

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 951**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2014 PCT/EP2014/050902**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014 WO14111521**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2014 E 14701322 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2946210**

54 Título: **Procedimiento para preparar una superficie externa de una guía de ondas planar capaz de unir muestras objetivo a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas y una guía de ondas planar**

30 Prioridad:

17.01.2013 EP 13151646

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

11.06.2018

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 2 671 951 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

Procedimiento para preparar una superficie externa de una guía de ondas planar capaz de unir muestras objetivo a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas y una guía de ondas planar

5

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una superficie externa de una guía de ondas planar que sea capaz de unir muestras objetivo a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas.

[0002] En campos técnicos remotos que no están relacionados con las guías de ondas, se conoce el patrón de nanoestructuras en superficies de metal, como el titanio nativo (por ejemplo, "Getachew Tizazu *et al.*, Large area nanopatterning of alkylphosphonate self-assembled monolayers on titanium oxide surfaces by interferometric photolithography", *Nanoscale*, 2011, 3, 2511, publicado el 23 de marzo de 2011 en <http://pubs.rsc.org>, doi:10.1039/C0NR00994F). Los metales, generalmente, no son adecuados para formar una guía de ondas planar. La preparación de superficies de metal no proporciona ninguna pista para la preparación de una superficie externa de una guía de ondas planar. En particular, el titanio nativo no es un material adecuado para ser utilizado en una guía de ondas planar.

[0003] El campo de aplicación de la presente invención es la detección de eventos vinculantes. Dispositivos conocidos detectan eventos vinculantes de una muestra objetivo con una molécula capturadora mediante el uso de etiquetas que son capaces de emitir luz fluorescente en excitación. Por ejemplo, las etiquetas fluorescentes pueden utilizarse como marcas para etiquetar las muestras objetivo. En excitación, las etiquetas fluorescentes pueden provocar la emisión de luz fluorescente que tiene un espectro de emisión característico. La detección de este espectro de emisión característico en un punto particular indica que la molécula diana marcada se ha unido al tipo particular de molécula capturadora presente en el respectivo punto particular en la superficie externa de la guía de ondas planar. En el artículo "Zeptosens' protein microarrays: A novel high performance for low abundance protein analysis", *Proteomics* 2002, 2, S. 383-393, Wiley-VCH Verlag GmbH, 69451 Weinheim, Alemania, se describe un sensor para detectar muestras objetivo marcadas.

[0004] La detección de luz fluorescente emitida por una etiqueta fluorescente se conoce de los documentos US 2006/057729 A1, US 2003/032043 A1, US 2003/017464 A1, US 2002/182603 A1 y US 2002/137096 A1.

[0005] Un novedoso dispositivo para la detección óptica de eventos vinculantes proporciona una forma ventajosa de superar la necesidad de etiquetas al detectar directamente la presencia de muestras objetivo en moléculas capturadoras. El dispositivo comprende una guía de ondas planar en la que la luz coherente se acopla por medio de un acoplador óptico de manera que la luz coherente se propaga a través de la guía de ondas planar con un campo evanescente de la luz coherente que se propaga a lo largo de una superficie externa de la guía de ondas planar. La superficie externa de la guía de ondas planar se prepara para que sea capaz de unir muestras objetivo a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas de modo que la luz del campo evanescente es dispersada por muestras objetivo dispuestas a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas. La luz dispersa interfiere constructivamente en una ubicación de detección predeterminada para facilitar una señal detectable de la luz dispersa superpuesta desde las muestras objetivo.

[0006] Este novedoso dispositivo logra una alta sensibilidad de detección por superposición de luz coherente dispersa en muestras objetivo dispuestas a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas, este fenómeno físico se conoce como "difracción". La luz dispersa interfiere constructivamente, por ejemplo, en una ubicación de detección predeterminada a un máximo en intensidad, ya que las líneas de la pluralidad de líneas predeterminadas están dispuestas de manera que la luz dispersa en muestras objetivo en diferentes líneas tiene, en la ubicación de detección predeterminada, una diferencia en la longitud de camino óptico de un múltiplo entero de la longitud de onda de la luz que se propaga a través de la guía de ondas planar. La ubicación de detección predeterminada se debe disponer con respecto a la pluralidad de líneas predeterminadas para cumplir con los requisitos de interferencia constructiva. En ejemplos adicionales, la luz se difracta en la pluralidad de líneas predeterminadas para interferir en direcciones predeterminadas en la guía de ondas planar.

[0007] Por lo tanto, es un objeto de la invención proporcionar un procedimiento para preparar una superficie externa de una guía de ondas planar que sea capaz de unir muestras objetivo a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas.

[0008] Realizaciones ventajosas del procedimiento de acuerdo con la invención son el objeto de las respectivas reivindicaciones dependientes.

[0009] Según la invención, se proporciona un procedimiento para preparar una superficie externa de una guía de ondas planar de manera que sea capaz de unir muestras objetivo a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas. Las líneas predeterminadas están dispuestas de manera que en funcionamiento un campo evanescente de luz coherente acoplado y propagándose a través de la guía de ondas planar se dispersa en muestras objetivo dispuestas a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas para interferir constructivamente en una ubicación de detección predeterminada con una diferencia en la longitud de camino óptico que es un múltiplo entero de la longitud de onda de la luz coherente que se propaga a través de la guía de ondas planar, o las líneas predeterminadas están dispuestas de manera que en funcionamiento el campo evanescente de la luz coherente acoplada y propagándose a través de la guía de ondas planar se dispersa en muestras objetivo dispuestas a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas para interferir en direcciones predeterminadas dentro de la guía de ondas planar. El procedimiento comprende las etapas siguientes.

[0010] Proporcionar una guía de ondas planar que tiene una superficie externa adaptada para adherir un grupo de cabeza de una molécula enlazadora a la superficie externa.

[0011] A continuación, aplicar secuencialmente al menos una pluralidad de moléculas enlazadoras a la superficie externa. Cada pluralidad de la al menos una pluralidad de moléculas enlazadoras se ensambla para formar una capa individual de moléculas enlazadoras con placas individuales formadas una encima de la otra a partir de la superficie externa de la guía de ondas planar. Cada molécula enlazadora comprende al menos un grupo funcional y un grupo de cabeza que es capaz de adherirse a la superficie externa de la guía de ondas planar o a los grupos funcionales de la placa anterior de moléculas enlazadoras a través de la formación de un enlace covalente o absorbido por interacción electrostática. Los grupos funcionales de la pluralidad de moléculas enlazadoras de la capa superior están unidos a grupos protectores fotolábiles para que cada grupo funcional protegido por dicho grupo protector fotolábil no pueda unirse a un grupo funcional complementario de una molécula adicional.

[0012] Luego, exponer esos grupos protectores fotolábiles de la capa superior dispuesta a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas a la luz de una longitud de onda predeterminada para eliminar los grupos protectores fotolábiles expuestos de los grupos funcionales para que estos grupos funcionales sean capaces de unirse a un grupo funcional complementario de una molécula adicional.

[0013] Como resultado, la eliminación de los grupos protectores fotolábiles expuestos de los grupos funcionales define las ubicaciones geométricas de estos grupos funcionales que son capaces de unirse a un grupo funcional complementario de una molécula adicional. Las ubicaciones de los grupos funcionales se eligen para ser la pluralidad de líneas predeterminadas. Como se describe en la parte introductoria, la luz coherente dispersa en muestras objetivo en esas líneas interfiere constructivamente en una ubicación de detección predeterminada. Técnicamente, se prefiere la disposición en una pluralidad de líneas curvas predeterminadas que tienen una distancia decreciente entre líneas adyacentes. La disposición de líneas curvas con una distancia decreciente entre líneas adyacentes permite enfocar la luz difractada en una ubicación de detección predeterminada. La disposición de la pluralidad de líneas curvas predeterminadas incluye la disposición repetida de una serie de pluralidades de líneas predeterminadas una encima de la otra con el fin de proporcionar más focos separados (por ejemplo, rotando ligeramente cada pluralidad posterior de líneas predeterminadas con respecto a la pluralidad anterior de líneas predeterminadas). Cada una de las series de pluralidades de líneas predeterminadas puede ser de características químicas, biológicas o farmacéuticas diferentes. Alternativamente, se prefiere la disposición en líneas rectas para difractar la luz dentro del plano de la guía de ondas planar en la que la luz difractada interfiere en direcciones predeterminadas dentro de la guía de ondas planar. La exposición de estos grupos protectores fotolábiles dispuestos a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas puede llevarse a cabo completamente (idealmente se eliminan todos los grupos protectores fotolábiles) o parcialmente (se elimina una porción predeterminada de los grupos protectores fotolábiles, por ejemplo, 10 %, 20 %) con varios procedimientos fotolitográficos (por ejemplo, modo de contacto o fotolitografía de campo lejano), pero se lleva a cabo preferentemente mediante fotolitografía de campo cercano en la que la máscara fotolitográfica no tiene contacto con la guía de ondas, pero forma un pequeño espacio entre la máscara y la superficie externa de la guía de ondas (respectivamente, los grupos protectores fotolábiles expuestos de las moléculas enlazadoras que se puede llenar con un líquido durante la exposición de los grupos protectores fotolábiles en las moléculas enlazadoras adheridos a la superficie externa de la guía de ondas). La exposición en los procedimientos fotolitográficos incluye el uso de herramientas producidas por fotolitografía, como una máscara de fase elastómera para fotolitografía de modo de contacto de campo cercano, como se describe detalladamente en John A. Rogers *et al.*, Generating -90 nanometer features using nearfield contact-mode photolithography with an elastomeric phase mask, J. Vac. Sci. Technol. B 16(1), enero/febrero 1998, página 59 y siguientes.

[0014] La aplicación secuencial de la al menos una pluralidad de moléculas enlazadoras incluye dos ejemplos preferidos que se describen con más detalle a continuación. En una variante, una pluralidad de moléculas enlazadoras se aplica directamente a la superficie externa de la guía de ondas planar que se ensambla en una sola
5 capa individual. En otra variante, se aplica una primera pluralidad de moléculas enlazadoras a la superficie externa y posteriormente se aplica una segunda pluralidad de moléculas enlazadoras a la misma para que se ensamblen en solo dos capas individuales una encima de la otra. En cada ejemplo, los grupos funcionales de las moléculas enlazadoras ensamblados en la capa superior de moléculas enlazadoras se vinculan a grupos protectores fotolábiles. Esto se puede lograr antes o después de la aplicación de la pluralidad superior de moléculas
10 enlazadoras. La capa superior o, en otras palabras, la capa más externa, permite la disposición de una máscara fotolitográfica para que la capa más externa pueda ser iluminada por fotolitografía directamente a través de la misma.

[0015] Las “moléculas” en el sentido de la presente aplicación incluyen una amplia gama de significados, pero se refiere, en principio, a la afiliación de dos o más átomos que están unidos entre sí mediante enlaces
15 químicos. El tipo y número de átomos no se limita, por lo que el término moléculas incluye explícitamente la composición de dos o más moléculas. El término moléculas no se limita a tipos específicos de enlaces inter e intramoleculares, así como a características químicas, farmacéuticas o físicas específicas. En particular, los conjuntos macromoleculares y moleculares se incluyen explícitamente en el término (por ejemplo, polímeros,
20 oligonucleótidos, ácidos nucleicos, proteínas, liposomas y péptidos). El término molécula se refiere principalmente a cualquier afiliación poliatómica estable sintética o natural.

[0016] Debe entenderse que, dentro del ámbito de la invención, los enlaces químicos pueden ser reemplazados por cualquier otro conjunto específico estable de interacciones moleculares como la interacción iónica,
25 la interacción hidrofóbica, la formación de complejos, enlaces de hidrógeno, la formación de fases fluoradas y similares, como resulta conocido por un experto en el campo.

[0017] Los “grupos funcionales” en el sentido de la presente solicitud son fracciones (secciones de moléculas) y moléculas (incluyendo biomoléculas) a las que puede unirse una fracción o molécula específica, en particular un grupo funcional complementario de una molécula adicional. Por ejemplo, una molécula enlazadora
30 comprende al menos un grupo funcional. Ejemplos de grupos funcionales son grupos funcionales ordinarios como los grupos amino, ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, tioéster, hidroxilo, mercapto, ácido borónico, alquino, azido, ciclooctileno, maleinimido, yodacetilo, aldehído, ceto, hidroxilamino, ciano, epoxi, ácido sulfónico. Otros ejemplos son grupos bifuncionales como un diol vecinal, un orto dialdehído aromático o un alcano alfa mercapto
35 amino (por ejemplo, cisteína N-terminal) y un adsorbente de quelato de metal orgánico o peptídico como el ácido nitrilotriacético (NTA) o complejos estables que forman poli-histidina con Ni²⁺, ADN monocatenario, estreptavidina, biotina, un receptor o su ligando. Otros ejemplos de grupos funcionales son las “etiquetas” que son reconocidas por enzimas para formar un enlace covalente entre una etiqueta y una “etiqueta” complementaria. Ejemplos de las mismas son las etiquetas Snap, las etiquetas Clip y las etiquetas Sortase.
40

[0018] También se incluyen interacciones múltiples de varios grupos funcionales de la pluralidad de las moléculas enlazadoras y grupos funcionales complementarios de una molécula adicional. Las interacciones múltiples podrían ser covalentes y no covalentes e incluyen también interacción hidrofóbica, lo que significa que el término grupo funcional también incluye fracciones hidrofóbicas capaces de interactuar con entidades hidrofóbicas
45 de la molécula adicional.

