

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 859 638**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2011 PCT/FR2011/053208**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO12089987**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2011 E 11815551 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2020 EP 2710351**

54 Título: **Dispositivo de tipo biochip**

30 Prioridad:

**29.12.2010 FR 1061349**

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

**04.10.2021**

73 Titular/es:

**GENEWAVE (100.0%)  
Immeuble Le Dorian, Bât 2B, 172 Rue de  
Charonne  
75011 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**WEISBUCH, CLAUDE;  
MARTINELLI, LUCIO;  
BENISTY, HENRI;  
SCHAFAUER, CHRISTOF;  
SAGARZAZU, GABRIEL;  
GACOIN, THIERRY y  
BEDU, MÉLANIE**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 859 638 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Dispositivo de tipo biochip

- 5 La invención se refiere a un dispositivo tipo biochip destinado al análisis de moléculas biológicas por marcaje fluorescente.

En estos dispositivos, un sustrato consta de tacos formadas por moléculas sonda capaces de hibridar de manera preferente con moléculas diana contenidas en una solución de hibridación obtenida a partir de una muestra a analizar.  
10 Las moléculas diana se marcan con ayuda de elementos cromóforos capaces de emitir una fluorescencia cuya longitud de onda depende de su naturaleza, cuando están excitados por una luz apropiada.

- Después de la hibridación, el biochip se seca y se ilumina con una fuente luminosa a la longitud de onda de excitación de los cromóforos que marcan las moléculas diana y se recoge una imagen de la fluorescencia del biochip con ayuda de una óptica adaptada. En la imagen obtenida de este modo, la intensidad de cada punto está conectada a la cantidad de cromóforos presentes en el punto correspondiente del biochip y, por lo tanto, al número de moléculas diana que se fijan selectivamente en este punto durante la fase de hibridación, lo que permite obtener información sobre el contenido en especies biológicas de la solución hibridada.  
15

- 20 Sin embargo, este tipo de lectura secuencial de la fluorescencia del biochip después de la hibridación no está adaptado para efectuar una lectura en tiempo real de la señal de hibridación, ya que las fases de hibridación y de imagen están disociadas temporalmente y se efectúan en aparatos de hibridación y de lectura separados.

- Ciertos aparatos integran las fases de hibridación y de lectura y permiten de este modo detectar la señal en tiempo real, durante la fase de hibridación (ver en particular Y. Marcy, P.-Y. Cousin, M. Rattier, G. Cerovic, G. Escalier, G. Béna, M. Guéron, L. McDonagh, F.L. Boulaire, H. Benisty, C. Weisbuch, J.-C. Avarre, "Innovative integrated system for real-time measurement of hybridization and melting on standard format microarrays", *Biotechniques* 44, 2008, 913). La imagen de la fluorescencia de los tacos que llevan moléculas hibridadas se adquiere en presencia del líquido de hibridación que contiene las moléculas diana marcadas, por lo tanto, fluorescentes, que puedes estar presentes en gran concentración. A continuación, se observa la fluorescencia que proviene tanto de las moléculas diana unidas a los tacos de las moléculas sonda (que forman la señal útil) como en las moléculas fluorescentes en la solución (que constituyen una señal de fondo que se añade a la señal útil).  
25  
30

- Esto es desventajoso, ya que la fuerte señal de fondo generada por las especies fluorescentes en solución limita la sensibilidad de la detección de la unión de las moléculas diana y la dinámica de la medición de hibridación.  
35

- Para evitar este inconveniente, una posibilidad consiste en excitar selectivamente las moléculas de la superficie del biochip sin excitar las presentes en la solución, usando una onda evanescente en la superficie del biochip para excitar solamente los tacos fluorescentes (una técnica que se usa a menudo para esto es la configuración de tipo "TIRF": fluorescencia de reflexión interna total). Otros métodos de excitación de ondas evanescentes consisten, por ejemplo, en utilizar sustratos que llevan una guía de onda, preferentemente monomodo, y en excitar uno o varios modos en esta guía de onda con ayuda de redes de acoplamiento grabadas o en excitar modos guiados en el biochip mediante la iluminación del tramo (U82004077099A1).  
40

- 45 Se encontrará en el artículo de Schmitt y *col.*, "Optical Guided-wave Chemical and Biosensors I, High-Refractive-Index Waveguide Platforms for Chemical and Biosensing", 1 de enero de 2010 (01-01-2010), OPTICAL GUIDED-WAVE CHEMICAL AND BIOSENSORS I, págs. 21-54, una descripción de los diferentes medios de acoplar una excitación exterior con una estructura óptica de guía y de la precisión necesaria de las estructuras de acoplamiento, de direccionalidad y colimación de la luz excitadora.  
50

- El documento US 6620623 enseña un sistema de iluminación donde la luz que entra en el sustrato de un biochip se transmite a través del tramo del biochip a partir de un haz plano de fibras ópticas, lo que necesita la alineación de la red de fibras ópticas con el tramo del sustrato. La luz que sale de las fibras es difundida por un colimador divergente hacia el tramo del sustrato para tener una excitación homogénea y la luz excitadora que se propaga en el plano del sustrato de la micromatriz.  
55

- El documento US 2001/003043 enseña la excitación de un sustrato de biochip con ayuda de un haz colimado que excita a través del tramo del sustrato los modos guiados en el sustrato, o el acoplamiento a los modos guiados del sustrato por una cara con ayuda de un prisma o red de difracción.  
60

- El documento FR 2846745 y tesis de Mélanie Bedu ("Développement de Guides d'ondes Planaires de TiO<sub>2</sub> Optiquement Actifs Pour Biopuces à Ondes Évanescentes", Tesis doctoral de la École Normale Supérieure de Cachan, 13 de noviembre de 2009) enseñan la excitación en modos guiados de una guía de ondas monomodo o multimodo que contiene elementos fotoluminiscentes que emiten a longitudes de ondas capaces de excitar los elementos cromóforos del biochip. Por lo tanto, la luz excitadora se convierte tanto en longitudes de ondas como en direcciones por el fenómeno de fotoluminiscencia que es, para simplificar el argumento, isotrópico. Esta fotoluminiscencia luego  
65

excita modos guiados en la guía de ondas. La excitación de la fotoluminiscencia se puede realizar con un haz incidente sobre las especies fotoluminiscentes sin ser colimada con precisión, una clara ventaja con relación a las técnicas discutidas anteriormente. En cambio, el método consta de dos inconvenientes: la fabricación de guías de ondas que contienen especies fotoluminiscentes es costosa y el método carece de flexibilidad: las especies fotoluminiscentes y los cromóforos están emparejados, así como la luz de excitación, lo que impone, por ejemplo, que, una vez fabricadas las guías de ondas con sus especies fluorescentes, los cromóforos utilizados en los biochips tienen su longitud de onda de excitación cuasi impuesta. Esto también congela la longitud de onda de excitación. Por último, la potencia de excitación de los cromóforos estará limitada por la potencia soportada por las especies fotoluminiscentes antes de su blanqueamiento ("*bleaching*").

De manera general, también es necesario tener en cuenta la interacción de las ondas guiadas con la parte optofluídica del dispositivo en contacto con la guía de onda.

