

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-530125

(P2004-530125A)

(43) 公表日 平成16年9月30日(2004.9.30)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 21/78	GO 1 N 21/78 Z C C C	2 G O 4 3
GO 1 N 13/14	GO 1 N 13/14 A	2 G O 5 4
GO 1 N 21/64	GO 1 N 21/64 A	
GO 1 N 21/75	GO 1 N 21/64 B	
GO 1 N 27/62	GO 1 N 21/64 F	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 118 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-577546 (P2002-577546)	(71) 出願人	599116649 ツェプトゼンス アクチエンゲゼルシャフト Zeptosens AG スイス国 4108 ヴィッテルスヴィル ベンケンシュトラッセ 254
(86) (22) 出願日	平成14年3月18日 (2002.3.18)	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月2日 (2003.10.2)	(74) 代理人	100075225 弁理士 篠田 文雄
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/002958	(72) 発明者	ドゥフェネク, ゲルト・エル ドイツ国, 79189 パート・クロツィンゲン, エツマッテンヴェーク 34
(87) 国際公開番号	W02002/079765		
(87) 国際公開日	平成14年10月10日 (2002.10.10)		
(31) 優先権主張番号	0617/01		
(32) 優先日	平成13年4月2日 (2001.4.2)		
(33) 優先権主張国	スイス (CH)		
(31) 優先権主張番号	0689/01		
(32) 優先日	平成13年4月12日 (2001.4.12)		
(33) 優先権主張国	スイス (CH)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多光子励起のための光学構造及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、少なくとも一つの励起波長で透明である導波層 (a) を有する光学導波体を含む光学構造の可変的な実施態様に関する。前記光学構造は、層 (a) 中に入力されかつ前記層 (a) 中を誘導される励起光の強さが、前記層 (a) の上及び中で、層 (a) の表面に又は後者 (a) から 200 nm 未満の距離に位置する、ルミネセンスが可能である分子及び/又は光反応性分子を多光子励起、好ましくは 2 光子励起によって励起させるのに十分なほど高いことを特徴とする。好ましい実施態様は、層 (a) 中を誘導される励起光に沿って直線的又は平面的多光子励起を可能にする実施態様である。本発明はまた、励起光源を含む光学系及び分析系の種々の実施態様ならびに光学構造の新規な実施態様ならびにそれに基づく方法、特に多光子励起による 1 種又はいくつかの分析対象物のルミネセンス励起及び発光検出、さらには前記実施態様及び方法の使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくともある励起波長で光学的に透明である導波層 (a) を有する光学導波体を含む光学構造であって、層 (a) に内結合されかつ層 (a) 中を誘導される励起光の強さが、層 (a) 内及び層 (a) 上で、層 (a) の表面に又は 200 nm 未満の距離内に位置する分子又は分子群を多光子励起によって励起させることができるのに十分なほど高い光学構造。

【請求項 2】

光学導波体が、少なくともある励起波長で光学的に透明である導波層 (a) を、少なくとも前記励起波長で同じく光学的に透明である、層 (a) よりも低い屈折率の層 (b) の上に有する光学薄膜導波体である、請求項 1 記載の光学構造。

10

【請求項 3】

層 (a) の表面に又は 200 nm 未満の距離内に位置しかつ多光子励起によって励起される分子が、光反応性の分子又は分子群、すなわち、光による励起ののち化学反応性になる分子又は分子群である、請求項 1 ~ 2 のいずれか記載の光学構造。

【請求項 4】

層 (a) 上に又は 200 nm 未満の距離内に位置する前記光反応性分子の多光子励起によって光重合が開始される、請求項 3 記載の光学構造。

【請求項 5】

層 (a) 上に又は 200 nm 未満の距離内に位置する前記光反応性分子の多光子励起によって、光解離が、すなわち、層 (a) 上に又は層 (a) から 200 nm 未満の距離内に多光子励起まで存在する分子又は分子複合体の破断が開始される、請求項 3 記載の光学構造。

20

【請求項 6】

前記光反応性分子が、比較的高分子量の分子、特に天然及び人造 (合成) ポリマーならびに生物学的分子、たとえばタンパク質、ポリペプチド及び核酸を埋め込むための分子マトリックスの一部である、請求項 5 記載の光学構造。

【請求項 7】

前記構造が、マスマスペクトロメトリー、好ましくは MALDI / TOF - MS (マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化飛行時間型マスマスペクトロメトリー) のためのサンプルキャリアとして設けられている、請求項 5 記載の光学構造。

【請求項 8】

少なくともある励起波長で光学的に透明である導波層 (a) を、少なくとも前記励起波長で同じく光学的に透明である、層 (a) よりも低い屈折率の層 (b) の上に有する光学薄膜導波体を含み、層 (a) に内結合されかつ層 (a) 中を誘導される励起光の強さが、層 (a) 上及び層 (a) 内で、層 (a) の表面に又は層 (a) から 200 nm 未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起させてルミネセンスに至らせるのに十分なほど高い、請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の光学構造。

30

【請求項 9】

層 (a) への励起光の内結合が、プリズムカプラと、重畳する減衰フィールドを有する連結した光学導波体に基づく減衰カプラと、導波層の前に位置する合焦レンズ、好ましくは円柱レンズを有する前面カプラと、格子カプラとによって形成される群からの 1 個以上の光学内結合素子を使用して実施される、請求項 1 ~ 8 のいずれか記載の光学構造。

40

【請求項 10】

層 (a) への励起光の内結合が、層 (a) 中で変調される格子構造によって実施される、請求項 9 記載の光学構造。

【請求項 11】

前記構造が平面薄膜導波構造である、請求項 1 ~ 10 のいずれか記載の光学構造。

【請求項 12】

少なくともある励起波長で光学的に透明である層 (a) を、少なくとも前記励起波長で同じく光学的に透明である、層 (a) よりも低い屈折率の層 (b) の上に有するとともに、層 (a) 中で変調される少なくとも 1 個の格子構造 (c) を有する平面薄膜導波体を含み

50

、層(a)に内結合するための共振角で投射される励起光の強さが、層(a)上及び層(a)内で、少なくとも格子構造(c)の領域で、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起させるのに十分なほど高い、請求項11記載の光学構造。

【請求項13】

多光子励起が2光子励起である、請求項1～12のいずれか記載の光学構造。

【請求項14】

層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を、直線経路に沿って、すなわち層(a)中を誘導される励起光に沿って同時に多光子励起によって励起させるように作動可能である、請求項1～13のいずれか記載の光学構造。

10

【請求項15】

層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子の多光子励起を、層(a)への励起光の内結合の位置から起算して少なくとも5mmの距離にわたり直線経路に沿って実施するように作動可能である、請求項14記載の光学構造。

【請求項16】

拡大した励起光の照射により、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を、層(a)中を誘導される励起光に沿って拡大区域で同時に多光子励起によって励起させるように作動可能である、請求項1～15のいずれか記載の光学構造。

【請求項17】

層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に少なくとも1mm²の面積で位置する分子の同時多光子励起のために作動可能である、請求項1～16のいずれか記載の光学構造。

20

【請求項18】

層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に少なくとも10mm²の面積で位置する分子の同時多光子励起のために作動可能である、請求項1～16のいずれか記載の光学構造。

【請求項19】

層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に少なくとも1cm²の面積で位置する分子の同時多光子励起のために作動可能である、請求項1～16のいずれか記載の光学構造。

30

【請求項20】

前記構造が、格子構造(c)によって内結合されかつ層(a)中を誘導される励起光の伝播方向に配設されることが好ましい、層(a)の連続非変調領域を含む、請求項10～19のいずれか記載の光学構造。

【請求項21】

前記構造が、同一又は異なる周期を有する多数の格子構造(c)を、場合によっては層(a)の連続非変調領域がそれに隣接する状態で、共通の連続基板上に含む、請求項10～20のいずれか記載の光学構造。

【請求項22】

多光子吸収によって層(a)の上に又はその近接場で生成されるルミネセンスが、少なくとも部分的に層(a)中に結合されるとともに、層(a)中の誘導によって前記光学構造上の隣接領域に伝播する、請求項8～21のいずれか記載の光学構造。

40

【請求項23】

前記構造が、異なる周期数の2個以上の格子構造を、格子線が平行又は非平行、好ましくは非平行に配設された状態で重畳したものを含み、その構造が異なる波長の励起光の内結合のために作動可能であり、二つの重畳格子構造の場合、それらの格子線が好ましくは互いに対して垂直に配設されている、請求項12～22のいずれか記載の光学構造。

【請求項24】

層(a)よりも低い屈折率を有するとともに、5nm～10000nm、好ましくは10nm～1000nmの厚さを有するさらなる光学的に透明な層(b)が、層(a)と層(b)と

50

の間にかつ層 (a) と接触した状態で位置する、請求項 2 ~ 2 3 のいずれか記載の光学構造。

【請求項 2 5】

格子構造 (c) が、均一な周期の回折格子であるか、又は、多回折格子である、請求項 1 0 ~ 2 2 又は 2 4 のいずれか記載の光学構造。

【請求項 2 6】

格子構造 (c) は、光学的に透明な層 (a) 中に結合される励起光の伝播方向に対して垂直又は平行な周期数であり、横方向に変化する周期数を備える、請求項 1 0 ~ 2 5 のいずれか記載の光学構造。

【請求項 2 7】

光学的に透明な (a) の材料が、ガラス、石英又はたとえばポリカーボネート、ポリアミド、ポリイミド、ポリメチルメタクリレート、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸エステル、ポリフェニレンスルフィド、ポリエチレンテレフタレート (P E T) 及びポリウレタンならびにそれらの誘導体を含む群からの透明なプラスチックを含む、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか記載の光学構造。

【請求項 2 8】

光学的に透明な層 (a) が、 TiO_2 、 ZnO 、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 、 HfO_2 又は ZrO_2 の群の材料、特に好ましくは TiO_2 又は Nb_2O_5 又は Ta_2O_5 の群の材料を含む、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか記載の光学構造。

【請求項 2 9】

光学的に透明な層 (a) の屈折率が 1 . 8 よりも大きい、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか記載の光学構造。

【請求項 3 0】

光学的に透明な層 (a) が自立性である、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか記載の光学構造。

【請求項 3 1】

光学的に透明な層 (a) が低モード導波体である、すなわち、照射励起光の所与の偏光の最初の 1 0 モード未満を誘導するように作動可能である、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか記載の光学構造。

【請求項 3 2】

光学的に透明な層 (a) が、照射励起光の所与の偏光の 1 ~ 3 モードのみを誘導するように作動可能である低モード導波体である、請求項 3 1 記載の光学構造。

【請求項 3 3】

光学的に透明な層 (b) の材料が、ガラス、石英又はたとえばポリカーボネート、ポリイミド、ポリメチルメタクリレート、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸エステル、ポリフェニレンスルフィド、ポリエチレンテレフタレート (P E T) 及びポリウレタンによって形成される群からの透明な熱可塑性もしくは成形性プラスチックを含む、請求項 2 ~ 3 2 のいずれか記載の光学構造。

【請求項 3 4】

層 (a) の厚さとその屈折率との積が、層 (a) 中に結合される励起光の励起波長の $1 / 1 0 \sim 1$ 、好ましくは $1 / 1 0 \sim 2 / 3$ である、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか記載の光学構造。

【請求項 3 5】

層 (a) 中で変調される格子構造 (c) が、 $2 0 0 \text{ nm} \sim 1 0 0 0 \text{ nm}$ の周期及び $3 \text{ nm} \sim 1 0 0 \text{ nm}$ 、好ましくは $1 0 \text{ nm} \sim 3 0 \text{ nm}$ の変調深さを有する、請求項 1 0 ~ 3 4 のいずれか記載の光学構造。

【請求項 3 6】

第一の光学的に透明な層 (a) の厚さに対する格子の変調深さの比が 0 . 2 以下である、請求項 1 0 ~ 3 5 のいずれか記載の光学構造。

【請求項 3 7】

格子構造 (c) が、矩形、三角形又は半円形の断面のレリーフ格子であるか、又は本質的

10

20

30

40

50

に平面的な光学的に透明な層 (a) 中で屈折率の周期変調を有する位相又は容積格子である、請求項 1 0 ~ 3 6 のいずれか記載の光学構造。

【請求項 3 8】

光学系における調節の簡素化のための及び / 又は分析系の一部としてのサンプル区画への接続のための光学的又は機械的に認識可能な印が前記構造に設けられている、請求項 1 ~ 3 7 のいずれか記載の光学構造。

【請求項 3 9】

供給されるサンプル中の 1 種以上の分析対象物の測定に備えて生物学的又は生化学的又は合成認識要素 (e) を固定化するために、厚さが好ましくは 2 0 0 nm 未満、もっとも好ましくは 2 0 nm 未満の付着促進層 (f) が光学的に透明な層 (a) に被着され、かつ、この付着促進層 (f) が、好ましくは、シランと、エポキシドと、官能化された帯電又は極性ポリマーと、「自己組織化官能化単分子層」と、を含む群からの化合物を含む、請求項 1 ~ 3 8 のいずれか記載の光学構造。

10

【請求項 4 0】

横方向に分けられた計測区域 (d) が、好ましくはインクジェットスポッティング、機械的スポッティング、マイクロコンタクトプリント、生物学的、生化学的又は合成認識要素を平行又は交差マイクロチャンネルに供給し、圧力差又は電気もしくは電磁ポテンシャルを印加して計測区域と流体接触させることを含む方法の群の一つ以上の方法を適用することによって生物学的、生化学的又は合成認識要素を前記光学構造上に横方向に選択的に被着させることによって生成される、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか記載の光学構造。