[0019] Por lo tanto, se incluye todo tipo de interacciones de grupos funcionales y grupos funcionales complementarios que generan la inmovilización de una molécula adicional.

[0020] Una “molécula adicional que tiene un grupo funcional complementario” es en el sentido de la presente solicitud, la molécula capturadora, la molécula capturadora modificada o una molécula enlazadora que comprende un grupo de cabeza de la pluralidad adicional aplicada de moléculas enlazadoras. Un grupo funcional complementario es capaz de reaccionar o interactuar con un grupo funcional de moléculas enlazadoras.

[0021] Un “grupo funcional complementario” en el sentido de la presente solicitud es una fracción (una sección de una molécula), una molécula o una biomolécula a la que se puede unir una fracción o molécula específica. Por ejemplo, el grupo funcional complementario de una molécula adicional es un grupo de cabeza de una molécula enlazadora, así como una sección de una molécula capturadora capaz de unirse al grupo funcional de una molécula enlazadora de la capa anterior. Por ejemplo, el ADN monocatenario complementario puede formar una

5 doble hélice por enlace de hidrógeno para llevar a cabo la química de acoplamiento octogonal. Otra opción es formar un enlace no covalente estable mediante el uso de interacciones proteína ligando. Ejemplos de grupos funcionales complementarios son el grupo funcional ordinario como NH₂-, COOH-, OH-, SH-, ácido sulfónico, un adsorbente quelato de metal orgánico o peptídico como el ácido nitrilotriacético (NTA) o la poli-histidina que forma complejos estables con Ni²⁺, un ADN monocatenario, estreptavidina, biotina, un receptor o su ligando. En general, los grupos funcionales complementarios pueden ser del mismo tipo que el grupo funcional para que los ejemplos mencionados de grupos funcionales se apliquen a grupos funcionales complementarios.

10 **[0022]** Las “moléculas captadoras” son cualquier tipo de objetivo molecular farmacéutico, biológico o químico al que puede unirse una muestra objetivo para la detección de eventos vinculantes. Por ejemplo, receptores biológicos, proteínas, liposomas, nanorreactores. En general, una “muestra objetivo” es una molécula diana en una muestra que puede unirse a la molécula captadora para la detección de eventos vinculantes.

15 **[0023]** “Enlace” y “evento vinculante” en el sentido de la presente solicitud incluye cualquier tipo de reconocimiento molecular y cualquier tipo de interacción molecular entre cualquier tipo de molécula captadora o sitio de unión de la misma y cualquier tipo de muestra objetivo. Esto incluye la unión real de dos o más uniones comunicantes, así como la acumulación de uniones comunicantes de interacción biomolecular (alquitrán lipo que tiene una proteína de canal).

20 **[0024]** El término “adherir” se usa de forma similar al acoplamiento y se refiere en general a cada tipo de unión química o física (o acoplamiento) para que una molécula (por ejemplo, el grupo de cabeza de la molécula enlazadora o la molécula captadora) se adhiera a la superficie externa de la guía de ondas planar o al grupo funcional de una molécula enlazadora a través de la formación de un enlace covalente o a través de la quimisorción o fisisorción mediante interacciones de van der Waals o electrostáticas o iónicas o enlaces de hidrógeno o formación de fase fluorosa. En general, se incluye cada tipo de unión química para que cada unión comunicante se una a una unión comunicante adicional. Se debe entender que ambas uniones químicas están vinculadas entre sí sin ninguna condición previa de las respectivas capacidades de enlace de cada molécula adherida respectivamente. Por ejemplo, el grupo funcional que se une a la molécula captadora es igual que la molécula captadora que se une al grupo funcional, o para que ambos estén unidos el uno al otro.

30 **[0025]** La guía de ondas planar proporcionada es de un material al que se puede adherir el grupo de cabeza de las moléculas enlazadoras. Los materiales adecuados de la guía de ondas para la presente invención son materiales de alto índice de refracción tales como Ta₂O₅, TiO₂, Nb₂O₅ o Si₃N₄ para los que están disponibles las tecnologías de deposición de película delgada para la preparación de películas ópticas lisas con propiedades de 35 guía de ondas. Un proceso de producción eficiente para guías de ondas de alto índice de refracción en sustratos de vidrio y polímero en los que se forma un acoplador óptico de rejilla se explica detalladamente en “Fattinger *et al.*, Bidiffractive grating coupler: Universal transducer for optical interface analytics”, OPTICAL ENGINEERING, Vol. 34 núm. 9, página 2744 - 2753, septiembre de 1995. La guía de ondas planar puede comprender múltiples capas de las que, al menos una es de un alto índice de refracción. La guía de ondas planar proporcionada tiene un alto índice de refracción relativo al medio en la superficie externa que forma el lado superior de la guía de ondas planar. Por ejemplo, el índice de refracción de la guía de ondas planar puede estar en el rango de 1,7 a 2,8, mientras que el índice de refracción del medio en la superficie de la guía de ondas planar está típicamente en el rango de 1 a 1,5, en particular, 1,33 a 1,4 para el agua o tampón de ensayo acuoso y 1 para el aire. La luz coherente se acopla a través de un acoplador óptico en la guía de ondas planar para propagarse con un campo evanescente en la superficie 40 externa de la guía de ondas. El campo evanescente que penetra fuera de la superficie externa se difracta en muestras objetivo, unidas a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas en la superficie externa de la guía de ondas. El grosor de la película de guía de ondas está preferentemente en el rango de 60 a 200 nm. La profundidad de penetración del campo evanescente en el medio en la superficie externa de la guía de ondas es preferentemente menor de 150 nm.

50 **[0026]** En una primera variante del procedimiento, la etapa descrita anteriormente sobre la aplicación de manera secuencial de al menos una pluralidad de moléculas enlazadoras consiste en aplicar solo dos pluralidades de moléculas enlazadoras. Las dos pluralidades de moléculas enlazadoras se ensamblan para formar dos capas individuales de moléculas enlazadoras una encima de la otra a partir de la superficie externa de la guía de ondas 55 planar.

[0027] De acuerdo con un aspecto de la primera variante, el procedimiento comprende además las siguientes etapas. Unir grupos funcionales complementarios de moléculas captadoras a los grupos funcionales de la capa superior de las moléculas enlazadoras dispuestas a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas. Cada

molécula capturadora es capaz de unirse a una muestra objetivo. Seguidamente, exponer los grupos protectores fotolábiles dispuestos entre la pluralidad de líneas predeterminadas a la luz de la longitud de onda predeterminada para eliminar los grupos protectores fotolábiles de los grupos funcionales para lograr que estos grupos funcionales sean capaces de unirse a un grupo funcional complementario de dicha molécula adicional. A continuación, unir 5 grupos funcionales complementarios de moléculas capturadoras modificadas a los grupos funcionales dispuestos entre la pluralidad de líneas predeterminadas. Cada molécula capturadora modificada es incapaz de vincularse a la muestra objetivo a la que las primeras moléculas capturadoras son capaces de unirse.

[0028] La exposición de los grupos protectores fotolábiles dispuestos entre la pluralidad de líneas 10 predeterminadas (segunda exposición) es realizada por toda la capa en la que se disponen los grupos protectores fotolábiles restantes, sin regiones de sombra. De hecho, los grupos protectores fotolábiles dispuestos entre la pluralidad de líneas predeterminadas son los únicos grupos protectores fotolábiles después de la primera exposición fotolitográfica de los grupos protectores fotolábiles dispuestos entre la pluralidad de líneas predeterminadas. Las moléculas capturadoras modificadas son moléculas en las que la luz coherente se dispersa de manera similar en 15 comparación con las moléculas capturadoras. Ventajosamente, la luz dispersa de las moléculas capturadoras y las moléculas capturadoras modificadas tienen amplitudes coincidentes y una diferencia en la longitud de camino óptico para interferir destructivamente en una ubicación de detección predeterminada. Por lo tanto, la señal mínima en la ubicación de detección predeterminada se puede ajustar variando el tiempo de exposición respectivo que se relaciona con la cantidad de grupos funcionales desde los que se eliminan los grupos protectores fotolábiles. La 20 señal mínima es ventajosa en la medida en que después de la aplicación de las muestras objetivo, el cambio de la señal en la ubicación de detección se debe principalmente a la muestra objetivo unida a las moléculas capturadoras. Por lo tanto, la contribución de la muestra objetivo a la señal en la ubicación de detección aumenta en comparación con la señal de las moléculas capturadoras sin muestras objetivo, es decir, en comparación con la luz dispersa en las moléculas capturadoras solamente. Las moléculas capturadoras o las moléculas capturadoras modificadas se 25 aplican a la superficie externa de la guía de ondas por inmersión, sumersión, impresión o el uso de un aparato fluídico.

[0029] En una segunda variante del procedimiento, en la etapa descrita anteriormente para aplicar 30 secuencialmente la al menos una pluralidad de moléculas de unión consiste en aplicar solamente una pluralidad de moléculas enlazadoras.

[0030] De acuerdo con un aspecto de la segunda variante, el procedimiento comprende, además, la etapa de unir grupos de cabeza de una pluralidad adicional de moléculas enlazadoras a los grupos funcionales de la capa anterior de moléculas enlazadoras dispuestos a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas. Los grupos 35 funcionales de moléculas enlazadoras de la pluralidad adicional de moléculas enlazadoras no están vinculados a grupos protectores fotolábiles y son capaces de unir un grupo funcional complementario de una molécula adicional. Las moléculas enlazadoras de la pluralidad de moléculas enlazadoras son diferentes de la molécula enlazadora de la capa anterior para proporcionar características diferentes, como flexibilidad, hidrofiliicidad, unión mínima no específica y longitud óptima para la inmovilización de las moléculas capturadoras en la superficie externa de la guía de ondas planar. Después de esta etapa, las moléculas enlazadoras de la pluralidad adicional de moléculas 40 enlazadoras y las moléculas capturadoras unidas a la pluralidad adicional de moléculas enlazadoras se disponen a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas solamente.

[0031] De acuerdo con otro aspecto de la segunda variante, el procedimiento comprende además las etapas 45 siguientes. Unir grupos funcionales complementarios de moléculas capturadoras a los grupos funcionales de moléculas enlazadoras de la pluralidad adicional de moléculas enlazadoras dispuestas a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas. (Esto se puede lograr mediante la aplicación de las moléculas enlazadoras junto con las moléculas capturadoras). Seguidamente, exponer esos grupos protectores fotolábiles dispuestos entre la pluralidad de líneas predeterminadas a la luz de la longitud de onda predeterminada para eliminar los grupos protectores 50 fotolábiles expuestos de los grupos funcionales para lograr que estos grupos funcionales sean capaces de unirse a un grupo funcional complementario de una molécula adicional. Posteriormente, unir grupos funcionales complementarios (grupos de cabeza) de otra pluralidad adicional de moléculas enlazadoras a los grupos funcionales de la capa anterior de moléculas enlazadoras que están dispuestas entre la pluralidad de líneas predeterminadas. Los grupos funcionales de moléculas enlazadoras de la pluralidad adicional de moléculas enlazadoras están 55 separados de grupos protectores fotolábiles y son capaces de unir un grupo funcional complementario de una molécula adicional. A continuación, unir grupos funcionales complementarios de moléculas capturadoras modificadas a los grupos funcionales de moléculas enlazadoras de la pluralidad adicional de moléculas enlazadoras dispuestas entre la pluralidad de líneas predeterminadas.