Para los dispositivos de ondas evanescentes descritos anteriormente, el acoplamiento de la luz necesita utilizar dispositivos de excitación que tienen restricciones mecánicas muy exigentes en términos de precisión.

Este tipo de acoplamiento impone el uso de ópticas de precisión submicrométricas sobre tramos pulidos para el acoplamiento de la luz de excitación a un único modo, o el uso de haces colimados en ángulos muy precisos (algunos miliradianes o menos).

La presente invención se libera de las restricciones descritas anteriormente. Se sabe que la luz que incide en conjuntos no homogéneos como partículas metálicas o dieléctricas, o en general difusores, permite excitar modos guiados de cualquier estructura plana con la condición de que los elementos del difusor estén en una posición muy próxima a la guía, en la cola evanescente de los modos. Esto permite de este modo superar las bajas tolerancias de acoplamiento encontradas con los dispositivos descritos anteriormente. Se llamará a tales difusores "*medios de generación o acoplamiento sustancialmente no direccionales*" de modos guiados.

La expresión "*medios de acoplamiento sustancialmente no direccionales*" aquí designa medios para el acoplamiento de una luz de excitación en la guía de onda en forma de ondas guiadas en una pluralidad de direcciones en el interior de la guía de onda, a partir de la luz de excitación procedente de una pluralidad de direcciones. El acoplamiento de la luz de excitación con la guía de onda puede tener lugar a partir de un haz de luz de excitación que no está necesariamente colimado. Con tales medios de acoplamiento, ya no es necesario orientar el haz con mucha precisión en la guía de onda.

Dichos medios de acoplamiento son conocidos para guías de ondas y células solares, de silicio, por ejemplo. En estas aplicaciones, una interfaz desordenada difusora sirve para transformar la luz incidente en luz guiada con el fin de que se use en la guía de onda o absorbida en la célula solar. Para las aplicaciones en guías de ondas, el objetivo es entonces utilizar la luz en la guía para que se absorba allí para su uso, por ejemplo, en un dispositivo fotodetector. Para las células solares, la difusión tiene lugar sobre toda la superficie de la célula para capturar adecuadamente toda la luz interceptada por la célula.

El objeto de la invención es aportar una solución simple a los problemas antes mencionados de los dispositivos de tipo biochip conocidos de la técnica anterior.

Para este fin, la invención propone un dispositivo de tipo biochip, tal como se define en la reivindicación 1.

La integración de medios de acoplamiento sustancialmente no direccionales en un dispositivo de tipo biochip hace posible superar las restricciones de precisión encontradas con la técnica conocida.

Según la invención, los medios de acoplamiento cubren solo una parte del biochip. En particular, estos medios de acoplamiento se colocan a una distancia de la parte fluidica u optofluídica, para evitar una extracción de las ondas guiadas hacia el fluido que contiene moléculas fluorescentes, lo que es precisamente lo que se busca evitar gracias a la excitación de los fluoróforos excitados por las únicas ondas evanescentes.

En una configuración ventajosa, el dispositivo comprende medios de filtrado modal para la eliminación en la guía de onda de los modos guiados de índice efectivo inferior o igual a un valor umbral predeterminado, siendo este valor umbral elegido de modo que ningún modo guiado se escape de la guía después de la zona que consta de los medios de filtrado.

Un primer inconveniente de los enfoques basados en medios de acoplamiento sustancialmente no direccionales reside en la baja eficacia de acoplar los modos de excitación a los modos guiados. Para lograr una determinada intensidad guiada, es posible utilizar una fuente excitadora más intensa. No obstante, el principal inconveniente en el caso de una guía multimodo es que este tipo de método de excitación de los modos guiados tiende a excitar los modos independientemente de su índice efectivo. Sin embargo, los modos de los índices efectivos más bajos corresponden a los modos que salen de la guía para entrar en el fluido o en las partes optofluídicas, donde contribuyen a aumentar la señal de fondo.

Debido a que los modos guiados transfieren un flujo propagativo al fluido solo en contacto con el fluido o la parte optofluídica, el uso de medios de acoplamiento no direccionales puede combinarse ventajosamente con medios de filtrado eliminando los molestos modos capaces de interactuar con el fluido o la parte optofluídica.

5 Desde un punto de vista teórico, la condición de no transferencia de un modo guiado a una interfaz habitualmente se presenta en forma angular (el ángulo de incidencia sobre la interfaz es superior a un ángulo crítico) pero esta condición se expresa más fundamentalmente en forma de índice efectivo de modo guiado que debe ser mayor que la de la parte optofluídica o del fluido.

10 Al sintetizar las proposiciones anteriores, en el dispositivo según la invención, la facilidad mecánica del acoplamiento se asegura mediante medios de generación de ondas guiadas débilmente direccionales, tales como en particular medios difusores ópticos, mientras que los medios de filtrado modal permiten la eliminación selectiva de aquellos entre los modos guiados que podrían extraerse de la guía de onda y aumentar la señal parásita de fondo. De este modo, los modos guiados cuyo índice efectivo es inferior al del material de una cámara de hibridación y el de la solución biológica se filtran antes de llegar al nivel de la zona optofluídica y a fortiori antes de llegar al nivel de la zona portadora de los elementos cromóforos para que la excitación de los elementos cromóforos libres en solución más allá de la onda evanescente se evita.

15 En un primer modo de realización, los medios de filtrado comprenden una capa de adaptación de índice en contacto con la guía de onda y formada por un medio de índice sustancialmente igual al valor umbral predeterminado para filtrar por extracción los modos guiados de índice efectivo inferior al valor umbral, para que no alcancen las zonas que constan de funciones fluídicas u optofluídicas. La capa de adaptación de índice determina el valor de umbral mencionado anteriormente por debajo del cual todos los modos guiados previamente se extraerán de la guía de onda.

20 Según una variante, la capa de adaptación de índice se intercala entre la hoja de guía de onda y una capa inferior de absorción, extendiéndose la capa de adaptación de índice y la capa de absorción que, sobre toda la longitud de la guía de onda, teniendo la capa de absorción un índice al menos igual al de la capa intermedia de adaptación de índice y presentando una absorción importante en la escala del trayecto óptico entre los medios de acoplamiento y una zona de la guía de onda que lleva los elementos cromóforos, a las longitudes de onda de excitación de los cromóforos.

25 En la práctica, la capa de absorción tiene un coeficiente de absorción superior o igual a  $2/L$ , donde  $L$  corresponde a la distancia entre los medios de acoplamiento no direccionales y la parte optofluídica para garantizar una absorción suficiente de los modos de índice inferior al valor umbral predeterminado. Estos modos se propagan en esta capa y después de un trayecto de aproximadamente  $L$ , una transmisión inferior a  $\exp(-2)$  aproximadamente igual a 0,14. La hoja de la guía de onda y la capa de adaptación de índice permiten, con espesores conocidos por el experto en la materia tener al menos un modo guiado sobre al menos una longitud  $L$  con un índice  $n_{\text{eff}}$  mayor que el umbral deseado.

30 Según otra variante de este primer modo de realización, los medios de filtrado son llevados por la guía de onda y están localizados, entre una zona de la guía de onda en la que se generan las ondas guiadas y una zona de la guía de onda que lleva los elementos cromóforos.