20

【請求項 4 1】

核酸 (たとえば DNA、RNA、オリゴヌクレオチド) 及び核酸類似体 (たとえば PNA)、抗体、アプタマー、膜結合しかつ単離された受容体、それらのリガンド、抗体に対する抗原、「ヒスチジンタグ成分」、分子インプリントをホストするための、化学合成によって生成されたキャビティ、天然又は合成ポリマーなど又は全細胞もしくは細胞断片によって形成される群の成分が、生物学的又は生化学的又は合成認識要素として被着され、かつ、これらの認識要素が、光学構造上に直接又は請求項 3 9 記載の付着促進層を介して被着されている、請求項 1 ~ 4 0 のいずれか記載の光学構造。

【請求項 4 2】

分析対象物に対して「化学的に中性」である化合物、好ましくはたとえばアルブミン、特にウシ血清アルブミンもしくはヒト血清アルブミン、分析されるポリヌクレオチドとでハイブリダイズしない、断片化された天然もしくは合成 DNA、たとえばニシンもしくはサケの精液又は帯電していないが親水性のポリマー、たとえばポリエチレングリコールもしくはデキストランによって形成される群の化合物が、横方向に分けられた計測区域 (d) の間に被着されている、請求項 4 0 ~ 4 1 のいずれか記載の光学構造。

30

【請求項 4 3】

二以上の横方向に分けられた計測区域が光学構造上でセグメントに組み合わされ、かつ、好ましくは異なるセグメントがさらに、隣接区域間の流体シールを支持する被着されたリム及び / 又は隣接区域間の光学クロストークの減少に貢献する被着されたリムによって互いに分けられている、請求項 4 0 ~ 4 2 のいずれか記載の光学構造。

40

【請求項 4 4】

1, 0 0 0, 0 0 0 個までの計測区域が二次元配列で設けられ、かつ、単一の計測区域が 0 . 0 0 1 mm² ~ 6 mm² の面積を占有する、請求項 4 0 ~ 4 3 のいずれか記載の光学構造。

【請求項 4 5】

少なくとも 1 個の励起光源と、請求項 1 ~ 4 4 のいずれか記載の光学構造とを含む多光子励起のための光学系であって、層 (a) に内結合されかつ層 (a) 中を誘導される励起光の強さが、層 (a) 内及び層 (a) 上で、層 (a) の表面に又は 2 0 0 nm 未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起させるのに十分なほど高い光学系。

【請求項 4 6】

層 (a) に内結合されかつ層 (a) 中を誘導される励起光の強さが、層 (a) 内及び層 (

50

a) 上で、層(a)の表面に又は200nm未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起させてルミネセンスに至らせるのに十分なほど高くなる、請求項45記載の多光子励起のための光学系。

【請求項47】

層(a)への励起光の内結合が、プリズムカプラと、重畳する減衰フィールドを有する連結した光学導波体に基づく減衰カプラと、導波層の前に位置する合焦レンズ、好ましくは円柱レンズを有する前面カプラと、格子カプラとによって形成される群からの1個以上の光学内結合素子を使用して実施される、請求項45～46のいずれか記載の光学系。

【請求項48】

層(a)への励起光の内結合が、層(a)中で変調される格子構造によって実施される、請求項47記載の光学系。 10

【請求項49】

前記構造が平面薄膜導波構造である、請求項45～48のいずれか記載の光学系。

【請求項50】

少なくとも1個の励起光源と、請求項10～44のいずれか記載の光学構造とを含み、層(a)に内結合するための共振角で層(a)中で変調される格子構造(c)に投射される励起光の強さが、層(a)上及び層(a)内で、少なくとも格子構造(c)の領域で、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起させるのに十分なほど高い、請求項49記載の光学系。

【請求項51】

多光子励起が2光子励起である、請求項45～50のいずれか記載の光学系。 20

【請求項52】

層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を、直線経路に沿って、すなわち層(a)中を誘導される励起光に沿って同時に多光子励起によって励起させるように作動可能である、請求項45～51のいずれか記載の光学系。

【請求項53】

層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子の多光子励起を、層(a)への励起光の内結合の位置から起算して少なくとも5mmの距離にわたり直線経路に沿って実施するように作動可能である、請求項52記載の光学系。

【請求項54】

拡大した励起光の照射により、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を、層(a)中を誘導される励起光に沿って拡大区域で同時に多光子励起によって励起させるように作動可能である、請求項45～53のいずれか記載の光学系。 30

【請求項55】

層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に少なくとも1mm²の面積で位置する分子の同時多光子励起のために作動可能である、請求項45～54のいずれか記載の光学系。

【請求項56】

多光子吸収によって層(a)の上に又はその近接場で生成されるルミネセンスが、少なくとも部分的に層(a)中に結合されるとともに、層(a)中の誘導によって前記光学構造上の隣接領域に伝播する、請求項46～54のいずれか記載の光学系。 40

【請求項57】

光学構造からの一以上のルミネセンスを検出するための少なくとも1個の検出器をさらに含む、請求項45～56のいずれか記載の光学系。

【請求項58】

少なくとも1個の励起光源から発せられる励起光が本質的に平行であり、かつ、層(a)に内結合するための共振角で、光学的に透明な層(a)中で変調される格子構造(c)に照射される、請求項48～57のいずれか記載の光学系。

【請求項59】

少なくとも1個の光源からの励起光が拡大光学部品によって本質的に平行な光束に拡大さ 50

れ、かつ、層 (a) 中に内結合するための共振角で、光学的に透明な層 (a) 中で変調される巨視的領域の格子構造 (c) に照射される、請求項 4 8 ~ 5 8 のいずれか記載の光学系。

【請求項 6 0】

少なくとも 1 個の光源からの励起光が、回折光学要素又は、光源が多数ある場合には、好ましくはダンマン格子である多数の回折光学要素又は好ましくはマイクロレンズアレイである屈折光学要素によってできるだけ均一な強さの複数の個々の光線に分割され、個々の光線が、互いに対して本質的に平行に、層 (a) に内結合するための共振角で格子構造 (c) に投射される、請求項 4 8 ~ 5 9 のいずれか記載の光学系。

【請求項 6 1】

同様な又は異なる発光波長の 2 個以上の光源が励起光源として使用される、請求項 4 5 ~ 6 0 のいずれか記載の光学系。

10

【請求項 6 2】

請求項 2 3 に記載の光学構造を有し、2 個以上の光源からの励起光が異なる方向から同時又は順次に格子構造 (c) に投射され、異なる周期数の格子構造を重畳したものを含むその格子構造によって層 (a) に内結合される、請求項 6 1 記載の光学系。

【請求項 6 3】

たとえば、CCDカメラ、CCDチップ、フォトダイオードアレイ、アバランシェダイオードアレイ、マルチチャネルプレート及びマルチチャネル光電子増倍管によって形成される群からの少なくとも 1 個の横方向に解像する検出器が信号検出に使用される、請求項 4 5 ~ 6 2 のいずれか記載の光学系。

20

【請求項 6 4】

伝送される光束を成形するためのレンズもしくはレンズ系、光束を偏光させ、場合によってはさらに成形するための平面もしくは湾曲したミラー、光束を偏光させ、場合によってはスペクトル分離するためのプリズム、光束の部分をスペクトル選択的に偏光させるためのダイクロイックミラー、伝送される光の強さを調整するためのニュートラルフィルタ、光束の部分をスペクトル選択的に透過させるための光学フィルタもしくはモノクロメータ、又は励起及び / 又はルミネセンス光の別個の偏光方向を選択するための偏光選択素子によって形成される群の光学部品が、1 個以上の励起光源と請求項 1 ~ 4 4 の光学構造との間に及び / 又は前記光学構造と 1 個以上の検出器との間に配置されている、請求項 4 5 ~ 6 3 のいずれか記載の光学系。

30

【請求項 6 5】

励起光が 1 fsec ~ 1 0 min の間隔のパルスで投射され、かつ、場合によっては、計測区域からの発光が時間分解的に計測される、請求項 4 6 ~ 6 4 のいずれか記載の光学系。

【請求項 6 6】

参照のため、計測区域の他に、光源の位置での励起光又は拡大後の励起光又は個々のビームに分割された後の励起光と、一以上の横方向に分けられた計測区域の位置からの励起波長の散乱光と、格子構造 (c) によって外結合された励起波長の光と、によって形成される群の光信号が計測される、請求項 4 6 ~ 6 5 のいずれか記載の光学系。

【請求項 6 7】

発光の測定のための計測区域と参照信号の測定のための計測区域とが同一である、請求項 4 6 ~ 6 6 のいずれか記載の光学系。

40

【請求項 6 8】

励起光の投射及び一以上の計測区域からの発光の検出が一以上の計測区域ごとに順次に実施される、請求項 4 6 ~ 6 7 のいずれか記載の光学系。

【請求項 6 9】

順次の励起及び検出が、ミラー、偏光プリズム及びダイクロイックミラーによって形成される群の可動光学部品によって実施される、請求項 6 8 記載の光学系。

【請求項 7 0】

順次の励起及び検出が、本質的に焦点及び角度保存的なスキャナを使用して実施される、

50

請求項 69 記載の光学系。

【請求項 71】

光学構造が順次の励起及び検出の過程の間で動かされる、請求項 68 ~ 70 のいずれか記載の光学系。

【請求項 72】

請求項 1 ~ 44 のいずれか記載の光学構造及び / 又は請求項 45 ~ 71 のいずれか記載の光学系の使用を含む多光子励起の方法であって、層 (a) に内結合されかつ層 (a) 中を誘導される励起光の強さが、層 (a) 内及び層 (a) 上で、層 (a) の表面に又は層 (a) から 200 nm 未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起させるのに十分なほど高い方法。

10

【請求項 73】

光学構造の層 (a) の表面に又は層 (a) から 200 nm 未満の距離に位置する分子が光反応性であり、かつ、多光子励起によって励起して化学反応に至らせることができる、請求項 72 記載の方法。

【請求項 74】

光学構造の層 (a) の表面に又は層 (a) から 200 nm 未満の距離に位置する分子を多光子励起によって励起して他の分子に結合させることができる、請求項 73 記載の方法。

【請求項 75】

光学構造の層 (a) の表面に又は層 (a) から 200 nm 未満の距離に位置する分子を多光子励起によって励起して光重合に至らせることができる、請求項 73 記載の方法。

20

【請求項 76】

光解離を、すなわち、層 (a) 上に又は層 (a) から 200 nm 未満の距離内に多光子励起まで存在する分子又は分子複合体の破断を、層 (a) 上に又は 200 nm 未満の距離内に位置する前記光反応性分子の多光子励起によって開始させる、請求項 73 記載の方法。

【請求項 77】

請求項 1 ~ 44 のいずれか記載の光学構造及び / 又は請求項 45 ~ 71 のいずれか記載の光学系の使用を含むルミネセンス励起の方法であって、層 (a) に内結合されかつ層 (a) 中を誘導される励起光の強さが、層 (a) 上及び層 (a) 内で、層 (a) の表面に又は層 (a) から 200 nm 未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起させてルミネセンスに至らせるのに十分なほど高い方法。

30

【請求項 78】

請求項 39 ~ 44 のいずれか記載の光学構造の一以上の計測区域上の 1 種以上のサンプル中で 1 種以上の分析対象物をルミネセンス検出によって検出するための、前記光学構造上で計測区域からの又は少なくとも二以上の横方向に分けられた計測区域 (d) のアレイ又はいくつかの計測区域を含む少なくとも 2 個以上の横方向に分けられたセグメントのアレイからの一以上のルミネセンスを測定するための方法であって、層 (a) に内結合されかつ層 (a) 中を誘導される励起光の強さが、層 (a) 上及び層 (a) 内で、層 (a) の表面に又は層 (a) から 200 nm 未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起させてルミネセンスに至らせるのに十分なほど高い方法。

【請求項 79】

プリズムカバーと、重畳する減衰フィールドを有する連結した光学導波体に基づく減衰カバーと、導波層の前に位置する合焦レンズ、好ましくは円柱レンズを有する前面カバーと、格子カバーとによって形成される群からの 1 個以上の光学内結合素子を使用して層 (a) への励起光の内結合を実施する、請求項 72 ~ 78 のいずれか記載の方法。

40

【請求項 80】

層 (a) 中で変調される格子構造によって層 (a) への励起光の内結合を実施する、請求項 72 ~ 79 のいずれか記載の方法。

【請求項 81】

光学構造が平面薄膜導波構造である、請求項 72 ~ 80 のいずれか記載の方法。

【請求項 82】

50

少なくともある励起波長で光学的に透明である層(a)を、少なくとも前記励起波長で同じく光学的に透明である、層(a)よりも低い屈折率の層(b)の上に有するとともに、層(a)中で変調される少なくとも1個の格子構造(c)を有する平面薄膜導波体を含む光学構造の使用を含み、層(a)に内結合するための共振角で投射される励起光の強さが、層(a)上及び層(a)内で、少なくとも格子構造(c)の領域で、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起させるのに十分なほど高い、請求項81記載の方法。

【請求項83】

多光子励起が2光子励起である、請求項72～82のいずれか記載の方法。

【請求項84】

光学構造の層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を、直線経路に沿って、すなわち層(a)中を誘導される励起光に沿って同時に多光子励起によって励起させることができる、請求項72～83のいずれか記載の方法。

