

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 011**

51 Int. Cl.:

G01N 21/77 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2013 PCT/EP2013/075408**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014 WO14086789**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2013 E 13799537 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2929326**

54 Título: **Dispositivo para uso en la detección de afinidades de unión**

30 Prioridad:

04.12.2012 EP 12195532

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

25.04.2017

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

FATTINGER, CHRISTOF

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 610 011 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

Dispositivo para uso en la detección de afinidades de unión.

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un dispositivo para el uso en la detección de afinidades de unión así como un sistema para la detección de afinidades de unión de acuerdo con la respectiva reivindicación independiente.

[0002] Tales dispositivos se utilizan, por ejemplo, como biosensores en una amplia variedad de aplicaciones. 10 Una aplicación particular es la detección o el control de procesos o afinidades de unión. Por ejemplo, con la ayuda de tales biosensores, se pueden llevar a cabo diversos ensayos que detectan la unión de las muestras objetivo a los sitios de unión. De forma característica, se llevan a cabo grandes cantidades de tales ensayos en un biosensor en lugares que están dispuestos en una micromatriz (microarray) bidimensional en la superficie del biosensor. El uso de micromatrices proporciona una herramienta para la detección simultánea de los procesos o afinidades de unión de 15 diferentes muestras objetivo en proyecciones de alto rendimiento, donde un amplio número de muestras objetivo como moléculas, proteínas o ADN se pueden analizar rápidamente. Para la detección de afinidades de muestras objetivo que están unidas a sitios de unión específicos (p. ej. las afinidades de moléculas seleccionadas para unirse a moléculas de captura diferentes), un gran número de sitios de unión se inmovilizan en la superficie del biosensor en lugares en los cuales se puede aplicar, por ejemplo, por manchado de chorro de tinta o fotolitografía. Cada 20 mancha forma una zona de medición individual para un tipo predeterminado de moléculas de captura. La afinidad de una muestra objetivo a un tipo específico de moléculas de captura se detecta y se utiliza para proporcionar información sobre la afinidad de unión de la muestra objetivo.

[0003] Una técnica conocida para la detección de afinidades de unión de muestras objetivo utiliza etiquetas 25 que son capaces de emitir luz fluorescente tras el estímulo. Por ejemplo, las marcas fluorescentes se pueden utilizar como etiquetas para etiquetar las muestras objetivo. Tras el estímulo, las marcas fluorescentes ocasionan la emisión de luz fluorescente que tiene un espectro de emisión característico. La detección de este espectro de emisión característico en una mancha concreta indica que la molécula seleccionada etiquetada se ha unido al tipo concreto de sitios de unión presente en la mancha respectiva.

30 **[0004]** Un sensor para la detección de muestras objetivo etiquetadas se describe en el artículo "Micromatrices de proteína de Zeptosens: una plataforma de micromatriz de alto rendimiento innovadora para el análisis de proteína de baja abundancia", Proteomics 2002, 2, S. 383-393, Wiley-VCH Verlag GmbH, 69451 Weinheim, Alemania. El sensor descrito aquí comprende una guía de onda plana dispuesta en un sustrato y una rejilla para el acoplamiento de luz coherente de una longitud de onda predeterminada en la guía de onda plana. Una rejilla adicional está 35 dispuesta en ese extremo de la guía de onda plana alejada de la rejilla para el acoplamiento de la luz en la guía de onda. La luz coherente que se ha propagado a través de la guía de onda plana está acoplada fuera de la guía de onda por la rejilla adicional. La luz acoplada fuera se utiliza para el ajuste del acoplamiento de la luz coherente de longitud de onda predeterminada dentro de la guía de onda plana. La luz coherente se propaga a través de la guía 40 de onda plana bajo el reflejo total con un campo evanescente de la luz coherente que se propaga a lo largo de la superficie externa de la guía de onda plana. La profundidad de penetración del campo evanescente en el medio de índice de refracción inferior en la superficie exterior de la guía de onda plana es del orden de magnitud de una fracción de la longitud de onda de la luz coherente que se propaga a través de la guía de onda plana. El campo evanescente excita las marcas fluorescentes de las muestras objetivo etiquetadas unidas a los sitios de unión 45 dispuestos en la superficie de la guía de onda plana. Debido a la penetración muy reducida del campo evanescente en el medio ópticamente más delgado en la superficie exterior de la guía de onda plana, únicamente se excitan las muestras etiquetadas unidas a los sitios de unión inmovilizados en la superficie exterior de la guía de onda plana. La luz fluorescente emitida por estas marcas se detecta entonces con la ayuda de una cámara CCD.

50 **[0005]** Aunque es principalmente posible detectar las afinidades de unión mediante el uso de etiquetas fluorescentes, esta técnica no es ventajosa en que la señal detectada sea producida por las etiquetas en vez de por los socios de unión en sí mismos. Además, el etiquetado de las muestras objetivo requiere pasos de trabajo adicional. Además, las muestras objetivo etiquetadas son comparativamente costosas. Otra desventaja es la falsificación de los resultados causada por el impedimento estérico de las etiquetas fluorescentes en la muestra 55 objetivo que podrían interferir con la unión de las muestras objetivo a las moléculas de captura. Unas desventajas adicionales son la falsificación de los resultados debida al fotoblanqueo de las etiquetas o a los efectos de extinción.

[0006] Un biosensor basado en guía de onda sin el requerimiento de etiquetado de moléculas objetivo se divulga en US 7.505.641 B1. El biosensor utiliza una o más plantillas de rejilla en la superficie de la guía de onda

para proporcionar una respuesta específica de longitud de onda que es detectada con un espectrómetro.

[0007] Es un objeto de la presente invención proporcionar un dispositivo para el uso en la detección de afinidades de unión de una muestra objetivo así como un sistema capaz de detectar tales afinidades de unión que
5 superen o al menos reduzcan en gran medida las desventajas del sensor de la técnica anterior descrito más arriba.

[0008] De acuerdo con la invención, este objetivo se logra por un dispositivo para el uso en la detección de afinidades de unión, como se define en la reivindicación 1. El dispositivo comprende una guía de onda plana dispuesta en un sustrato y comprende además un acoplador óptico de una longitud predeterminada para el
10 acoplamiento de la luz coherente de una longitud de onda predeterminada en la guía de onda plana de tal forma que un haz paralelo de luz coherente se propague a través de la guía de onda plana con un campo evanescente de la luz coherente que se propaga a lo largo de una superficie exterior de la guía de onda plana. La superficie exterior de la guía de onda plana comprende sitios de unión al respecto capaces de unir muestras objetivos a los sitios de unión de tal forma que la luz del campo evanescente sea difractada por las muestras objetivo unidas a los sitios de unión.
15 Los sitios de unión están dispuestos a lo largo de una pluralidad de líneas rectas que se ejecutan paralelas a otras con una distancia constante entre líneas rectas adyacentes. Las líneas rectas predeterminadas están dispuestas en un ángulo β relativo a la dirección de propagación del campo evanescente de tal forma que la luz coherente difractada por las muestras objetivo unidas a los sitios de unión incida bajo un ángulo de difracción α relativo a las líneas rectas sobre un acoplador óptico adicional dispuesto en una porción de la guía de onda plana fuera del haz de
20 luz coherente que se propaga a través de la guía de onda plana. El acoplador óptico adicional acopla la luz coherente difractada fuera de la guía de onda plana de tal forma que interfiera en una ubicación de detección predeterminada con una diferencia en la longitud de ruta óptica que es un número entero múltiplo de la longitud de onda predeterminada. Técnicamente, el término "difractado" describe la interferencia de la luz coherente del campo evanescente que ya ha interactuado con muestras objetivo unidas a los sitios de unión. La difracción da lugar a que
25 la luz coherente se propague a través de la guía de onda plana con un campo evanescente en la superficie exterior para interferir de manera constructiva en direcciones predeterminadas dentro de la guía de onda plana.

[0009] La detección de afinidades de unión de acuerdo con la invención tampoco está limitada a tipos específicos de muestras objetivo ni a ningún tipo de sitios de unión, sino más bien las características de unión de
30 moléculas, proteínas, ADN, etc. se pueden analizar con respecto a cualquier tipo de sitios de unión de la guía de onda plana. La detección de afinidades de unión se puede lograr de una manera libre de etiquetas. Como alternativa, los intensificadores de difracción (p. ej. las etiquetas de difracción) que dispersan considerablemente la luz se pueden utilizar para incrementar la sensibilidad de detección. Tales intensificadores de difracción pueden ser una nanopartícula (sola o con un agente ligante) o en otro ejemplo una partícula coloidal. De manera ventajosa, la
35 característica de unión que se va a analizar puede ser de tipo estático (por ejemplo, se puede analizar si una muestra objetivo ha sido o no ha sido unida a los sitios de unión) o de tipo dinámico (por ejemplo, se puede analizar la dinámica del proceso de unión a lo largo del tiempo). De acuerdo con la invención, el dispositivo comprende una guía de onda plana en un sustrato, la guía de onda plana que tiene un índice refractivo alto relativo al medio en la superficie exterior que forma el lado superior de la guía de onda plana. Por ejemplo, el índice refractivo de la guía de
40 onda plana puede ser del orden de 1,6 a 2,8, mientras que el índice refractivo del medio en la superficie de la guía de onda plana es característicamente del orden de 1 a 1,6, en particular, 1,33 a 1,4 para agua o tampón de ensayo acuoso y 1 para aire. El índice refractivo efectivo N del modo guiado, el índice refractivo del medio en la superficie de la guía de onda plana y la longitud de onda predeterminada de la luz determinan la profundidad de penetración (distancia entre la superficie exterior de la guía de onda plana y el descenso de la intensidad $1/e^2$ del campo
45 evanescente) del campo evanescente dentro del medio en la superficie exterior de la guía de onda plana. La profundidad de penetración es tal que el campo evanescente que penetra fuera de la superficie exterior de la guía de onda plana se difracta en las muestras objetivo unidas a los sitios de unión dispuestos en la superficie exterior. En uso, la luz coherente de una longitud de onda predeterminada (que es preferiblemente monocromática) está acoplada a través de un acoplador óptico en la guía de onda plana de tal forma que un haz paralelo de la luz
50 coherente se propague a través de la guía de onda plana con el campo evanescente propagándose a lo largo de la superficie exterior. El haz paralelo tiene un ancho correspondiente a la longitud predeterminada del acoplador óptico. El acoplador óptico comprende una rejilla óptica para acoplar la luz coherente en la guía de onda plana, definiendo la longitud de las líneas la rejilla óptica. La longitud de onda predeterminada no está limitada a valores específicos sino que más bien se prefiere que sea del orden de luz visible. La superficie exterior de la guía de onda plana
55 comprende sitios de unión al respecto. Los sitios de unión son ubicaciones en la superficie exterior de la guía de onda plana a la cual se puede unir una muestra objetivo. Por ejemplo, los sitios de unión pueden comprender moléculas de captura que están inmovilizadas en la superficie exterior de la guía de onda plana o pueden comprender simplemente las ubicaciones activadas en la superficie exterior de la guía de onda plana que son capaces de unir muestras objetivo a las ubicaciones activadas o que se pueden realizar de cualquier otra manera