35 Ventajosamente, unos medios de absorción o de desviación de los modos guiados extraídos de la guía de onda están montados sobre la capa de adaptación de índice, con el fin de que los modos extraídos no puedan alcanzar las partes fluídicas u optofluídicas del biochip.

Los medios de absorción consisten, por ejemplo, en un filtro de banda ancha. Los medios de desviación pueden consistir en un prisma o una red, estando estos medios unidos directamente a la capa de adaptación del índice.

40 Según otra característica de la invención, la capa de adaptación de índice, así como los medios de absorción o los medios de desviación se extienden a lo largo de la guía de onda en una distancia superior a la longitud que permite que el modo guiado a filtrar que tiene el índice efectivo más alto interactúe al menos una vez con la interfaz que filtra los modos.

45 Esta distancia es dada por  $2 \times e \times \tan \theta$ , donde  $e$  es el espesor de la guía de onda y  $\theta$  es el ángulo de reflexión en el interior de la guía de onda y con respecto a la normal a la guía de onda. Con tal extensión mínima de medios de filtrado, se garantiza que todos los modos guiados, cuyo índice efectivo es inferior al valor umbral predeterminado, sufrirán al menos una refracción, una absorción o una desviación al nivel de la interfaz de la guía de onda y, de este modo, se extraerán de la guía de onda.

50 Según otra característica de la invención, los medios de filtrado modal se extienden aguas arriba y en el exterior de la zona que lleva los elementos cromóforos, pero también en parte en esta zona. Esto tiene el interés de filtrar los fotones eventualmente dispersos por los bordes de la cámara de hibridación hacia modos guiados de la guía de índice incontrolados que luego podrían salir de la guía de ondas y excitar la solución de hibridación.

55 Preferentemente, el valor umbral se elige para que sea superior o igual al índice de refracción más alto de los

5 elementos que constituyen el entorno de los cromóforos, tales como, por ejemplo, una cámara de hibridación colocada sobre el sustrato, generalmente en contacto óptico, y un fluido de hibridación contenido en la cámara, lo que evita que los modos guiados de índice efectivo inferior al valor umbral se extraigan de la guía de onda y se propaguen directamente en el fluido de hibridación, o bien, indirectamente en el fluido por medio del material de la cámara de hibridación, y exciten los cromóforos de las moléculas diana no unidas a moléculas sonda.

10 En la práctica, el valor umbral está entre  $n=1,30$  y  $n=1,45$  ya que el índice de refracción de una solución de hibridación está habitualmente entre  $n=1,3$  y  $n=1,4$  y el material que constituye la cámara es habitualmente PDMS (polidimetilsiloxano) de  $n=1,42$ .

15 En un segundo modo de realización, los medios de filtrado están formados por la hoja que lleva los elementos cromóforos y cuyas caras superior e inferior se alejan una de la otra de la zona de los medios de acoplamiento aguas abajo de la zona que lleva los elementos cromóforos, para elevar en cada reflexión interna el índice efectivo más bajo de distribución de la luz. Esto corresponde, de este modo, a hacer que los rayos de las ondas guiadas sean más oblicuos a su llegada a la zona optoflúidica que el ángulo límite asociado al paso a través del fluido o al material de la cámara de hibridación.

20 En este segundo modo de realización, por lo tanto, la estructura ya no es plana sino abocinada, con un ángulo  $\alpha$  definido entre las caras superior e inferior de la hoja antes mencionada. De este modo, por lo tanto, el ángulo de un modo guiado aumenta en  $2\alpha$  por cada rebote del modo guiado en la cara inferior. La aplicación de las leyes de la óptica geométrica a imágenes sucesivas procedentes de un punto sobre la superficie superior muestra fácilmente que el ángulo más pequeño (al que corresponde el índice efectivo más bajo) aumenta hasta el límite de  $90^\circ$  cuando la fuente de generación de ondas guiadas se acerca a la arista formada por la intersección de las caras superior e inferior de la guía. Por lo tanto, existe una posición ideal  $L'$  entre esta arista y el sistema optoflúidico, para colocar los medios de acoplamiento sustancialmente no direccionales.

25 En una realización particular, de este segundo modo de realización, las caras superior e inferior de la guía de onda son planas y los medios de acoplamiento no direccionales se colocan a un cuarto de la distancia que separa la arista formada en la intersección de las caras superior e inferior y la parte de la guía de onda que lleva los elementos cromóforos.

En una variante posible, solo la cara superior puede ser plana, la cara inferior siendo, por ejemplo, curvada cóncava.

35 Preferentemente, el acoplamiento de la luz de excitación tiene lugar por difusión y genera ondas guiadas que se propagan en una pluralidad de direcciones en el interior de la guía de onda.

40 Las ondas guiadas se pueden generar por iluminación de una estructura difusora formada en o sobre la guía de onda, lo que permite la formación de ondas guiadas que se propagan en una pluralidad de direcciones en el interior de la guía de onda, y evita una etapa posterior de homogeneización de la luz guiada en el plano de la guía.

Ventajosamente, la estructura difusora que sirve para realizar un acoplamiento sustancialmente no direccional es una estructura con distribución espacial desordenada de índice.

45 La estructura difusora puede estar formada por un deslustrado que tiene una granularidad típica tanto en el plano de la guía como perpendicularmente comprendida entre  $0,1 \mu\text{m}$  y  $50 \mu\text{m}$ . La estructura difusora también puede estar formada por una capa depositada sobre una cara de la guía de onda, por ejemplo, de teflón o de partículas metálicas o coloidales.

50 Como variante, la estructura difusora puede comprender partículas difusoras en una matriz de una resina tal como, por ejemplo, una resina acrílica, gliceroftálico o de un polímero que puede ser fluorado. Para garantizar una buena difusión de la luz de excitación por la estructura difusora, es preferible que la matriz tenga un índice de refracción inferior en al menos  $\Delta n=0,5$  al de las partículas difusoras. De este modo, son preferentes las partículas de alto índice, por ejemplo, óxidos como  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{BaSO}_4$ .

55 La estructura difusora también puede ubicarse en el interior de la guía de onda y realizarse en forma de microcavidades con dimensiones del orden de  $0,1$  a  $40 \mu\text{m}$  y preferentemente del orden de  $0,1$  a  $30 \mu\text{m}$ . También se puede realizar en forma de modificaciones locales tales como la formación local de compuestos no estequiométricos del tipo  $\text{SiO}_x$  en vidrio, por ejemplo, o en forma de zonas moleculares de diferentes fases de la fase de la guía, por ejemplo, ordenado en lugar de amorfo, en particular. Estos cambios en la estequiometría o en las fases afectan el índice o al tensor dieléctrico de la estructura difusora. Tal estructura difusora de este tipo se puede realizar suministrando energía localizada por un láser enfocado en el lugar donde se desea formar la estructura difusora.

65 En una segunda realización de la estructura difusora, este último se deposita sobre una cara de la guía de onda y comprende una capa de material fluoróforo y que genera, en respuesta a una excitación luminosa, una luz de fluorescencia que, a su vez se propaga en la guía de onda en forma de ondas que tienen una parte evanescente.