【請求項85】

層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子の多光子励起を、層(a)への励起光の内結合の位置から起算して少なくとも5mmの距離にわたり直線経路に沿って実施するように作動可能である、請求項84記載の方法。

【請求項86】

拡大した励起光の照射により、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を、層(a)中を誘導される励起光に沿って拡大区域で同時に多光子励起によって励起させるように作動可能である、請求項80～85のいずれか記載の方法。

【請求項87】

層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に少なくとも1mm²の面積で位置する分子の同時多光子励起のために作動可能である、請求項72～86のいずれか記載の方法。

【請求項88】

層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に少なくとも1cm²の面積で位置する分子の同時多光子励起のために作動可能である、請求項72～87のいずれか記載の方法。

【請求項89】

光学構造が、格子構造(c)によって内結合されかつ層(a)中を誘導される励起光の伝播方向に配設されることが好ましい、層(a)の連続非変調領域を含む、請求項80～88のいずれか記載の方法。

【請求項90】

光学構造が、同一又は異なる周期を有する多数の格子構造(c)を、場合によっては層(a)の連続非変調領域がそれに隣接する状態で、共通の連続基板上に含む、請求項80～89のいずれか記載の方法。

【請求項91】

多光子吸収によって光学構造の層(a)の上に又はその近接場で生成されるルミネセンスが、少なくとも部分的に層(a)中に結合させるとともに、層(a)中の誘導によって前記光学構造の隣接領域に伝播する、請求項80～90のいずれか記載の方法。

【請求項92】

ルミネセンスの生成のために、200nm～1100nmの波長で励起することができるルミネセンス染料又は発光性ナノ粒子をルミネセンス標識として使用する、請求項77～91のいずれか記載の方法。

【請求項93】

前記ルミネセンス標識を2光子吸収によって励起する、請求項92記載の方法。

【請求項94】

前記ルミネセンス標識を可視又は近赤外の励起光の2光子吸収によって励起して紫外又は青ルミネセンスに至らせる、請求項93記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 95】

ルミネセンス標識を、分析対象物に結合するか、競合検定で、分析対象物類似体に結合するか、多工程検定で、固定化された生物学的、生化学的又は合成認識要素の結合相手の一つに結合するか、生物学的、生化学的又は合成認識要素に結合する、請求項 92 ~ 94 のいずれか記載の方法。

【請求項 96】

第一のルミネセンス標識と同じ又は異なる励起波長及び同じ又は異なる発光波長の第二以降のルミネセンス標識を使用する、請求項 92 ~ 95 のいずれか記載の方法。

【請求項 97】

蛍光が可能である生分子、たとえば、蛍光性アミノ酸を有するタンパク質の固有蛍光（「自己蛍光」）を多光子励起によって励起する、請求項 77 ~ 91 のいずれか記載の方法。 10

【請求項 98】

蛍光が可能である前記アミノ酸が、トリプトファン、トリシン及びフェニルアラニンによって形成される群から選択される、請求項 97 記載の方法。

【請求項 99】

計測区域に固定化された生物学的、生化学的又は合成認識要素の固定化密度を、多光子吸収によって励起されるそれら固有ルミネセンス（固有蛍光又は自己蛍光）から測定する、請求項 77 ~ 98 のいずれか記載の方法。

【請求項 100】

分析対象物検出過程（多光子吸収又は 1 光子吸収による）で励起される分析対象物からの又はその結合相手の一つからのルミネセンス信号を、利用可能な結合部位の数及び密度に関して、多光子吸収によって励起される固定化された生物学的、生化学的又は合成認識要素の計測された固有ルミネセンスに基づいて修正及び/又は正規化する、請求項 77 ~ 99 のいずれか記載の方法。 20

【請求項 101】

励起波長における一以上のルミネセンスの計測及び/又は光信号の測定を偏光選択的に実施し、好ましくは、励起光の偏光とは異なる偏光で一以上のルミネセンスを計測する、請求項 77 ~ 100 のいずれか記載の方法。

【請求項 102】

層（a）の表面に又は層（a）から 200 nm 未満の距離に位置する分子を、層（a）上及び層（a）内に照射される励起光の大きな増幅により、高い表面閉じ込め励起光の強さと表面に向かう方向におけるその勾配の増大とがこれらの分子に「光学ピンセット」の作用を受けさせることにより、この距離内で捕捉する、請求項 72 ~ 101 のいずれか記載の方法。 30

【請求項 103】

抗体もしくは抗原、受容体もしくはリガンド、キレート化剤もしくは「ヒスチジンタグ成分」、オリゴヌクレオチド、DNA もしくは RNA スtrand、DNA もしくは RNA 類似体、酵素、酵素補因子もしくは阻害薬、レクチン及び炭水化物を含む群の 1 種以上の分析対象物の同時及び/又は順次の定量的及び/又は定性的測定のための、請求項 72 ~ 102 のいずれか記載の方法。 40

【請求項 104】

試験するサンプルが、天然に産出する体液、たとえば血液、血清、血漿、リンパ液もしくは尿又は卵黄、光学的に濁った液体、表面水、土壌抽出物、植物抽出物又はバイオもしくはプロセスプロセスであるか、生物学的組織片から採取されるものである、請求項 72 ~ 103 のいずれか記載の方法。

【請求項 105】

薬学的研究、コンビナトリアルケミストリー、臨床及び臨床前開発におけるスクリーニング法での化学的、生化学的又は生物学的分析対象物の測定のための定量的及び/又は定性的分析、アフィニティスクリーニング及び研究における運動パラメータのリアルタイム結合研究及び測定、特に DNA 及び RNA 分析学のための分析対象物定性的及び定量的測 50

定、毒性発生研究及び発現プロフィールの決定、ならびに医薬品研究開発、ヒト及び動物の診断、農薬製品研究開発における抗体、抗原、病原体又はバクテリアの決定、医薬品開発及び治療薬選択における患者層別化、食品及び環境分析学における病原体、有害薬剤及び細菌、特にサルモネラ、プリオン及びバクテリアの決定のための、請求項 1 ~ 44 のいずれか記載の光学構造及び / 又は請求項 45 ~ 71 のいずれか記載の光学系及び / 又は請求項 72 ~ 104 のいずれか記載の方法の使用。

【請求項 106】

非常に高い励起光強さ及び / 又は励起期間の適用を要する表面閉じ込め研究、たとえば材料の光安定性の研究、光触媒法などのための、請求項 1 ~ 44 のいずれか記載の光学構造及び / 又は請求項 45 ~ 71 のいずれか記載の光学系及び / 又は請求項 72 ~ 104 のいずれか記載の方法の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、少なくともある励起波長で光学的に透明である導波層 (a) を有する光学導波体を含む光学構造であって、層 (a) に内結合されかつ層 (a) の中を誘導される励起光の強さが、層 (a) 内及び層 (a) 上で、層 (a) の表面又は 200 nm 未満の距離内に位置する、ルミネセンスが可能である及び / 又は光反応性である分子を多光子励起、好ましくは 2 光子励起によって励起するのに十分なほど高くなる光学構造の可変的な実施態様に関する。これに関して、層 (a) 中を誘導される励起光のトレースに沿って、巨視的距離にわたり又は拡大面で多光子励起を可能にする実施態様が好ましい。本発明はまた、励起光源を有する光学系及び分析系の種々の実施態様ならびに本発明の光学構造の実施態様ならびにそれに基づく、特にルミネセンス励起のための及び多光子励起後のルミネセンス検出による 1 種以上の分析対象物の測定のための方法ならびにその使用に関する。

20

【0002】

本発明の目標は、導波構造の近接場、すなわち導波構造の上で又は約 200 nm 未満の距離内で、ルミネセンスが可能である及び / 又は光反応性である分子の多光子励起を可能にするための光学構造及び使いやすい光学的方法を提供することである。

【0003】

本発明の範囲内で、「多光子励起」とは、分子 (又は分子群) が、得られた励起状態から別の状態、特に基底状態まで緩和する前に、照射励起波長の多数の光子を吸収することをいうと理解される。このような多光子励起の結果は、基底状態への減衰によって発される、照射励起波長よりも短い波長のルミネセンス、特に蛍光であることができる。結果はまた、光反応性状態への遷移のための活性化障壁の解消であることができる。この光反応性状態は、他の分子又は分子複合体への分子結合の形成 (たとえば光重合の形態)に通じることにもできるし、既存の結合の破断 (後に脱着が続くこともある光解離)に通じることにもできる。相応に、「1光子励起」とは、単一の光子の吸収によって分子が前記励起状態に励起されることと理解される。

30

【0004】

明示的に区別されない限り、「分子群」(たとえば、蛍光的にマークされた分子の一部としての蛍光標識)は、「分子」の使用に含まれる。

40

【0005】

たとえば生化学的分析学では、供給されたサンプル中の分析対象物を、表面に固定化された生化学的又は生物学的又は合成認識要素を使用して高い選択性及び感度で測定するための構造及び方法が大きく要望されている。それに関して、多くの公知の測定法は、分析対象物の存在における一以上のルミネセンスの検出に基づく。

【0006】

これに関して、本出願では「ルミネセンス」は、光学的又は非光学的、たとえば電氣的、化学的、生化学的又は熱的励起ののちに起こる、紫外線から赤外線までのスペクトル範囲における光子の自然発生的放出をいう。たとえば、ケミルミネセンス、バイオルミネセン

50

ス、エレクトロルミネセンスならびに特に蛍光及びリン光が「ルミネセンス」に含まれる。

【0007】

以下、「物質の光学透明性」は、少なくともある励起波長でその物質の透明性が求められるという意味で使用する。より短い又はより長い波長では、この物質は吸収性になることもできる。

【0008】

近年、わずかに数100ナノメートルの薄い導波膜に基づく高屈折薄膜導波体により、感度が有意に高められた。たとえば、WO95/33197には、レリーフ格子を回折光学要素として使用して励起光を導波膜に結合する方法が記載されている。センサプラットフォームの表面を、分析対象物を含有するサンプルと接触させ、減衰フィールドの浸透深さ内に位置しかつるルミネセンスが可能である物質から等方的に発されるルミネセンスを、適切な計測装置、たとえばフォトダイオード、光電子増倍管又はCCDカメラによって記録する。また、減衰的に励起されたルミネセンスのうち、導波体に逆結合された部分を回折光学要素、たとえば格子によって外結合し、計測することが可能である。この方法はたとえばWO95/33198に記載されている。

10

【0009】

以下、「減衰フィールド」と「近接場」とは同義に使用する。

【0010】

現在の技術水準、特にWO95/33197及びWO33/198における上記した減衰的に励起されるルミネセンスを検出する方法の欠点は、センサプラットフォームの、均質な膜として設けられた導波層上で常に1種のサンプルしか分析することができないことである。同じセンサプラットフォーム上でさらなる計測を可能にするためには、面倒な洗浄及び清浄工程が絶えず求められる。これは、最初の計測とは別の分析対象物を測定しなければならない場合、特に当てはまる。免疫検定の場合、これは通常、センサプラットフォーム上の固定化層をまるごと交換しなければならないか、新たなセンサプラットフォームを全体として使用しなければならないことを意味する。

20

【0011】

したがって、いくつかのサンプルを平行に、すなわち同時に又は追加的な清浄工程をささむことなく続けざまに分析することを可能にする方法を開発することが要望されている。

30

【0012】

本質的に単モードの平面無機導波体を使用してルミネセンス検出のみに基づく多数の計測を同時又は順次を実施するため、たとえばWO96/35940には、互いに別々に励起光を照射される少なくとも二つの別個の導波区域が1個のセンサプラットフォーム上に配設されている装置(アレイ)が報告されている。しかし、センサプラットフォームを別々の導波区域に隔離することから生じる欠点として、共通のセンサプラットフォーム上の別個の導波領域における別個の計測区域のための所要面積が比較的大きい。したがって、ここでもまた、比較的低い密度の異なる計測フィールド(又はいわゆる「フィーチャ」)しか達成することができない。

【0013】

したがって、フィーチャ密度を増す又は計測面積あたりの所要面積を減らすこともまた要望されている。

40

【0014】

簡単なガラス又は顕微鏡スライドに基づき、さらなる導波層をもたない、非常に高いフィーチャ密度のアレイが公知である。たとえば、米国特許第5,445,934号(Affymax Technologies)では、1平方センチメートルあたり1000を超えるフィーチャの密度を有するオリゴヌクレオチドのアレイが記載され、特許請求されている。このようなアレイの励起及び読出しは、従来の光学構造及び方法に基づく。拡大させた励起光束を使用するとアレイ全体を同時に照らすことができるが、結果として、比較的低い感度しか得られない。散乱光の部分が比較的大きくなり、また、分析対象物の結合のためのオリゴヌク

50

レオチドが固定化されていない領域では、ガラス基板からの散乱光又はバックグラウンド蛍光が発生する。励起及び検出を固定化されたフィーチャの領域に限定し、隣接領域における発光を抑制するため、共焦点計測構造が広く使用され、種々のフィーチャが走査によって順次に分析される。しかし、その結果、大きなアレイの読出しに要する時間が増し、光学設備が比較的複雑になる。

【0015】

したがって、薄膜導波体に基づくセンサプラットフォームによって達成されてきた同じ高さの感度を達成すると同時にフィーチャあたりの所要計測面積を最小限にすることを可能にするセンサプラットフォームの実施態様及び光学構造が要望されている。