adecuada para unir muestras objetivo en las ubicaciones deseadas en la superficie exterior de la guía de onda plana. En principio, los sitios de unión son capaces de unir muestras objetivo de tal forma que la luz del campo evanescente sea difractada por las muestras objetivo unidas a los sitios de unión. De acuerdo con la invención, los sitios de unión están dispuestos a lo largo de una pluralidad de líneas rectas predeterminadas. La disposición de los sitios de unión "a lo largo de las líneas rectas predeterminadas" representa el caso óptimo en el cual todos los sitios de unión están dispuestos exactamente en las líneas rectas predeterminadas. Tal disposición óptima de los sitios de unión resulta en una señal máxima en la ubicación de detección. Es obvio para la persona experta en la técnica que en la práctica la disposición de los sitios de unión puede desviarse de algún modo de tal disposición óptima sin perder una señal detectable en la ubicación de detección. Por ejemplo, la desviación puede estar causada por el método respectivo de disposición de los sitios de unión en la superficie exterior de la guía de onda plana, como se explicará en detalla a continuación. Las líneas rectas son tales que la luz difractada a ello interfiere de manera constructiva en un máximo de intensidad alta dentro de la guía de onda plana. Las líneas rectas predeterminadas se ejecutan paralelas una a otra con una distancia constante entre las líneas rectas adyacentes. Las distancias constantes preferidas entre las líneas rectas predeterminadas adyacentes son del orden de más de 100 nm. Para la distancia entre las líneas predeterminadas adyacentes, se prefiere un rango de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 1.000 nm, en particular entre 300 nm a 600 nm. Los rangos mencionados permiten el uso de luz UV suave y casi infrarroja visible de los cuales la longitud de onda oscila entre 350 nm y 1.500 nm de forma que la luz difractada pueda ser detectada por medio ópticos estándar. Las líneas rectas predeterminadas están dispuestas en un ángulo β en el rango de 10° a 70° con respecto a la dirección de propagación del campo evanescente. La dirección de propagación se define como empezando a partir del acoplador óptico y se extiende en la dirección en la cual la luz coherente está acoplada en la guía de onda plana que usualmente está cerca de la posición perpendicular a las líneas de la rejilla óptica que forman el acoplador óptico. La luz coherente difractada por las muestras objetivo unidas a los sitios de unión incide sobre el acoplador óptico adicional bajo el ángulo de difracción α relativo a las líneas rectas. El ángulo de difracción bajo el cual la luz interfiere de manera constructiva por un número entero múltiplo de la longitud de onda predeterminada depende de la distancia constante entre las líneas rectas predeterminadas adyacentes tomando en cuenta la longitud de onda predeterminada y los índices refractivos del sustrato, la guía de onda plana y del medio en la superficie exterior de la guía de onda en esta longitud de onda. Dado que la luz del campo evanescente que se propaga a lo largo de la superficie exterior de la guía de onda plana es coherente como es la luz que se propaga a través de la guía de onda plana, la luz coherente del campo evanescente es difractada coherentemente por los centros de difracción formados por las muestras objetivo unidas a los sitios de unión que están dispuestos en las líneas rectas predeterminadas diferentes. La luz difractada en cualquier ubicación se puede determinar añadiendo las contribuciones de cada uno de los centros de difracción individuales. De manera ventajosa, la difracción interna de la luz que se propaga a través de la guía de onda plana es de una eficiencia superior comparada a la difracción de la luz guiada fuera de la guía de onda plana. Dado que la difracción en las muestras objetivo unidas a sitios de unión es usualmente bastante débil, la difracción dentro del plano de la guía de onda plana proporciona una sensibilidad de detección mejorada que permite incluso detectar de manera comparativa los números reducidos de centros de difracción. El acoplador óptico adicional sobre el cual incide la luz difractada puede ser una rejilla física adecuada para acoplar la luz fuera de la guía de onda plana. Un punto crucial adicional de la invención es que el acoplador óptico adicional está dispuesto en una porción de la guía de onda plana fuera del haz de luz coherente que se propaga a través de la guía de onda plana. Esto permite detectar la señal de la luz difractada sin un fondo desde el haz de la luz coherente que se propaga a través de la guía de onda plana. Debido a que la señal detectada en la ubicación de detección tiene menos señal de fondo, una mejor sensibilidad de detección se logra la cual permite detectar una señal causada por menos centros de difracción. Un máximo de la luz difractada se localiza en la ubicación de detección predeterminada porque el acoplador óptico adicional está formado como una rejilla de modo que en la ubicación de detección predeterminada, la longitud de ruta óptica de la luz difractada por las diferentes líneas de la rejilla difiera por un número entero múltiplo de la longitud de onda de la luz. Para una señal máxima en la ubicación de detección, la longitud de ruta óptica de la luz desde el acoplador óptico a las líneas rectas predeterminadas, desde allí al acoplador óptico adicional y desde allí a la ubicación de detección predeterminada es también un número entero múltiplo de la longitud de onda predeterminada. De este modo, la luz difractada por las muestras objetivo unidas a los sitios de unión interfiere de manera constructiva en una ubicación de detección predeterminada. El requisito de interferencia constructiva se cumple por parte de la luz difractada que se añade a la señal detectable en la ubicación de detección.

[0010] De acuerdo con un aspecto ventajoso de la invención, la distancia constante d entre las líneas rectas adyacentes se escoge para cumplir la condición de Bragg $2N d \sin(\alpha) = k\lambda$, donde N es el índice refractivo efectivo del modo guiado en la guía de onda plana, d es la distancia entre las líneas rectas predeterminadas adyacentes, α es el ángulo de difracción, k es el número de la intensidad máxima y λ es la longitud de onda de vacío de la luz de propagación. Es importante destacar que la distancia entre las líneas rectas predeterminadas adyacentes d en la cual se produce la interferencia constructiva en una ubicación de detección predeterminada depende del índice

refractivo efectivo N que, a su vez, depende del índice refractivo del medio en la superficie exterior de la guía de onda. De manera ventajosa, la distancia entre las líneas rectas predeterminadas adyacentes d se escoge para tener en cuenta el cambio en el índice refractivo para las diferentes muestras aplicadas a la superficie exterior. Una distancia constante d entre las líneas adyacentes incluye de forma explícita pequeños cambios en la distancia entre las líneas adyacentes. Tal gradiente en la distancia entre las líneas adyacentes sobre la pluralidad de las líneas predeterminadas permite completar la condición de Bragg en únicamente una fracción de la pluralidad de líneas predeterminadas.

[0011] De acuerdo con otro aspecto ventajoso de la invención, las líneas rectas predeterminadas están dispuestas en el ángulo β en el rango de 10° - 70° con respecto a la dirección de propagación del campo evanescente. La luz coherente difractada por las muestras objetivo unidas a los sitios de unión incide en el ángulo de difracción α (que es igual a β) con respecto a las líneas rectas sobre el acoplador óptico adicional. La disposición de las líneas rectas predeterminadas y el acoplador óptico adicional en ángulos fijos es beneficioso para la preparación de las líneas rectas predeterminadas en la superficie exterior del dispositivo, que tiene una orientación fijada al respecto.

[0012] De acuerdo con un aspecto ventajoso adicional de la invención, el acoplador óptico adicional comprende una pluralidad de líneas de rejilla. Cada una de la pluralidad de líneas de rejilla tiene una curvatura respectiva y distancia entre líneas de rejilla adyacentes de forma que el acoplador óptico adicional sea capaz de acoplar la luz coherente difractada fuera de la guía de onda plana de tal forma que interfiera en una ubicación de detección predeterminada con una diferencia en la longitud de ruta óptica que es un número entero múltiplo de la longitud de onda predeterminada. La pluralidad de líneas de rejilla puede tener un eje de simetría que se extiende con respecto a las líneas rectas predeterminadas bajo el ángulo de difracción α . Esta simetría persiste en una pluralidad de líneas de rejilla en el acoplador óptico adicional con una estructura de tipo rejilla curvada simétrica de una distancia decreciente entre las líneas de rejilla adyacentes de forma que la luz de una longitud de onda predeterminada única acoplada fuera de la guía de onda plana cumpla la condición de que la diferencia en la longitud de ruta óptica es un número entero múltiplo de la longitud de onda predeterminada única en la ubicación de detección. Disponer el eje de simetría bajo el ángulo de difracción permite a la ubicación de detección incluir el eje central de la rejilla óptica formada circular.

[0013] De acuerdo con un aspecto aún más ventajoso de la invención, la pluralidad de líneas rectas predeterminadas está dispuesta en una zona efectiva en la guía de onda plana. La zona efectiva tiene un ancho equivalente a la longitud del acoplador óptico de forma que la zona efectiva completa esté iluminada por el campo evanescente de la luz coherente acoplada en la guía de onda plana por el acoplador óptico. El haz que se propaga en la guía de onda tiene un pequeño ángulo de divergencia de forma que el incremento del ancho de haz comparado con las otras dimensiones del dispositivo sea insignificante. De este modo, el ancho de la zona efectiva se puede seleccionar generalmente idéntico a la longitud del acoplador óptico para la iluminación de la zona efectiva completa. En la práctica, no obstante, el ancho de la zona efectiva es más pequeño comparado con la longitud del acoplador óptico. Como ejemplo, el ancho de la zona efectiva es $310\ \mu\text{m}$ mientras que la longitud del acoplador óptico es $400\ \mu\text{m}$.

[0014] De acuerdo con otro aspecto ventajoso de la invención, al menos dos pluralidades de líneas rectas predeterminadas están dispuestas en la guía de onda plana, una tras otra en la dirección de propagación del campo evanescente. Un acoplador óptico adicional respectivo está dispuesto con respecto a cada pluralidad de líneas rectas predeterminadas de tal forma que la luz coherente difractada por las muestras objetivo unidas a los sitios de unión dispuestos a lo largo de las líneas rectas de la respectiva pluralidad de líneas rectas incide en un ángulo de difracción α sobre el acoplador óptico adicional respectivo. Mediante la disposición de las pluralidades de líneas rectas predeterminadas una tras otra en la dirección de propagación del campo evanescente, el campo evanescente del haz incide en (se difracta en) todas las pluralidades de líneas rectas predeterminadas dispuestas de tal manera que permitan la detección simultánea de afinidades de unión en una multitud de muestras.

[0015] En un aspecto alternativo preferido de la invención, al menos dos pluralidades de líneas rectas predeterminadas tienen cada una la misma distancia constante d entre líneas rectas adyacentes. La misma distancia constante d entre las líneas rectas adyacentes de cada pluralidad de líneas rectas predeterminadas permite una detección redundante de afinidades de unión en una multitud de muestras.

[0016] En un aspecto alternativo preferido adicional de la invención, al menos dos pluralidades de líneas rectas predeterminadas tienen cada una, una distancia constante diferente $d_{1...n}$ entre las líneas rectas adyacentes. La distancia constante diferente $d_{1...n}$ puede abarcar un rango de distancias constantes que corresponde a un rango

de índices refractivos detectables en el medio en la superficie exterior de la guía de onda. El rango de los índices refractivos detectables permite detectar las afinidades de unión para muestras en los medios con índices refractivos diferentes o desconocidos. El índice refractivo en las muestras que entran en contacto con la superficie del sensor podrían variar en el rango de unos escasos tanto por ciento debido a la composición diferente. En un aspecto adicional preferido de la invención, la distancia constante $d_{1...n}$ entre las líneas rectas adyacentes de las pluralidades adyacentes de las líneas rectas predeterminadas difiere, en los pasos de 0,5 a 3 nm. Disponer de pluralidades de líneas rectas predeterminadas con una diferencia en la distancia constante $d_{1...n}$ que cambia en pasos iguales permite cuantificar convenientemente las afinidades de unión en muestras de índices refractivos diferentes o desconocidos en el rango de los índices refractivos detectables conocidos. La interferencia constructiva en una ubicación de detección predeterminada se produce cuando la distancia d de la pluralidad de líneas rectas predeterminadas se corresponde con la condición de Bragg para el índice refractivo de la muestra aplicada.

