterizado** por que se utiliza como sistema de excitación un haz alargado utilizando un prisma con simetría de rotación o axición para generar un haz de Bessel.

5^a.- Sistema de iluminación y adquisición de datos para tomografía óptica que emplea el procedimiento de la reivindicación 1^a, **caracterizado** por que se utiliza un volumen (V) de excitación alargado utilizando una lente cilíndrica.

6^a.- Sistema de iluminación y adquisición de datos para tomografía óptica que emplea el procedimiento de la reivindicación 1^a, **caracterizado** por que se utiliza una matriz de microlentes para analizar la estructura de la luz de fluorescencia con el fin de encontrar la distribución tridimensional de emisores que la genera.

5 7^a.- Sistema de iluminación y adquisición de datos para tomografía óptica que emplea el procedimiento de la reivindicación 1^a, **caracterizado** por que se utiliza un sensor de frente de onda para obtener información de la distribución tridimensional de emisores.

10

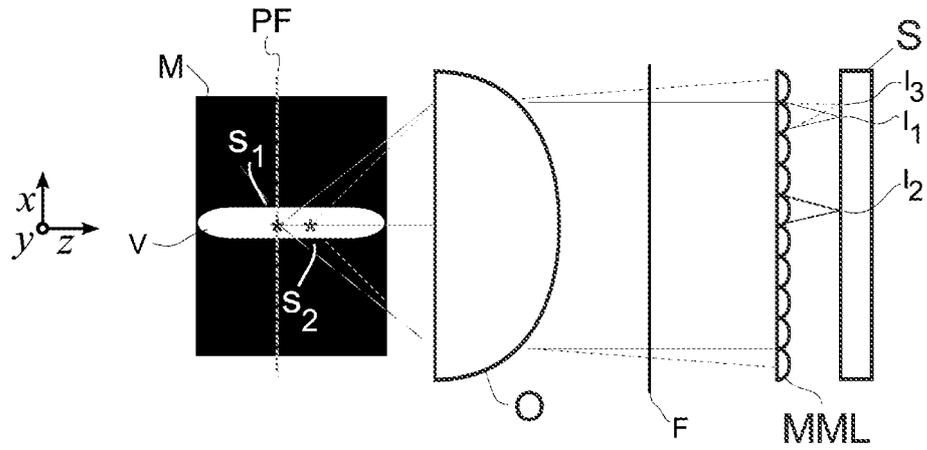


FIG. 1

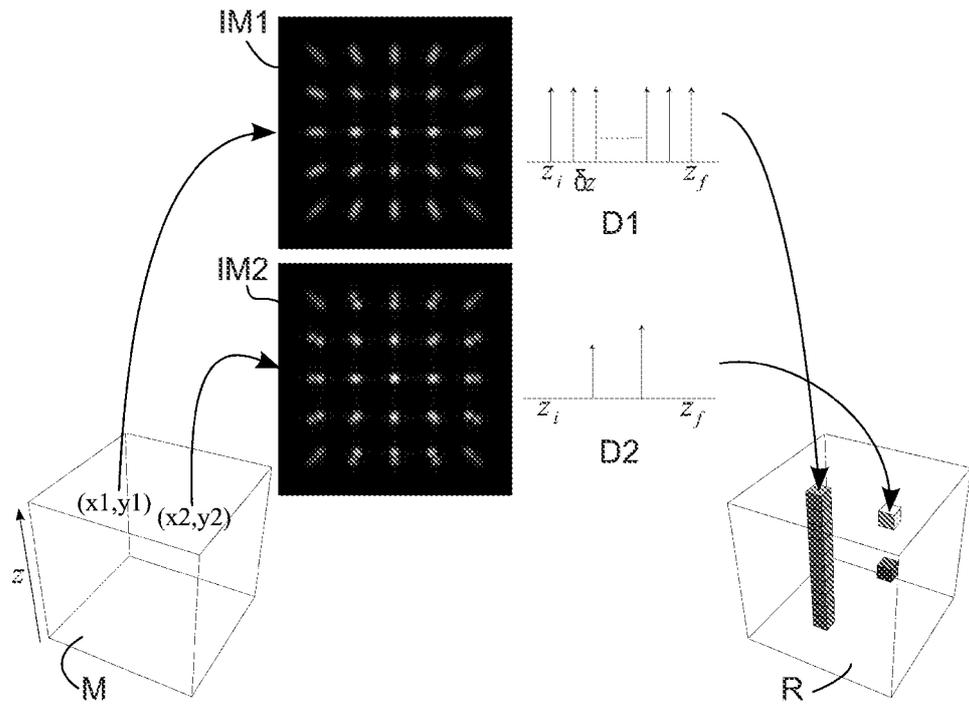


FIG. 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930002

②② Fecha de presentación de la solicitud: 18.03.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N21/64** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 5854684 A (SARNOFF CORP [US]) 29.12.1998, figura 1B; columnas 2-4,10-11.	1-7
Y	JP 6317472 A (SHIMADZU CORP (JP)) 15.11.1994, resumen EPODOC.	1-7
Y	CN 101361651 A (UNIV TSINGHUA [CN]) 11.02.2009, resumen EPODOC y WPI; figuras.	1-7
Y	WO 2008008231 A2 (GEN HOSPITAL CORP [US]; MAHMOOD UMAR [US]; WEISSLEDER RALPH [US]; SHETH RAHUL A [US]; UPADHYAY RABI [US]) 17.01.2008, figura 1; páginas 12-16.	1-7
X	Development of a noncontact 3-D fluorescence tomography system for small animal in vivo imaging. Proc Soc Photo Opt Instrum Eng. Author manuscript; Proc Soc Photo Opt Instrum Eng.; 7191: nihpa106691. doi: 10.1117/12.808199; (XIAOFENG ZHANG, CRISTIAN BADEA, MATHEWS JACOB y G. ALLAN JOHNSON)	1-7