- 5 **[0032]** En esta segunda variante, se logran las mismas ventajas que en la primera variante, en particular, con respecto a la interferencia destructiva de la luz dispersa de las moléculas captadoras y de las moléculas captadoras modificadas en una ubicación de detección predeterminada. Es una ventaja si la aplicación de la pluralidad adicional de moléculas enlazadoras se lleva a cabo junto con la aplicación de moléculas captadoras o las moléculas captadoras modificadas. Esto proporciona la ventaja de que las moléculas captadoras y las moléculas captadoras modificadas pueden aplicarse parcialmente contenidas por las moléculas enlazadoras adicionales. De esta manera, las moléculas enlazadoras pueden proporcionar una matriz poco compacta (por ejemplo, un polímero tal como el DEXTRAN o el poli(etilenglicol) (PEG)) en el que las moléculas captadoras están incrustadas. Las ventajas de las mismas se analizan detalladamente a continuación.
- 10 **[0033]** De acuerdo con un aspecto de la invención, la etapa de exponer esos grupos protectores fotolábiles dispuestos a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas se lleva a cabo para una primera dosis de exposición, y luego la etapa de exponer esos grupos protectores fotolábiles dispuestos entre la pluralidad de líneas predeterminadas se lleva a cabo para una segunda dosis de exposición. La primera dosis de exposición es diferente de la segunda dosis de exposición. En general, el tiempo de exposición está relacionado con la cantidad de grupos protectores fotolábiles eliminados de los grupos funcionales de la pluralidad de moléculas enlazadoras. Esto determina el número total de grupos funcionales capaces de unir un grupo funcional complementario de una molécula adicional, como moléculas captadoras. El número de moléculas captadoras unidas a los grupos funcionales determina la señal de la luz dispersa en la ubicación de detección. Por lo tanto, el primer y segundo tiempo de exposición determina la contribución relativa de la luz dispersa en moléculas captadoras dispuestas a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas comparadas con las dispuestas entre la pluralidad de líneas predeterminadas. Como la contribución de ambas interfiere destructivamente, la señal detectada puede ajustarse a un mínimo variando los dos tiempos de exposición de forma independiente.
- 15 **[0034]** El tiempo de exposición máximo corresponde a una dosis de energía de exposición máxima que se elige para estar entre 1 y 10 julios/cm², para separar grupos protectores fotolábiles a lo largo de líneas que tienen una anchura menor que la mitad de la distancia de las líneas predeterminadas. Preferentemente, la primera dosis de exposición y la segunda dosis de exposición son inferiores a 10 julios/cm², lo que resulta en un tiempo de exposición cuando se utiliza una fuente de luz LED estándar de alrededor de 390 nm de longitud de onda de menos de 60 segundos o más preferentemente entre 1 y 10 segundos. Esta dosis de exposición ha demostrado ser adecuada para eliminar grupos protectores fotolábiles de grupos funcionales como moléculas enlazadoras de fotoclivaje con núcleo diarilsulfido -NPPOC para la síntesis transitoria de bioconjugados de alto rendimiento y con reacciones secundarias mínimas.
- 20 **[0035]** En otro ejemplo más, la sensibilización de la fotodesprotección como en D. Wöll, S. Walbert, K.-P. Stengele, T. Albert, T. Richmond, J. Norton, M. Singer, R. Green, W. Pfeleiderer, U. E. Steiner, Triplet-sensitized photodeprotection of oligonucleotides in solution and on microarray chips, *Helv. Chim. Acta* 2004, 87(1), 28-45 puede ser útil para lograr la etapa de fotodesprotección en la longitud de onda deseada mediante la transferencia de energía FRET triplete-triplete bajo irradiación.
- 25 **[0036]** En un aspecto ventajoso, la etapa de exponer esos grupos protectores fotolábiles dispuestos a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas comprende las etapas siguientes. Colocar una máscara de fase en la proximidad de los grupos protectores fotolábiles. La máscara de fase tiene una pluralidad de protuberancias que tienen un primer índice de refracción n_1 . Disponer un medio que tenga un segundo índice de refracción n_2 entre la máscara de base y la superficie externa de la guía de ondas planar, con el primer índice de refracción n_1 diferente del segundo índice de refracción n_2 . Transmitir luz de la longitud de onda predeterminada a través de la máscara de fase para exponer esos grupos protectores fotolábiles dispuestos a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas.
- 30 **[0037]** Dicha máscara de fase comprende un sustrato de vidrio y una pluralidad de protuberancias que son preferentemente de un material adecuado de alto índice de refracción, tal como Ta₂O₅, TiO₂, Nb₂O₅ o Si₃N₄. La máscara de fase es, por ejemplo, una máscara de fase difractiva binaria. Cada una de dichas protuberancias tiene una profundidad predeterminada y una distancia predeterminada a las protuberancias adyacentes para proporcionar un desplazamiento de fase π (es decir, la mitad de la longitud de onda) para la luz que se propaga a través de las protuberancias de la máscara de fase en comparación con la luz que se propaga a través del medio líquido entre las protuberancias de la máscara de fase. La interfaz de luz que se propaga a través de la máscara de fase crea un patrón de interferencia con una intensidad de luz mínima a lo largo de los bordes de las protuberancias. Por lo tanto, el patrón de interferencia detrás de la máscara de fase es un patrón de periodicidad oscuro brillante duplicado en comparación con la periodicidad local de las protuberancias en la máscara de fase. La anchura y la forma de las

protuberancias puede variar a lo largo de la máscara de fase. La iluminación fotolitográfica incluye procedimientos holográficos como se describe detalladamente en Suleski, *et al.*, "Fabrication of high-spatial-frequency gratings through computer-generated near-field holography", *Optics Letters*, vol. 24, núm. 9, págs. 602 - 604, 1 de mayo de 1999. Dado que los procedimientos holográficos, como la holografía de campo cercano, pueden usarse para generar
 5 (o disponer) la pluralidad de líneas predeterminadas se ha acuñado el término "molograma" que se refiere a los sitios de unión a los que se puede unir una muestra objetivo, que están dispuestos a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas. A modo de ejemplo, la pluralidad de líneas predeterminadas puede denominarse molograma A y las líneas ubicadas entre las líneas de la pluralidad de líneas predeterminadas pueden denominarse molograma B. En aplicaciones útiles, la luz que incide en un detector difractado en el molograma A es desplazado de fase por π
 10 (es decir, la mitad de la longitud de onda) en comparación con la luz difractada en el molograma B. Además, la máscara de fase se puede revestir para mejorar la calidad del patrón de interferencia, como se describe detalladamente en Pasi Laakkonen *et al.*, *Coated phase mask for proximity printing of Braag grating*, *Optics Communications* 192 (2001) 153-159, ELSEVIER. La luz utilizada para transmitir la exposición de los grupos protectores fotolábiles a través de la máscara de fase es, por ejemplo, de una longitud de onda de 390 nm. Puede
 15 requerirse el uso de otra longitud de onda, dependiendo de los grupos protectores fotolábiles que se eliminarán de los grupos funcionales. Debe entenderse que la exposición puede ser adecuada para la unión fotoquímica directa (por ejemplo, utilizando reacciones de inserción fotorrádicales mediadas por benzofenona o arilazida o diazirina o sensibilización por iniciadores de radical como tioxantonas). En principio, las dimensiones de las protuberancias deben elegirse de acuerdo con esas longitudes de onda.

20
[0038] Se prefiere que la pluralidad de moléculas enlazadoras de las que los grupos de cabeza se adhieren a la superficie externa se ensamblen para formar una capa individual que tiene un grosor de 0,5 nm a 10 nm. La densidad promedio de las moléculas enlazadoras en la primera capa se elige para evitar el contacto de las moléculas adicionales aplicadas a la superficie externa de la guía de ondas. Esto es importante para prevenir, por
 25 ejemplo, la unión no específica de las moléculas capturadoras y las moléculas adicionales en las muestras aplicadas a la superficie externa de la guía de ondas.

[0039] La primera capa de moléculas enlazadoras se adhiere directamente a la superficie externa de la guía de ondas planar. Ventajosamente, la primera capa es de alta densidad y de poca altura. Idealmente, la primera capa
 30 cubre la superficie externa de manera que resulta imposible el contacto de cualquier molécula adicional con la superficie externa.

[0040] En un aspecto ventajoso, la pluralidad de moléculas enlazadoras de las que se adhieren los grupos de cabeza a la superficie externa de la guía de ondas se ensambla para formar una monocapa de moléculas
 35 enlazadoras. La calidad de la señal de la luz difractada en la ubicación de detección aumenta cuando la primera capa está dispuesta ordenadamente en la superficie externa que proporciona un fondo muy pequeño y uniforme de luz dispersa en las moléculas enlazadoras en la superficie externa de la guía de ondas. La pluralidad de moléculas enlazadoras que forman la primera capa es preferentemente una monocapa autoensamblada (SAM por su sigla en inglés). Una SAM puede transportar los grupos protectores fotolábiles de modo que sean capaces de realizar el
 40 procesamiento fotolitográfico.

[0041] En una realización, la SAM pueden consistir en una mezcla de alcanos, que contienen entre el 10 y el 100 % de grupos amino como grupos funcionales, que a su vez pueden ser modificados por un grupo fotoprotector antes de la formación de la SAM o después de la formación de la SAM, para generar la SAM deseada lista para la
 45 modulación fotográfica de acuerdo con la invención.

[0042] En otra realización, la SAM pueden consistir en una mezcla de alcanos, que contienen entre el 10 y el 100 % de grupos carboxi como grupos funcionales, que a su vez pueden ser modificados por un grupo fotoprotector antes de la formación de la SAM o después de la formación de la SAM, para generar la SAM deseada lista para la
 50 modulación fotográfica de acuerdo con la invención.

[0043] En otro aspecto de la invención, la pluralidad de moléculas enlazadoras de las que los grupos de cabeza se unen a los grupos funcionales de la capa anterior de moléculas enlazadoras se ensamblan para formar la
 55 capa superior individual que tiene un grosor de 10 nm a 200 nm. La densidad promedio local de moléculas enlazadoras por área se elige como baja para permitir que las moléculas capturadoras se difundan a través de las mismas o que las moléculas capturadoras estén parcialmente contenidas dentro de las mismas. Se prefiere que la capa superior comprenda moléculas enlazadoras que sean largas comparadas con las moléculas de la primera capa. La capa superior debe ser de baja densidad espacial para permitir que las moléculas en la muestra objetivo literalmente se difundan a través de la misma. Estas moléculas enlazadoras pueden ser flexibles para poderse

adaptar a la forma. Estas moléculas enlazadoras consisten en un ejemplo ventajoso, en una matriz poco compacta (un polímero tal como un polisacárido como el dextrano, el dextrano carboximetilado, el ácido hialurónico carboximetilado, el ácido hialurónico y el ácido algínico, o el ácido poliláctico, el ácido poliacrílico o un polímero hidrofílico de acrilato 3D descrito, por ejemplo, por D. Kyprianu *et al.*, Talanta 103. 2013, 260 - 266 o un poli(etilenglicol) (PEG) o un oligonucleótido de ADN monocatenario.

[0044] Los polímeros pueden modificarse adicionalmente para generar redes de polímero modificado estructuralmente, en las que los modificantes poliméricos pueden consistir en grupos iónicos, lípidos, péptidos oligonucleótidos.

10

[0045] En otro aspecto del procedimiento, la pluralidad de líneas predeterminadas está dispuesta en al menos dos puntos de difracción separados en la superficie externa de la guía de ondas planar. Cada punto de difracción tiene un área mayor de $25 (\mu\text{m})^2$ ($(\mu\text{m})^2 = \mu\text{m}^2$). La pluralidad de líneas predeterminadas tiene una distancia entre líneas adyacentes menor de 1,5 μm , en particular menor de 1 μm . Esto proporciona puntos de difracción para la detección de la luz dispersa sobre el mismo que tiene un tamaño mínimo para proporcionar una señal de detección de intensidad adecuada. La pluralidad de líneas predeterminadas tiene una distancia máxima entre líneas adyacentes que se determina por la luz que se difracta en los puntos de difracción. Se prefiere el uso de luz visible. Esta distancia incluye armónicos de la longitud de onda predeterminada para la que la distancia entre líneas adyacentes es un múltiplo de la longitud de onda de la luz que se propaga a través de la guía de ondas planar.

20

[0046] Otros aspectos ventajosos de la invención resultan evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones de la invención con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

- 25 - la **figura 1** muestra una realización de una guía de ondas planar con un detalle ampliado de una pluralidad de líneas predeterminadas y una porción de una máscara fotolitográfica;
- la **figura 2** muestra una vista lateral de una sección de una guía de ondas planar tal como se ejemplifica en la figura 1 con dos pluralidades de moléculas enlazadoras aplicadas a la misma;
- la **figura 3** muestra la guía de ondas planar de la figura 2 que ilustra una etapa de desactivación de los grupos funcionales a los que no se ha unido ninguna molécula enlazadora de la pluralidad adicional de moléculas enlazadoras;
- 30 - la **figura 4** muestra la guía de ondas planar de la figura 3 que ilustra una etapa de exposición de esos grupos protectores fotolábiles dispuestos a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas a la luz;
- la **figura 5** muestra la guía de ondas planar de la figura 4 que ilustra una etapa de aplicación de una pluralidad de moléculas captadoras;
- 35 - la **figura 6** muestra la guía de ondas planar de la figura 5 que ilustra una etapa de desactivación de los grupos funcionales a los que no se ha unido ninguna molécula captadora;
- la **figura 7** muestra la guía de ondas planar de la figura 6 que ilustra una etapa de exposición de esos grupos protectores fotolábiles dispuestos entre la pluralidad de líneas predeterminadas a la luz;
- 40 - la **figura 8** muestra la guía de ondas planar de la figura 7 que ilustra una etapa de aplicación de una pluralidad de moléculas captadoras modificadas;
- la **figura 9** muestra la guía de ondas planar de la figura 8 que ilustra una etapa de desactivación de grupos a los que no se une ninguna molécula captadora modificada;
- la **figura 10** muestra la guía de ondas planar de la figura 9 que ilustra una etapa de aplicación de una pluralidad de muestras objetivo;
- 45 - la **figura 11** muestra una vista lateral de una guía de ondas planar como se ejemplifica en la figura 1 en la que las moléculas enlazadoras están dispuestas de acuerdo con una realización adicional que ilustra una etapa de aplicación de una placa de moléculas enlazadoras con grupos protectores fotolábiles;
- la **figura 12** muestra la guía de ondas planar de la figura 11 que ilustra una etapa de exposición de esos grupos protectores fotolábiles dispuestos a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas a la luz;
- 50 - la **figura 13** muestra la guía de ondas planar de la figura 12 que ilustra una etapa de aplicación de una pluralidad adicional de moléculas enlazadoras que están parcialmente unidas a moléculas captadoras mediante grupos funcionales, estando dispuesta la pluralidad adicional de moléculas enlazadoras a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas;
- la **figura 14** muestra la guía de ondas planar de la figura 13 que ilustra una etapa de exposición de esos grupos protectores fotolábiles dispuestos entre la pluralidad de líneas predeterminadas a la luz;
- la **figura 15** muestra la guía de ondas planar de la figura 14 que ilustra una etapa de aplicación de una pluralidad adicional de moléculas enlazadoras que están parcialmente unidas a moléculas captadoras modificadas mediante grupos funcionales, estando dispuesta la pluralidad adicional de moléculas enlazadoras entre la pluralidad de líneas

predeterminadas;