[0017] En un aspecto alternativo aún más preferido, al menos dos pluralidades de líneas rectas predeterminadas incluye grupos de pluralidades de líneas rectas predeterminadas, teniendo cada grupo una distancia constante igual d entre las líneas rectas adyacentes. Diferentes grupos de pluralidades de líneas rectas predeterminadas tienen una distancia constante diferente $d_{1...n}$ entre las líneas rectas adyacentes. Tener grupos de distancia constante igual d entre las líneas rectas adyacentes combina las ventajas tratadas para las otras alternativas con el fin de permitir la detección redundante de afinidades de unión así como detectar las afinidades de unión para las muestras en los medios con índices refractivos diferentes o desconocidos en el rango de los índices refractivos detectables conocidos.

[0018] En un aspecto aún más preferido de la invención, al acoplador óptico comprende al menos dos porciones independientes para el acoplamiento de luz coherente de la longitud de onda predeterminada en la guía de onda plana. Cada porción independiente tiene una longitud predeterminada y está separada por un espaciado predeterminado hacia la otra porción independiente de tal forma que al menos dos haces paralelos de luz coherente se propaguen a través de la guía de onda plana separados por el espaciado predeterminado. Las porciones independientes del acoplador óptico permiten disponer una o más pluralidades de líneas rectas predeterminadas en la dirección de propagación de cada haz acoplado a través de la porción independiente respectiva en la guía de onda plana. Al separar los haces paralelos acoplados a la guía de onda con un espaciado predeterminado en medio da lugar a que una porción de la guía de onda plana esté fuera de los haces paralelos de la luz coherente. El acoplador óptico adicional dispuesto en dicha porción mejora la señal detectada mediante la reducción de la luz de fondo en la ubicación de detección. En un ejemplo para el acoplador óptico adicional que tiene un tamaño de 400 μm , el espaciado predeterminado se selecciona para que sea 600 μm .

[0019] De acuerdo con un aspecto ventajoso de la invención, los sitios de unión comprenden moléculas de captura fijadas a la superficie exterior de la guía de onda plana a lo largo de las líneas rectas predeterminadas únicamente. Las moléculas de captura son capaces de unir las muestras objetivo. Dos formas de realización están particularmente concebidas de cómo los sitios de unión pueden estar dispuestos a lo largo de la pluralidad de líneas rectas predeterminadas. De acuerdo con una primera realización, los sitios de unión comprenden moléculas de captura fijadas a la superficie de la guía de onda plana a lo largo de las líneas predeterminadas únicamente. Estas moléculas de captura son capaces de unir las muestras objetivo y están inmovilizadas en la superficie exterior de la guía de onda plana (aunque, como se ha mencionado anteriormente, los sitios de unión pueden estar formados por la superficie activada de la guía de onda plana en sí misma). La inmovilización de las moléculas de captura en la superficie exterior de la guía de onda plana a lo largo de las líneas predeterminadas se puede llevar a cabo generalmente por cualquier método adecuado, por ejemplo se puede llevar a cabo mediante el uso de métodos fotolitográficos que utilizan una máscara litográfica con líneas rectas. Ni que decir tiene que la disposición de los sitios de unión a lo largo de las líneas rectas predeterminadas se debe entender en cualquier realización de la invención en un sentido en que la mayoría de los sitios de unión (en la realización instantánea las moléculas de captura) están ubicados a lo largo de las líneas rectas predeterminadas e incluye explícitamente que algunos sitios de unión están dispuestos en ubicaciones diferentes de eso.

[0020] De acuerdo con la segunda realización, los sitios de unión comprenden moléculas de captura capaces de unir las muestras objetivo, estando dispuestas las moléculas de captura capaces de unir las muestras objetivo a lo largo de las líneas rectas predeterminadas por inmovilización de las moléculas de captura capaces de unir las muestras objetivo sobre la superficie exterior de la guía de onda plana y mediante la desactivación de esas moléculas de captura que no están dispuestas a lo largo de las líneas rectas predeterminadas. El término "desactivación" se refiere a este respecto a cualquier método adecuado para cambiar la capacidad de unión de las moléculas de captura antes o después de su inmovilización en la superficie exterior de la guía de onda plana. La desactivación se puede conseguir, por ejemplo, exponiendo las moléculas de captura a luz UV con el fin de

conseguir que no vuelvan a ser capaces de unir las muestras objetivo. La desactivación de las moléculas de captura inmovilizadas entre las líneas rectas predeterminadas se puede conseguir, por ejemplo, por una alteración de la región de unión de la molécula de captura. De acuerdo con esta realización de la invención, las moléculas de captura se pueden aplicar uniformemente o estadísticamente uniformemente sobre la superficie exterior de la guía de onda plana. Después de la desactivación de las moléculas de captura que están dispuestas entre las líneas rectas predeterminadas únicamente las moléculas de captura dispuestas a lo largo de las líneas rectas predeterminadas (estas no se han desactivado) son capaces de unir una muestra objetivo. Sin embargo, las moléculas de captura desactivadas permanecen inmovilizadas en la superficie exterior de la guía de onda plana.

10 **[0021]** Esta realización tiene la ventaja adicional de que la contribución de la señal generada por la luz difractada por las moléculas seleccionadas unidas a las moléculas de captura a la señal global en la ubicación de detección aumenta. Generalmente, la diferencia entre las señales de la luz difractada por moléculas seleccionadas pequeñas unidas a las moléculas de captura y la luz difractada por las moléculas de captura sin ninguna molécula seleccionada unida a ello es pequeña comparada con la luz difractada por las moléculas de captura solas.

15 Suponiendo que las propiedades de difracción de las moléculas de captura dispuestas a lo largo de las líneas rectas predeterminadas (que no se han desactivado) y de las moléculas de captura desactivadas dispuestas entre las líneas rectas predeterminadas son casi idénticas y suponiendo además que las moléculas de captura están distribuidas de forma homogénea sobre la superficie exterior de la guía de onda plana, entonces de manera ideal no se produce ninguna señal en la ubicación de detección después de que las moléculas de captura se hayan inmovilizado en la superficie exterior de la guía de onda plana y después de que las moléculas de captura dispuestas entre las líneas rectas predeterminadas hayan sido desactivadas. En la práctica, no obstante, la desactivación de las moléculas de captura cambia ligeramente las propiedades de difracción de las moléculas de captura, de forma que puede que no sea ideal desactivar todas las moléculas de captura que están dispuestas entre las líneas rectas predeterminadas. En su lugar, solo la gran mayoría de las moléculas de captura dispuestas entre

20 las líneas rectas predeterminadas se pueden desactivar. La desactivación de las moléculas de captura se lleva a cabo en cierta medida de tal forma que la señal total en la ubicación de detección producida por esas moléculas de captura dispuestas a lo largo de las líneas rectas predeterminadas y por las desactivadas y las moléculas de captura no desactivadas dispuestas entre las líneas rectas predeterminadas está en un mínimo y es preferiblemente cero. Suponiendo que la señal obtenida de este modo en la ubicación de detección se pueda reducir a cero, esto significa

25 que, después de añadir las muestras objetivo, la señal producida en la ubicación de detección solo resulta de las muestras objetivo unidas a las moléculas de captura. En el caso de que no se unan muestras objetivo a las moléculas de captura, la señal en la ubicación de detección siga siendo cero. Esto incrementa la sensibilidad del detector para la señal generada por la luz difractada por las moléculas objetivo unidas a las moléculas de captura en la ubicación de detección.

35 **[0022]** Otro aspecto de la invención se refiere a un sistema para la detección de afinidades de unión que comprenden un dispositivo de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones precedentes y que comprende además una fuente de luz para la emisión de luz coherente de una longitud de onda predeterminada. La fuente de luz y el dispositivo están dispuestos uno con respecto al otro de tal forma que la luz coherente emitida por la fuente de luz está acoplada en la guía de onda plana a través del acoplamiento óptico.

[0023] De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, la fuente de luz y el dispositivo están dispuestos ajustables uno con respecto al otro para cambiar el ángulo de acoplamiento bajo el cual la luz coherente emitida por la fuente de luz está acoplada a través del acoplamiento óptico en la guía de onda plana. La fuente de luz emite luz

45 coherente de una longitud de onda predeterminada, preferentemente en lo visible, cerca del rango espectral UV suave o infrarrojo con una longitud de onda (ajustable) en el rango de 350 nm a 1.500 nm.

[0024] De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, la fuente de luz se puede ajustar para emitir luz coherente de longitud de onda predeterminada con un rango de ajuste de aproximadamente 1 a 5 nm. El rango de ajuste de la fuente de luz permite disponer la fuente de luz y el dispositivo en un ángulo de acoplamiento fijo. La luz emitida por la fuente de luz ajustable está acoplada a través de un acoplador óptico (p. ej. rejilla óptica) en la guía de onda plana cuando la longitud de onda de la luz emitida en el rango de ajuste se corresponde con la longitud de onda en la cual se produce el acoplamiento en el ángulo de acoplamiento fijo.

55 **[0025]** La fuente de luz ajustable se puede utilizar para un segundo modo ventajoso de funcionamiento del dispositivo en un sistema para la detección de afinidades de unión. La condición de Bragg que describe la intensidad máxima de interferencia constructiva se refiere a la distancia entre las líneas rectas predeterminadas adyacentes, al ángulo bajo el cual el campo evanescente se difracta en las muestras objetivo unidas a los sitios de unión que están dispuestos a lo largo de las líneas rectas predeterminadas, a la longitud de onda de la luz que se propaga a través

de la guía de onda plana y al índice refractivo efectivo N del modo guiado. Al considerar las muestras de las cuales el índice refractivo no se conoce exactamente, la fuente de luz ajustable permite variar la longitud de onda en la cual se produce el acoplamiento de tal forma que la condición de Bragg para la intensidad máxima de interferencia constructiva se cumple (incluso para una distancia fija entre las líneas adyacentes y un ángulo de difracción fijo relativo a las líneas predeterminadas). La variación de ambos, la longitud de onda de la fuente de luz ajustable y el ángulo de acoplamiento (bajo el cual la luz está acoplada a través del acoplador óptico en la guía de onda) permite ajustar la longitud de onda en la cual se produce el acoplamiento en la guía de onda a la longitud de onda que cumple la condición de Bragg para una distancia fija entre las líneas rectas predeterminadas adyacentes.