A	KR 20040043234 A (KOREA INST SCI & TECH [KR]) 24.05.2004, resumen EPODOC y WPI.	1-7
A	JP 6034337 A (FUJITSU LTD (JP)) 08.02.1994, resumen EPODOC y WPI.	1-7
A	JP 8153467 A (KANSAI NIPPON ELECTRIC (JP)) 11.06.1996, resumen EPODOC y WPI.	1-7
A	US 2004119974 A1 (BECTON DICKINSON AND COMPANY) 24.06.2004, todo el documento.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

26.06.2012

Examinador

G. Foncillas Garrido

Página

1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.06.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-7	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 5854684 A (SARNOFF CORP [US])	29.12.1998
D02	JP 6317472 A (SHIMADZU CORP (JP))	15.11.1994
D03	CN 101361651 A (UNIV TSINGHUA [CN])	11.02.2009
D04	WO 2008008231 A2 (GEN HOSPITAL CORP [US]; MAHMOOD UMAR [US]; WEISSLEDER RALPH [US]; SHETH RAHUL A [US]; UPADHYAY RABI [US])	17.01.2008
D05	Development of a noncontact 3-D fluorescence tomography system for small animal in vivo imaging. Proc Soc Photo Opt Instrum Eng. Author manuscript; Proc Soc Photo Opt Instrum Eng.; 7191: nihpa106691. doi: 10.1117/12.808199; (XIAOFENG ZHANG, CRISTIAN BADEA, MATHEWS JACOB y G. ALLAN JOHNSON)	16.02.2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención se basa en un procedimiento para detectar en qué puntos de una muestra hay partículas fluorescentes y el sistema que permite esa detección.

Reivindicación 1

El documento más próximo al objeto de la solicitud es D01, dicho documento presenta (columna 4, líneas 8-32, columna 10, líneas 8-13, Figura 1B) un sistema en el que se ilumina una muestra, se filtra la luz que se emite de la muestra. Este filtro (208) absorbe selectivamente ciertas longitudes de onda. El hecho de que se existe la posibilidad de dejar únicamente las componentes de luz fluorescentes se indica en la columna 3, líneas 22-32. A continuación se conduce dicha luz utilizando un sistema óptico que comprende una lente (211) y que finalmente va a un sensor (212) que sirve para registrar imágenes que son procesadas por un ordenador (250).