Los materiales fluoróforo pueden ser de muy diversas naturalezas y comprenden, en particular, puntos cuánticos, fluoróforos orgánicos o basados en tierras raras o iones luminiscentes.

5 Otras ventajas y características de la invención resultarán evidentes al leer la siguiente descripción dada a modo de ejemplo no limitativo y con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

- la figura 1 es una vista esquemática en sección de un dispositivo de tipo biochip de la técnica conocida;
- las figuras 2 y 3 son vistas esquemáticas en sección de un dispositivo de tipo biochip según la invención que comprende medios de filtrado integrados en la guía de onda;
- 10 - la figura 4 es una vista esquemática en sección de un dispositivo de tipo biochip según la invención en el que la guía de onda lleva los medios de filtrado;
- las figuras 5 y 6 son vistas esquemáticas en sección de dos variantes del dispositivo de la figura 4;
- las figuras 7A, 7B y 7C son representaciones esquemáticas de la parte de la guía de onda al nivel de la que se forman las ondas guiadas que tienen una parte evanescente;
- 15 - las figuras 8 a 13 representan diferentes montajes para generar ondas guiadas en la guía de onda con el dispositivo según la invención.

Se hace referencia primero a la figura 1 que representa un dispositivo 10 de tipo biochip de la técnica conocida que comprende un sustrato 12 que consta de una capa superior 14 que forma una guía de onda. La luz de excitación 16 se dirige a los medios de acoplamiento 18 tales como, por ejemplo, una red formada en la superficie de la guía de onda para hacer que una onda guiada se propague en el interior de la guía de onda 14. La guía de onda 14 lleva, a distancia de la red 18, una cámara de hibridación 20 que contiene una solución 22 que consta de moléculas diana marcadas con elementos cromóforos y adecuados para llegar a hibridar con moléculas sonda depositadas sobre los tacos 24 de la superficie de la guía de onda 14.

25 Se proporcionan medios de detección, por ejemplo, sobre la cara del sustrato 12 opuesta a la que lleva la cámara de hibridación 20 y comprenden una cámara 26 tal como una cámara CCD o CMOS y un filtro 28 de rechazo de la luz de excitación de los cromóforos. En tal dicho dispositivo, la parte evanescente de la onda guiada excita los cromóforos llevados por la guía de onda 14. Sin embargo, y como se mencionó anteriormente, este tipo de dispositivo puede resultar difícil de implementar debido a la dificultad de realizar un acoplamiento óptico adecuado entre la luz incidente y la guía de onda, necesitando este acoplamiento una gran precisión sobre el ángulo de incidencia de colimación de la luz de excitación si se trata de un acoplamiento por red resonante convencional en óptica guiada, o incluso precisión mecánica submicrométrica si es un acoplamiento directo por el tramo. Además, y especialmente cuando la guía de onda es adecuada para propagar una pluralidad de modos guiados, es decir, una guía de onda que normalmente tiene un espesor superior a la longitud de onda de las ondas guiadas para saltos de índice del orden de 1, los modos guiados cuyo índice efectivo es inferior al índice de los elementos que rodean a los cromóforos, tales como el material de la cámara de hibridación 20 y/o la solución de hibridación 22, se extraen de la guía de onda 14 y excitan las moléculas diana presentes en la solución de hibridación 22 y no unidas a las moléculas sonda. De ello resulta una disminución en la relación señal/ruido cuando se realiza una medición en tiempo real de la luminiscencia emitida por los cromóforos.

40 El dispositivo según la invención propone utilizar medios de acoplamiento sustancialmente no direccionales 19 y de dimensiones poco críticas (0,1 a 10 mm, por ejemplo) que realizan un acoplamiento óptico entre la fuente luminosa y la guía, para generar ondas guiadas en una pluralidad de direcciones en el interior de la guía de onda, a partir de, por ejemplo, un haz de luz de excitación no colimado. Tales medios de acoplamiento son, por ejemplo, una estructura difusora y se describirán con más detalle en el resto de la descripción.

Ventajosamente, estos medios de acoplamiento se combinan con medios de filtrado modal, para extraer de la guía plana multimodo 14 los modos guiados cuyo índice efectivo es inferior o igual a un valor umbral predeterminado.

50 Estos medios de filtrado pueden estar formados por la propia guía de onda (figuras 2 y 3) o por ser llevados por ésta (figuras 4 a 6).

Se hace ahora referencia a la figura 2 que representa una estructura estratificada que comprende tres capas superpuestas de las cuales la capa superior 30 sirve como guía de onda plana sin absorción y tiene un índice  $n_1$ . La segunda capa 32 está intercalada entre la capa superior 30 y una capa de absorción inferior 34. La capa intermedia 32 de adaptación de índice tiene un índice  $n_2$  sustancialmente igual al valor de umbral de índice predeterminado.

60 En esta realización, la capa superior 30 comprende en un extremo los medios de acoplamiento 19 y en el otro extremo la parte optofluídica 36. Las capas intermedias 32 y de absorción 34 se extienden sobre toda la longitud de la capa superior de guía 30 para realizar el filtrado sobre toda la longitud L que separa los medios de acoplamiento sustancialmente no direccionales 19 y la parte optofluídica 36.

65 El índice  $n_3$  de la capa absorbente 34 se elige para que sea superior a  $n_2$ , siendo  $n_1$  por su parte suficientemente grande y siendo el espesor adecuado las reglas de la óptica guiada teniendo en cuenta los contrastes con  $n_2$  por un lado y con el índice  $n$  de la solución de hibridación 22 por otro lado, para soportar al menos un modo de índice superior al umbral deseado. El espesor  $z_2$  de la capa intermedia de índice  $n_2$  es suficiente para que este modo no se filtre a lo

largo de la distancia L: el factor de caída exponencial en  $z_2$ ,  $f = \exp [2 \times \pi \times (z_2/\lambda) \times \sqrt{(n_{\text{eff}}^2 - n_2^2)}] > 1$  debe ser al menos tres veces mayor que la relación  $L/z_1$  de L al espesor de la capa 30 de índice  $n_1$  de modo que la capa intermedia juega su papel en la longitud L. Los modos del índice  $n_{\text{eff}} < n_2$  se ven obligados a extenderse a la tercera capa absorbente, de espesor  $z_3$  y cubrir una distancia del orden de L. Entonces es suficiente con dotar a esta tercera capa 34 de un coeficiente de absorción  $\alpha_3$  superior a  $2/L$  para atenuar modos indeseables de índice  $n_{\text{eff}} < n_2$ .

A título de ejemplo, estas tres capas laminadas se pueden formar a partir de polímero. Una secuencia de índice típica puede ser  $n_1=1,55$ ,  $n_2=1,42$  y  $n_3=1,55$ . Los espesores pueden ser  $z_1=5$  a  $50 \mu\text{m}$  para la capa 30,  $z_2 > 3 \mu\text{m}$  para la capa 32 y  $z_3$  superior o igual a  $z_1$  para la capa 34, por ejemplo, del orden de  $500 \mu\text{m}$  para una longitud L de 1 cm.