【0016】

同時係属出願 (PCT/EP00/04869) には、光学的に透明な層 (a) を層 (a) よりも低い屈折率の第二の層 (b) の上に含み、層 (a) 中で変調される格子構造 (c) をその上に設けられた計測区域とともに含む膜導波体を有するセンサプラットフォームが記載されている。それに関して、パラメータ、特に格子深さの適切な選択により、励起光を計測区域に内結合し、対応するルミネセンス励起を層 (a) の近接場に内結合したのち層 (a) 中に逆結合されるルミネセンス光を、短い距離、すなわち、何百マイクロメートルで完全に外結合することでき、ひいては、導波層 (a) 中にさらに広がることを防ぐことができる。

【0017】

この構造は、非常に小さな区域での多種の分析対象物の高感度同時測定を見込んでいる。光路を最適化し、反射又は散乱光を遮蔽すると、感度をさらに高めることができる。しかし、最後に、バックグラウンド信号及び対応するバックグラウンドのノイズによる制限が残る。これは、とりわけ、大部分の被着されるルミネセンス染料に関して、励起波長と発光波長との間のスペクトル分離 (ストークスシフト) が比較的小さく、通常は 20 nm ~ 50 nm であるという事実による。300 nm までの大きなストークスシフトを示すルミネセンス染料が知られているが、これらの染料は一般に、欠点として、量子収率及び/又は光安定性が比較的低い。

【0018】

さらには、従来 of 励起と組み合わせた高屈折薄膜導波体、たとえば Ta_2O_5 又は TiO_2 の導波膜に基づく公知の構造の欠点は、これらの導波体の伝播損及びこれらの薄膜導波体の自己蛍光 (たとえば層 (b) 中の極微量の蛍光性汚染物によって生じる) が短い励起波長で強烈に増すということである。その結果、短波長励起は約 450 nm ~ 500 nm に限られる。しかし、短めの波長においてもフルオロフォアを励起し、できるだけ低いバックグラウンドで又はできればバックグラウンドなしでそのルミネセンスを検出することを可能にする構造が高く評価されるであろう。

【0019】

最近、ほぼバックグラウンドなしのルミネセンス検出を可能にする、2光子励起に基づく方法が報告された。しかし、2光子励起は、きわめて高いフィールド強度及び励起光の強さを要する。記載された構造では、これは、極短いパルス期間 (通常はフェムト秒単位) を有する強力なパルスレーザによって達成される。しかし、これらの光学構造は非常に高額なシステム費を特徴とし、このシステム費が使用者の特定の資格に関して高い要件を課す。三次元画像の再現及び記憶のための構造の開発に関する 1967 年の米国特許第 3,572,941 号における非常に初期の研究では、たとえば、記憶媒体、たとえば単結晶、たとえば La でドーブされた CaF_2 の光学密度の変化 (永久的) に関して、20 MW/cm² のオーダの励起強さ密度が必要であると記載されている。たとえば、このような高強度密度は、たとえば米国特許第 5,034,613 号では、パルス高出力レーザを、そのレーザ焦点の直径が顕微鏡の焦点面で 1 マイクロメートル未満である状態で、共焦点顕微鏡的配置で使用することによって達成され、記載されている。しかし、走査による拡大区域の計測は、計器に多くの手間をかける他に、大きな時間的投資を要する。

【0020】

10

20

30

40

50

驚くことに今、少なくともある励起波長で透明である導波層 (a) を、前記励起波長で同じく透明である、層 (a) よりも低い屈折率の層 (b) の上に有する薄膜導波体に基づく光学構造の物理的パラメータを適切に選択し、十分に高い励起光強さを適用することにより、層 (a) に内結合され、層 (a) 中を誘導される励起光の強さが、層 (a) 上及び層 (a) 内で、層 (a) の表面又は層 (a) から 200 nm 未満の距離内に位置する分子を多光子吸収によって励起してルミネセンスに至らせるのに十分なほど高くなるということがわかった。

【0021】

驚くことに、少なくともある励起波長で透明である層 (a) を、少なくとも前記励起波長で同じく透明である、層 (a) よりも低い屈折率の層 (b) の上に有し、層 (a) 中で変調される少なくとも 1 個の格子構造 (c) を有する平面薄膜導波体として設けられる本発明の光学構造の好ましい実施態様により、層 (a) に内結合するための共振角で投射される励起光の強さが、層 (a) 上及び層 (a) 内で、層 (a) 中の励起光の伝播路全体にわたり、層 (a) 上に固定化されたルミネセンスが可能である分子を直線的なトレースにたどり前記伝播路に沿って拡大面上で 2 光子励起によって励起するのに十分なほど高くなるということが示された。これに関して、肉眼によって周囲光でも観察することができるほど強いルミネセンスを 2 光子吸収によって発生させることができる。

10

【0022】

これまで多光子励起はきわめて小さな空間、すなわち高出力レーザー (一般には、高い繰り返し率で脈動するフェムト秒レーザー) の焦点でのみ可能であったが、本発明は、巨視的寸法、すなわちミリメートルからセンチメートルの範囲にわたり平方ミリメートルから平方センチメートルの面積で 2 光子ルミネセンス励起及び観察を同時に可能にする。本発明のおかげで、たとえば単一のパルスのための励起光源のパルスエネルギーに対する要求を相対的に軽減することができ、すなわち、本発明の導波構造を用いる多光子ルミネセンス励起のために、より長いパルスのレーザー (たとえば、フェムト秒レーザーではなくピコ秒又はナノ秒レーザー) 又は連続発光 (c w) レーザーの使用が可能になる。

20

【0023】

特に分析対象物に対して表面結合認識要素を使用する分析対象物測定のための導波体の減衰フィールドにおける多光子励起によるルミネセンス励起の重要な利点は、高屈折導波体面からの距離の増大に関して、1 光子吸収による従来の励起に比べてさらに有意に増大した励起の感度である。従来の 1 光子吸収によって発生する減衰フィールドの強さ及びルミネセンスの強さ (フィールド強さに比例する) は距離 x とともに指数関数的に減少するが、 n 光子吸収後のルミネセンスの減少は、 $1 / e^{n \cdot x}$ に比例する、すなわち、2 光子励起の場合、 $1 / e^{2 \cdot x}$ に比例する。

30

【0024】

比較的低い照射励起光強さの場合でも非常に大きな増幅定数のおかげで比較的わずかな努力で達成することができる非常に高い表面結合励起光強さにより、本発明の光学構造は、多様な異なる技術分野で、生分析学以外でも、たとえば高い励起光強さにさらされる特に新規な物質の光物理的又は光化学的性質の調査に応用することができる。

【0025】

特に、本発明の種々の実施態様に関して以下さらに詳細に記載するように、導波構造から非常に小さな距離 (z 方向) の範囲内に位置する光反応性分子又は分子群を多光子励起、好ましくは 2 光子励起によって励起して化学反応に至らせることができる。これらの化学反応は、 z 方向への分子拡張の三次元構造を簡単に生成することができる光重合をたとえば生じさせる、隣接分子への化学結合の形成であることができる。化学反応はまた、巨視的基底区域で、マスペクトロメトリー、特に MALDI / TOF - MS (マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化飛行時間型マスペクトロメトリー) 及び新たな光学的クロマトグラフィー法としての分子分離のための新規で簡素化された方法をたとえば生じさせる分子結合の表面閉じ込め選択的破断であることもできる。

40

【0026】

50

本発明の第一の主題は、少なくともある励起波長で光学的に透明である導波層 (a) を有する光学導波体を含む光学構造であって、層 (a) に内結合されかつ層 (a) 中を誘導される励起光の強さが、層 (a) 内及び層 (a) 上で、層 (a) の表面に又は 200 nm 未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起させることができるのに十分なほど高い光学構造である。

【 0027 】

好ましくは、前記光学導波体は、少なくともある励起波長で光学的に透明である導波層 (a) を、少なくともその励起波長で同じく光学的に透明である、層 (a) よりも低い屈折率の層 (b) の上に有する光学薄膜導波体である。

【 0028 】

本発明の光学構造の実施態様の一群に特徴的であることは、層 (a) の表面に又は 200 nm 未満の距離内に位置しかつ多光子励起によって励起される分子が光反応性分子又は分子群である、すなわち、光による励起ののち化学反応性になる分子又は分子群であるということである。これらの光反応性分子は、たとえば、適当な、通常は短波長の励起光 (たとえば UV 光) の照射ののち光重合を開始することができるいわゆる光開始剤であることができる。したがって、この特別な実施態様に特徴的であることは、層 (a) 上に又は 200 nm 未満の距離内に位置する前記光反応性分子の多光子励起によって光重合が開始されるということである。これは、現在の技術水準に比較して二重の利点をもたらす。まず、比較的低い励起強さの照射により、表面近く (構造の導波層 (a) からの距離 z であって、その範囲内で当該化合物の 2 光子励起が可能である距離によって定義される) で重合を効率的に励起することができる。他方、距離 z によって定義されるきわめて浅い (すなわち分子サイズの) 三次元構造 (すなわち分子サイズの) を簡単な方法で生成することができる。これに関して、光学構造の表面に対して平行な線形又は横方向の範囲が、導波層 (a) 内の照射励起光の伝播長によって制限される。励起光の内結合及び外結合を同時に得るために光重合の工程が層 (a) 中で変調される格子構造上で実施されるならば (以下さらに詳細な説明を参照)、同じく非常に小さな横方向範囲 (マイクロメートルレベルの) のポリマー構造を生成又は書き込みすることができる (照射励起光に関して横方向への光学構造の動きによって)。

【 0029 】

本発明の光学構造のもう一つの実施態様に特徴的であることは、光解離が、すなわち、層 (a) 上に又は層 (a) から 200 nm 未満の距離内に設けられ、多光子励起の瞬間まで存在する分子又は分子複合体の破断が、層 (a) 上に又は層 (a) から 200 nm 未満の距離内で、前記光反応性分子の多光子励起によって開始されるということである。

【 0030 】

特殊な変形態様に特徴的であることは、前記光反応性分子が、比較的高分子量の分子、特に天然及び人造 (合成) ポリマーならびに生物学的分子、たとえばタンパク質、ポリペプチド及び核酸を埋め込むための分子マトリックスの一部であるということである。これに関して、光学構造は、マスペクトロメトリー、好ましくは MALDI / TOF - MS (マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化飛行時間型マスペクトロメトリー) のためのサンプルキャリアとして設けられることが特に好ましい。

【 0031 】

もう一つの好ましい実施態様は、少なくともある励起波長で光学的に透明である導波層 (a) を、少なくとも前記励起波長で同じく光学的に透明である、層 (a) よりも低い屈折率の層 (b) の上に有する光学薄膜導波体を含む光学構造であって、層 (a) に内結合されかつ層 (a) 中を誘導される励起光の強さが、層 (a) 上及び層 (a) 内で、層 (a) の表面に又は層 (a) から 200 nm 未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起させてルミネセンスに至らせるのに十分なほど高い光学構造である。

【 0032 】

層 (a) への励起光の内結合は、プリズムカップラと、重畳する減衰フィールドを有する連結した光学導波体に基づく減衰カップラと、導波層の前に位置する合焦レンズ、好ましくは

10

20

30

40

50

円柱レンズを有する前面カプラと、格子カプラとによって形成される群からの1個以上の光学内結合素子を使用して実施することができる。

【0033】

好ましくは、層(a)への励起光の内結合は、層(a)中で変調される格子構造によって実施される。

【0034】

さらには、光学構造は平面薄膜導波構造であることが好ましい。

【0035】

特に好ましいものは、少なくともある励起波長で光学的に透明である層(a)を、少なくとも前記励起波長で同じく光学的に透明である、層(a)よりも低い屈折率の層(b)の上
10
上に有するとともに、層(a)中で変調される少なくとも1個の格子構造(c)を有する平面薄膜導波体を含み、層(a)に内結合するための共振角で投射される励起光の強さが、層(a)上及び層(a)内で、少なくとも格子構造(c)の領域で、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起させるのに十分なほど高い本発明の光学構造の実施態様である。

【0036】

好ましくは、多光子励起は2光子励起である。

【0037】

本発明の光学構造により、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を、直線経路に沿って、すなわち層(a)中を誘導される励起光に沿って同時
20
に多光子励起によって励起させることが可能である。

【0038】

特に有利であるものは、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子の多光子励起を、層(a)への励起光の内結合の位置から起算して少なくとも5mmの距離にわたり直線経路に沿って可能にするような実施態様である。

【0039】

また、拡大した励起光の照射により、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子が、層(a)中を誘導される励起光に沿って拡大区域で同時に多光子励起によって励起されるならば、それは特に有利である。格子(c)によって光を層(a)に内結合する場合、励起光束は、好ましくは、格子線に対して平行に拡大される。
30

【0040】

本発明の光学構造は、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に少なくとも1mm²の面積で、より好ましくは少なくとも10mm²の面積で、さらに好ましくは少なくとも1cm²の面積で位置する分子の同時多光子励起のために作動可能であることが好ましい。

【0041】

特に多光子励起を可能にするための非常に高い表面閉じ込め励起光強さ及び表面に近いところでの高い強さは、以下さらに詳細に概説するように、多様な用途、特にバイオセンシングに有利であるが、通信及び遠隔通信技術にも有利である。