- la **figura 16** muestra la guía de ondas planar de la figura 15 que ilustra una etapa de desactivación de los grupos funcionales restantes de la primera capa de moléculas enlazadoras a la que no se une ninguna molécula enlazadora adicional, los grupos funcionales restantes de la segunda capa de moléculas enlazadoras a la que no se une ninguna molécula capturadora y la desactivación de los grupos funcionales restantes de la segunda capa de moléculas enlazadoras a la que no se une ninguna molécula capturadora modificada;
- la **figura 17** muestra una vista lateral de una guía de ondas planar en la que los enlazadores moleculares están dispuestos de acuerdo con otra variante de la invención que ilustra enlazadores moleculares alternativos y moléculas capturadoras alternativas;
- 10 - la **figura 18** muestra un aspecto adicional de la invención con tres pluralidades de líneas predeterminadas dispuestas en un solo punto de difracción, cada pluralidad enfocando la luz difractada en una ubicación de detección diferente;
- la **figura 19** muestra la guía de ondas planar de la figura 18 con dos pluralidades de moléculas enlazadoras aplicadas sobre un punto de difracción completo en la superficie externa de la guía de ondas planar, conteniendo la pluralidad superior grupos protectores fotolábiles;
- 15 - la **figura 20** muestra la guía de ondas planar de la figura 19 que ilustra una etapa de exposición parcial de grupos protectores fotolábiles dispuestos a lo largo de una primera pluralidad de líneas predeterminadas a la luz;
- la **figura 21** muestra la guía de ondas planar de la figura 20 con tres tipos de ADN monocatenarios aplicados posteriormente para ser dispuestos en tres pluralidades parcialmente expuestas de líneas predeterminadas;
- 20 - la **figura 22** muestra la guía de ondas planar de la figura 21 con tres tipos diferentes de moléculas capturadoras dispuestas en tres pluralidades diferentes de líneas predeterminadas;
- la **figura 23** muestra un aspecto adicional de la invención con dos pluralidades de líneas predeterminadas dispuestas en un solo punto de difracción, enfocando cada pluralidad la luz difractada en una ubicación de detección individual; y
- 25 - la **figura 24** muestra la guía de ondas planar con dos tipos diferentes de moléculas capturadoras de un tipo diferente con respecto a los ejemplos anteriores dispuestas en las dos pluralidades diferentes de líneas predeterminadas de la figura 23.

[0047] La **figura 1** muestra una vista en perspectiva de un ejemplo de una guía de ondas planar 1 que tiene una superficie externa 11 en la que pueden estar dispuestas moléculas enlazadoras de acuerdo con la invención. Estructuralmente, la guía de ondas planar 1 está dispuesta encima de un sustrato (no mostrado) y comprende un número de 25 puntos de difracción separados 41 dispuestos en la superficie externa 11. Una pluralidad de líneas predeterminadas 4 (cada una de las líneas mostradas representa una multiplicidad de líneas) está dispuesta en cada uno de estos puntos de difracción 41. Las líneas 4 en el ejemplo mostrado son curvas, pero pueden ser rectas en otra variante. Las líneas 4 en el presente ejemplo tienen una distancia entre las líneas adyacentes 4 que disminuyen de izquierda a derecha (dirección de la propagación de la luz a través de la guía de ondas planar) para mejorar la señal detectada. Alternativamente, las líneas 4 pueden disponerse equidistantemente o diferentes pluralidades de líneas predeterminadas 4 pueden disponerse en dicho punto de difracción 41. Además, un acoplador óptico 12 y un acoplador óptico adicional 13 están dispuestos en la guía de ondas planar 1 para acoplar la luz coherente dentro y fuera de la guía de ondas planar 1, respectivamente. Ambos pueden formarse en la superficie de un sustrato hecho de vidrio o de un material polimérico. El acoplador óptico adicional 13 puede ser alternativa o adicionalmente un medio absorbente de luz. De acuerdo con el principio de funcionamiento de un dispositivo para detectar eventos vinculantes que comprende la guía de ondas planar 1 mostrada, la luz coherente se acopla a través del acoplador óptico 12 en la guía de ondas planar 1 para propagarse con un campo evanescente en la superficie externa 11. El campo evanescente de la luz coherente se dispersa en las moléculas (moléculas enlazadoras, moléculas capturadoras, muestras objetivo, etc.) dispuestas en la superficie externa 11 a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas 4 de manera que la luz coherente dispersa interfiera constructivamente en una ubicación de detección predeterminada (no mostrada).

50 **[0048]** El círculo mostrado proporciona una vista exagerada de algunas pluralidades de líneas predeterminadas 4 dispuestas en dicho punto 41 con líneas negras 42 y con líneas blancas 43 en el medio. A lo largo de las líneas negras 42, las moléculas capturadoras están dispuestas en grupos funcionales de las moléculas enlazadoras. Las moléculas capturadoras son capaces de unirse a una muestra objetivo (las moléculas no se muestran en la presente ilustración debido a su pequeño tamaño en comparación con el tamaño del dispositivo). Las líneas blancas 43 comprenden las moléculas capturadoras modificadas que son incapaces de unirse a la muestra objetivo a la que las moléculas capturadoras son capaces de unirse. Un campo evanescente de una luz coherente acoplada a la guía de ondas planar 1 se dispersa en las moléculas dispuestas en las líneas negras mostradas 42, así como en las líneas blancas 43. La luz dispersada por moléculas dispuestas en las líneas negras 42 tiene una primera longitud de camino óptico (no mostrado) para interferir en un máximo de intensidad en el mismo. La luz

coherente dispersa en moléculas dispuestas en la pluralidad de líneas blancas 43 entre las líneas negras 42 tiene una segunda longitud de camino óptico con respecto a la ubicación de detección para interferir en un máximo de intensidad en el mismo. Ambos máximos tienen un desplazamiento de fase de π en relación con el otro para interferir de manera destructiva a un mínimo en intensidad general. Esto permite minimizar la señal de fondo de la luz dispersa aparte de las muestras objetivo, unidas a las moléculas capturadoras. La señal mínima se puede ajustar variando el tiempo de exposición para desproteger los respectivos grupos funcionales, a los que pueden unirse las moléculas capturadoras y las moléculas capturadoras modificadas. En teoría, las moléculas capturadoras dispuestas en las líneas negras 42 y las moléculas capturadoras modificadas dispuestas en las líneas blancas 43 no proporcionan señal de fondo general de la luz dispersa respectivamente en la ubicación de detección única, antes de aplicar una muestra objetivo.

[0049] Por encima del círculo que proporciona la vista exagerada, se muestra una porción de una máscara de fase 9 para explicar la iluminación fotolitográfica de aquellos grupos protectores fotolábiles dispuestos a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas 4. La máscara de fase 9 comprende un sustrato de vidrio 9 y una pluralidad de protuberancias 91 hechos de un material de alto índice de refracción tal como Ta_2O_5 , TiO_2 , Nb_2O_5 o Si_3N_4 . El grosor (o profundidad) de las protuberancias 91 se elige de acuerdo con un primer índice de refracción n_1 del material de las protuberancias 91 (por ejemplo, Ta_2O_5) y un segundo índice de refracción n_2 del medio presente entre la máscara de fase 9 y la superficie externa 11 de la guía de ondas planar 1 para proporcionar un desplazamiento de fase predeterminado. El primer índice de refracción n_1 de Ta_2O_5 está en una longitud de onda de 390 nm $n_1 = 2.246$. En funcionamiento, la máscara de fase 9 está dispuesta con las protuberancias 91 en la proximidad de la superficie externa 11 para exponer esos grupos protectores fotolábiles dispuestos a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas 4 por iluminación de campo cercano. Las moléculas enlazadoras con esos grupos protectores fotolábiles (no mostrados por su tamaño tan pequeño) se aplican a la superficie externa 11 en una solución de, por ejemplo, DMSO con 5 % de agua para llenar el espacio entre la superficie externa 11 y la máscara de fase 9. El segundo índice de refracción n_2 de la solución DMSO puede calcularse de la siguiente manera. El DMSO tiene un índice de refracción en una longitud de onda de 590 nm de $n_2 = 1.477$. El índice de refracción calculado para una longitud de onda de 390 nm es $n_2 = 1.50$, como se explica detalladamente en Kozma, J. Opt. Soc. Am. B, 22(7), página 1479 (2005).

[0050] El índice de refracción aproximado para el DMSO con 5 % de agua para 390 nm es $n_2 = 1.494$, como se explica detalladamente en Le Bel y Goring, J. Chem. Eng. DATA 7(1), página 100 (1962). De acuerdo con una variante, la N-metil-2-pirrolidona se puede utilizar como una solución de aplicación para los enlazadores moleculares y esos grupos protectores fotolábiles. La máscara de fase 9 causa un desplazamiento de fase para la luz que se propaga a través de las protuberancias 91 en comparación con la luz que se propaga a través del medio entre la máscara de fase 9 y la superficie externa 11. La interferencia provoca un patrón brillante oscuro de doble frecuencia en comparación con el patrón de la máscara de fase 9. La altura de las protuberancias 91 se elige para que Ta_2O_5 sea $d = 259$ nm ($d = \lambda / 2 (n_{Ta_2O_5} - n_{DMSO})$). La anchura de las protuberancias 91 puede variar en el punto 41, por ejemplo, a lo largo de la dirección de propagación de la luz a través de la guía de ondas planar 1. La anchura de las protuberancias 91 se elige preferentemente igual o aproximada a la distancia de las líneas predeterminadas 4; 42, 43 en la superficie externa 11 de la guía de ondas planar 1. La iluminación fotolitográfica de esos grupos protectores fotolábiles se lleva a cabo colocando la máscara de fase 9 en la proximidad de los mismos e iluminando estos grupos protectores fotolábiles dispuestos a lo largo de las líneas blancas 42 con la luz transmitida a través de la máscara de fase 9. La exposición a través de la máscara de fase 9 se lleva a cabo durante un primer tiempo de exposición. La segunda exposición de esos grupos protectores fotolábiles dispuestos a lo largo de las líneas blancas 42 entre la pluralidad de líneas negras 42 se lleva a cabo sin máscara de fase 9.

[0051] El perfil sólido 61 mostrado sobre las líneas negras 42 y el perfil punteado 62 debajo de las líneas blancas 43 representan el perfil de intensidad de la luz (o el patrón de interferencia) en el campo cercano de la luz transmitida a través de la máscara de fase 9.

[0052] Ambos perfiles pueden interpretarse además como que representan la densidad promedio local de moléculas capturadoras o grupos funcionales desprotegidos (líneas negras 42) unidos a los respectivos grupos funcionales expuestos de moléculas enlazadoras. En el caso ideal mencionado más arriba, la luz dispersa en las moléculas capturadoras dispuestas en líneas negras 42 así como en moléculas capturadoras modificadas dispuestas entre las líneas negras 42 a lo largo de las líneas blancas 43 contribuye a la ubicación de detección a una señal de fondo mínima (idealmente cero). Esto se logra teóricamente por medio de densidades promedio locales idénticas de moléculas capturadoras y moléculas capturadoras modificadas. Los bordes filosos entre las líneas negras 42 y las líneas blancas 43 aproximan la transición sinusoidal entre las líneas negras y blancas (debido a requisitos formales, dicha ilustración sombreada no se muestra, pero sería más realista). En principio, la densidad

local de moléculas capturadoras es causada por un perfil de intensidad sinusoidal de la iluminación de campo cercano a través de la máscara de fase 9.

[0053] A continuación, se muestra una primera realización y una segunda realización, ambas permitiendo llevar a cabo la invención. Ambas realizaciones emplean una guía de ondas planar como se ejemplifica en la figura 1. En estas realizaciones, la etapa fotolitográfica se lleva a cabo de la misma manera, pero en etapas diferentes. En la práctica, la exposición de esos grupos protectores fotolábiles se lleva a cabo solo una vez utilizando la máscara fotolitográfica. La realineación de la máscara fotolitográfica es difícil y poco práctica de modo que la segunda exposición es una exposición de los grupos protectores fotolábiles restantes que se lleva a cabo sin el uso de una máscara.

[0054] En la figura 2 a la figura 10 siguientes, se explica la primera realización de acuerdo con la invención.