La absorción se puede obtener mediante un colorante orgánico o inorgánico disperso en la tercera capa 34. En un caso práctico, para absorber la luz a 532 nm utilizada para la excitación de cromóforos tales como la cianina 3, se pueden utilizar un dopaje por absorbentes estables como sales de hierro en  $\text{Fe}^{3+}$ .

La figura 3 representa una segunda realización de los medios de acoplamiento formados por la guía de onda. En esta realización, las caras superior 38 e inferior 40 de la guía de onda 42 son planas y se alejan una de la otra desde los medios de acoplamiento 19 hasta la parte optofluídica 36, por ejemplo, en forma de bisel. Las caras superior 38 e inferior 40 de la guía de onda 42 forman un ángulo  $\alpha$ , al nivel de su arista de intersección 44 que, en el presente caso, se encuentra fuera del dispositivo. Tal guía 42 se denomina guía biselada. Los rayos procedentes de los medios de acoplamiento 19 que se reflejan en la cara inferior 40 se encuentran cada vez más inclinados con respecto a la cara superior 38, desde un ángulo  $2\alpha$  a cada par de reflexión. Este filtrado es un filtrado "dinámico", en el que la energía de los modos se transfiere a índices efectivos que aumentan de tamaño a medida que se propagan los rayos de luz. Para comprender cómo funciona este filtrado, se pueden utilizar las leyes de la óptica geométrica. De este modo es posible prever que las sucesivas imágenes 46 de los medios de acoplamiento 19 giren sucesivos ángulos  $2\alpha$  en cada par de reflexión y se alejen hacia la arista 44 siguiendo un semicírculo centrado en la arista 44. Esto implica un límite al ángulo de incidencia alcanzable sobre la parte optofluídica, en función de las dos distancias relevantes del problema óptico geométrico, a saber, L' correspondiendo a la distancia de la arista 44 a los medios de acoplamiento 19, y la distancia L desde los medios de acoplamiento 19 a la parte optofluídica 36. La construcción del triángulo rectángulo ABC que pasa por la arista 44 y el radio L' muestra que el ángulo mínimo de incidencia  $\theta$  de un radio en la parte optofluídica está dado por  $\sin(90^\circ - \theta) = \cos \theta = L'/(L+L')$ , ya que el triángulo rectángulo ABC tiene un ángulo de  $90^\circ - \theta$  en el vértice C. La determinación de este ángulo impone, de este modo, un valor mínimo sobre el índice efectivo que es  $n_{\text{eff}} = n \times \sin(\theta)$ . En la práctica, es deseable apuntar a ángulos  $\theta$  del orden de  $70^\circ$  ( $n_{\text{eff}}=1,41$  para un índice del material guía del orden de  $n=1,5$ ). Esto impone una relación  $L/L'=1/\sin(90^\circ - \arcsen(n_{\text{eff}}/n))-1 = 2$ . Cabe señalar que este resultado es independiente del ángulo  $\alpha$  del bisel. En la práctica, se puede elegir entre  $2^\circ$  y  $10^\circ$ . La extensión de los medios de acoplamiento 19, por ejemplo, difusores, debe tenerse en cuenta simplemente buscando asegurar la condición deseada para los rayos más desfavorables entre los que resultan de estos medios, por lo tanto, los de la fuente 19 más cercana a la cámara de hibridación 20.

En otras variantes (no representadas), las caras superior e inferior pueden alejarse una de la otra sin ser planas, que sería el caso, por ejemplo, de caras curvas cóncavas. La cara superior también puede ser plana y la cara inferior se puede curvar, por ejemplo, curvada cóncava.

En las realizaciones mostradas en las figuras 4 a 6, los medios de filtrado son transportados por la guía de onda y están interpuestos entre los medios de acoplamiento 19 y la zona 36 de la guía de onda 14 que lleva la cámara de hibridación 20. Estos medios comprenden ventajosamente una capa de adaptación de índice 48 en contacto con la superficie superior 50 de la guía de onda 52. Esta capa de adaptación de índice 48 se elige de modo que su índice de refracción sea igual al valor umbral predeterminado (figura 4).

Los medios de absorción o desviación 53 de los modos guiados extraídos de la guía de onda 52 se colocan ventajosamente en la capa de adaptación de índice 48.

En una realización práctica de la invención, los medios de absorción comprenden, por ejemplo, un filtro 54 de amplio espectro de absorción que realiza un filtrado volumétrico de las ondas guiadas. Este tipo de filtro es muy adecuado ya que refleja solo muy pocas ondas guiadas en su interfaz con la capa de adaptación del índice 48 (figura 5). Los medios de desviación comprenden, por ejemplo, un prisma 56 de índice elegido para producir una desviación de las ondas guiadas extraídas como se muestra en 58 en la figura 6.

Debido a la presencia de una capa de adaptación de índice 48 entre los medios de acoplamiento y la zona 36 de la guía de onda que lleva la cámara de hibridación 20, los modos guiados cuyo índice efectivo es inferior al índice de la capa de adaptación de índice 48 se extraen de la guía de onda y se refractan en el interior de esta capa. La presencia de los medios de absorción 54 o desviación 56 en la capa 48 evita una reflexión de los modos guiados extraídos al nivel de la interfaz superior de la capa de adaptación del índice 48, lo que llevaría a reintroducir los modos guiados extraídos en el interior de la guía plana 52.

Para garantizar un filtrado óptimo de los modos guiados con un índice efectivo inferior al valor umbral predeterminado, la capa de adaptación de índice 48 y los medios de absorción o los medios de desviación deben extenderse entre la

5 zona 19 de generación de las ondas guiadas y la zona 36 que lleva la cámara de hibridación 20 sobre una distancia superior o igual a  $2e \times \tan \theta$ , donde  $e$  es el espesor de la guía de onda y  $\theta$  es el ángulo de reflexión en el interior de la guía de onda y con respecto a la normal a la guía de onda 52 del modo guiado a filtrar que tiene el índice efectivo más alto. De esta manera, es posible garantizar que todos los modos guiados cuyo índice efectivo es inferior al valor umbral predeterminado sufrirán al menos una refracción en la interfaz entre la guía de onda 52 y la capa de adaptación de índice 48.

10 Como variante, los medios de filtrado también pueden extenderse al menos parcialmente debajo de los tacos 24 en la cámara de hibridación para filtrar los fotones posiblemente dispersos por los bordes de la cámara hacia modos de guía de índice no controlados que podrían filtrar y excitar la solución.

15 En una realización de la invención, la cámara de hibridación 20 está realizada de polidimetilsiloxano (PDMS) que tiene un índice de refracción de  $n=1,42$  y la solución de hibridación 20 es a base de agua y tiene un índice del orden de  $n=1,33$ . En un caso de este tipo, el medio de adaptación del índice 36 se elige para que tenga un índice al menos igual al índice más alto que rodea a los cromóforos, es decir,  $n=1,42$ .

20 En la práctica, el valor del índice de umbral se elegirá entre  $n=1,30$  y  $1,45$ , que corresponde a los valores de índices comúnmente encontrados para los materiales de la cámara de hibridación 20 así como para la solución de hibridación 20.