【0042】

さらには、構造は、格子構造(c)によって内結合され、層(a)中を誘導される励起光の伝播方向に配設されることが好ましい、層(a)の連続非変調領域を含むことが好ましい。特に、構造は、同一又は異なる周期を有する多数の格子構造(c)が、場合によっては層(a)の連続非変調領域がそれに隣接する状態で、共通の連続基板上に設けられるような方法で設計することができる。したがって、多光子励起によるルミネセンス励起の場合、多光子吸収によって層(a)の上に又はその近接場で生成されるルミネセンスを少なくとも部分的に層(a)中に結合させるとともに、層(a)中の誘導によって前記光学構造上の隣接領域に伝播させることもまた可能である。

【0043】

特定の用途では、異なる励起波長の励起光を同じ光学構造に同時又は順次に適用すること
50

10

20

30

40

50

が望ましい。その場合、この構造が、異なる周期数の2個以上の格子構造を、格子線が平行又は非平行、好ましくは非平行に配設された状態で重畳したものを含み(2個の重畳格子構造の場合、それらの格子線は、好ましくは互いに対して垂直に配設される)、その構造が異なる波長の励起光の内結合に作動可能であるならば、それは有利であることができる。

【0044】

光学導波層(a)中を誘導されるモードの伝播損の量は、下に位置する支持層の表面粗さによって、及びこのキャリア層で起こるかもしれないクロモフォアの吸収(層(a)中を誘導されるモードの減衰フィールドの浸透による、多くの用途に望ましくない、このキャリアにおけるルミネセンスの励起の危険をさらに伴う)によって多大な程度まで決まる。さらには、光学的に透明な層(a)及び(b)の熱膨張率の違いによって熱ひずみが発生することもある。化学的に高感度で光学的に透明な層(b)の場合、それがたとえば透明な熱可塑性プラスチックからなる場合、層(b)を攻撃するかもしれない溶剤の、光学的に透明な層(a)中に存在するかもしれない微孔への浸透を防ぐことが望ましい。

10

【0045】

したがって、多数の層((a)及び(b))を含む導波体の場合、層(a)よりも低い屈折率を有するとともに、5nm~1000nm、好ましくは10nm~1000nmの厚さを有するさらなる光学的に透明な層(b)が、層(a)と層(b)との間にかつ層(a)と接触した状態で位置するならば、それは有利である。この中間層の導入により、多様な課題層(a)の下の表面粗さの軽減と、層(a)中を誘導される光の減衰フィールドの、下に位置する一以上の層への浸透の軽減と、格子導波構造内で熱的に誘発される応力の軽減と、層(a)の微孔を下に位置する層に対してシールすることによる、下に位置する層からの光学的に透明な層(a)の化学的分離と、を満たすことができる。

20

【0046】

本発明の光学構造の格子構造(c)は、均一な周期の回折格子であることもできるし、多回折格子であることもできる。また、格子構造(c)には、光学的に透明な層(a)中に結合される励起光の伝播方向に対して垂直又は平行な周期数であり、横方向に変化する周期数を備えることもできる。

【0047】

光学的に透明な層(a)に使用することができる数多くの異なる材料がある。もっとも重要な事前要件は、できるだけ大きな程度で少なくとも投射励起光の波長における吸収又はルミネセンスの非存在と、少なくともミリメートルからセンチメートル程度の距離にわたる光誘導能力とである。

30

【0048】

本発明の光学構造の特定の実施態様の場合、光学的に透明な(a)の材料は、ガラス、石英又はたとえばポリカーボネート、ポリアミド、ポリイミド、ポリメチルメタクリレート、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸エステル、ポリフェニレンスルフィド、ポリエチレンテレフタレート(PET)及びポリウレタンならびにそれらの誘導体を含む群からの透明なプラスチックを含むことが好ましい。

【0049】

光学的に透明な層(a)はまた、 TiO_2 、 ZnO 、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 、 HfO_2 又は ZrO_2 の群の材料、特に好ましくは TiO_2 又は Nb_2O_5 又は Ta_2O_5 の群の材料を含むことができる。

40

【0050】

また、光学的に透明な層(a)の屈折率が1.8よりも大きいことが好ましい。

【0051】

光学的に透明な層(a)は、多様な「外見的に」異なる実施態様で設けることができる。ファイバタイプであることもできるし、平面導波体であることもできる。なおさらに、技術的に製造可能な形状が可能である。

【0052】

50

光学的に透明な層 (a) は、たとえばマイクロメートルからミリメートル程度の厚さ (又はファイバタイプ導波体の場合は直径) を有して自立性であることができる。層 (a) はまた、層 (a) の屈折率よりも低い屈折率の層を層 (a) に隣接して有する、同じくファイバタイプ実施態様及び平面的実施態様が可能である多層系の一部であることができる。

【 0 0 5 3 】

光学的に透明な層 (a) が低モード導波体である、すなわち、照射励起光の所与の偏光の最初の 1 0 モード未満を誘導するように作動可能であるならば、それは特に有利である。

【 0 0 5 4 】

光学的に透明な層 (a) が、照射励起光の所与の偏光の 1 ~ 3 モードのみを誘導するように作動可能である低モード導波体であることが特に好ましい。

10

【 0 0 5 5 】

上記ですでに概説したように、(平面) 光学薄膜導波体としての本発明の光学構造の実施態様が特に好ましい。

【 0 0 5 6 】

その場合、光学的に透明な層 (b) の材料は、ガラス、石英又はたとえばポリカーボネート、ポリイミド、ポリメチルメタクリレート、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸エステル、ポリフェニレンスルフィド、ポリエチレンテレフタレート (P E T) 及びポリウレタンによって形成される群からの透明な熱可塑性もしくは成形性プラスチックを含むことがさらに好ましい。

【 0 0 5 7 】

光学的に透明な導波層 (a) の屈折率の他にも、その厚さが、より低い屈折率の隣接層との界面でできるだけ強い減衰フィールドを発生させるとともに、層 (a) 内でできるだけ高いエネルギー密度を発生させるのに重要な第二のパラメータである。層厚さが少なくとも一つの励起波長モードを誘導するのに十分である限り、導波層 (a) の厚さの減少とともに減衰フィールドの強さが増す。それに関して、モードを誘導するための最小「カットオフ」層厚さは、このモードの波長に依存する。「カットオフ」層厚さは、短めの波長の光よりも長めの波長の光の場合の方が大きい。しかし、「カットオフ」層厚さに近づくと、望まれない伝播損もまた強く増大し (特に、散乱中心における散乱による) 、それにより、好ましい層厚さの選択の下限をさらに限定する。しかし、これらの伝播損は一般に、短波長の光よりも長めの波長の光の場合の方が低い。好ましいものは、所与の励起波長で一つから三つのモードだけを誘導することを見込んだ光学的に透明な層 (a) の厚さである。特に好ましいものは、この所与の励起波長で単モード導波体を生じさせる層厚さである。誘導される光の別々のモードの特性は横モードだけに関することが理解される。

20

30

【 0 0 5 8 】

これらの要件の結果として、層 (a) の厚さとその屈折率との積は、層 (a) 中に結合される励起光の励起波長の、好ましくは $1 / 10 \sim 1$ であり、もっとも好ましくは $1 / 10 \sim 2 / 3$ である。

【 0 0 5 9 】

光学的に透明な導波層 (a) 及び隣接層の所与の屈折率に関して、上記共振条件にしたがって励起光を内結合するための共振角は、内結合される回折オーダと、励起波長と格子周期とに依存する。第一の回折オーダの内結合は、内結合効率を増すのに有利である。内結合効率の量のためには、回折オーダの数の他に、格子深さが重要である。原則として、結合効率は、格子深さが増すとともに増大する。しかし、外結合の過程が内結合に対して完全に逆であるため、外結合効率が同時に増し、その結果、格子構造 (c) の上又はそれに隣接して位置する計測区域 (d) (以下の定義に準じる) におけるルミネセンスの励起のための最適値が得られる。この最適値は、計測区域の形状及び投射される励起光束の形状に依存する。これらの境界条件に基づき、格子 (c) が $200 \text{ nm} \sim 1000 \text{ nm}$ の周期及び $3 \text{ nm} \sim 100 \text{ nm}$ 、好ましくは $10 \text{ nm} \sim 30 \text{ nm}$ の変調深さを有するならば、それは有利である。

40

【 0 0 6 0 】

50

さらには、第一の光学的に透明な層（a）の厚さに対する格子の変調深さの比は0.2以下であることが好ましい。

【0061】

それに関して、格子構造（c）は、矩形、三角形又は半円形の断面のレリーフ格子であることもできるし、本質的に平面的な光学的に透明な層（a）中で屈折率の周期変調を有する位相又は容積格子であることもできる。

【0062】

さらには、光学系における調節の簡素化のための及び/又は分析系の一部としてのサンプル区画への接続のための光学的又は機械的に認識可能な印が構造に設けられるならば、それは有利であることができる。

10

【0063】

本発明の光学構造は、生化学的分析学における応用において1種以上の供給されるサンプル中の1種以上の分析対象物の高感度検出に特に適している。これらの応用の場合、測定する分析対象物の認識及び結合のための生物学的、生化学的又は合成認識要素が光学構造上に固定化される。固定化は、おそらくは構造全体に及ぶ大きな面を実施することもできるし、別個のいわゆる計測区域で実施することもできる。

【0064】

本発明の本質では、液体サンプル中の1種又は多種の分析対象物の認識のため、横方向に分けられた計測区域（d）が、その上に固定化された生物学的、生化学的又は合成認識要素によって占有される区域によって画定される。これらの区域は、いかなる形状、たとえば点、円、矩形、三角形、楕円又は線の形を有することもできる。1,000,000個までの計測区域を本発明の光学構造上に二次元配列で設けることが可能であり、その場合、単一の計測区域がたとえば0.001mm²~6mm²の面積を占有することができる。所与の計測区域内には、単一の分析対象物の認識及び結合ならびに測定のための同一の認識要素、又は種々の分析対象物の認識のための異なる認識要素を固定化することができる。また、認識要素として、異なる分析対象物を結合させることができるいくつか（すなわち二以上）の異なる領域又はセグメントを設けられている当該化合物を被着させることもできる。

20

【0065】

たとえば、導波構造として励起光の内結合のための1個以上の格子構造（c）を有する平面薄膜導波体の場合、計測区域は、そのような格子構造上に配設することもできるし、誘導励起光の伝播方向に関してそのような格子構造の後に位置する連続非変調領域に配設することもできる。

30

【0066】

サンプル中の多種の分析対象物を同時に測定するためには、二以上の横方向に分けられた計測区域が光学構造上でセグメントに組み合わされるならば、それは有利であることができる。隣接セグメントで生成されかつ層（a）中に逆結合されるルミネセンスのクロストークを、格子構造（c）によって防止する、又は光学構造上で生成される他の分離によって、たとえば被着された顔料の吸収ストリップもしくはサンプル区画の生成のための、光学構造の導波層（a）を下面として有する構造の隔壁によって防止するならば、種々のセグメントを特に光学的に互いに分けることができる。種々のセグメントはさらに、隣接区域間の流体シールを支持する被着されたリム及び/又は隣接区域間の光学クロストークの軽減に貢献する被着されたリムにより、互いから分けることができる。

40

【0067】

生物学的、生化学的又は合成認識要素を光学的に透明な層（a）に被着させる方法は数多くある。たとえば、被着は、物理的吸着又は静電的相互作用によって実施することができる。その場合、一般に、認識要素の向きは統計的性質である。さらには、分析対象物を含有するサンプル及び分析過程で加えられる試薬が異なる組成を有するならば、固定化された認識要素の一部が洗い落とされる危険がある。したがって、生物学的、生化学的又は合成認識要素（e）の固定化のために付着促進層（f）が光学的に透明な層（a）に被着

50

されるならば、それは有利であることができる。この付着促進層はもまた、透明であるべきである。特に、付着促進層の厚さは、導波層(a)を出てその上に位置する媒体に入る減衰フィールドの浸透深さを超えるべきではない。したがって、付着促進層(a)は、厚さ200nm未満、好ましくは20nm未満であるべきである。付着促進層は、たとえば、シランと、エポキシドと、官能化された帯電又は極性ポリマーと、「自己組織化官能化単分子層」と、を含む群の化合物を含むことができる。

【0068】

計測区域の定義で述べたように、横方向に分けられた計測区域(d)は、生物学的又は生化学的又は合成認識要素を光学構造上に横方向に選択的に被着させることによって生成することができる。ルミネセンスが可能である分析対象物や、固定化された認識要素への結合を求めて分析対象物と競合する発光的にマークされた分析対象物類似体や多工程検定におけるさらに発光的にマークされた結合相手と、接触させられると、ルミネセンスが可能であるこれらの分子は、固定化された認識要素によって占有された区域によって画定される計測区域だけで選択的に光学構造の表面に結合する。

10

【0069】

生物学的、生化学的又は合成認識要素を被着させるためには、インクジェットスポッティング、機械的スポッティング、マイクロコンタクトプリント及び生物学的、生化学的又は合成認識要素を平行又は交差マイクロチャンネルに供給し、圧力差又は電気もしくは電磁ポテンシャルを印加して計測区域と流体接触させることを含む方法の群の一以上の方法を適用することができる。