En una realización alternativa (la correspondiente a la figura 2, columna 10, líneas 23-33) se indica la posibilidad de hacer uso de muchas lentes de fresnel 4C para enfocar. También se puede hacer uso de un grupo de lentes para recoger la luz emitida. La posibilidad de usar una matriz de lentes se deduce del uso de una matriz de ventanas usada para dirigir la luz (columna 10, líneas 34-64). Además se indica que la fabricación del perfil de emplazamiento de detección (columna 15, líneas 59-62) se puede realizar por micromaquinado (micromachining). A raíz de esta descripción, se considera evidente para un experto en la materia el hacer uso de una matriz de microlentes para que pase la luz de fluorescencia.

En la reivindicación 1 se indica que existe la posibilidad de que o bien se desplaza el volumen de excitación o la muestra. Pues bien, en D01 se indica (columna 11, líneas 18-24) que para conseguir los datos de los distintos puntos es posible desplazar la superficie en la que se sitúa la muestra respecto a la fuente de luz y al detector.

Por último se indica (columna 3, líneas 25-32) que en determinados tipos de fluorescencia es posible afinar la óptica para controlar la profundidad del campo para que sólo se detecte fluorescencia en una porción estrecha.

La diferencia entre el objeto de la presente solicitud y D01 se basa en el uso de un volumen de excitación, alargado en la dirección axial (Z) y compacto en direcciones transversales sobre el plano (X, Y).

El efecto técnico de dicha diferencia es permitir la iluminación y la detección en tramos alargados sobre la muestra.

Por tanto, el problema técnico objetivo sería cómo añadir en D01 un elemento de iluminación alargado o permitir la detección en tramos concretos de la muestra.

Sin embargo, el problema técnico y su correspondiente solución se encuentran ya divulgados en el documento D02, ya que este documento presenta (resumen EPODOC) un sistema en el que se ilumina desde una fuente de luz (3), una muestra en una celda (1), y en una realización (figura 1A) esta luz pasa a través de una lente (4), un filtro (7) y posteriormente va a un detector (5). Diferentes realizaciones se ven en las figuras 1B, 3A, 4A, B, C. En este sistema, la luz incidente es en la dirección x, y se hace uso de distintas ópticas (fuente de luz 3, junto con 21, 22, 2) para generar distintos volúmenes de excitación, así por ejemplo, en la figura 1B el volumen de excitación es en las direcciones xz. También se hace uso de dos fotodetectores de resolución unidimensional, por ejemplo el fotodetector (5) se coloca en la posición de una imagen formada en el centro de la muestra en la dirección y. Además un array de sensores se coloca en la dirección z y la imagen se forma en él.

Por último, en dicha reivindicación se establecen meras diferencias respecto a lo indicado en los Documentos D01 y D02, no obstante dichos elementos se consideran sobradamente conocidos para un experto en la materia. Por tanto, en base a la combinación de ambos documentos, sería obvio para un experto en la materia obtener lo indicado en el objeto de la invención.

Además, a su vez D03 presenta (resumen EPODOC y WPI) un sistema en el que se ilumina una muestra, y la luz pasa a través de un filtro que permite únicamente a las componentes de luz fluorescentes el paso hacia una pluralidad de lentes. También se dispone de un sistema óptico y un sensor. Además, se permite el desplazamiento controlado de la muestra. En este caso se hace uso de una pluralidad de lentes en vez de una única matriz de microlentes, sin embargo esta sustitución se considera evidente para un experto en la materia.

Por lo tanto, la diferencia entre la reivindicación 1 y D03 es el uso de la óptica que genere el volumen de excitación alargado en la dirección axial y compacto en las direcciones transversales.