10 **[0026]** Aspectos ventajosos adicionales de la invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción de realización del dispositivo con referencia a los dibujos adjuntos en los cuales:

La Fig. 1 muestra una vista en perspectiva de una primera realización del dispositivo de acuerdo con la invención;

15 La Fig. 2 muestra una vista en planta de la guía de onda plana del dispositivo de la Fig. 1 que ilustra diferentes ángulos de acuerdo con la invención:

La Fig. 3 muestra una vista en planta de la guía de onda plana del dispositivo de la Fig. 1 que ilustra la disposición de los sitios de unión;

20 La Fig. 4 muestra una vista en planta de la guía de onda plana del dispositivo de la Fig. 1 que ilustra una zona efectiva;

La Fig. 5 muestra una vista en planta de la guía de onda plana del dispositivo de la Fig. 1 que ilustra diferentes rutas ópticas;

La Fig. 6 muestra una vista en planta de la guía de onda plana del dispositivo de la Fig. 1 que tiene dos pluralidades de líneas rectas predeterminadas;

30 La Fig. 7 muestra tres pluralidades de líneas predeterminadas que tienen una diferencia en la distancia constante d entre las líneas rectas predeterminadas adyacentes;

La Fig. 8 muestra una vista en planta de una máscara que se va a utilizar para la preparación de un dispositivo de acuerdo con una segunda realización de la invención que tiene el patrón de 24 pluralidades de líneas rectas predeterminadas al respecto;

La Fig. 9 muestra una vista en planta de un dispositivo no preparado de acuerdo con la segunda realización de la invención que se va a preparar con la máscara de la Fig. 8;

40 La Fig. 10 muestra una vista en planta del dispositivo preparado de acuerdo con la segunda realización de la invención que es el dispositivo de la Fig. 9 listo para su uso en la detección de las afinidades de unión;

La Fig. 11 muestra una ilustración esquemática que visualiza la diferencia en la longitud de ruta óptica para la difracción de la luz del campo evanescente en las muestras objetivo unidas a los sitios de unión dispuestos a lo largo de la pluralidad de líneas rectas predeterminadas;

La Fig. 12 muestra la ilustración esquemática de la Fig. 11 con los sitios de unión que comprenden las moléculas de captura a lo largo de una pluralidad de líneas rectas predeterminadas y entre las moléculas de captura desactivadas para lograr una señal de fondo mínima; y

La Fig. 13 muestra la ilustración esquemática de la Fig. 12 con las muestras objetivo aplicadas a las moléculas de captura capaces de la unión.

[0027] La Fig. 1 muestra una vista en perspectiva de una realización del dispositivo para el uso en la detección de afinidades de unión. Estructuralmente, el dispositivo comprende un sustrato 3, una pluralidad de líneas rectas predeterminadas 7 (cada una de las líneas mostradas representa una multiplicidad de líneas) dispuestas en una superficie exterior 21 de una guía de onda plana 2, un acoplamiento óptico 41, una ubicación de detección y un acoplador óptico adicional 8. Se muestra además que de acuerdo con el principio de funcionamiento del dispositivo, la luz coherente 1 está acoplada en la guía de onda plana 2 de forma que se propague con un campo evanescente

11 (representado por flechas paralelas) que se difracta de modo que la luz coherente difractada 12 (representada por flechas paralelas) se propaga bajo un ángulo relativo a las líneas predeterminadas 7 que se va a acoplar fuera de la guía de onda plana 2 de tal forma que la luz acoplada 13 acoplada fuera de la guía de onda plana 2 interfiere en la ubicación de detección 9.

5

[0028] En el ejemplo mostrado, la guía de onda plana 2 está dispuesta en el sustrato 3 que permiten ambos que la luz coherente visible se propague a través de los mismos. Dado que la guía de onda plana 2 tiene un grosor en el rango de unas decenas de nanómetros a unas centenas de nanómetros, se extrae con la línea de la superficie superior del sustrato 3. La luz coherente 1 proporcionada por una fuente de luz (no mostrada) tiene una longitud de onda predeterminada. En la práctica, la longitud de onda predeterminada no está limitada a valores específicos para la longitud de onda sino que más bien se debe seleccionar entre otros de acuerdo con el índice refractivo efectivo del modo guiado así como el tamaño, la posición y geometría del acoplador óptico 41, las líneas predeterminadas 7 y el acoplador óptico adicional 8. Para el acoplamiento de la luz coherente 1 de una longitud de onda predeterminada en la guía de onda plana 2, el acoplador óptico 41 emplea en el ejemplo mostrado una rejilla con líneas rectas de una longitud predeterminada de forma que se permita el acoplamiento coherente de la luz coherente 1 bajo un ángulo de acoplamiento predeterminado en la guía de onda plana 2. Debido a la longitud predeterminada del acoplador 41, un haz paralelo de luz coherente que tiene un ancho de acuerdo con la longitud del acoplador óptico 41 se propaga a través de la guía de onda plana 2. El haz paralelo de luz coherente tiene un campo evanescente 11 de una profundidad de penetración característica. La profundidad de penetración del campo evanescente 11 en el medio en la superficie exterior 21 de la guía de onda plana 2 (distancia entre la superficie exterior 21 de la guía de onda plana 2 y descenso de intensidad de $1/e^2$ del campo evanescente 11) depende del índice refractivo efectivo N del modo guiado, en el índice refractivo del medio en la superficie de la guía de onda plana y en la longitud de onda λ de la luz. La luz del campo evanescente 11 es difractada por muestras objetivo (no mostradas en la Fig. 1) unidas a los sitios de unión (no mostrados en la Fig. 1). En principio, los sitios de unión están dispuestos a lo largo de la pluralidad de líneas rectas predeterminadas 7 que se ejecutan paralelas una a otra con una distancia constante entre las líneas rectas adyacentes. Las líneas rectas predeterminadas 7 están dispuestas en la superficie exterior 21 de la guía de onda plana 2 en un ángulo relativo a la dirección de propagación del campo evanescente 11. La luz del campo evanescente 11 se difracta de forma que incida en un ángulo de difracción relativo a las líneas rectas sobre un acoplador óptico adicional 8 formado en la guía de onda plana 2. La luz difractada interfiere en el acoplador óptico adicional 8 con una diferencia en la longitud de ruta óptica de un número entero múltiplo de la longitud de onda predeterminada. De manera ventajosa, la difracción interna de la luz que se propaga a través de la guía de onda plana 2 es de una eficiencia superior comparada con la difracción de la luz guiada fuera de la guía de onda plana 2. Esto proporciona una sensibilidad de detección suficiente que permite detectar de forma comparativa los números pequeños de los centros de difracción. En teoría. Podrían existir otros ángulos de difracción relativos a las líneas rectas que tienen una intensidad máxima de la luz difractada de forma que el acoplador óptico adicional 8 pueda estar dispuesto en otros ángulos de difracción también. Una ventaja adicional de la invención se puede ver a partir de la Fig. 1 con respecto a la disposición del acoplador óptico adicional 8. El acoplador óptico adicional 8 y, de este modo, la ubicación de detección 9 están dispuestos en la guía de onda plana 2 y orientados uno con respecto al otro de tal forma que no se detecta ninguna luz del haz que se propaga a través de la guía de onda plana 2. De este modo, el acoplador óptico adicional 8 está dispuesto en una porción 10 de la guía de onda plana 2 fuera del haz de luz coherente que se propaga a través de la guía de onda plana 2 empezando a partir del acoplador óptico 41. Esto permite detectar la señal a partir de la luz difractada sin un fondo desde el haz de luz coherente que se propaga a través de la guía de onda plana. Una ventaja aún adicional se refiere a la señal detectada en la ubicación de detección 9 que tiene menos señal de fondo debido a la ubicación del acoplador óptico adicional 8 en la porción 10. De este modo, se consigue una mejor sensibilidad de detección que permite detectar una señal causada por menos centros de difracción. El acoplador óptico adicional 8 se muestra como una lente de rejilla de fase orientada con el eje de simetría en la dirección del ángulo de difracción. La lente de rejilla de fase ejemplifica cualquier medio óptico para acoplar la luz coherente difractada 12 fuera de la guía de onda plana 2 mientras se centra en la ubicación de detección 9 con una intensidad suficiente para la detección de las afinidades de unión.

[0029] Las Figs. 2-6, respectivamente, con vistas en planta de la superficie exterior 21 de la guía de onda plana 2 de la Fig. 1 que ya describe la guía de onda plana 2, el acoplador óptico 41, el acoplador óptico adicional 8 y la pluralidad de líneas predeterminadas 7 dispuestas en la superficie exterior 21 de la guía de onda plana 2.

55

[0030] En la Fig. 2 se ilustran el ángulo α relativo a las líneas rectas predeterminadas 7 el ángulo β relativo a la dirección de propagación del campo evanescente 11. En la presente realización, el ángulo β es de $22,5^\circ$ y el ángulo α es de $22,5^\circ$. Los ángulos fijos son obviamente beneficiosos para la preparación del dispositivo. El campo evanescente 11 (representado por una flecha que empieza desde el acoplador óptico 41 y que termina en el centro

de las líneas rectas predeterminadas 7) que se propaga a lo largo de la superficie exterior 21 de la guía de onda plana 2 se difracta en las muestras objetivo (no mostradas) unidas a los sitios de unión (no mostrados). La luz coherente difractada 12 (representada por una flecha que empieza desde el centro de las líneas rectas predeterminadas 7 y que se propaga a lo largo de eje de simetría del acoplador óptico adicional 8) interfiere constructivamente de tal forma que incide en el ángulo α de $22,5^\circ$ sobre el acoplador óptico adicional 8. El ángulo α es de acuerdo con la condición de Bragg $2N\text{dsin}(\alpha)=k\lambda$ dependiente de la distancia d entre las líneas rectas predeterminadas adyacentes 7 y desde la longitud de onda predeterminada λ y se puede variar para que cumpla la condición de Bragg. N es el índice refractivo efectivo del modo guiado en la guía de onda plana y λ es la longitud de onda de vacío de la luz que se propaga a través de la guía de onda plana 2.

10

[0031] Una vista en planta de la guía de onda plana 2 del dispositivo de la Fig. 1 con una ilustración ampliada de los sitios de unión 5 dispuestos a lo largo de las líneas rectas predeterminadas 7 se proporciona en la Fig. 3. En la ilustración ampliada, la luz del campo evanescente 11 se representa por flechas paralelas que se aproximan a las líneas rectas predeterminadas 7, que están dispuestas bajo un ángulo β conocido a ello. Las líneas rectas predeterminadas 7 están dispuestas paralelas una a otra con una distancia constante d . La luz coherente difractada 12 difractada en las muestras objetivo 6 unidas a los sitios de unión 5 dispuestas a lo largo de las líneas rectas predeterminadas 7 tiene para ángulos predeterminados una diferencia en la longitud de ruta óptica que es un número entero múltiplo de la longitud de onda. La luz coherente difractada 12 tiene para esos ángulos predeterminados una intensidad máxima. El ángulo de difracción descrito es el primer ángulo bajo el cual se produce tal máximo en intensidad. De hecho, este es el dibujo bien conocido que representa el principio de difracción de Bragg en el cual la luz se difracta en "estructuras de cristal" para interferir constructivamente en ciertas direcciones. Esta ilustración no es correcta en tanto que los sitios de unión 5 y de esta forma las muestras objetivo 6 unidas a los sitios de unión 5 no están dispuestos a lo largo de las líneas rectas predeterminadas 7 en el orden regular mostrado. La disposición de estos se desvía en cierta medida tanto, a lo largo de estas líneas como perpendicular a estas líneas sin perder el máximo de intensidad de la luz coherente difractada 12.

[0032] En la Fig. 4 la disposición de las líneas rectas predeterminadas 7 en una zona efectiva 71 en la guía de onda plana 2 se representa de forma explicativa. La construcción de la zona efectiva 71 se muestra con respecto a la luz coherente que se propaga a través de la guía de onda plana 2. Asumiendo una densidad uniforme de los centros de difracción en la zona efectiva 71, en principio, cuanto mayor sea el área de la zona efectiva 71, mayor será el número de centros de difracción que contribuirán a la luz coherente difractada 12. El área de la zona efectiva 71 se selecciona principalmente en dependencia de la fuerza de la señal detectada para que sea adecuada para la detección de las afinidades de unión. Dado que la longitud del acoplador óptico 41 es fija, el ancho de la zona efectiva 71 se fija para que sea equivalente a ella. Esto permite la iluminación de la zona efectiva total 71 por el campo evanescente 11, como se muestra por las flechas paralelas lateralmente que limitan el ancho de la zona efectiva 71. La longitud de la zona efectiva 71 es tal que por un lado la luz coherente difractada 12 incide completamente en el acoplador óptico adicional 8 mientras que por el otro lado, el acoplador óptico adicional 8 solamente está iluminado por la luz coherente difractada 12 desde los centros de difracción en la zona efectiva 11. La separación lateral de la luz coherente difractada 12 desde el campo evanescente 11 limita la luz que incide en el acoplador óptico adicional 8 a la luz coherente difractada 12 de los centros de difracción en la zona efectiva 71 y evita la luz de fondo adicional en la región 10 a través de la cual, aparte de la luz difractada 12, no se propaga ninguna otra luz.