A continuación, se describirán con más detalle los medios utilizados para generar una pluralidad de ondas guiadas en el interior de la guía de onda plana y que tienen una parte evanescente destinada a excitar los elementos cromóforos fijados en los tacos 24.

25 En un primer modo de realización, el dispositivo comprende una estructura difusora formada en o sobre la guía de onda y destinada a ser iluminada por la luz de excitación.

30 Esta estructura difusora (figuras 7 y 8) tiene una distribución espacial desordenada del índice para difundir la luz de excitación en el interior de la guía en una pluralidad de direcciones. Tal estructura facilita la conversión de la luz de excitación en luz guiada y esto con una eficacia que depende poco de las condiciones de excitación, en particular, el ángulo de incidencia. De este modo, con tal estructura tan difusora, la tolerancia angular es bastante grande y del orden de 10 grados, lo que no requiere un montaje mecánico y óptico muy preciso, mientras que es del orden de 0,1 grados cuando se utiliza una red 18.

35 Esta estructura difusora se puede encontrar en una cara u otra sobre la guía de onda 14, que es transparente a la luz de excitación 16.

40 En una primera realización de la estructura difusora 60, esta está formada por una capa depositada sobre la guía de onda y tiene una estructura interna desordenada. La capa puede consistir en un depósito de partículas metálicas o coloidales 60 (figura 7A) o también en un depósito de "teflón" (politetrafluoroetileno).

45 También es posible depositar una capa 62 formada por una matriz que contiene partículas difusoras 64 (figura 7B). La matriz puede consistir en una resina del mismo tipo que la utilizada para pinturas o barnices, como, por ejemplo, resinas acrílicas o gliceroftálicas o fluoropolímeros.

Para garantizar una buena conversión por difusión de la luz de excitación 16 en ondas guiadas para espesores bajos de la capa de difusión, es decir, del orden del 15 % al 60 %, es deseable que el índice de refracción de la matriz sea al menos inferior  $\Delta n=0,5$  al de las partículas difusoras 64.

50 También se puede obtener una estructura difusora 66 haciendo microcavidades, por ejemplo, microcavidades esféricas, en el interior de la guía de onda 14 o modificando localmente el material de la guía de onda 14 cambiando su grado de oxidación o cambiando su fase, de amorfo a cristalino o de cristalino a amorfo mediante, por ejemplo, pulsos de láser del orden de 0,1 ps a 1  $\mu$ s con una energía típica de 1 nanojulio a 100 microjulios. De este modo, este tipo de estructura tiene discontinuidades de índices adecuados para realizar una difusión de la luz de excitación en una pluralidad de direcciones. También existen métodos de nucleación de poros en fase sol-gel y se utilizan a menudo para producir capas de baja constante dieléctrica en microelectrónica.

60 En otra realización de una estructura difusora, esta consiste en una capa 68 de un material fluorescente y que se difunde como los fósforos de los diodos electroluminiscentes blancos, y que genera, en respuesta a una excitación luminosa, unas ondas guiadas que tienen una parte evanescente y que se propagan en una pluralidad de direcciones.

El material fluorescente puede consistir en una capa ordenada o desordenada de fluoróforos tales como, en particular, cajas cuánticas, fluoróforos orgánicos o fluoróforos basados en tierras raras.

65 La capa de material fluorescente también puede consistir en una capa que comprende un aglutinante tal como un polvo mineral u orgánico con un tamaño de partícula entre 0,1 y 50  $\mu$ m o una matriz polimérica perteneciente a las

familias utilizadas en maquillajes y barnices y pinturas, tales como las resinas acrílicas, gliceroftálicos, etc. y elementos fluoróforo tales como los descritos en el párrafo anterior.

5 La capa de material fluorescente también puede comprender elementos difusores del tipo de partículas de alto índice (óxidos de titanio, por ejemplo, o carbonatos de calcio o sulfato de bario) y fluoróforos como los mencionados anteriormente.

10 En estas realizaciones de estructura difusora, el proceso de creación de ondas guiadas que tienen una parte evanescente se puede esquematizar como la emisión de un conjunto de dipolos ópticos en la superficie de la guía de onda o en su interior. En el caso de una estructura difusora mostrada en las figuras 7A, 7B y 7C, estos dipolos oscilan a la misma frecuencia que la de la luz de excitación 16 y en el caso de una estructura difusora por fluorescencia, los dipolos oscilan después de la conversión a la frecuencia de fluorescencia de los fluoróforos. En este último caso, la frecuencia de fluorescencia se elige para permitir la excitación de los cromóforos llevados por los tacos 24.

15 La excitación de la estructura difusora por la luz 16 puede efectuarse directa o indirectamente como se muestra en las figuras 8 a 13.

20 La figura 8 representa una excitación de la estructura difusora por transmisión de la luz 16 de excitación a través de la estructura difusora 68. Esto sólo es posible cuando la estructura difusora 68 es débilmente opaca para evitar la absorción de la luz de excitación 16 por la estructura difusora 68.

La figura 9 representa una excitación de la estructura difusora por transmisión de la luz de excitación 16 a través del espesor de la guía de onda.

25 En otra configuración que se representa en la figura 10, un prisma 72 puede acoplarse ópticamente a la guía de onda 52 mediante una capa de adaptación de índice 74. También es posible integrar el prisma 72 en la guía de onda 52 mediante moldeo. La luz de excitación 16 es de este modo desviada por el prisma en el interior de la guía de onda y llega a excitar la estructura difusora 70.

30 En una realización similar representada en la figura 11, se realiza un chaflán 76 en el extremo de la guía de onda que lleva la estructura difusora 70. Para estas dos realizaciones representadas en las figuras 10 y 11, la excitación luminosa 16 está orientada paralela al plano de la guía de onda en dirección de la superficie inclinada del prisma 72 o del chaflán 76. A continuación, la luz 16 se desvía hacia la estructura difusora 70 para generar ondas guiadas que tienen una parte evanescente.

35 En la realización de la figura 12, la estructura difusora 70 es llevada por la superficie biselada 62 de la guía de onda y la luz de excitación puede orientarse de cualquier forma con respecto al plano de la guía de onda que lleva los tacos 24. De este modo, la luz de excitación 78 puede orientarse perpendicularmente a la hoja o también inclinarse 80 respecto a la vertical de la hoja. Pasa a través de una parte de la guía de onda para luego iluminar la estructura difusora. La luz de excitación 82 también puede excitar la guía por difusión/transmisión a través del difusor 70.

40 En una última realización representada en la figura 13, la excitación luminosa 16 se transmite a la estructura difusora 70 a través del tramo rugoso o pulido de la guía de onda 14.