20

【0070】

概論の限定なしに、たとえば核酸(たとえばDNA、RNA、オリゴヌクレオチド)、核酸類似体(たとえばPNA)、抗体、アダプター、膜結合しかつ単離された受容体、それらのリガンド、抗体に対する抗原、「ヒスチジンタグ成分」、分子インプリントをホストするための、化学合成によって生成されたキャビティなどを含む群の成分を、生物学的、生化学的又は合成認識要素として被着させることができる。最後に挙げたタイプの認識要素は、「分子インプリンティング」として文献に記載されている方法によって製造されるキャビティをいう。この手法では、大部分は有機溶液中の分析対象物又は分析対象物類似体をポリマー構造に封入する。すると、これが「インプリント」と呼ばれる。そして、適切な試薬の添加により、分析対象物又はその類似体をポリマー構造から溶解させ、ポリマー構造中に空のキャビティを残す。そして、この空のキャビティを、分析対象物測定の後の方法で、高い立体選択性をもつ結合部位として使用することができる。

30

【0071】

当然、考慮中の用途に望まれ、求められる選択性にしたがって、測定する分析対象物を選択的に認識し、それと相互作用する他の化合物もまた、認識要素として適当である。

【0072】

また、全細胞又は細胞断片を生物学的又は生化学的又は合成認識要素として被着させることもできる。

【0073】

前記認識要素は、光学構造に直接被着させることもできるし、光学構造上の付着促進層を介して被着させることもできる。

40

【0074】

さらには、「認識要素」及び「分析対象物」の機能は、必要ならば適切な化学調製ののち、分析されるサンプルに含まれる化合物を本発明の光学構造に固定化することができ、対応する生物学的、生化学的又は合成認識要素が連続的な工程でそれらと接触するという意味において交換可能である。これに関して、別個の計測区域は、たとえば、サンプルを別々のアリコートに分割したのち、それらのアリコートを光学構造上の別個の区域に連続的に被着させることによって形成することができる。この場合、通常は種々の化合物の混合物が各計測区域に固定化されるであろう。

【0075】

50

多くの場合、分析方法の検出限界は、いわゆる非特異的結合によって生じる信号によって、すなわち、分析対象物の結合によって又は分析対象物測定で加えられる他の成分（たとえば疎水性吸着又は静電的相互作用により、設けられた固定化生物学的又は生化学的又は合成認識要素の区域で結合するだけでなく、これらの認識要素によって占有されないセンサプラットフォームの区域でも結合する）の結合によって生じる信号によって制限される。したがって、非特異的結合又は吸着を最小限にするため、分析対象物に対して「化学的に中性」である化合物が横方向に分けられた計測区域（d）の間に被着されるならば、それは有利である。多工程検定でそれ自体は分析対象物、分析対象物の類似体又はさらなる結合相手の認識及び結合に特異的な結合部位を有さず、かつ、その存在のため、分析対象物、その類似体又はさらなる結合相手のセンサプラットフォームの表面へのアクセスを阻止するような化合物が「化学的に中性」の化合物と呼ばれる。

10

【0076】

アルブミン、特にウシ血清アルブミンもしくはヒト血清アルブミン、分析されるポリヌクレオチドとでハイブリダイズしない、断片化された天然もしくは合成DNA、たとえばニシンもしくはサケ精液又は帯電していないが親水性のポリマー、たとえばポリエチレングリコールもしくはデキストランによって形成される群の化合物を「化学的に中性」の化合物として被着させることができる。

【0077】

それに関して、特に、ポリヌクレオチドハイブリダイゼーション検定で非特異的ハイブリダイゼーションの低減のための前述の化合物（たとえばニシン又はサケ精液）の選択は、分析されるポリヌクレオチドとはできるだけ異なる、分析されるポリヌクレオチド配列との相互作用が知られていないDNAの経験的好適さによって決定される。

20

【0078】

本発明のさらなる主題は、少なくとも1個の励起光源と、本発明の光学構造とを含み、層（a）に内結合されかつ層（a）中を誘導される励起光の強さが、層（a）内及び層（a）上で、層（a）の表面又は200nm未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起させるのに十分なほど高い光学系である。

【0079】

本発明の光学系の実施態様の一群に特徴的であることは、層（a）の表面又は層（a）から200nm未満の距離内で多光子励起によって励起される分子が光反応性分子、すなわち、光による励起ののち化学反応性になる分子又は分子群であるということである。これに関して、一つの変形態様として、層（a）の表面又は層（a）から200nm未満の距離内に位置する前記光反応性分子の多光子励起によって光重合が開始される。その場合、たとえば、光不安定性の保護基を有する化合物が光反応性分子として適当である。

30

【0080】

もう一つの変形態様に特徴的であることは、光解離が、すなわち、層（a）上又は層（a）から200nm未満の距離内に多光子励起工程の前に存在する分子又は分子複合体の破断が、層（a）上又は層（a）から200nm未満の距離内に位置する前記光反応性分子の多光子励起によって起こるということである。

【0081】

特殊な変形態様として、前記光反応性分子は、比較的高分子量の分子を埋め込むための、特に天然及び人造（合成）ポリマーならびに生物学的分子、たとえばタンパク質、ポリペプチド及び核酸を埋め込むための分子マトリックスの一部である。特に好ましいものは、光学構造がマススペクトロメトリー、好ましくはMALDI/TOF-MS（マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型マススペクトロメトリー）のためのサンプルキャリアとして設けられる実施態様である。

40

【0082】

好ましいものは、少なくとも1個の励起光源と、本発明の光学構造とを含み、層（a）に内結合され、層（a）中を誘導される励起光の強さが、層（a）内及び層（a）上で、層（a）の表面に又は200nm未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起させ

50

てルミネセンスに至らせるのに十分なほど高い光学系である。

【0083】

本発明の光学系は、通常、層(a)への励起光の内結合が、プリズムカプラと、重畳する減衰フィールドを有する連結した光学導波体に基づく減衰カプラと、導波層の面に位置する合焦レンズ、好ましくは円柱レンズを有する前面カプラと、格子カプラとによって形成される群からの1個以上の光学内結合素子を使用して実施されるような方法で設計されている。

【0084】

層(a)への励起光の内結合は、層(a)中で変調される格子構造によって実施されることが好ましい。

【0085】

また、光学構造が平面薄膜導波構造であることが好ましい。

【0086】

特に好ましいものは、少なくとも1個の励起光源と、上記実施態様のいずれかの光学構造とを含み、層(a)に内結合するための共振角で層(a)中で変調される格子構造(c)に投射される励起光の強さが、層(a)上及び層(a)内で、少なくとも格子構造(c)の領域で、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起させるのに十分なほど高い本発明の光学系の実施態様である。

【0087】

好ましくは、多光子励起は2光子励起である。

【0088】

好ましいものは、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を、直線経路に沿って、すなわち層(a)中を誘導される励起光に沿って同時に多光子励起によって励起させるように作動可能であるような実施態様である。

【0089】

特に有利なものは、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子の多光子励起を層(a)への励起光の内結合の位置から起算して少なくとも5mmの距離にわたり直線経路に沿って実施するように作動可能である実施態様である。

【0090】

また、拡大した励起光の照射により、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子が、層(a)中を誘導される励起光に沿って拡大区域で同時に多光子励起によって励起されることが好ましい。層(a)への光の内結合が層(a)中で変調される格子構造(c)によって実施されるならば、励起光束が格子線に対して平行に拡大されることが好ましい。

【0091】

また、特に有利なものは、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に少なくとも 1mm^2 の面積で、好ましくは少なくとも 10mm^2 の面積で、さらに好ましくは少なくとも 1cm^2 の面積で位置する分子の同時多光子励起を可能にするような本発明の光学系の実施態様である。

【0092】

本発明の光学系の他の好ましい実施態様に特徴的であることは、系の一部としての光学構造が、格子構造(c)によって内結合され、層(a)中を誘導される励起光の伝播方向に配設されることが好ましい、層(a)の連続非変調領域を含むということである。ここでもまた、多くの用途で、光学構造が、同一又は異なる周期を有する多数の格子構造(c)を、場合によっては層(a)の連続非変調領域がそれに隣接する状態で、共通の連続基板上に含むならば、それは有利である。

【0093】

また、本発明のルミネセンス励起のための光学系の多くの実施態様に不可欠な特徴は、多光子吸収によって層(a)の上に又はその近接場で生成されるルミネセンスが少なくとも部分的に層(a)中に結合されるとともに、層(a)中の誘導によって前記光学構造上の

10

20

30

40

50

隣接領域に伝播されることである。

【0094】

通常、本発明の光学系は、光学構造からの一以上のルミネセンスを検出するための少なくとも1個の検出器をさらに含む。

【0095】

光学構造に当たるまでの励起光の光線誘導の幾何学に関して、多様な異なる実施態様が可能である。好ましい実施態様の一つに特徴的であることは、少なくとも1個の励起光源から発せられる励起光が本質的に平行であり、かつ、層(a)に内結合するための共振角で、光学的に透明な層(a)中で変調される格子構造(c)に照射されるということである。

10

【0096】

少なくとも1個の光源からの励起光が拡大光学部品によって本質的に平行な光束に拡大され、かつ、層(a)中に内結合するための共振角で、光学的に透明な層(a)中で変調される巨視的領域の肉眼的構造(c)に照射されることが特に好ましい。

【0097】

もう一つの好ましい実施態様に特徴的であることは、少なくとも1個の光源からの励起光が、回折光学要素又は、光源が多数ある場合には、好ましくはダンマン格子である多数の回折光学要素又は好ましくはマイクロレンズアレイである屈折光学要素によってできるだけ均一な強さの複数の個々の光線に分割され、個々の光線が、互いに対して本質的に平行に、層(a)に内結合するための共振角で格子構造(c)に投射されるということである。

20

【0098】

特定の用途では、同様な又は異なる発光波長の2個以上の光源を励起光源として使用することが好ましい。

【0099】

二以上の異なる励起波長が照射されるような用途の場合、2個以上の光源からの励起光が異なる方向から同時又は順次に格子構造(c)に投射され、異なる周期数の格子構造を重畳したものを含む格子構造によって層(a)中に内結合される光学系の実施態様が好ましい。

【0100】

たとえば、CCDカメラ、CCDチップ、フォトダイオードアレイ、アバランシェダイオードアレイ、マルチチャネルプレート及びマルチチャネル光電子増倍管によって形成される群からの少なくとも1個の横方向に解像する検出器を信号検出に使用することが好ましい。

30

【0101】

本発明によると、光学系は、伝送される光束を成形するためのレンズもしくはレンズ系、光束を偏光させ、場合によってはさらに成形するための平面もしくは湾曲したミラー、光束を偏光させ、場合によってはスペクトル分離するためのプリズム、光束の部分をスペクトル選択的に偏光させるためのダイクロイックミラー、伝送される光の強さを調整するためのニュートラルフィルタ、光束の部分をスペクトル選択的に透過させるための光学フィルタもしくはモノクロメータ、又は励起及び/又はルミネセンス光の別個の偏光方向を選択するための偏光選択素子によって形成される群の光学部品が、1個以上の励起光源と本発明の光学構造との間に及び/又は光学構造と1個以上の検出器との間に配置されているような実施態様を含む。

40

【0102】

また、励起光を1fsec~10minの間隔のパルスで投射し、かつ、場合によっては、計測区域からの発光を時間分解的に計測することが可能である。これに関して、十分な時間的解像度の検出器の使用により、励起光のパルス照射によって計測区域からの発光の計測を実施し、修正することができる。通常、従来技術で公知の構造では2光子蛍光励起のために高いパルス繰り返し率のフェムト秒レーザーが使用されてきたが、本発明の光学構造に関

50

する本発明の光学系の場合、より長いパルス間隔のレーザ（たとえばピコ秒又はナノ秒レーザ）を、場合によってはより低い繰り返し率で、多光子ルミネセンス励起（好ましくは2光子ルミネセンス励起）のための励起光源として使用することもできるということが特徴的である。

【0103】

非常に短いパルスのレーザを使用するとき、このようなレーザからの励起光を本発明の光学構造に内結合する効率を最大限にするためには、パルス長からの励起パルスのスペクトル帯域幅の依存性（不確定性関係の結果として）を考慮に入れなければならない。たとえば、100 fsレーザは、5 ~ 15 nm程度の帯域幅を有することができる。これは、格子構造(c)による導波構造への内結合の達成可能な効率に関して、たとえば深さ < 10 nmの浅い格子の場合、内結合のための共振条件は、一定の調節角で照射されるスペクトルの小さな部分に関してしか満たされず、したがって、内結合効率が低いということを意味する。より深い格子を使用すると、角とスペクトル許容度との双方に関して共振条件の鋭さを落とすことができる。これは、原則的に、1 ~ 10 psecよりも短いレーザパルスを使用するとき、格子パラメータを最適化するためにはこの関係を考慮に入れなければならないことを意味する（他の系パラメータにも依存する）。一傾向として、より短いレーザパルスの内結合にはより大きな格子深さが求められる。

10

【0104】

本発明の光学系のさらなる好ましい実施態様に特徴的であることは、参照のため、計測区域の他に、光源の位置での励起光、拡大後の励起光又は個々のビームに分割された後の励起光、一以上の横方向に分けられた計測区域の位置からの励起波長の散乱光及び格子構造(c)によって外結合された励起波長の光によって形成される群の光信号が計測されるということである。それに関して、発光の測定のための計測区域と参照信号の測定のための計測区域とが同一であるならば、それは特に有利である。

20

【0105】

励起光の投射及び一以上の計測区域からの発光の検出は、一以上の計測区域ごとに順次に実施することができる。これに関して、特に、ミラー、偏光プリズム及びダイクロイックミラーによって形成される群の可動光学部品によって順次の励起及び検出を実施することができる。