[0033] En la Fig. 5, dos ejemplos para rutas ópticas diferentes de luz se ilustran por las flechas para el campo evanescente 11, las flechas para la luz coherente difractada 12 así como para la luz 13 que interfiere en la ubicación de detección 9. En principio, una multiplicidad de haces paralelos empieza en el acoplador óptico 41 para difractarse en toda el área de la zona efectiva 71 en la cual están dispuestas las líneas rectas predeterminadas 7. La luz coherente difractada 12 se propaga hacia el acoplador óptico adicional 8 con diferencia en la ruta óptica de un número entero múltiplo de la longitud de onda predeterminada. La luz coherente difractada 12 incide en el acoplador óptico adicional 8 de tal forma que esté acoplada fuera de la guía de onda plana 2. El acoplador óptico adicional 8 se representa como rejilla óptica con una pluralidad de líneas de rejilla 81. Las líneas de rejilla 81 están formadas de tal modo que la luz coherente difractada 12 que incide al respecto está acoplada fuera de la guía de onda plana 2 y está centrada en la ubicación de detección 9. Para centrar la luz 13 acoplada fuera de la guía de onda plana en la ubicación de detección 9, cada una de las pluralidades de líneas de rejilla 81 tiene una curvatura respectiva y las líneas están dispuestas con una distancia decreciente entre las líneas de rejilla adyacentes 81 en la dirección de propagación de la luz coherente difractada 12. Esto permite la difracción de la luz de una longitud de onda predeterminada "idealmente" en un punto de enfoque único con una diferencia en la longitud de ruta óptica que es un número entero múltiplo de la longitud de onda predeterminada. Una sección en blanco 82 está formada en el acoplador óptico adicional 8 para evitar un reflejo de Bragg de segundo orden o efectos ópticos similares, que

reducen potencialmente la intensidad total de la señal detectada.

[0034] Un aspecto ventajoso de la presente invención se muestra en la **Fig. 6**, donde la guía de onda plana 2 del dispositivo de la Fig. 1 comprende dos pluralidades de líneas rectas predeterminadas 7. Las dos pluralidades de líneas rectas predeterminadas 7 tienen una distancia diferente entre las líneas rectas predeterminadas adyacentes 7. En general, la distancia diferente entre las líneas rectas predeterminadas adyacentes 7 permite la detección de las afinidades de unión para muestras que tienen un índice refractivo diferente bajo el mismo ángulo de difracción "fijo". Cada índice refractivo diferente de la muestra da lugar a un índice refractivo efectivo diferente para la luz que se propaga a través de la guía de onda plana 2. Generalmente, el índice refractivo efectivo del modo guiado en la guía de onda plana depende del grosor y el índice refractivo de la guía de onda plana 2, el índice refractivo del sustrato, el índice refractivo de un medio en la superficie exterior 21 de la guía de onda plana 2 y la polarización del modo guiado. De este modo, el campo evanescente 11 de la luz que se propaga a través de la guía de onda plana 2 tiene una longitud de ruta óptica específica diferente entre las líneas adyacentes para diferentes muestras en la guía de onda. En la práctica, el índice refractivo del medio en la superficie exterior 21 de la guía de onda plana 2 no es exactamente conocido. De manera ventajosa, la pluralidad de líneas rectas predeterminadas 7 con distancias diferentes permite detectar una señal para un índice refractivo desconocido en un rango de índices refractivos detectables conocidos que podrían variar en el segundo o tercer decimal del índice refractivo de muestra a muestra. Para la detección de las afinidades de unión, es suficiente si una pluralidad única de líneas rectas predeterminadas 7 muestra una señal detectable. Como se muestra, al menos dos pluralidades de líneas rectas predeterminadas 7 están dispuestas en la guía de onda plana 2 en la dirección de propagación del campo evanescente 11. La luz coherente 12 acoplada en la guía de onda plana 2 es difractada por las muestras objetivo 6 unidas a los sitios de unión 5 de cada pluralidad de líneas rectas predeterminadas 7. Un acoplador óptico adicional 8 se proporciona en cada pluralidad de líneas rectas predeterminadas 7 para que la luz incida bajo un ángulo de difracción relativo a las líneas rectas en una región 10 fuera del haz de luz coherente.

[0035] La **Fig. 7** se refiere de nuevo a la idea de disponer al menos dos pluralidades de líneas rectas predeterminadas 7 en la guía de onda plana 2. Esto se ilustra por la disposición de tres pluralidades de líneas rectas predeterminadas 7 con la pluralidad en el lado izquierdo marcada como que dispone de una primera distancia constante $d_{1...24}$ entre las líneas rectas adyacentes 7 fuera de un número de 24 distancias constantes. Esto se refiere a la idea de que 24 pluralidades de líneas rectas predeterminadas 7 están dispuestas cada una disponiendo de una distancia constante diferente d entre las líneas rectas adyacentes. Como ejemplo, la distancia d_1 entre las líneas predeterminadas adyacentes es 446 nm y la distancia d_2 entre las líneas predeterminadas adyacentes es 447 nm. 24 pluralidades de líneas rectas predeterminadas es un número escogido de forma arbitraria que proporciona en el presente ejemplo un rango de 24 distancias diferentes entre 446 nm a 469 nm en pasos de 1 nm. Los pasos mencionados proporcionan un rango suficiente para abarcar la variación esperada de índices refractivos efectivos en el segundo o tercer decimal (correspondiente a una variación de índice refractivo efectivo en el rango de por ciento a por mil).

[0036] Una segunda realización de la invención se proporciona en el dispositivo mostrado en las Figs. 9 y 10, que representan el dispositivo antes de la preparación, así como cuando está correctamente preparado para su uso. Dicho dispositivo se prepara con la máscara 14 mostrada en la Fig. 8.

[0037] La **Fig. 8** muestra la máscara 14 para su uso en un método fotolitográfico para la disposición de los sitios de unión 5 en la superficie exterior 21 de la guía de onda plana 2 a lo largo de las líneas rectas predeterminadas 7. Tal máscara 14 comprende un patrón al respecto adecuado para transferir líneas rectas predeterminadas 7 en la superficie exterior 21. El patrón se utiliza en procedimientos fotolitográficos para fijar los sitios de unión en líneas rectas predeterminadas 7 en la superficie exterior 21 de la guía de onda plana 2. El dispositivo que aún no está preparado se muestra en la **Fig. 9**. Los métodos fotolitográficos ejemplifican cualquier método apropiado para la disposición de las líneas rectas predeterminadas 7 en la superficie exterior 21 de la guía de onda plana 2. En general, cada método conocido en la técnica adecuado para estructurar los sitios de unión en la escala de nanómetro a micrómetro se puede emplear para disponer los sitios de unión al respecto. En la **Fig. 10** el dispositivo preparado se muestra con 24 pluralidades de líneas rectas predeterminadas 7. Las 24 pluralidades de líneas rectas predeterminadas 7 están dispuestas en una línea con respecto a una de las tres porciones independientes 411, 412, 413 de forma que la luz coherente acoplada a través de cada una de dichas porciones independientes se difracte en ocho pluralidades de líneas rectas predeterminadas 7 dispuestas una tras otra. Las 24 pluralidades de las líneas rectas predeterminadas 7 están dispuestas en tres filas paralelas que tienen una distancia entremedio que forma una porción 10 de la guía de onda plana 2 fuera de los haces paralelos de luz coherente que se propaga a través de la guía de onda plana. El acoplador óptico 41 comprende tres porciones independientes 411, 412, 413 para el acoplamiento de tres haces paralelos de luz coherente en la guía de onda plana 2. Las tres

porciones independientes 411, 412, 413 que forman el acoplador óptico están dispuestas en una fila y están separadas lateralmente por una distancia predeterminada desde la porción independiente adyacente. De este modo, los haces paralelos de la luz coherente se propagan a través de la guía de onda plana 2 separados por esta distancia predeterminada. Cada porción independiente 411, 412, 413 tiene una longitud predeterminada igual al ancho de la pluralidad de líneas rectas predeterminadas 7 dispuestas en una fila única de pluralidades. Cada porción independiente 411, 412, 413 acopla un haz de luz coherente en la guía de onda plana. Entremedio hay tres porciones 10 en la superficie exterior 21 de la guía de onda plana 2 que están fuera de los haces de luz coherente. Las porciones 10 se utilizan para disponer el acoplador óptico adicional 8 respectivamente a cada pluralidad de líneas rectas predeterminadas 7. La luz coherente que no es difractada por las muestras objetivo unidas a los sitios de unión dispuestas a lo largo de las líneas rectas predeterminadas 7 se propaga a través de la guía de onda plana al acoplador óptico adicional 42 para el acoplamiento fuera de la luz que se propaga a través de la guía de onda plana 2 que no se difracta en las muestras objetivo unidas a los sitios de unión dispuestos a lo largo de las líneas rectas predeterminadas 7.

15 **[0038]** Las Fig. 11, Fig. 12 y Fig. 13 ilustran ejemplos para la difracción de la luz del campo evanescente 11. La luz 11 se difracta en las muestras objetivo 6 unidas a los sitios de unión 5 dispuestos a lo largo de las líneas predeterminadas 7 de una distancia d de forma que se contribuya a un máximo en una ubicación de detección predeterminada. Las ilustraciones mostradas son bien conocidas a partir de la descripción de la difracción de Bragg en "estructuras de cristal". En principio, la condición de Bragg $2n\sin(\alpha)=k\lambda$ describe los ángulos bajo los cuales se puede detectar una intensidad máxima de luz difractada. Debido a la disposición paralela de las líneas rectas predeterminadas 7 a una distancia constante d entre las líneas adyacentes, la luz del campo evanescente 11 difractada en líneas subsiguientes interfiere bajo ángulos de difracción predeterminados de forma que tenga una diferencia en la longitud de ruta óptica de un número entero múltiplo de la longitud de onda predeterminada de la luz que se propaga a través de la guía de onda plana 2. De este modo, los haces paralelos mostrados 12 de la luz difractada interfieren en esos ángulos de difracción de forma que tengan una diferencia en la longitud de ruta óptica de un número entero múltiplo de la longitud de onda predeterminada de la luz de propagación. Las muestras mostradas ejemplifican las muestras objetivo 6 unidas a los sitios de unión sin ninguna precondición al tipo de sitios de unión así como al tipo de muestras objetivo 6. Para la interferencia constructiva, es fundamental disponer los sitios de unión a los cuales se pueden unir las muestras objetivo o no a lo largo de las líneas rectas predeterminadas 7 de forma que la luz interfiera de forma constructiva bajo las condiciones prescritas.

[0039] En la Fig. 11, los sitios de unión comprende un tipo único de moléculas de captura. La detección de las afinidades de unión prueba la capacidad de las moléculas de captura de unir las muestras objetivo 6 o no, observando en realidad la unión de las muestras objetivo 6 a las moléculas de captura. Las moléculas de captura están fijadas en este primer ejemplo a la superficie exterior de la guía de onda plana para estar dispuestas a lo largo de las líneas rectas predeterminadas 7 únicamente.