## REIVINDICACIONES

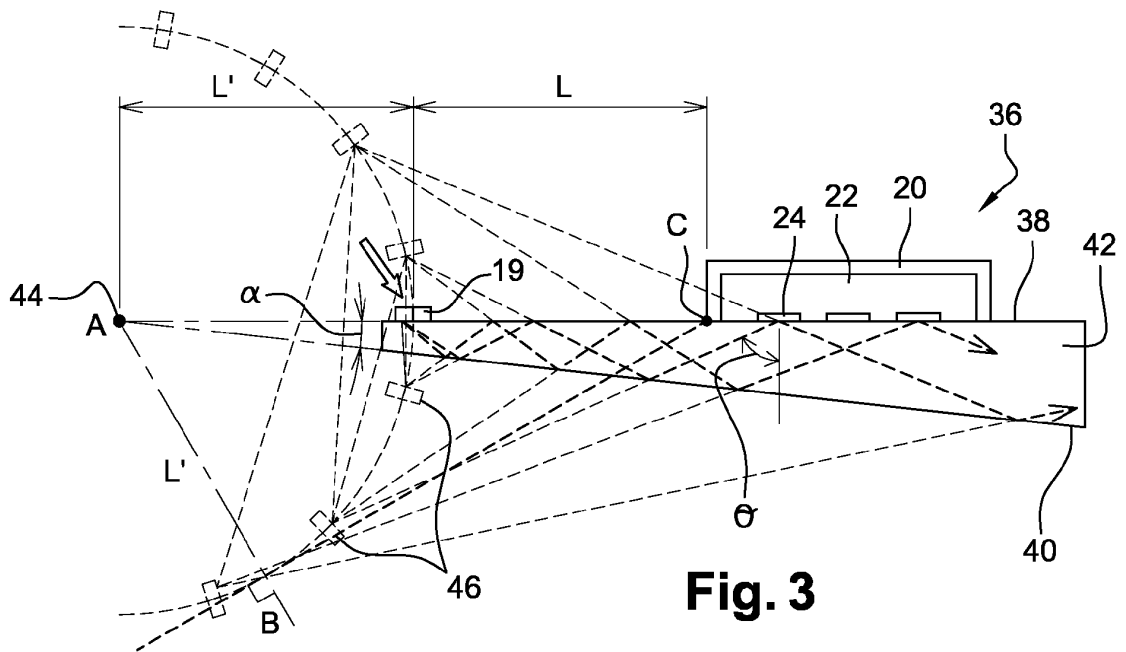
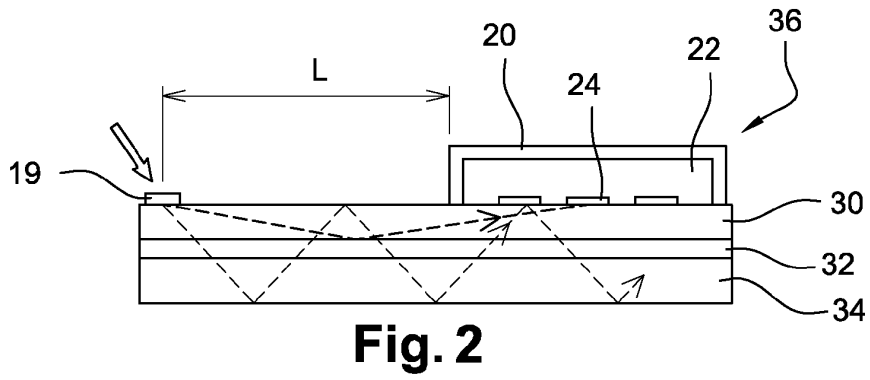
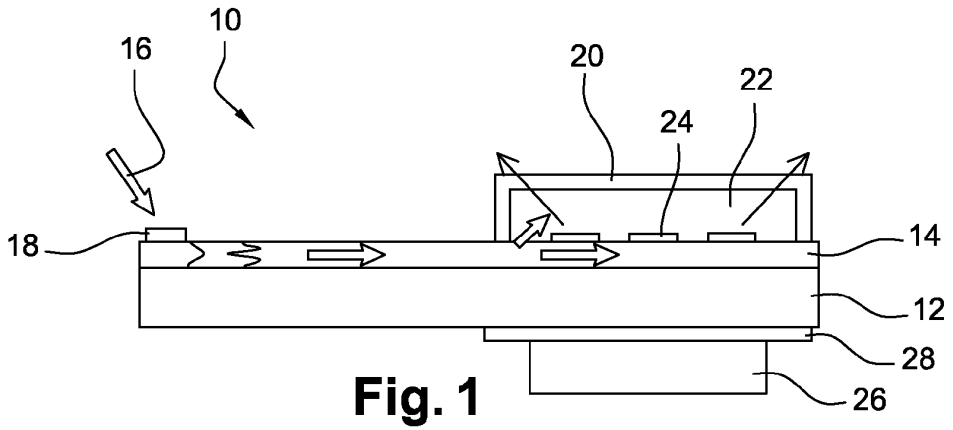
1. Dispositivo de tipo biochip, que comprende un sustrato (12) constituido de al menos una hoja (52) de un material que forma una guía de onda multimodo y que lleva elementos cromóforos adecuados para emitir una fluorescencia en respuesta a una excitación por ondas guiadas que tienen una parte evanescente, **caracterizado por que** comprende medios de acoplamiento (19) de una luz exterior de excitación de los cromóforos con la guía de onda en forma de ondas guiadas, siendo estos medios de acoplamiento (19) sustancialmente no direccionales para difundir la luz exterior de excitación según una pluralidad de direcciones en el interior de la guía de onda cuando dicha luz exterior de excitación de los cromóforos proviene de una pluralidad de direcciones.
2. Dispositivo según la reivindicación 1, que comprende medios de filtrado modal para la eliminación en la guía de onda de modos guiados de índice efectivo inferior o igual a un valor umbral predeterminado.
3. Dispositivo según la reivindicación 2, en el que los medios de filtrado comprenden una capa de adaptación de índice (32, 48) en contacto con la guía de onda (30, 52) y formada por un medio de índice sustancialmente igual al valor umbral predeterminado para filtrar por extracción los modos guiados de índice efectivo inferior al valor umbral.
4. Dispositivo según la reivindicación 3, en el que la capa de adaptación de índice se intercala entre la hoja de guía de onda (30) y una capa inferior de absorción (34), extendiéndose la capa de adaptación de índice (32) y la capa de absorción (34) sustancialmente sobre la longitud de la guía de onda (30), teniendo la capa de absorción (34) un índice al menos igual al de la capa intermedia de adaptación de índice y presentando una absorción importante en la escala del trayecto óptico entre los medios de acoplamiento y una zona de la guía de onda que lleva los elementos cromóforos, a las longitudes de onda de excitación de los cromóforos.
5. Dispositivo según la reivindicación 3, en el que los medios de filtrado son llevados por la guía de onda (52) y están localizados entre una zona (19) de la guía de onda (52) en la que se generan las ondas guiadas y una zona (36) de la guía de onda (52) que lleva los elementos cromóforos.
6. Dispositivo según la reivindicación 5, en el que unos medios de absorción (54) de los modos guiados extraídos de la guía de onda se colocan sobre la capa de adaptación de índice (48).
7. Dispositivo según la reivindicación 5, en el que unos medios de desviación (56) de los modos guiados extraídos de la guía de onda se colocan sobre una capa de adaptación de índice (48).
8. Dispositivo según la reivindicación 6 o 7, en el que la capa de adaptación de índice (48) así como los medios de absorción o los medios de desviación se extienden sobre una distancia superior a  $2x + x \tan \theta$ , donde  $x$  es el espesor de la guía de onda y  $\theta$  es el ángulo de reflexión en el interior de la guía de onda (14) y con respecto a la normal a la guía de onda (14) del modo guiado a filtrar que tiene el índice efectivo más alto.
9. Dispositivo según una de las reivindicaciones 2 a 8, en el que los medios de filtrado modal se extienden aguas arriba de la zona (36) que lleva los elementos cromóforos y parcialmente en esta zona (36).
10. Dispositivo según la reivindicación 2, en el que los medios de filtrado están formados por la hoja que lleva los elementos cromóforos y cuyas caras superior (38) e inferior (40) se alejan una de la otra de la zona de los medios de acoplamiento (19) hasta aguas abajo de la zona (34) que lleva los elementos cromóforos.
11. Dispositivo según la reivindicación 10, en el que las caras superior e inferior son planas y por que los medios de acoplamiento (19) no direccionales se colocan como máximo a un tercio de la distancia que separa una arista formada en la intersección de las caras superior (38) e inferior (40) y la parte de la guía de onda que lleva los elementos cromóforos (36).
12. Dispositivo según una de las reivindicaciones 2 a 11, en el que el valor de índice de umbral es superior o igual que el índice de refracción más alto de los elementos que constituyen el entorno de los cromóforos, tales como, por ejemplo, una cámara de hibridación (20) colocada sobre el sustrato (12) y un fluido de hibridación (22) contenido en la cámara (20).
13. Dispositivo según una de las reivindicaciones 2 a 12, en el que los medios de acoplamiento comprenden una estructura difusora formada en o sobre la guía de onda (14).
14. Dispositivo según la reivindicación 13, en el que la estructura difusora es una estructura con distribución espacial desordenada de índice.
15. Dispositivo según la reivindicación 13 o 14, en el que la estructura difusora está formada por un deslustrado o por una capa depositada sobre una cara de la guía de onda, por ejemplo, de "teflón" o de partículas metálicas o coloidales.
16. Dispositivo según una de las reivindicaciones 13 a 15, en el que la estructura difusora (64) comprende partículas