【0106】

また、本発明の一部は、本質的に焦点及び角度保存的なスキャナを使用して順次の励起及び検出が実施されるような光学系である。また、光学構造を順次の励起及び検出の工程の間で動かすことが可能である。

30

【0107】

本発明のさらなる主題は、光学導波体を含む光学構造上の一以上の計測区域で少なくとも1種のサンプル中で1種以上の分析対象物を、その分析対象物、その結合相手又は分析対象物分子を取り囲むサンプルマトリックス分子の多光子励起によって測定するための分析系である。この分析系は、

本発明及び記載した実施態様のいずれかの光学構造と、
本発明及び上記実施態様のいずれかの光学系と
を含む。

40

【0108】

ここでもまた、前記光学導波体は、好ましくは光学薄膜導波体として設けられる。

【0109】

本発明のこのような分析系の特別な実施態様は、それがマスマスペクトロメトリー、好ましくはMALDI/TOF-MS（マトリックス支援レーザ脱離/イオン化飛行時間型マスマスペクトロメトリー）のための計測系であり、前記光学構造がマスマスペクトロメトリーのためのサンプルキャリアであり、測定される分析対象物分子、好ましくは比較的高分子量の分子、特に天然及び人造（合成）ポリマーならびに生物学的分子、たとえばタンパク質、ポリペプチド及び核酸が光反応性分子のマトリックスに埋め込まれ、このマトリックス

50

から、前記光反応性分子の多光子励起によって解離させ、脱着させることができることを特徴とする。

【0110】

特殊な実施態様に特徴的であることは、層(a)上又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する前記光反応性分子の多光子励起によって光重合が開始されるということである。

【0111】

もう一つの変形態様に特徴的であることは、光解離が、すなわち、多光子励起の工程の前に存在する分子又は分子複合体の破断が、層(a)上又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する前記光反応性分子の多光子励起によって開始されるということである。

10

【0112】

好ましいものは、光学導波体(好ましくは薄膜導波体として設けられる)を含む光学構造の一以上の計測区域で少なくとも1種のサンプル中の1種以上の分析対象物を、分析対象物又はその結合相手の一つの多光子励起によるルミネセンス検出によって測定するための

、
本発明の光学構造と、

本発明の光学系と、

1種以上のサンプルを光学構造の計測区域と接触させるための供給手段と

を含む分析系である。

【0113】

これに関して、分析系が、少なくとも一以上の計測区域の領域で光学構造に向けて開口した1個以上のサンプル区画をさらに含み、サンプル区画それぞれが好ましくは0.1nl~100μlの容積を有することが好ましい。

20

【0114】

一つの可能な実施態様として、サンプル区画は、光学的に透明な層(a)とは反対側が、サンプル及び場合によってはさらなる試薬の供給又は排除のための入口及び出口を除いて閉じられ、サンプル及び場合によってはさらなる試薬の供給又は排除が、共通の入口及び出口を有するいくつかの計測区域又はセグメントへの液体供給の場合、これらの開口が好ましくは行ごと又は列ごとに指定される閉鎖スルーフロー系で実施される。

【0115】

もう一つの可能な実施態様に特徴的であることは、サンプル区画が、サンプル又は他の試薬の局所的な指定供給又は排除のための開口を光学的に透明な層(a)とは反対側に設けられているということである。

30

【0116】

スクリーニング用途、たとえば、いわゆる「標的」化合物に結合することができる化合物の選択及び連続工程におけるこれらの化合物の濃縮に特に適しているものは、光学導波体(好ましくは薄膜導波体として設けられる)を含む光学構造の一以上の計測区域上の少なくとも1種のサンプル中で1種以上の分析対象物を、分析対象物又はその結合相手の一つのルミネセンス励起によるルミネセンス検出によって測定するための、

本発明の光学構造と、

本発明の光学系と、

1種以上のサンプルを光学構造の計測区域と接触させるための供給手段と、

1種以上のサンプル及び場合によってはさらなる試薬を受けるための1個以上のサンプル区画と、

40

サンプル区画に含まれる液体を除去するための手段と

を備え、

一以上の計測区域中の1種以上の分析対象物の結合の検出ののち、前記分析対象物と各固定化された認識要素及び場合によってはさらなる結合相手との間に形成される分子複合体を多光子励起後の光解離によって分裂させることができるか、光学構造から脱着させることができ、前記分子複合体を、各サンプル区画からの溶離ののち、まるごと又は断片化さ

50

れた形態でさらなる分析又は調製処理に付することができる分析系である。

【0117】

これに関して、多光子励起による光解離のために前記光学構造上の1種以上のサンプル中で検出された分析対象物とで形成された、異なる分子複合体又は分子複合体の断片の分離をこれらの分子複合体の吸収断面にしたがって可能にするような本発明の分析系の実施態様が好ましい。

【0118】

本発明のさらなる主題は、本発明の光学構造及び/又は本発明の光学系及び/又は本発明の分析系の使用を含む、層(a)に内結合されかつ層(a)中を誘導される励起光の強さが、層(a)内及び層(a)上で、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起させるのに十分なほど高い多光子励起の方法である。

10

【0119】

本発明の方法の実施態様の一群に特徴的であることは、光学構造の層(a)の表面又は層(a)から200nm未満の距離に位置する分子が光反応性であり、多光子励起によって励起して化学反応に至らせることができるということである。

【0120】

これに関して、一つの変形態様として、光学構造の層(a)の表面又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起して他の分子に結合させることができる。特別な実施態様に特徴的であることは、光学構造の層(a)の表面又は層(a)から200nm未満の距離に位置する分子を多光子励起によって励起して光重合に至らせることができることである。

20

【0121】

本方法のもう一つの変形態様に特徴的であることは、光解離が、すなわち、層(a)上又は層(a)から200nm未満の距離内に多光子励起まで存在する分子又は分子複合体の破断が、層(a)上又は200nm未満の距離内に位置する前記光反応性分子の多光子励起によって開始されるということである。

【0122】

本発明の方法の特別な実施態様に特徴的であることは、前記分析系がマススペクトロメトリー、好ましくはMALDI/TOF-MS(マトリックス支援レーザー脱離飛行時間型マススペクトロメトリー)のための計測系であり、前記光学構造がマススペクトロメトリーのためのサンプルキャリアであり、検出される分析対象物分子、好ましくは比較的高分子量の分子、特に天然及び人造(合成)ポリマーならびに生物学的分子、たとえばタンパク質、ポリペプチド及び核酸が光反応性分子のマトリックスに埋め込まれ、このマトリックスから、前記光反応性分子の多光子励起によって解離させ、脱着させることができることである。

30

【0123】

好ましい実施態様は、本発明の光学構造及び/又は本発明の光学系及び/又は本発明の分析系の使用を含むルミネセンス励起の方法であって、層(a)に内結合されかつ層(a)中を誘導される励起光の強さが、層(a)上及び層(a)内で、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起させてルミネセンスに至らせるのに十分なほど高いルミネセンス励起の方法である。

40

【0124】

特に好ましいものは、本発明及び前記実施態様のいずれかの光学構造の一以上の計測区域上の1種以上のサンプル中で1種以上の分析対象物をルミネセンス検出によって検出するための、前記光学構造上の計測区域からの又は少なくとも二以上の横方向に分けられた計測区域(d)のアレイ又はいくつかの計測区域を含む少なくとも2個以上の横方向に分けられたセグメント(d)のアレイからの一以上のルミネセンスを測定するための方法であって、層(a)に内結合されかつ層(a)中を誘導される励起光の強さが、層(a)上及び層(a)内で、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する

50

分子を多光子励起によって励起させてルミネセンスに至らせるのに十分なほど高い方法である。

【0125】

本発明の方法では、層(a)への励起光の内結合は、プリズムカップラと、重複する減衰フィールドを有する連結した光学導波体に基づく減衰カップラと、導波層の前に位置する合焦レンズ、好ましくは円柱レンズを有する前面カップラと、格子カップラとによって形成される群からの1個以上の光学内結合素子を使用して実施することができる。

【0126】

層(a)への励起光の内結合は、層(a)中で変調される格子構造によって実施されることが好ましい。

【0127】

好ましくは、光学構造は平面薄膜導波構造である。

【0128】

特に好ましいものは、少なくともある励起波長で光学的に透明である層(a)を、少なくとも前記励起波長で同じく光学的に透明である、層(a)よりも低い屈折率の層(b)の上に有するとともに、層(a)中で変調される少なくとも1個の格子構造(c)を有する平面薄膜導波体を含む光学導波体の使用を含む方法であって、層(a)に内結合するための共振角で投射される励起光の強さが、層(a)上及び層(a)内で、少なくとも格子構造(c)の領域で、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を多光子励起によって励起させるのに十分なほど高い方法である。

【0129】

多光子励起は2光子励起であることが好ましい。

【0130】

有利であるものは、光学構造の層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を、直線経路に沿って、すなわち層(a)中を誘導される励起光に沿って同時に多光子励起によって励起させることができる本発明の方法の実施態様である。

【0131】

特に有利であるものは、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子の多光子励起が、層(a)への励起光の内結合の位置から起算して少なくとも5mmの距離にわたり直線経路に沿って可能になるような実施態様である。

【0132】

また、拡大した励起光の照射により、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に位置する分子を、層(a)中を誘導される励起光に沿って拡大区域で同時に多光子励起によって励起させることができることが好ましい。格子構造(c)によって光を層(a)に内結合する場合、励起光束は、ここでもまた、好ましくは、格子線に対して平行に拡大される。

【0133】

特に有利であるものは、同じく、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離内に少なくとも1mm²の面積で、より好ましくは少なくとも10mm²の面積で、さらに好ましくは少なくとも1cm²の面積で位置する分子の同時多光子励起を可能にするような本発明の方法の実施態様である。

【0134】

本発明の方法の種々の実施態様に関して、光学構造が、格子構造(c)によって内結合されかつ層(a)中を誘導される励起光の伝播方向に配設されることが好ましい、層(a)の連続非変調領域を含むならば、それは有利であることができる。光学構造が、同一又は異なる周期を有する多数の格子構造(c)を、場合によっては層(a)の連続非変調領域がそれに隣接する状態で、共通の連続基板上に含むならば、それは特に有利であることができる。それに関して、方法の好ましい実施態様では、光学系は、多光子吸収によって光学構造の層(a)の上に又は近接場で生成されるルミネセンスが少なくとも部分的に層(a)中に結合されるとともに、層(a)中の誘導によって前記光学構造の隣接領域に伝播

10

20

30

40

50

するような方法で設計されている。

【0135】

上記ルミネセンス検出法の場合、(1)等方向のルミネセンス又は(2)層(a)に内結合され、格子構造(c)によって外結合されたルミネセンス又は両方の部分(1)及び(2)のルミネセンスを同時に計測することができる。

【0136】

ルミネセンス又は蛍光の生成のために、本発明の方法では、200nm~1100nmの波長で励起することができるルミネセンス又は蛍光標識を使用することができる。ルミネセンス又は蛍光標識は、従来のルミネセンス又は蛍光染料であってもよいし、半導体に基づく発光又は蛍光ナノ粒子であってもよい(W. C. W. Chan及びS. Nieの"Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection", Science 281 (1998) 2016-2018)。当然、加えられる励起波長で特に大きな多光子吸収断面を有し、好ましい2光子励起の場合には特に大きな2光子吸収断面を有し、同時にできるだけ高い光安定性を示すルミネセンス標識が好適である。

10

【0137】

ルミネセンス標識は2光子吸収によって励起されることが好ましい。前記ルミネセンス標識を可視又は近赤外の励起光の2光子吸収によって励起して紫外線又は青ルミネセンスに至らせることが特に好ましい。

【0138】

ルミネセンス標識は、分析対象物に結合することもできるし、競合検定では、分析対象物類似体に結合することもできるし、多工程検定では、固定化された生物学的、生化学的又は合成認識要素の結合相手の一つに結合することもできるし、生物学的、生化学的又は合成認識要素に結合することもできる。

20

【0139】

さらには、第一のルミネセンス標識と同じ又は異なる励起波長及び同じ又は異なる発光波長の第二以降のルミネセンス標識を使用することができる。それに関して、第二以降のルミネセンス標識が、第一のルミネセンス標識と同じ波長で励起され、他の波長で発光することができるならば、それは有利であることができる。

【0140】

他の用途では、加えられる発光染料の励起スペクトルと発光スペクトルとが重複しないか、部分的にしか重複しないならば、それは有利であることができる。

30

【0141】

本発明の方法では、供与体として働く第一の発光染料から受容体として働く第二の発光染料への電荷又は光エネルギーの移動が分析対象物の検出に使用されるならば、それはさらに有利であることができる。

【0142】

本発明のルミネセンス検出による1種以上の分析対象物の測定方法の特別な実施態様は、層(a)の表面又は層(a)から200nm未満の距離に位置する蛍光が可能である生分子、たとえば、蛍光が可能であるアミノ酸を有するタンパク質、たとえばトリプトファン、トリシン又はフェニルアニリンの、固有蛍光(「自己蛍光」)を多光子吸収(好ましくは2光子吸収)によって励起する能力に基づく。この群のうち、280nmで約5600($1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)のモル吸光係数及び約360nmの発光で20%の発光量子収率を有するトリプトファンが好ましい。したがって、トリプトファン蛍光の励起は通常、高屈折率導波体の減衰フィールドにおける従来の1光子吸収法によっては可能ではない。理由は、そのような短い波長の励起光は、導波体中で有意な距離を誘導されることはなく、吸収されたり散乱したりするからである。また、そのような短波長励起光を導波体に送ることは、たとえば励起光がまずこの波長で吸収性を示す物質(たとえば大部分のプラスチック)を透過しなければならないならば、しばしば不可能である。しかし、本発明の方法によると、適切な長めの波長の励起光を2光子吸収法に適用し、それを導波体(a)中で長めの距離にわたって誘導し、それにより、短波長蛍光を励起することが可能である。特別な利点として