Como se ha visto, esta característica se extrae fácilmente del documento D02, y por lo tanto también se consideraría obvia para un experto en la materia la combinación de D03 y D02 para conseguir el efecto técnico deseado.

Por otro lado el documento D04 (página 12, línea 15- página 14, línea 27) presenta a su vez un procedimiento de iluminación y adquisición de datos en tomografía óptica de moléculas o partículas fluorescentes, que comprende: un elemento de iluminación de una muestra (46), que genera un volumen de excitación, en este caso a través de una fibra óptica (14) y un elemento (20). En este caso es el elemento 11 el que se inserta en la muestra. Posteriormente, la luz pasa a través del receptor (12), que incluye un filtro (26) y se conduce la luz a través de un sistema óptico (20) y posteriormente a través de una lente (24). Como se ha indicado, es posible sustituir la lente por una matriz de microlentes con la misma funcionalidad. Tras la lente hay un detector o cámara CCD (28) y por último la imagen se procesa en un ordenador (40, 60). En este caso para proceder a ver los distintos puntos de la muestra es posible desplazar el elemento 11 (sonda insertable), que equivale al desplazamiento transversal de la muestra indicado en la reivindicación 1.

La diferencia entre D04 y la reivindicación 1, ya se ha mencionado, y se basa en el uso de un volumen de excitación, alargado en la dirección axial (Z) y compacto en direcciones transversales sobre el plano (X, Y).

Como se ha visto, al comparar con D01, este elemento se encuentra presente en D02, y por lo tanto también se consideraría obvia para un experto en la materia la combinación de D04 y D02 para conseguir el efecto técnico deseado.

También el documento D05 (y especialmente la figura 1 y su descripción) presenta un sistema de detección de fluorescencia donde hay una fuente de luz (8) que hace uso de una óptica que genera un volumen de excitación alargado (uso de un galvo-scanner (7) de dos ejes). A lo largo del documento se indica cómo se va produciendo la reconstrucción 3D a partir de láminas 2D por medio de la transformada de Radon. Se ilumina la muestra (6) y la luz resultante pasa por un filtro (4) y se conduce a través de una lente (3) posteriormente pasa por un sistema óptico (2) y finalmente por un sensor (1) que sirve para registrar imágenes que son procesadas por un ordenador (uso de la aplicación LabVIEW y su correspondiente hardware). Además se indica que es posible desplazar la muestra; en este caso se produce una pequeña rotación.

Por lo tanto, la diferencia entre la reivindicación 1 y D05 es el uso de una matriz de microlentes en lugar de la lente (3), pero se considera evidente para un experto en la materia esta sustitución ya que el efecto técnico conseguido es el mismo y no se soluciona ningún problema técnico al realizar esas sustitución.

Así, la reivindicación 1 carece de actividad inventiva a la vista de D05.

Por lo mencionado, la reivindicación 1 presenta novedad (Artículo 6 LP) pero carece de actividad inventiva (Artículo 8 LP).

Reivindicaciones 2-7

Las reivindicaciones 2 y 6 no aportan características técnicas adicionales a la reivindicación 1, ya que ésta ya incluye esas características. A partir de la combinación de documentos D01 y D02 se consideraría evidente para un experto en la materia construir alternativas de diseño para conseguir el mismo volumen de excitación alargado variando el sistema óptico de salida de la luz. El hecho de sustituir la óptica utilizada no aporta actividad inventiva a una reivindicación si no se indica un efecto técnico o ventaja técnica asociada a dicha característica. Tampoco se indica ninguna característica técnica o dificultad técnica superada para añadir un sensor de frente de onda, por lo que se considera una mera alternativa u opción de diseño del sistema. Se considera que las características descritas en las reivindicaciones 2-7 son meras opciones de diseño.

También por ejemplo en el documento D04 (página 12, líneas 19-20) se indica que el elemento (20) puede ser un prisma o un espejo.

Por lo mencionado, las reivindicaciones 2-7 presentan novedad (Artículo 6 LP) pero carecen de actividad inventiva (Artículo 8 LP).