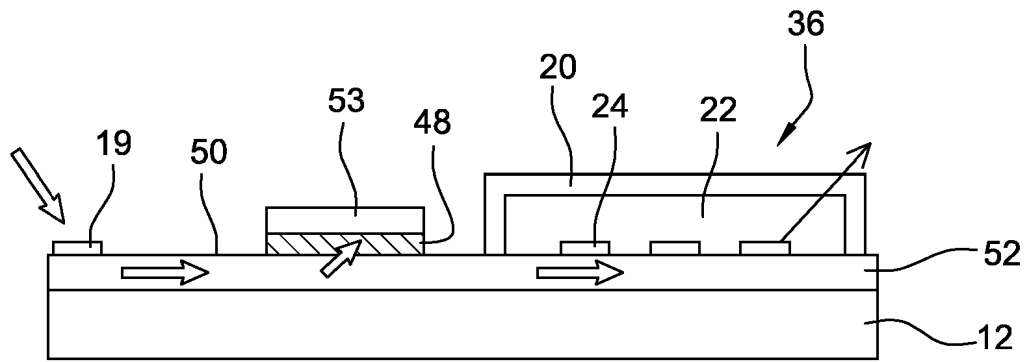
difusoras (62) en una matriz de una resina tal como, por ejemplo, una resina acrílica o gliceroftálica o de un polímero, por ejemplo, fluorado, teniendo la matriz un índice de refracción al menos 0,5 inferior al de las partículas difusoras.

5 17. Dispositivo según la reivindicación 13 o 14, en el que la estructura difusora (66) está ubicada en el interior de la guía de onda y se realiza en forma de microcavidades con dimensiones del orden de 0,1 a 40  $\mu\text{m}$  o de modificaciones locales de la guía de onda tales como, por ejemplo, un cambio en la estequiometría del medio o bien un paso local de una fase cristalina a una fase amorfa o viceversa, cambio que afecta su índice o su tensor dieléctrico.

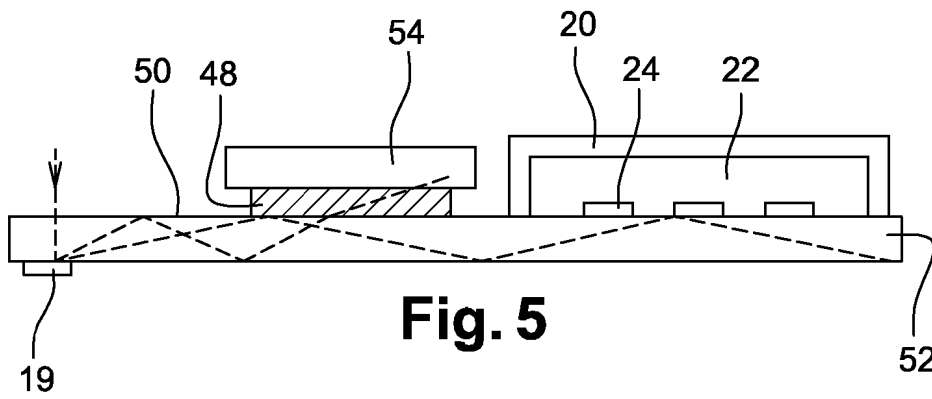
10 18. Dispositivo según la reivindicación 13, en el que la estructura difusora (68) depositada sobre una cara de la guía de onda comprende una capa de material fluoróforo que genera, en respuesta a una excitación luminosa, una luz de fluorescencia que se propaga en la guía de onda en forma de ondas que tienen una parte evanescente.

19. Dispositivo según la reivindicación 18, en el que el material fluoróforo comprende cajas cuánticas, fluoróforos orgánicos o basados en tierras raras o iones luminiscentes.

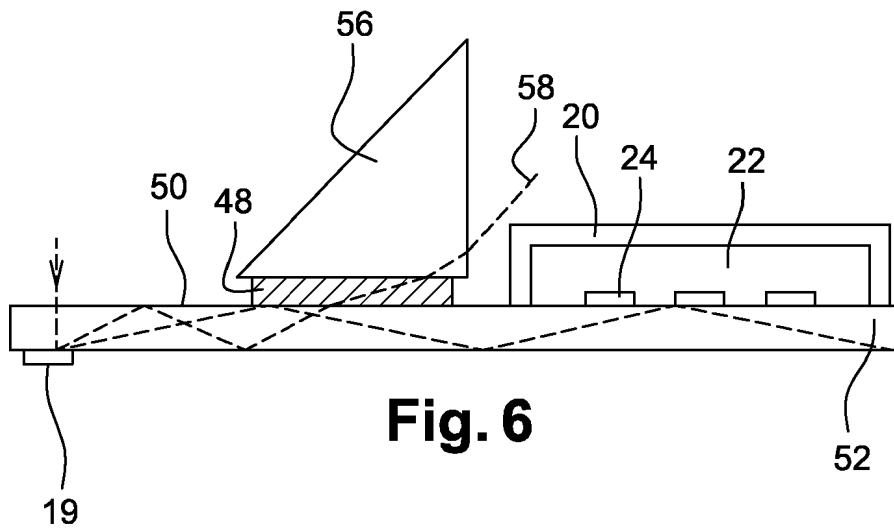




**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**