[0055] La **figura 2** muestra la aplicación de una pluralidad de moléculas enlazadoras 2 y de una pluralidad adicional de moléculas enlazadoras 5 que posteriormente se aplican a partir de una superficie externa 11 de una guía de ondas planar 1 para ensamblar en dos capas individuales separadas. Las moléculas enlazadoras 2 de la pluralidad de moléculas enlazadoras 2 que están directamente ensambladas en la superficie externa 11 para formar una monocapa autoensamblada (SAM). Estas moléculas enlazadoras 2 comprenden un grupo de cabeza 21 (por ejemplo, $-(PO_3)^{2-}$, $-(O-PO_3)^{2-}$, trialcoxisilano o poli(L-lisina) para adherirse a la superficie externa 11 y un grupo funcional 22 capaz de unirse a un grupo funcional complementario de una molécula adicional. Las moléculas enlazadoras 2 adecuadas para la formación de una monocapa autoensamblada (SAM) en óxidos de metales de transición, por ejemplo Ta_2O_5 , TiO_2 , Nb_2O_5 son por ejemplo, la molécula autoensamblada terminada en NH_2 amino-dodecil-fosfonato ($NH_2-(CH_2)_{12}-(PO_3)H_2$), la molécula autoensamblada terminada en $COOH$ carboxi-pentadecilfosfato ($COOH-(CH_2)_{15}-(PO_4)H_2$) o la molécula autoensamblada terminada en OH hidroxil-dodecil-fosfato amonio sal ($OH-(CH_2)_{12}-(PO_4)(NH_4)_2$). (véase Samuele Guido Tosatti: FUNCTIONALIZED TITANIUM SURFACES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS: PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL IN VITRO EVALUATION, DISS. ETH NÚM. 15095). El grupo funcional 22 puede ser un grupo funcional ordinario, un adsorbente de quelato de metal orgánico o peptídico, un ADN monocatenario, un receptor de proteína o su ligando. La molécula adicional no se limita a tipos específicos de moléculas, pero es en el caso mostrado, una matriz poco compacta (por ejemplo, un polímero tal como el dextrano o el poli (etilenglicol) (PEG) funcionalizado con un grupo funcional complementario (grupo de cabeza) 51 (por ejemplo, un grupo funcional ordinario como un carboxi de las moléculas enlazadoras 5 de la pluralidad posteriormente aplicada de moléculas enlazadoras 5. Las moléculas enlazadoras 5 de la pluralidad posteriormente aplicada de moléculas enlazadoras 5 comprenden también grupos de cabeza 51 capaces de unirse a los grupos funcionales 22 de la capa anterior aplicada. Los grupos funcionales 52 son capaces de unir un grupo funcional complementario de una molécula adicional. Los grupos funcionales 52, en el caso mostrado, están protegidos por un grupo protector fotolábil 3. El grupo protector fotolábil 3 protege el grupo funcional 52 de modo que ningún grupo funcional complementario de una molécula adicional, como una molécula capturadora, puede unirse al mismo. Por lo tanto, los grupos funcionales 52 se limitan a grupos funcionales capaces de ser protegidos por un grupo protector fotolábil como el grupo amino, mercapto, hidroxilo, carboxilato.

[0056] En la **figura 3**, los grupos funcionales 22 de la pluralidad de moléculas enlazadoras 2 a las que no se ha unido ningún grupo de cabeza 51 de la pluralidad adicional de moléculas enlazadoras 5 están desactivados, por ejemplo, reaccionando con una molécula adicional que no comprende ningún grupo funcional que sea capaz de reaccionar o interactuar con una molécula adicional con un grupo funcional complementario. Los grupos funcionales desactivados 221 son incapaces de realizar ninguna unión adicional.

[0057] En la **figura 4**, esos grupos protectores fotolábiles 3 unidos a los grupos funcionales 52 de la pluralidad adicional de moléculas enlazadoras 5 dispuestas a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas 4 están expuestos a la luz y son eliminados de los grupos funcionales 52. Por lo tanto, los grupos funcionales 52 dispuestos a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas 4 son capaces de unir un grupo funcional complementario de una molécula adicional, como una molécula capturadora, y los grupos funcionales 52 dispuestos entre la pluralidad de líneas predeterminadas 4 transportan grupos protectores fotolábiles 3. La exposición se puede lograr fotolitográficamente como se ha explicado para la figura 1 por medio de una máscara de fase. La línea individual mostrada 4 ejemplifica una línea de la pluralidad de líneas predeterminadas 4 a lo largo de las que esos grupos protectores fotolábiles están expuestos a la luz.

[0058] Teóricamente, este estado del procedimiento proporciona una guía de ondas planar que puede usarse para la detección de eventos vinculantes. Por ejemplo, si una muestra objetivo aplicada se une directamente a los grupos funcionales de la pluralidad de moléculas enlazadoras dispuestas a lo largo de líneas predeterminadas.

[0059] En la **figura 5**, una pluralidad de moléculas captadoras 6 se aplica a los grupos funcionales 52 dispuestos a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas 4. En general, dicha molécula captadora 6 es cualquier molécula capaz de unirse simultáneamente al grupo funcional 52 de la molécula enlazadora 5 y a una molécula diana en una muestra (mostrada en la figura 10) que será investigada. Las moléculas captadoras ilustradas 6 representan una proteína con dos sitios de unión para unir la molécula diana en una muestra. Las moléculas enlazadoras 5 pueden ser poco compactas con espacio entre las moléculas enlazadoras que puede llenarse con moléculas captadoras 6. En este caso, las moléculas captadoras 6 son preferentemente incrustadas dentro de una pluralidad poco compacta de moléculas enlazadoras 5. Ventajosamente, dicha pluralidad de moléculas enlazadoras poco compactas 5 consiste en una matriz poco compacta (por ejemplo, un polímero tal como el DEXTRAN o el poli(etilenglicol) (PEG) que tiene una interacción inespecífica mínima o nula con la molécula captadora 6 y con las moléculas en la muestra aplicada.

[0060] Cada molécula enlazadora 5 puede transportar varios (por ejemplo, dos o más) grupos funcionales 52 dispuestos a lo largo de la molécula enlazadora 5. En esta variante de la primera realización del procedimiento de acuerdo con la invención, todos los grupos funcionales 52 dispuestos a lo largo de moléculas enlazadoras 5 están protegidos por un grupo protector fotolábil antes de la eliminación de los grupos protectores de los grupos funcionales 52 por la primera exposición a la luz.

[0061] En la **figura 6**, los grupos funcionales 52 de la pluralidad adicional de moléculas enlazadoras 5 a las que no se ha unido ninguna molécula captadora 6 están desactivados. Los grupos funcionales desactivados 521 son incapaces de realizar ninguna unión adicional.

[0062] Esto proporciona una guía de ondas planar que puede ser utilizada para la detección de eventos vinculantes. Una muestra objetivo puede unirse a los sitios de unión proporcionados por las moléculas captadoras dispuestas a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas para dispersar luz coherente en las mismas para interferir a un máximo en una ubicación de detección predeterminada. Sin embargo, en la práctica, una señal de fondo comparablemente fuerte contribuye a la señal de la ubicación de detección mediante la luz que es dispersada solo por las moléculas captadoras, es decir, sin que se una ninguna muestra objetivo a la molécula captadora. A continuación, se muestra una posibilidad de disminuir la señal de fondo relativa a la señal detectada.

[0063] En la **figura 7**, esos grupos protectores fotolábiles se eliminan del grupo funcional 52 de la pluralidad adicional de moléculas enlazadoras 5 que están dispuestas entre la pluralidad de líneas predeterminadas 4 por exposición a la luz. Esta segunda exposición (la primera exposición se lleva a cabo a través de la máscara de fase) no necesita una máscara fotolitográfica, ya que los grupos protectores fotolábiles restantes están dispuestos correctamente a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas que se forman entre la pluralidad de líneas predeterminadas 4 formadas en la primera exposición.

[0064] En la **figura 8**, una pluralidad de moléculas captadoras modificadas 7 se aplica a grupos funcionales 52 de la pluralidad adicional de moléculas enlazadoras 5 dispuestas entre la pluralidad de líneas predeterminadas 4. Las moléculas captadoras modificadas 7 son en el presente ejemplo una proteína mutada. En general, las moléculas captadoras modificadas 7 son estructuralmente similares a las moléculas captadoras 6 y han sido modificadas por mutación o químicamente para que sean incapaces de unir una molécula diana en una muestra (no mostrada) a las que las moléculas captadoras 6 son incapaces de unirse. En otras palabras, las moléculas captadoras modificadas 7 no tienen sitios de unión capaces de unir una muestra objetivo mientras dispersan luz coherente de manera semejante a las moléculas captadoras 6.

[0065] En la **figura 9**, los grupos funcionales 52 de la pluralidad de moléculas enlazadoras 5 a las que no se ha unido ninguna molécula captadora 7 están desactivados. Los grupos funcionales desactivados 52 son incapaces de realizar cualquier unión adicional.

[0066] Esto da como resultado una guía de ondas planar que puede ser utilizada en la detección de eventos vinculantes. La ventaja de dicha guía de ondas planar es que, como se ha explicado anteriormente, la contribución de la luz dispersa desde las moléculas captadoras, así como desde las moléculas captadoras modificadas interfiere destructivamente en una señal mínima. Ventajosamente, la señal mínima se ajusta debido al cambio del tiempo de exposición y, en consecuencia, el número de moléculas captadoras o de moléculas captadoras modificadas unidas a los grupos funcionales desprotegidos para minimizar la señal de fondo en la ubicación de detección.

- [0067]** La **figura 10** muestra la aplicación de una pluralidad de moléculas diana 8 en una muestra a moléculas capturadoras 6 dispuestas a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas 4. Como se puede ver, esas muestras objetivo 8 solo se unen a moléculas capturadoras 6. Las moléculas capturadoras modificadas 7 son incapaces de unirse a la muestra objetivo 8. Por lo tanto, la luz en la ubicación de detección (no mostrada) se ha minimizado ajustando las contribuciones de luz dispersa en las moléculas capturadoras 6 con respecto a la luz dispersa en moléculas capturadoras modificadas 7. Ventajosamente, después de la aplicación de muestras objetivo 8, los cambios de la luz detectada en la ubicación de detección se originan en el enlace real de las muestras objetivo 8 con las moléculas capturadoras 6.
- 10 **[0068]** La detección de eventos vinculantes es ventajosa debido al hecho de que la luz coherente no es dispersada solamente por las moléculas capturadoras 6 dispuestas a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas 4 (correspondientes a las líneas negras 42 de la figura 1), sino que es dispersada también por las moléculas capturadoras modificadas 7 (correspondientes a las líneas blancas 43 de la figura 1). Dado que la distancia entre las moléculas capturadoras 6 y las moléculas capturadoras modificadas 7 se elige para ser la mitad de la longitud de onda (o un múltiplo de la longitud de onda más la mitad de la longitud de onda) de la luz coherente, la luz dispersa interfiere teóricamente en una ubicación de detección a un mínimo. En la práctica, la contribución de las moléculas capturadoras 6 y las moléculas capturadoras modificadas 7 en la ubicación de detección no interfiere con la luz cero, sino más bien que habrá algo de luz de fondo. El enlace de la muestra objetivo causará un cambio a dicha señal mínima que es comparablemente grande con respecto a la señal de fondo mínima.
- 15 20 **[0069]** En la figura 11 a la figura 16 siguientes, se describe la segunda realización para explicar otra manera de llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención.
- [0070]** En la **figura 11**, se aplica una pluralidad de moléculas enlazadoras 2 para adherirse con grupos de cabeza 21 a la superficie externa 11 de la guía de ondas planar 1. La pluralidad de moléculas enlazadoras 2 comprende grupos funcionales (no mostrados porque están cubiertos) protegidos por grupos protectores fotolábiles 3. La segunda realización es diferente en comparación con la primera realización porque se aplica una sola pluralidad de moléculas enlazadoras 2 (solo la SAM) en la primera etapa que transportan grupos protectores fotolábiles 3.
- 25 30 **[0071]** En la **figura 12**, los grupos protectores fotolábiles 3 dispuestos a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas 4 son expuestos a la luz y son eliminados. La exposición a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas 4 se lleva a cabo por fotolitografía. Por lo tanto, los grupos funcionales desprotegidos 22 de las moléculas enlazadoras 2 están dispuestos a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas 4.
- 35 **[0072]** En la **figura 13**, una pluralidad de moléculas capturadoras 6 unida a grupos funcionales 52 de moléculas enlazadoras 5 se aplican juntos (unidos entre sí) a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas 4. El grupo funcional complementario de la molécula capturadora 6 se une al grupo funcional 52 de la molécula enlazadora 5 y ambos están unidos entre sí mediante el grupo de cabeza 51 al grupo funcional 22. Esto permite en ejemplos preferidos encerrar parcialmente las moléculas capturadoras 6 en dichas moléculas enlazadoras 5 (por ejemplo, las moléculas enlazadoras 5 forman una matriz poco compacta (por ejemplo, un polímero como el dextrano o poli(etilenglicol) (PEG)) permitiendo al mismo tiempo que una muestra objetivo (no mostrada) se una a los sitios de unión proporcionados por las moléculas capturadoras 6.
- 40 45 **[0073]** En la **figura 14**, los grupos protectores fotolábiles dispuestos entre la pluralidad de líneas predeterminadas 4 son expuestos a la luz de longitud de onda predeterminada (segunda exposición sin usar una máscara fotolitográfica). Los grupos funcionales desprotegidos 22 son incapaces de unirse a un grupo funcional complementario de moléculas adicionales, como las moléculas capturadoras modificadas. La señal de fondo mínima se logra en la segunda realización de manera similar a como se ha explicado para la primera realización (véase la figura 7).
- 50 **[0074]** En la **figura 15**, una pluralidad de moléculas capturadoras modificadas 7 adheridas (unidas) a grupos funcionales 52 de moléculas enlazadoras 5 se aplica a grupos funcionales 22 dispuestos entre la pluralidad de líneas predeterminadas 4 (similar a la figura 13).
- 55 **[0075]** En la **figura 16**, los grupos funcionales 521 a los que no se ha unido ninguna molécula capturadora modificada, así como los grupos funcionales 221 a los que no se ha unido ningún grupo de cabeza de una molécula enlazadora, están desactivados. Esto proporciona una guía de ondas planar preparada para ser utilizada como se ha explicado en la figura 10.