[0040] De acuerdo con otro ejemplo mostrado en las Fig. 12 y Fig. 13, las moléculas de captura 5 son capaces de unir las muestras objetivo 6 que están dispuestas a lo largo de las líneas rectas predeterminadas 7 mediante la disposición de las moléculas de captura 5 capaces de unir las muestras objetivo 6 sobre la superficie exterior completa de la guía de onda plana y mediante la desactivación de esas moléculas de captura 51 que no están dispuestas a lo largo de las líneas rectas predeterminadas 7.

[0041] Esto se consigue por el hecho de que las moléculas de captura están inmovilizadas sobre la superficie exterior (completa) de la guía de onda plana, de forma que no haya disposición de las moléculas de captura a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas 7 únicamente. De este modo, la luz del campo evanescente 11 difractada por las moléculas de captura 5 y las moléculas de captura 51 no interfiere en el acoplador óptico adicional en la manera descrita más arriba para la luz coherente difractada 12.

50 **[0042]** Posteriormente, las moléculas de captura 51 dispuestas entre las líneas predeterminadas 7 están desactivadas de forma que ninguna muestra objetivo 6 pueda unirse a estas moléculas de captura desactivadas 51 nunca más. Como se muestra en la Fig. 12, la desactivación se lleva a cabo de tal forma que después de la desactivación, la señal global en el acoplador óptico adicional (no se han añadido aún muestras objetivo 6) producida por las moléculas de captura desactivadas 51 y las moléculas de captura 5 capaces de unir las muestras objetivo se establezca o ajuste a una señal mínima ajustada (de forma que interfiera de manera destructiva) en la ubicación de detección, idealmente a cero. La luz 121 difractada en las moléculas de captura desactivadas 51 así como en las moléculas de captura 5 tiene una diferencia en la longitud de ruta óptica con el fin de añadir a un mínimo en una ubicación de detección predeterminada. Las líneas mostradas de las moléculas de captura 5 y las moléculas de captura desactivadas 51 son líneas "ideales" pero proporcionan una aproximación suficiente dado que

la luz difractada de las moléculas de captura 5 y las moléculas de captura desactivadas 51 dispuestas distintas de (o en la proximidad de) la pluralidad de líneas "ideales" predeterminadas 7 en principio se elimina en sí misma.

5 **[0043]** Alternativamente, la señal mínima antes de la aplicación de las muestras objetivo se puede conseguir por el hecho de que las moléculas de captura 5 y las moléculas de captura desactivadas 51 se aplican posteriormente de modo que en un primer paso, las moléculas de captura 5 se aplican a la superficie exterior de la guía de onda plana a lo largo de la pluralidad de líneas rectas predeterminadas 7 (comparable a la Fig. 11). En un paso posterior, las moléculas de captura desactivadas 51 se aplican entremedio de las líneas de la pluralidad de líneas rectas predeterminadas 7.

10 **[0044]** En el último paso, las muestras objetivo se añaden a la superficie exterior de la guía de onda plana. Dado que solamente las moléculas de captura dispuestas a lo largo de las líneas predeterminadas 7 son capaces de unir las muestras objetivo 6, las muestras objetivo 6 se unen a esas moléculas de captura a lo largo de las líneas predeterminadas 7, como se muestra en la Fig. 13. Debido a que la señal en la ubicación de detección causada por las moléculas de captura desactivadas 51 y las moléculas de captura se ha establecido en o ajustado a un mínimo antes (véase la Fig. 12), la señal en la ubicación de detección es causada entonces principalmente (o completamente, si la señal producida por las moléculas de captura desactivadas 51 y las moléculas de captura 5 se reducido a cero antes) por la luz 12 la cual ha sido difractada por las muestras objetivo 6 unidas a las moléculas de captura dispuestas a lo largo de las líneas predeterminadas 7.

15 **[0045]** Aunque las formas de realización de la invención se han descrito con la ayuda de los dibujos, diversas modificaciones y cambios en las formas de realización descritas son posibles sin salirse de la enseñanza general subyacente a la invención. Por tanto, la invención no se debe entender como que está limitada a las formas de realización descritas, sino más bien al alcance de protección que se define por las reivindicaciones.

20
25

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para uso en la detección de afinidades de unión, comprendiendo el dispositivo una guía de onda plana (2) dispuesta en un sustrato (3) y comprendiendo además un acoplador óptico (41) que tiene una longitud predeterminada, comprendiendo el acoplador óptico (41) una rejilla óptica definida por las líneas que tienen una longitud, con la longitud predeterminada del acoplador óptico (41) que es la longitud de las líneas que definen la rejilla óptica, para el acoplamiento de la luz coherente (1) de una longitud de onda predeterminada en la guía de onda plana (2) de tal forma que un haz paralelo de luz coherente se propague a través de la guía de onda plana (2) con un campo evanescente (11) de la luz coherente que se propaga a lo largo de una superficie exterior (21) de la guía de onda plana (2), comprendiendo la superficie exterior (21) de la guía de onda plana (2) los sitios de unión (5) al respecto capaz de unir las muestras objetivo (6) a los sitios de unión (5) de tal forma que la luz del campo evanescente (11) sea difractada por las muestras objetivo (6) unidas a los sitios de unión (5), donde los sitios de unión (5) están dispuestos a lo largo de una pluralidad de líneas rectas predeterminadas (7) que se ejecutan paralelas una a otra con una distancia constante entre las líneas rectas adyacentes, estando las líneas rectas predeterminadas de la pluralidad de líneas rectas predeterminadas (7) dispuestas en un ángulo (β) con respecto a la dirección de propagación del campo evanescente (11) de tal forma que la luz coherente (12) difractada por las muestras objetivo (6) unidas a los sitios de unión (5) incida bajo un ángulo de difracción (α) con respecto a las líneas rectas predeterminadas sobre un acoplador óptico adicional (8) dispuesto en una porción (10) de la guía de onda plana (2) fuera del haz paralelo de la luz coherente que se propaga a través de la guía de onda plana (2), acoplando el acoplador óptico adicional (8) la luz coherente difractada (12) fuera de la guía de onda plana (2) de tal forma que interfiera en una ubicación de detección predeterminada (9) con una diferencia en la longitud de ruta óptica que es un número entero múltiplo de la longitud de onda predeterminada, donde la distancia constante (d) entre las líneas rectas adyacentes (7) se selecciona de tal forma que cumpla la condición de Bragg

$$2Ndsin(\alpha) = k\lambda$$

donde

N es el índice refractivo efectivo del modo guiado en la guía de onda plana,
 d es la distancia entre las líneas rectas predeterminadas adyacentes,
 α es el ángulo de difracción,
 K es el número de la intensidad máxima, y
 λ es la longitud de onda de vacío de la luz de propagación,

y donde el acoplador óptico adicional (8) comprende una pluralidad de líneas de rejilla (81), teniendo cada una de la pluralidad de líneas de rejilla (81) una curvatura respectiva y distancia entre líneas de rejilla adyacentes (81) de forma que el acoplador óptico adicional (8) sea capaz de acoplar la luz coherente difractada (12) fuera de la guía de onda plana (2) de tal forma que interfiera en una ubicación de detección predeterminada (9) con una diferencia en la longitud de ruta óptica que es un número entero múltiplo de la longitud de onda predeterminada y donde la pluralidad de líneas de rejilla (81) tiene un eje de simetría que se extiende con respecto a las líneas rectas predeterminadas (7) bajo el ángulo de difracción (α).

2. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, donde las líneas rectas predeterminadas (7) están dispuestas en el ángulo (β) de $22,5^\circ$ relativo a la dirección de propagación del campo evanescente (11) y donde la luz coherente (12) difractada por las muestras objetivo (6) unidas a los sitios de unión (5) incide bajo el ángulo de difracción (α) de $22,5^\circ$ relativo a las líneas rectas predeterminadas (7) sobre el acoplador óptico adicional (8).

3. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la pluralidad de líneas rectas predeterminadas (7) está dispuesta en una zona efectiva (71) en la guía de onda plana (2), teniendo la zona efectiva (71) un ancho equivalente a la longitud del acoplador óptico (41) de forma que la zona efectiva completa (71) sea iluminada por el campo evanescente (11) de la luz coherente acoplada en la guía de onda plana (2) por el acoplador óptico (41).

4. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde al menos dos pluralidades de líneas rectas predeterminadas (7) están dispuestas en la guía de onda plana (2), una tras otra en la dirección de propagación del campo evanescente (11) con un acoplador óptico adicional respectivo (8) que está dispuesto con respecto a cada pluralidad de líneas rectas predeterminadas (7) de tal forma que la luz coherente (12) difractada por las muestras objetivo (6) unidas a los sitios de unión (5) dispuestos a lo largo de las líneas rectas de la

pluralidad respectiva de líneas rectas (7) incide en un ángulo de difracción (α) sobre el acoplador óptico adicional respectivo (8).

5. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 4, donde al menos dos pluralidades de líneas rectas 5 predeterminadas (7) tienen cada una la misma distancia constante d entre las líneas rectas adyacentes.

6. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 4, donde al menos dos pluralidades de líneas rectas predeterminadas (7) tienen cada una, una distancia constante diferente $d_{1...n}$ entre las líneas rectas adyacentes.

10 7. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 6, donde la distancia constante $d_{1...n}$ entre las líneas rectas adyacentes de las pluralidades adyacentes de las líneas rectas predeterminadas (7) difiere, en pasos iguales en el rango de 0,5 a 10 nm.

8. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 4, donde al menos dos pluralidades de líneas rectas 15 predeterminadas (7) incluyen grupos de pluralidades de líneas rectas predeterminadas (7), teniendo cada grupo una distancia constante igual d entre las líneas rectas adyacentes y donde diferentes grupos de pluralidades de líneas rectas predeterminadas (7) tienen una distancia constante diferente $d_{1...n}$ entre las líneas rectas adyacentes.

9. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el acoplador óptico 20 (41) comprende al menos dos porciones independientes (411, 412, 413) para el acoplamiento de haces paralelos de luz coherente (1) de la longitud de onda predeterminada en la guía de onda plana (2), teniendo cada porción independiente (411, 412) una longitud predeterminada y estando lateralmente separadas por una distancia predeterminada desde la porción independiente adyacente (411, 412, 413) del acoplador óptico (41) de tal forma que los haces paralelos de la luz coherente se propague a través de la guía de onda plana (2) separada por la distancia 25 predeterminada.

10. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los sitios de unión 30 (5) comprenden las moléculas de captura fijadas a la superficie exterior (21) de la guía de onda plana (2) a lo largo de las líneas rectas predeterminadas (7) únicamente, siendo capaces las moléculas de captura de unir las muestras objetivo (7).

11. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 9, donde los sitios de unión (5) 35 comprenden las moléculas de captura capaces de unir las muestras objetivo (6) estando las moléculas de captura capaces de unir las muestras objetivo (6) dispuestas a lo largo de las líneas rectas predeterminadas (7) mediante la inmovilización de las moléculas de captura (6) capaces de unir las muestras objetivo sobre la superficie exterior (21) de la guía de onda plana (2) y mediante la desactivación de esas moléculas de captura que no están dispuestas a lo largo de las líneas rectas predeterminadas (7).

12. Sistema para la detección de las afinidades de unión que comprende un dispositivo de acuerdo con 40 cualquiera de las reivindicaciones precedentes y que comprende además una fuente de luz para la emisión de luz coherente (1) de una longitud de onda predeterminada, estando la fuente de luz y el dispositivo dispuestos uno con respecto al otro de tal forma que la luz coherente (1) emitida por la fuente de luz esté acoplada en la guía de onda plana (2) a través del acoplador óptico (41).