[0076] La **figura 17** muestra otra variante de la invención en la que se utilizan enlazadores moleculares alternativos que tienen grupos de cabeza alternativos 511, así como grupos funcionales alternativos 522. Superestructuras tipo membrana (por ejemplo, vesículas o liposomas) 61 y superestructuras tipo membrana modificadas (por ejemplo, vesículas o liposomas modificados) 71 están dispuestas en los grupos funcionales alternativos 522. La superestructura tipo membrana 61 con una proteína de transporte de membrana incorporada o reconstituida 611 (transportador o canal) representa una molécula capturadora cautiva. Las superestructuras tipo membrana modificadas 71 con una proteína de transporte de membrana incorporada o reconstituida 711 (transportador modificado o canal modificado) representan una molécula capturadora cautiva modificada. Con respecto a la figura 10 y la figura 17, las superestructuras tipo membrana 61 y las estructuras tipo membrana modificadas 71 están dispuestas a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas 4 y entre la pluralidad de líneas predeterminadas 4, respectivamente. Una muestra objetivo 81 puede ser capturada en las moléculas capturadoras cautivas (capturada dentro de las superestructuras tipo membrana). De este modo, el término molécula capturadora no puede verse solamente como la proporción de una serie de sitios de unión individuales a los que puede unirse o no una muestra objetivo, sino más bien para capturar una muestra objetivo a través de una proteína de transporte de membrana. Esto proporciona un procedimiento para acumular las muestras objetivo capturadas 81 durante un periodo de tiempo para la detección integral de una muestra objetivo 81.

[0077] La **figura 18** muestra un aspecto adicional de la invención. Tres pluralidades de líneas predeterminadas 401, 402, 403 están dispuestas en un punto de difracción 41 en una guía de ondas planar. Cada pluralidad está dispuesta de manera que la luz acoplada a través de un acoplador óptico 12 en la guía de ondas planar se difracta en cada pluralidad de líneas predeterminadas 401, 402, 403 para interferir constructivamente en ubicaciones de detección separadas 421, 422, 423. La presente disposición de tres pluralidades de líneas predeterminadas 401, 402, 403 debe verse como un ejemplo, pero puede disponerse otro número de pluralidades de líneas predeterminadas 401, 402, 403. Lo mismo se aplica para la geometría de las líneas mostradas la cual se elige en el presente ejemplo para hacer que la luz acoplada a través del acoplador óptico 12 interfiera constructivamente en tres ubicaciones de detección diferentes 421, 422, 423 dispuestas a lo largo de una línea. El punto de difracción 41 con múltiples ubicaciones de detección se denota como (o representa) un molograma con múltiples focos.

[0078] A continuación, se describe un procedimiento para aplicar (tres) tipos diferentes de moléculas capturadoras cada una en una pluralidad (de tres) diferente de líneas predeterminadas. Esta disposición es ventajosa, ya que las cascadas de proceso son detectables. Por ejemplo, una muestra objetivo se divide en productos separados en el primer tipo de moléculas capturadoras para proporcionar una señal en la primera ubicación de detección. Un primer producto de esta reacción se une luego al segundo tipo de moléculas capturadoras para proporcionar una señal en la segunda ubicación de detección. Un segundo producto de la reacción se une al tercer tipo de molécula capturadora para proporcionar una señal en la tercera ubicación de detección. La unión de los diferentes tipos de moléculas capturadoras a las diferentes pluralidades predeterminadas de líneas predeterminadas puede lograrse, por ejemplo, mediante el uso de ADN monocatenario como se describe a continuación (química ortogonal). Alternativamente, la fotoquímica ortogonal que utiliza diferentes longitudes de onda para la exposición y eliminación de los grupos protectores fotolábiles puede llevarse a cabo para lograr que solo un tipo predeterminado de molécula capturadora esté dispuesto en una pluralidad predeterminada de líneas predeterminadas en el punto de difracción.

[0079] La **figura 19** es una guía de ondas planar 1 que tiene una superficie externa 11 en la que se aplican dos pluralidades de moléculas enlazadoras 2, 5. La pluralidad superior de moléculas enlazadoras 5 transporta grupos protectores fotolábiles 3 (similar a la figura 3).

[0080] La **figura 20** muestra una etapa de exposición parcial a la luz de grupos protectores fotolábiles 3 dispuestos a lo largo de una primera pluralidad de líneas predeterminadas 401. La "exposición parcial" es la eliminación de solo un número de grupos protectores fotolábiles 3 a lo largo de dicha línea 401. El número es lo suficientemente alto como para proporcionar una señal detectable de luz difractada para muestras objetivo, unidas a la pluralidad de una primera molécula capturadora. El número debe ser tan pequeño como para que exposiciones (parciales) adicionales puedan llevarse a cabo a lo largo de pluralidades adicionales de líneas predeterminadas (402, 403), lo que provoca la eliminación de pluralidades adicionales de grupos protectores fotolábiles a lo largo de líneas adicionales (402, 403) en el mismo punto de difracción. Dichas líneas (401, 402, 403) pueden cruzarse o, en otras palabras, puede formarse un número de líneas una encima de la otra. Con referencia a la figura 18, las intersecciones de las líneas (401, 402, 403) generan la señal en ubicaciones de detección diferentes (421, 422, 423). La figura 20 muestra una posible estructura molecular de un molograma con múltiples focos.

[0081] La **figura 21** muestra tres tipos de ADN monocatenarios 621 (Tipo I), 622 (Tipo II), 623 (Tipo III) aplicados posteriormente mediante la repetición de la exposición parcial explicada en la figura 20 para estar dispuestos en tres pluralidades de líneas predeterminadas. Las diferentes pluralidades de líneas predeterminadas difractan la luz en diferentes focos (ubicaciones de detección separadas).

5

[0082] El ADN monocatenario permite llevar a cabo la química ortogonal de manera que las diferentes moléculas captadoras 6, 72, 73 estén vinculadas a diferentes ADN monocatenarios complementarios 631, 622, 623 selectivamente para que solo un tipo predeterminado de molécula captadora esté dispuesta en una pluralidad predeterminada de líneas predeterminadas. La disposición mostrada en la **figura 22** permite detectar individualmente las reacciones farmacéuticas, biológicas o químicas en la respectiva ubicación de detección (421, 422, 423).

10

[0083] La **figura 23** muestra un aspecto adicional de la invención. Se disponen dos pluralidades de líneas predeterminadas 402, 403 en un punto de difracción 41 en una guía de ondas planar (similar a la figura 18). Cada pluralidad está dispuesta de manera que la luz acoplada a través del acoplador óptico 12 en la guía de ondas planar difracta en cada pluralidad de líneas predeterminadas 402, 403 para interferir constructivamente en ubicaciones de detección individuales separadas 422, 423.

15

[0084] La **figura 24** es la guía de ondas planar 1 de la figura 23 que muestra un área de la superficie externa 11 en la que se interceptan líneas de las dos pluralidades de líneas predeterminadas 402, 403. Diferentes moléculas captadoras (en el presente ejemplo, moléculas capaces de unirse a uno de al menos dos sitios de unión de una proteína que es aplicada a la muestra objetivo) 75, 76 son dispuestas en diferentes pluralidades de líneas predeterminadas (véase la figura 23; 402, 403), lo que se puede lograr mediante química ortogonal. Como se ha explicado anteriormente, la química ortogonal utiliza, por ejemplo, ADN monocatenarios diferentes 621, 622 y ADN monocatenarios complementarios correspondientes 631, 632 para inmovilizar diferentes tipos de moléculas captadoras 75, 76 para disponerse en diferentes pluralidades de líneas predeterminadas en el mismo punto de difracción (véase la figura 23; 41). Una alternativa es la fotoquímica ortogonal que utiliza diferentes longitudes de onda para la exposición de grupos protectores fotolábiles. Una muestra objetivo 81 que es una proteína capaz de unirse a ambas moléculas captadoras 75, 76 puede formar enlaces cooperativos a través de interacciones de unión múltiples. Dicha interacción de unión múltiple es de alta resistencia debido a la fuerza combinada de ambas uniones, la unión de la muestra objetivo 81 a la molécula captadora 75, así como la unión de la muestra objetivo 81 a la molécula captadora 76. Ambas uniones pueden formarse simultánea o instantáneamente dentro de cortos periodos de tiempo. Las interacciones de unión múltiples son detectadas ópticamente a través de ambas ubicaciones de detección que proporcionan señales correlativas en ambas ubicaciones de detección. Ventajosamente, esto puede lograrse utilizando un procedimiento de detección de resolución temporal.

35

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar una superficie externa (11) de una guía de ondas planar (1) que sea capaz de unir muestras objetivo a lo largo de una pluralidad de líneas predeterminadas (4), estando dispuestas las 5 líneas predeterminadas (4) de manera que en funcionamiento, un campo evanescente de luz coherente acoplada y propagándose a través de la guía de ondas planar (1) se disperse en muestras objetivo a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas (4) para interferir constructivamente en una ubicación de detección predeterminada con una diferencia en longitud de camino óptico que es un múltiplo entero de la longitud de onda de la luz coherente que se propaga a través de la guía de ondas planar, o estando dispuestas las líneas predeterminadas (4) de manera que en 10 funcionamiento, el campo evanescente de la luz coherente acoplada y propagándose a través de la guía de ondas planar (1) se disperse en muestras objetivo dispuestas a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas (4) para interferir en direcciones predeterminadas dentro de la guía de ondas planar (1), comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 15 - proporcionar una guía de ondas planar (1) que tiene una superficie externa (11) adaptada para la adhesión de una molécula enlazadora (2) a la superficie externa (11);
 - aplicar secuencialmente al menos una pluralidad de moléculas enlazadoras (2, 5; 2) a la superficie externa (11), ensamblando cada pluralidad de la al menos una pluralidad de moléculas enlazadoras (2, 5; 2) para formar una capa individual de moléculas enlazadoras (2, 5; 2) con capas individuales que se forman una encima de la otra a partir de la 20 superficie externa (11) de la guía de ondas planar (1), comprendiendo cada molécula enlazadora (2,5; 2) un grupo funcional (22, 52; 22) y un grupo de cabeza (21, 51; 21), el grupo de cabeza (21, 51; 21) siendo capaz de adherirse a la superficie externa (11) de la guía de ondas planar (1) o a los grupos funcionales (22) de la capa anterior de moléculas enlazadoras (2), y en la que los grupos funcionales (52; 22) de las moléculas enlazadoras (5; 2) de la capa superior están unidos a los grupos protectores fotolábiles (3) de manera que cada grupo funcional (52; 22) de 25 la capa superior unida a dicho grupo protector fotolábil (3) sea incapaz de unirse a un grupo funcional complementario de una molécula adicional; y
 - exponer esos grupos protectores fotolábiles (3) de la capa superior dispuesta a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas (4) a la luz de una longitud de onda predeterminada para eliminar los grupos protectores fotolábiles expuestos (3) de los grupos funcionales (52; 22) capaces de unirse a un grupo funcional complementario de una 30 molécula adicional.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de aplicar secuencialmente la al menos una pluralidad de moléculas enlazadoras (2, 5) consiste en aplicar solo dos pluralidades de moléculas enlazadoras (2, 5), las dos pluralidades de moléculas enlazadoras (2, 5) ensambladas para formar dos capas individuales para formar dos capas individuales de 35 moléculas enlazadoras (2, 5) una encima de la otra a partir de la superficie externa (11) de la guía de ondas planar (1).
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, que comprende además las etapas de:
- 40 - unir grupos funcionales complementarios de moléculas capturadoras (6) a los grupos funcionales (52) de la capa superior de moléculas enlazadoras dispuestas a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas (4), siendo capaz cada molécula capturadora (6) de unir una muestra objetivo (8);
 - exponer esos grupos protectores fotolábiles (3) dispuestos entre la pluralidad de líneas predeterminadas (4) a la luz de la longitud de onda predeterminada para eliminar los grupos protectores fotolábiles expuestos (3) de los grupos 45 funcionales (52) para que estos grupos funcionales (52) sean capaces de unirse a un grupo funcional complementario de dicha molécula adicional; y
 - unir grupos funcionales complementarios de moléculas capturadoras modificadas (7) a los grupos funcionales (52) dispuestos entre la pluralidad de líneas predeterminadas (4), siendo incapaz cada molécula capturadora modificada (7) de unirse a esa muestra objetivo (8) a la que las moléculas capturadoras (6) son capaces de unirse. 50
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de aplicar secuencialmente la al menos una pluralidad de moléculas enlazadoras (2) consiste en aplicar solo una pluralidad de moléculas enlazadoras (2).
5. Procedimiento según la reivindicación 4, que comprende, además, la etapa de unir grupos de cabeza 55 de una pluralidad adicional de moléculas enlazadoras a los grupos funcionales (22) de la capa anterior de moléculas enlazadoras (2) dispuestas a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas (4), los grupos funcionales (52) de las moléculas enlazadoras (5) de la pluralidad adicional de moléculas enlazadoras (5) no estando vinculados a los grupos protectores fotolábiles (3) y siendo capaces de unirse a un grupo funcional complementario de una molécula adicional.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, que comprende, además, las etapas de:

- unir grupos funcionales complementarios de moléculas captadoras (6) a los grupos funcionales (52) de moléculas enlazadoras (5) de la pluralidad adicional de moléculas enlazadoras (5) dispuestas a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas (4);
- exponer esos grupos protectores fotolábiles (3) dispuestos entre la pluralidad de líneas predeterminadas (4) a la luz de la longitud de onda predeterminada para eliminar los grupos protectores fotolábiles expuestos (3) de los grupos funcionales (22) para que estos grupos funcionales (22) sean capaces de unirse a un grupo funcional complementario de una molécula adicional;
- unir grupos funcionales complementarios de otra pluralidad adicional de moléculas enlazadoras (5) a los grupos funcionales (22) de la capa anterior de moléculas enlazadoras (2) que están dispuestas entre la pluralidad de líneas predeterminadas (4), los grupos funcionales (52) de las moléculas enlazadoras (5) de la otra pluralidad adicional de moléculas enlazadoras (5) no estando vinculados a los grupos protectores fotolábiles (3) y siendo capaces de unirse a un grupo funcional complementario de dicha molécula adicional; y
- unir grupos funcionales complementarios de moléculas captadoras modificadas (7) a los grupos funcionales (52) de moléculas enlazadoras (5) de la pluralidad adicional de moléculas enlazadoras (5) dispuestas entre la pluralidad de líneas predeterminadas (4).

7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que la etapa de exponer esos grupos protectores fotolábiles (3) dispuestos a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas (4) se lleva a cabo para una primera dosis de exposición, y en el que la etapa de exponer esos grupos protectores fotolábiles (3) dispuestos entre la pluralidad de líneas predeterminadas (4) se lleva a cabo para una segunda dosis de exposición, siendo la primera dosis de exposición diferente de la segunda dosis de exposición.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la primera dosis de exposición y la segunda dosis de exposición son de menos de 10 julio/cm².

9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de exponer esos grupos protectores fotolábiles (3) dispuestos a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas (4) comprende las etapas de:

- colocar una máscara de fase (9) en la proximidad de los grupos protectores fotolábiles (3), la máscara de fase (9) teniendo una pluralidad de protuberancias (91) que tienen un primer índice de refracción n_1 y disponiendo un medio que tiene un segundo índice de refracción n_2 entre la máscara de fase (9) y la superficie externa (11) de la guía de ondas planar, siendo el primer índice de refracción n_1 diferente del segundo índice de refracción n_2 ; y
- transmitir luz de la longitud de onda predeterminada a través de la máscara de fase (9) para exponer esos grupos protectores fotolábiles (3) dispuestos a lo largo de la pluralidad de líneas predeterminadas (4).

10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la pluralidad de moléculas enlazadoras (2) de las que los grupos de cabeza (21) se adhieren a la superficie externa (11) se ensambla para formar una capa individual que tiene un grosor de 0,5 nm a 10 nm.

11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la pluralidad de moléculas enlazadoras (2) de las que los grupos de cabeza (21) se adhieren a la superficie externa (11) se ensamblan para formar una monocapa de moléculas enlazadoras (2).

12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la pluralidad de moléculas enlazadoras (5) de las que los grupos de cabeza (21) se adhieren a los grupos funcionales (22) de la capa anterior de moléculas enlazadoras (2) se ensambla para formar la capa individual superior que tiene un grosor de 10 nm a 200 nm.

13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la pluralidad de líneas predeterminadas (4) está dispuesta en al menos dos puntos de difracción separados (41) en la superficie externa (11) de la guía de ondas planar (1), cada punto de difracción (41) tiene un área mayor de 25 μm^2 y en el que la pluralidad de líneas predeterminadas (4) tiene una distancia entre líneas adyacentes (4) menor de 1,5 μm .

14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la distancia entre las líneas adyacentes (4) de la pluralidad de líneas predeterminadas (4) es menor de 1 μm .

60

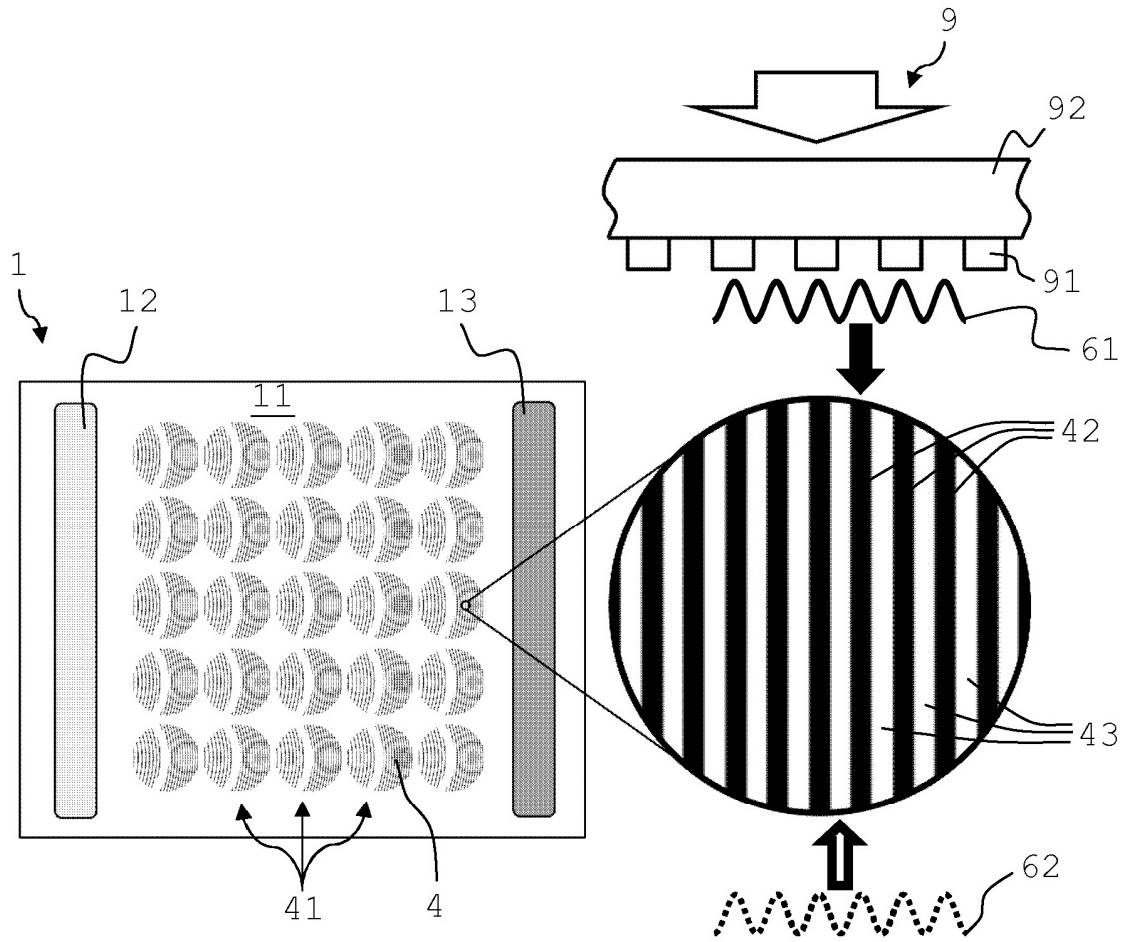


Fig. 1

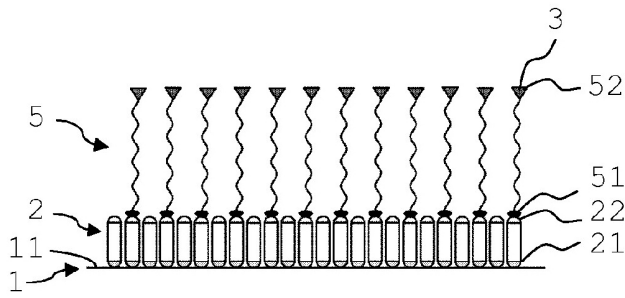


Fig. 2

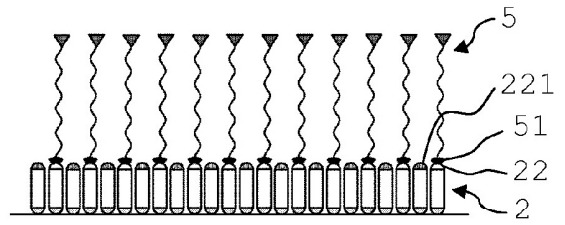


Fig. 3

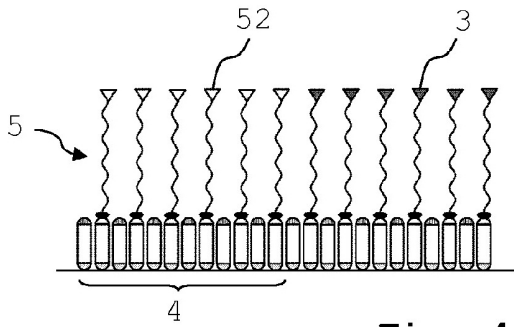


Fig. 4

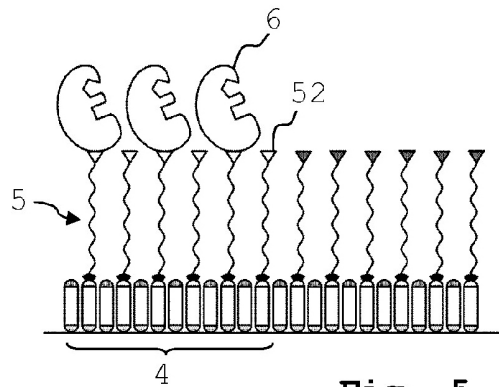


Fig. 5

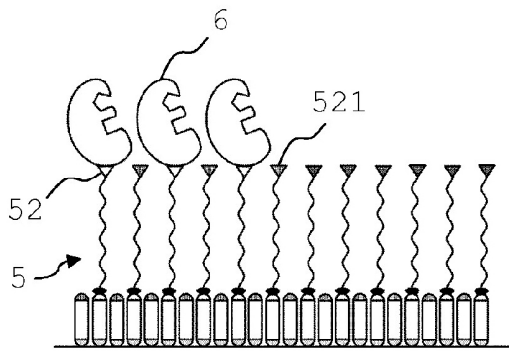


Fig. 6

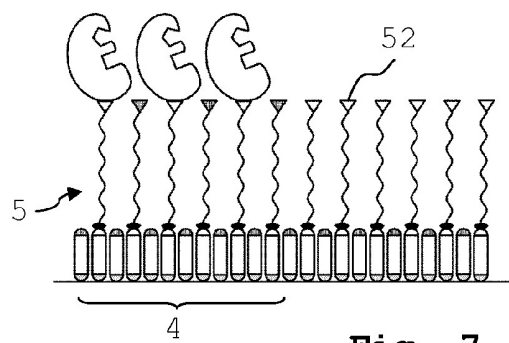


Fig. 7

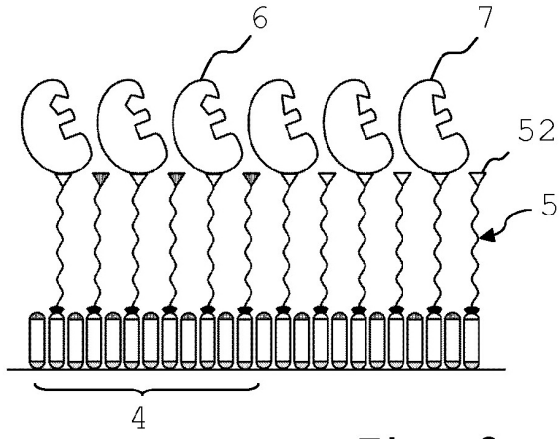


Fig. 8

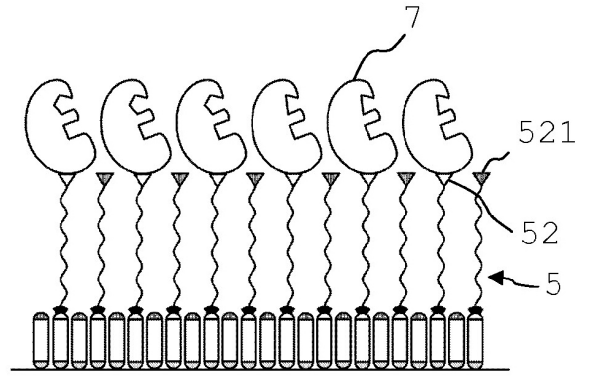


Fig. 9

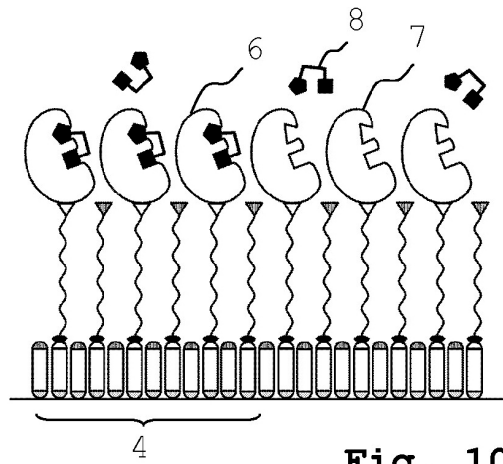


Fig. 10

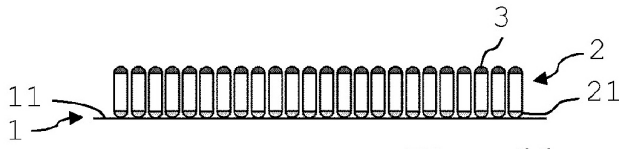


Fig. 11

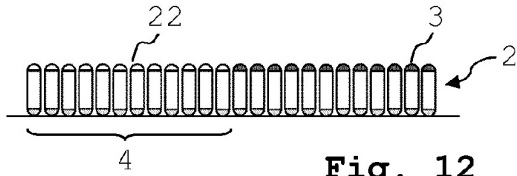


Fig. 12

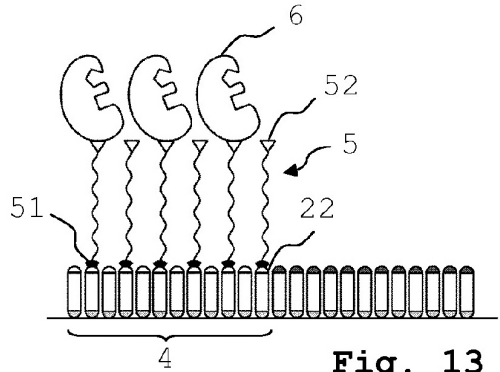


Fig. 13

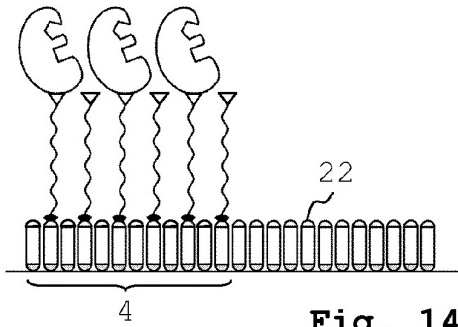


Fig. 14

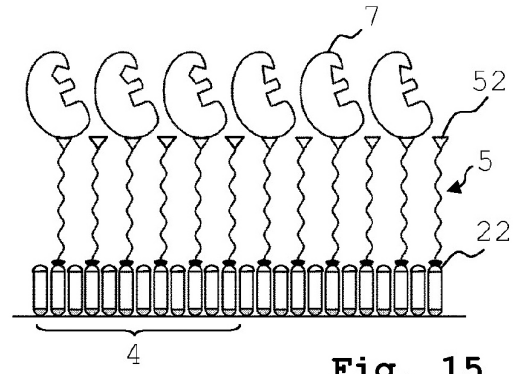


Fig. 15

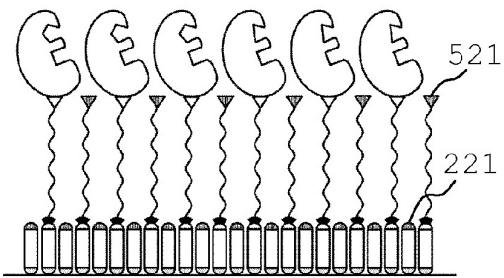


Fig. 16

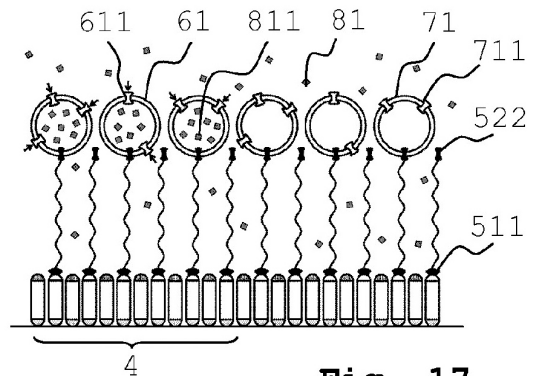


Fig. 17

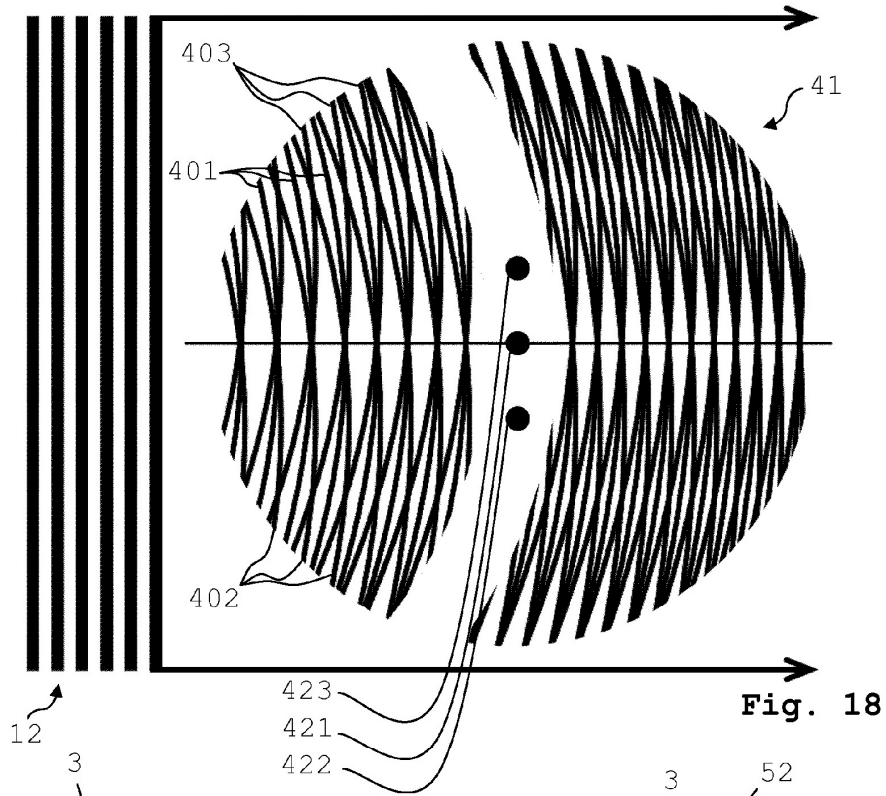


Fig. 18

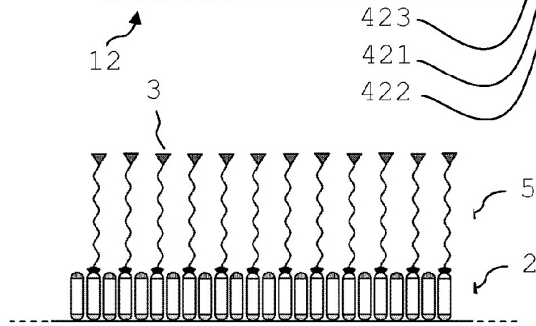


Fig. 19

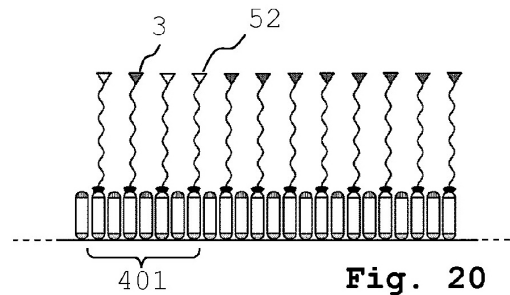


Fig. 20

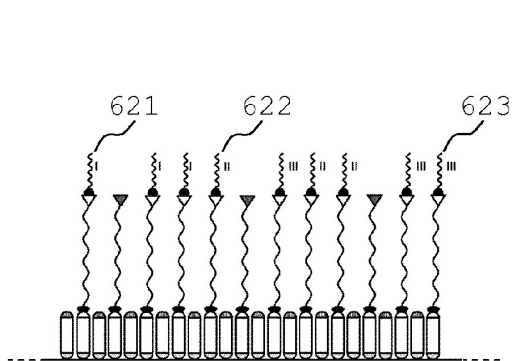


Fig. 21

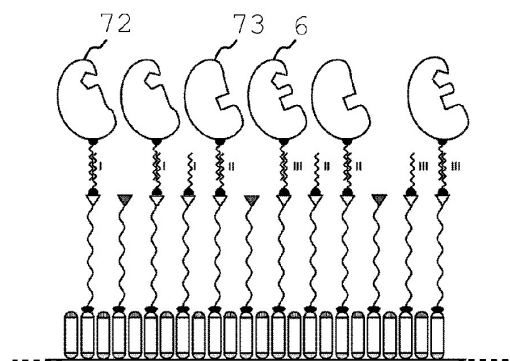


Fig. 22

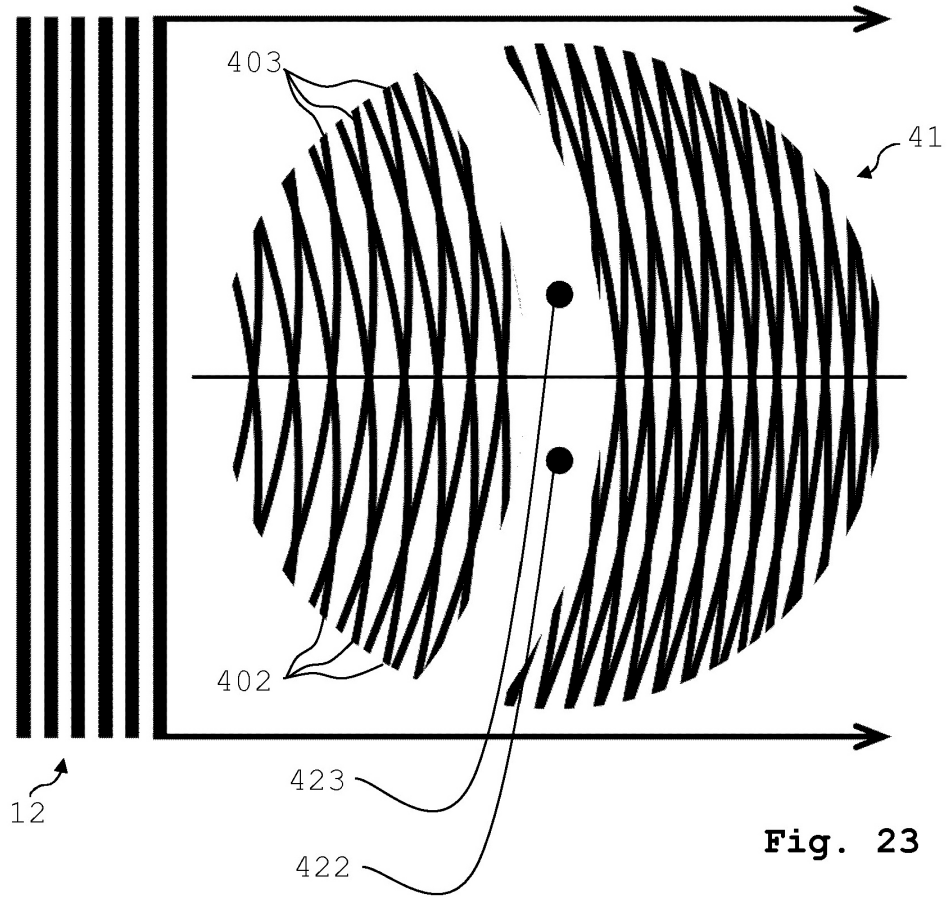


Fig. 23

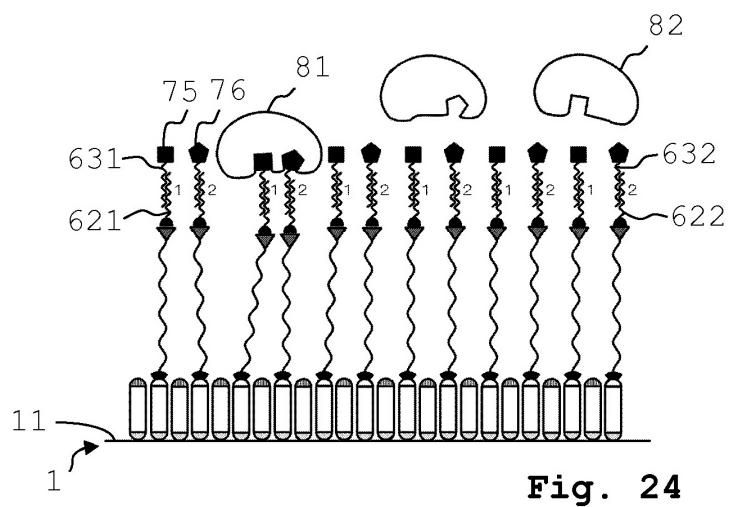


Fig. 24