45 13. Sistema de acuerdo con la reivindicación 12, donde la fuente de luz y el dispositivo están dispuestos de forma ajustable uno con respecto al otro para el cambio del ángulo de acoplamiento bajo el cual la luz coherente (1) emitida por la fuente de luz está acoplada a través del acoplador óptico (41) en la guía de onda plana (2) y donde la fuente de luz es ajustable para emitir la luz de una longitud de onda predeterminada en un rango predeterminado.

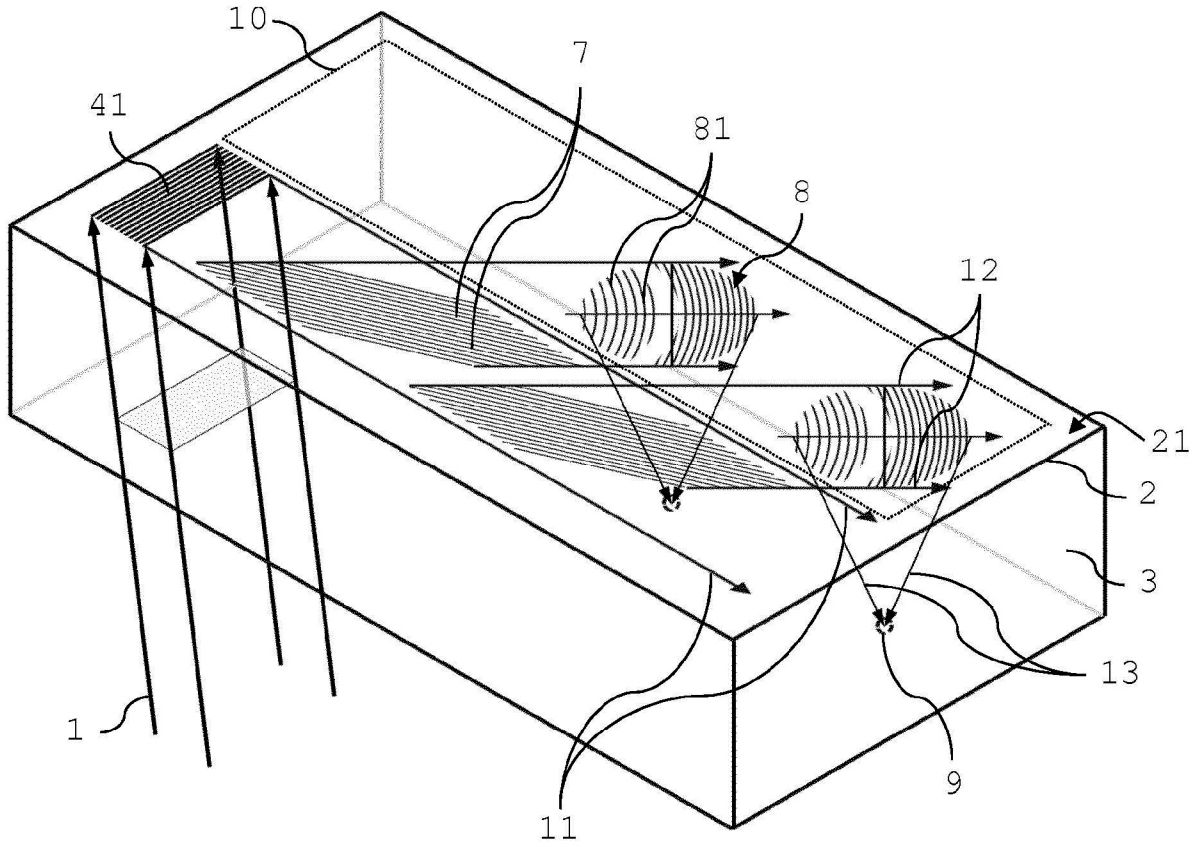


Fig. 1

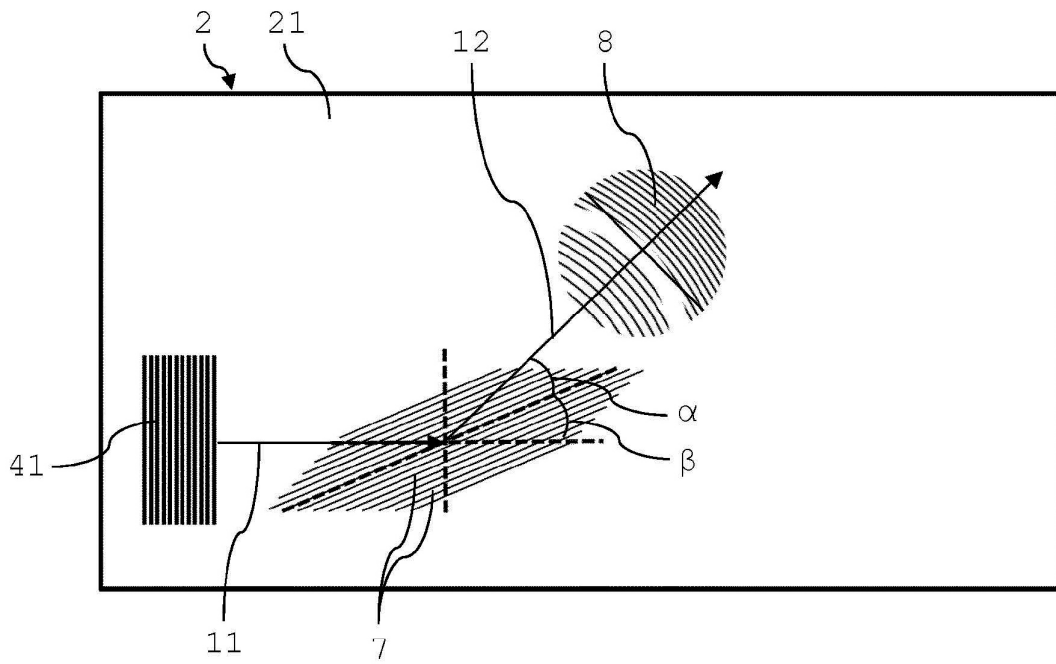


Fig. 2

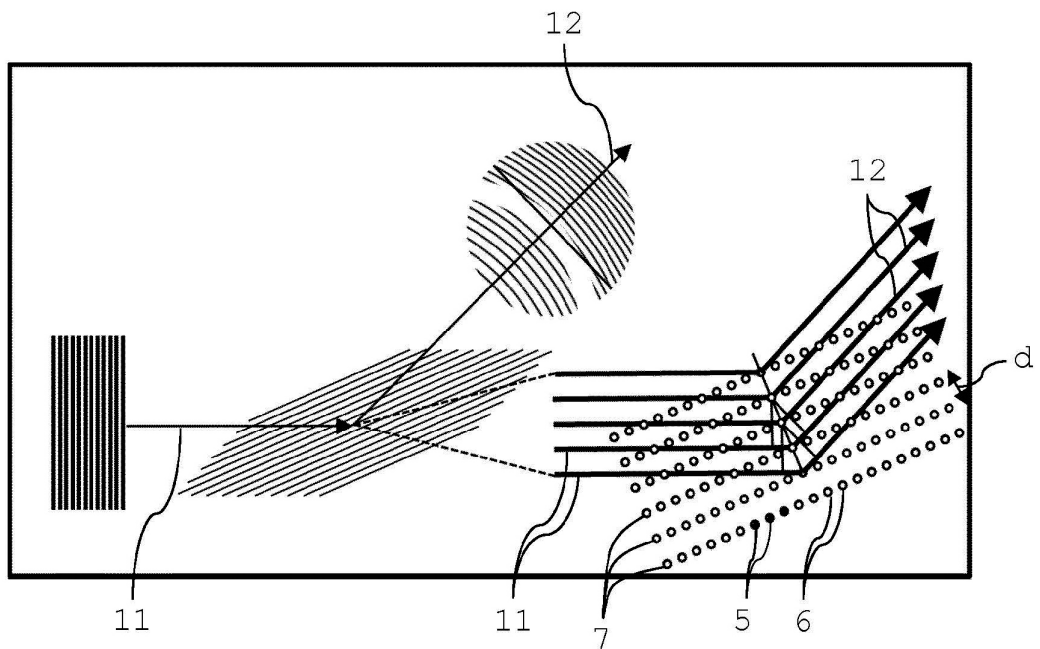


Fig. 3

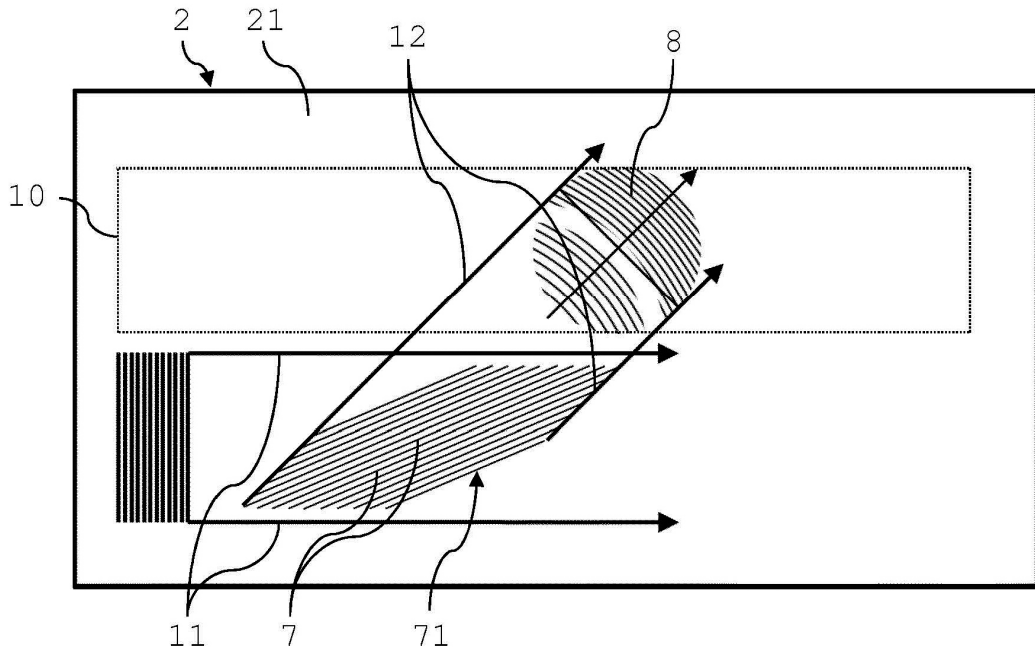


Fig. 4

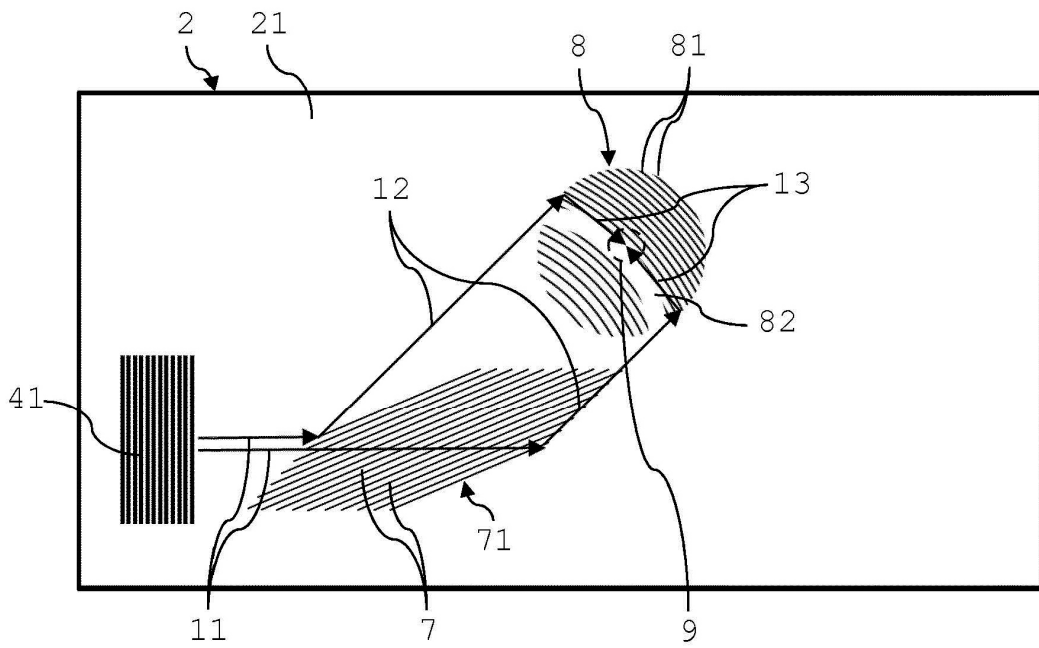


Fig. 5

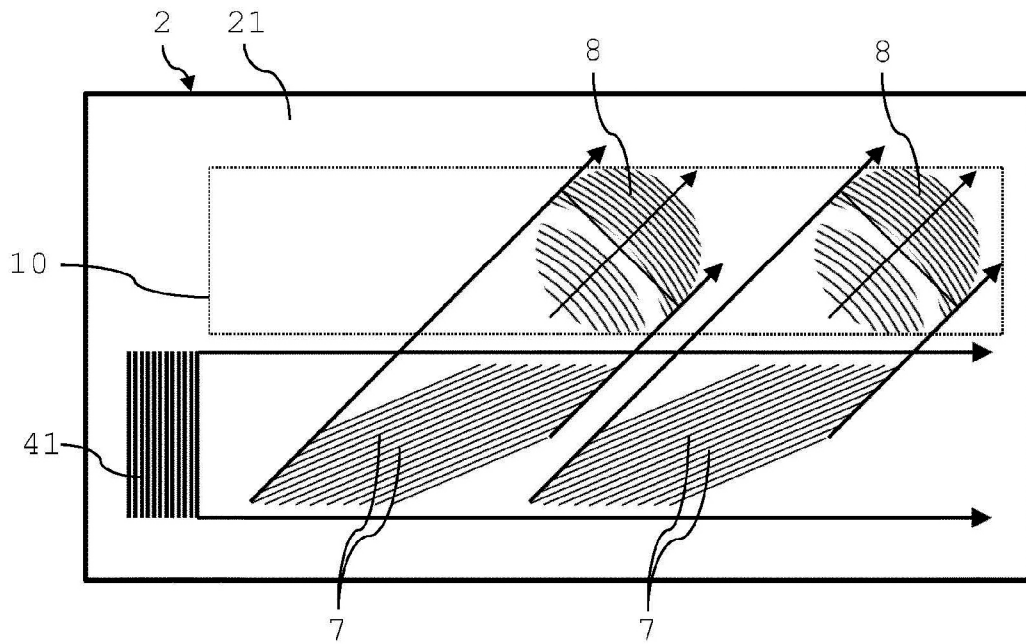


Fig. 6

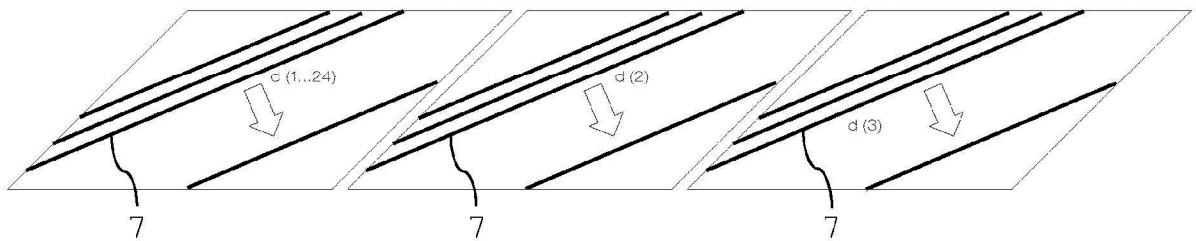


Fig. 7

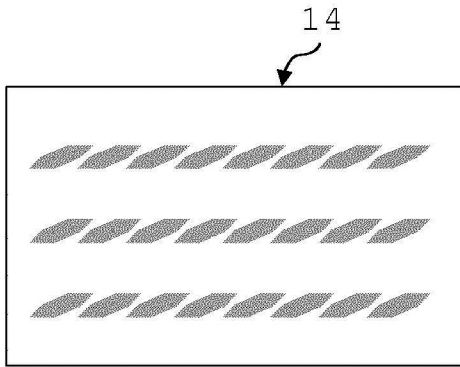


Fig. 8

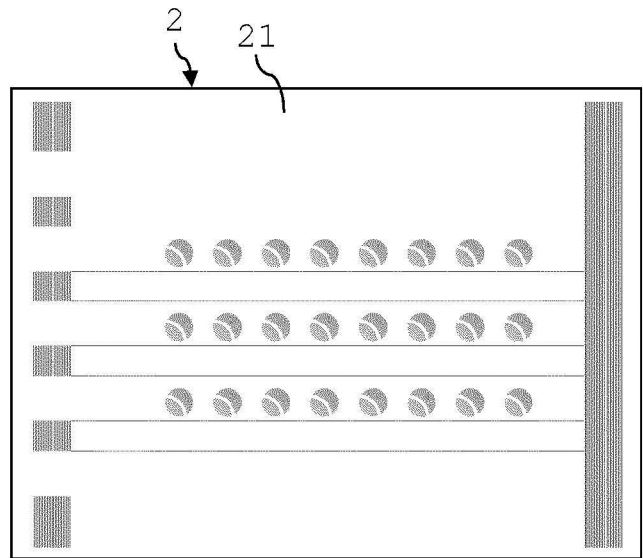


Fig. 9

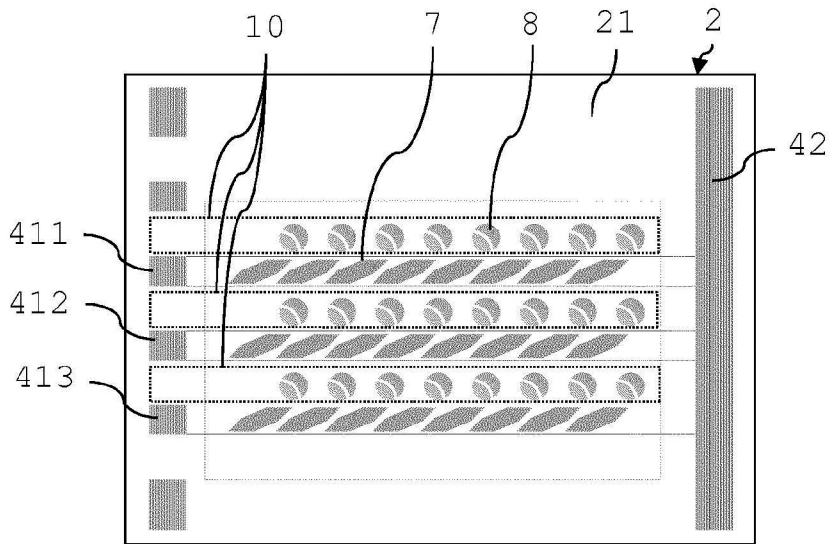


Fig. 10

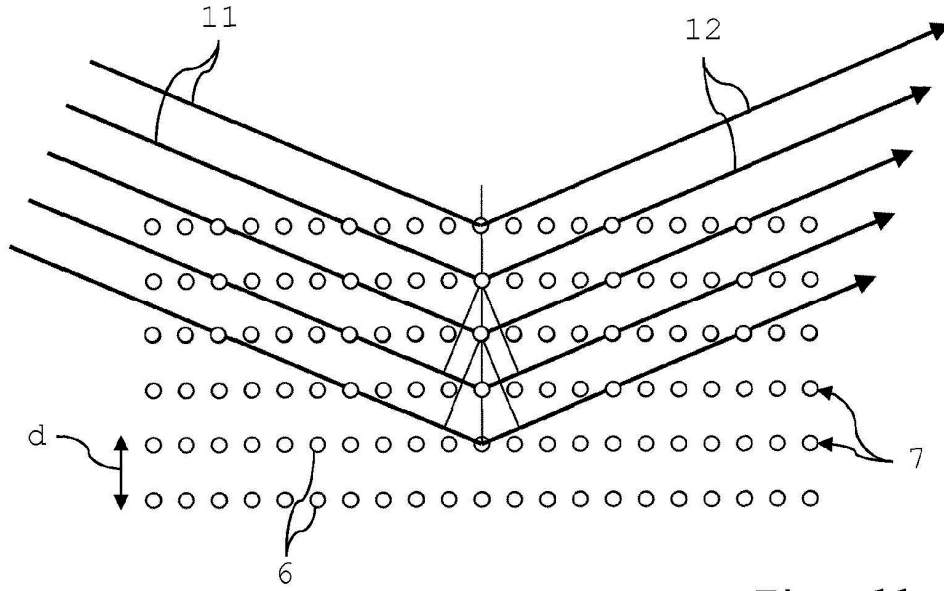


Fig. 11

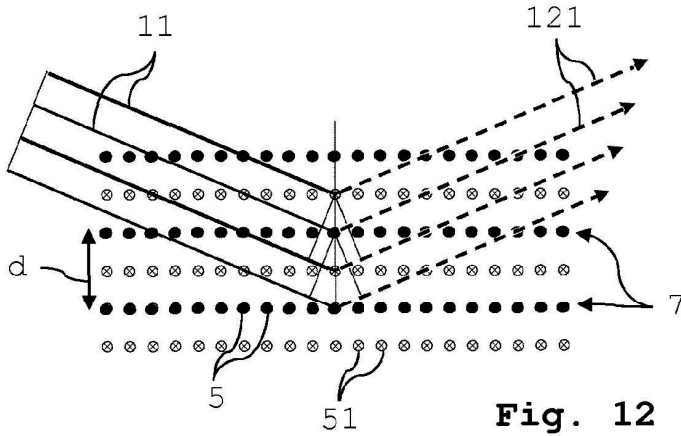


Fig. 12

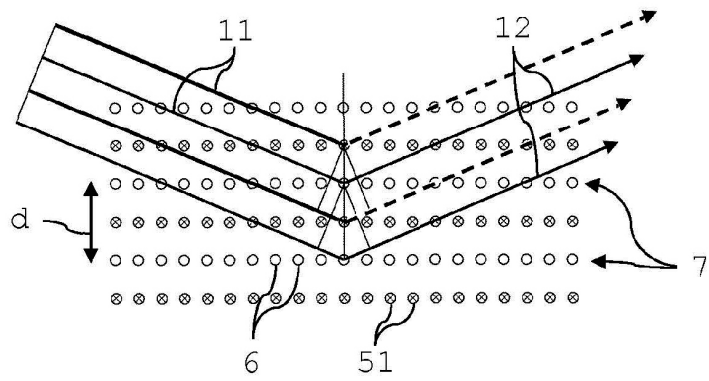


Fig. 13