40

50

、方法のこの変形態様は、測定方法における分析対象物又はその結合相手の一つとルミネセンス標識との化学的会合を要しない。その代わりに、測定は、これらの化合物の天然部分として存在するか、生物学的製造法で分析対象物又はその結合相手の一つに挿入される、ルミネセンスが可能である生物学的化合物の検出に直接基づくことができる。

【0143】

本発明の方法のこの特殊な実施態様に関して、ここでもまた、多くの下位的変形態様が可能である。たとえば、分析対象物検出のために固定化された生物学的、生化学的又は合成認識要素は、多光子励起により、固有ルミネセンスを示さないか、できるだけ低いルミネセンスしか示さない（適用された実験条件下で）ような方法で選択することができる。したがって、分析対象物検出工程で、測定法で適用される分析対象物そのもの又は結合相手の一つの多光子吸収によってルミネセンス励起されると、バックグラウンド信号を最小限にすることが可能である。もう一つの有利な実施態様は、計測区域に固定化された生物学的、生化学的又は合成認識要素の固定化密度を、多光子吸収によって励起されるそれら固有ルミネセンス（固有蛍光又は自己蛍光）によって測定することに基づく。したがって、分析対象物検出工程（多光子吸収又は1光子吸収による）の間に励起される分析対象物からの又はその結合相手の一つからのルミネセンス信号を利用可能な結合部位の数及び密度に関して修正及び/又は正規化することが可能である。

10

【0144】

特に、分析対象物及び/又はその結合相手ならびに固定化された認識要素の適切な吸収スペクトルの条件下、1光子吸収及び多光子吸収の場合に、1個の同じレーザを（同時又は順次）1光子及び多光子励起ルミネセンスに適用することができる。このような順次励起の場合、好ましい順序は具体的な用途に依存して異なることがある。

20

【0145】

層(a)の表面のエネルギー密度が非常に高く、適切な吸収断面のルミノフォアを使用する場合、ルミネセンス励起を三つの異なる波長で、たとえば発光波長1064nmのレーザを用いる1光子吸収によるNIR染料の励起、2光子吸収による可視での染料の励起（約532nm）及び3光子吸収によるUV染料の励起（約355nm）を同時に実施することができる。780nmで発光するレーザを使用する場合、対応する波長は、2光子吸収の場合で390nmであり、3光子吸収の場合で260nmであろう。

【0146】

したがって、本発明の多光子励起の方法は、照射波長における1光子吸収の過程によって励起される、ルミネセンスが可能である分子からの発光の同時又は順次ルミネセンス検出と組み合わせることができる。

30

【0147】

さらには、励起波長における一以上のルミネセンスの計測及び/又は光信号の測定が偏光選択的に実施されるならば、それは有利であることができる。さらには、本方法は、励起光の偏光とは異なる偏光で一以上のルミネセンスを計測する可能性を提供する。

【0148】

本発明のさらなる主題は、光学導波体（好ましくは薄膜導波体として設けられる）を含む光学構造の一以上の計測区域における少なくとも1種のサンプル中で、分析対象物又はその結合相手の一つのルミネセンス励起（1光子又は多光子励起ののち）によるルミネセンス検出によって1種以上の分析対象物を測定するための分析系を、

40

本発明の光学構造と、

本発明の光学系と、

1種以上のサンプルを光学構造の計測区域と接触させるための供給手段と、

1種以上のサンプル及び場合によってはさらなる試薬を受けるための1個以上のサンプル区画と、

サンプル区画に含まれる液体を除去するための手段と

ともに使用して、一以上の計測区域中の1種以上の分析対象物の結合の検出ののち、前記分析対象物と各固定化された認識要素及び場合によってはさらなる結合相手との間に形成

50

される分子複合体を多光子励起後の光解離によって分裂させることができるか、光学構造から脱着させることができ、前記分子複合体を、各サンプル区画からの溶離ののち、まるごと又は断片化された形態でさらなる分析又は調製処理に付すことができる本発明の方法の実施態様である。

【0149】

本発明の方法の特別な変形態様に特徴的であることは、層(a)の表面に又は層(a)から200nm未満の距離に位置する分子が、層(a)上及び層(a)内に照射される励起光の大きな増幅により、この距離内で捕捉されるということである。理由は、高い表面閉じ込め励起光の強さと表面に向かう方向におけるその勾配の増大とがこれらの分子に「光学ピンセット」の作用を受けさせるからである。

10

【0150】

本発明及び上記実施態様のいずれかの方法は、抗体もしくは抗原、受容体もしくはリガンド、キレート化剤もしくは「ヒスチジンタグ成分」、オリゴヌクレオチド、DNAもしくはRNAストランド、DNAもしくはRNA類似体、酵素、酵素補因子もしくは阻害薬、レクチン及び炭水化物を含む群の1種以上の分析対象物の同時及び/又は順次の定量的及び/又は定性的測定を見込んだものである。

【0151】

試験するサンプルは、天然に産出する体液、たとえば血液、血清、血漿、リンパ液もしくは尿又は卵黄であることができる。

【0152】

試験するサンプルはまた、光学的に濁った液体もしくは表面水、土壌抽出物、植物抽出物又はバイオもしくはプロセスブロスであることができる。

20

【0153】

試験するサンプルはまた、生物学的組織片から採取することができる。

【0154】

本発明のさらなる主題は、薬学的研究、コンビナトリアルケミストリー、臨床及び臨床前開発におけるスクリーニング法での化学的、生化学的又は生物学的分析対象物の測定のための定量的及び/又は定性的分析、アフィニティスクリーニング及び研究における運動パラメータのリアルタイム結合研究及び測定、特にDNA及びRNA分析学のための分析対象物定性的及び定量的測定、毒性発生研究及び発現プロファイルの決定、ならびに医薬品研究開発、ヒト及び動物の診断、農薬製品研究開発における抗体、抗原、病原体又はバクテリアの決定、医薬品開発及び治療薬選択における患者層別化、食品及び環境分析学における病原体、有害薬剤及び細菌、特にサルモネラ、プリオン及びバクテリアの決定のための、本発明の光学構造及び/又は本発明の光学系及び/又は本発明の分析系及び/又は本発明の方法ならびに上記実施態様いずれかの使用である。

30

【0155】

本発明のさらなる主題は、本発明の光学構造及び/又は本発明の光学系及び/又は本発明の方法の、非線形光学又は遠隔通信もしくは通信技術における使用である。

【0156】

非常に一般的に、本発明の光学構造及び/又は本発明の光学系及び/又は本発明の分析系及び/又は本発明の方法は、非常に高い励起光強さ及び/又は励起期間の適用を要する表面閉じ込め研究、たとえば材料の光安定性の研究、光触媒法などに適している。

40

【0157】

記載した具体的な実施態様によって本発明の汎用性を限定する意図なく、以下の例によって本発明をさらに詳細に説明する。

【0158】

例1

1. ルミネセンスの2光子励起のための光学構造

光学構造は、ガラス基板(光学層(b)としてのAF45ガラス、800nmで $n = 1.496$)と、五酸化タンタルの150nm薄層(a)(導波層(a)、800nmで $n = 2.0$

50

92) からなるものであった。層 (a) 中に 9 mm 間隔で生成したレリーフ格子の形態の結合格子 (格子周期 360 nm、格子深さ 12 nm) を、層 (a) への光の内結合及び層 (a) からの光の外結合に使用した。これらの条件の下、ガラス基板 (光学層 (b)、810 nm で $n = 1.496$) から導波層 (a) への方向における内結合角は -20.4° であった。層 (a) への外部投射角 (光学構造の法線に対して計測) は -31.4° に達した。

【0159】

2光子励起の場合のこの光学構造の適性の生成及び実証のために、ローダミンのエタノール溶液 (エタノール中 15.9 μM ローダミン B) 0.5 μl の滴を層 (a) 上の 2 個の格子構造の間に被着させて、エタノールの蒸発後、ルミネセンスが可能である分子の例としてのローダミン分子が層 (a) 上に残るようにした。

10

【0160】

2. 2光子励起のための光学系、2光子励起の計測方法及び結果

約 800 nm で発光するパルス式チタンサファイヤレーザ (パルス長: 100 fs、繰返し率: 80 MHz、平均印加電力: 最大 0.6 W まで、スペクトルパルス幅: 8 nm) を励起光源として使用した。レーザによって発せられる励起光の強さは、電気光学変調器を使用して本来の出力の 0% ~ 100% の間で連続的に調整することができる。また、コンピュータ制御の下、この範囲で連続的に加減することもできる。

【0161】

光学構造の内結合格子 (c) 上に所望の形状の平行な投射励起光束を生成するため、励起光路中の電気光学変調器の後に (導波構造に向かう方向で) レンズを挿入した。x、y 及び z 方向への並進 (格子線に対して平行及び垂直) 及び回転 (内結合格子の格子線と同一である回転軸で) を可能にするための調節部品に取り付けたミラーを使用して、投射励起光を光学構造の内結合格子 (c) に向けた。

20

【0162】

まず、0.4 W の平均照射出力で、平行化したビームを内結合のための共振角で内結合格子に向けた。そのために、内結合格子 (光学構造の平面) がビームウエスに位置する状態でレンズ ($f = 12.7 \text{ cm}$) によってビームをわずかに合焦させて、励起光が平面波として内結合格子に到達するようにした。驚くことに、固定化されたルミネセンス染料の領域で、光学構造中を誘導されるモードに沿って、屋内照明の下で肉眼でも観察することができるような強さの 2 格子蛍光が励起された (図 1、フィルタなしで撮影)。画像部分は、光学構造を内側に取り付けられたホルダを示す。左側の明るい光点は、内結合格子への励起光の内結合の位置を示す。写真はフィルタなしで撮られているため、長い波長でカメラの感度が低下するにもかかわらず、格子で散乱する励起光の強さはカメラによって記録するのに十分な強さであった。内結合モード (波長 800 nm) は、画像面で左から右に伝播した。ローダミン染料が固定化されている領域に達する前に、誘導モードは見えなくなった。そして、モード伝播がさらに右に向かうと、2光子励起によって生成されたローダミン染料の蛍光が明らかに見えるようになった。観察された光の跡は、誘導励起光が再び外結合される次の格子構造までの 8 mm の長さに相当した。全距離にわたり、誘導光及び励起された 2 格子蛍光の有意な減衰を観察することはできなかった。

30

【0163】

図 2 は、検出器としての CCD カメラの前に IR 遮断フィルタ (BG39) を使用して撮影した励起された 2 光子蛍光のプロフィールを格子線に対して平行な断面図で示す。励起ビームプロフィールは、格子上で、蛍光トレースの計測された半値幅と良好に合致する約 100 μm の理論幅に調節した。この例では、8 mm の距離にわたる直線トレースに沿って (蛍光プロフィールの基底幅をとって約 2 mm^2 の面積) 2 格子励起によって蛍光を発生させた。誘導された励起光の伝播長、ひいては 2 格子励起の励起長は外結合格子によってのみ制限されるということが注記されなければならない。

40

【0164】

図 3 は、さらなるビーム形成レンズなしで直接照射されたレーザ光線の対応する蛍光プロフィールを示す。この場合、蛍光プロフィールの半値幅は約 360 μm であり、基底幅は

50

約 800 μm であり、約 6 mm^2 の全面積 (8 mm のモード伝播長に沿って) で 2 格子励起によって励起される蛍光に相当した。

【0165】

次に、さらなる工程で、円柱レンズ ($f = 40 \text{ mm}$) を用いてレーザービームを格子線に対して平行に拡大した。対応する蛍光プロフィール (図 4) から、20 mm^2 を超える全面積で 2 格子励起によって励起される蛍光に対応する約 1.7 mm の半値幅及び約 3 mm の基底幅を測定した。

【0166】

励起蛍光が 2 格子励起によって生じたものであることを紛れなく識別するための重要な規準は、照射励起強さに対するその強さの二次方程式的依存性である。このためには、CCD カメラの代わりに、ロックイン増幅器 (チョップ周波数: 2 kHz) に接続された Si フォトダイオードを検出器として使用した。導波構造の減衰フィールドにおける 2 格子励起によって励起された等方性に発される蛍光を、レンズにより、フォトダイオードの前に配置された IR 遮断フィルタ (BG39) をここでも使用して、前記フォトダイオードに合焦させた。コンピュータ制御された電気光学変調器により、光学構造に照射される励起強さを 0 mW から 300 mW (平均照射出力) 近くまで 6 mW きざみで増大させ、発生した蛍光強さを同時に計測した。図 5 は、計測された蛍光強さ及び、直線として、計測された強さの方程式 $y = ax^2$ (y は蛍光強さに対応し、 x は励起強さに対応し、 a はフィッティングパラメータに対応する) へのあてはめを示す。驚くことに、さらなるバックグラウンド信号に相当するであろうオフセットなしで、励起強さに対する計測された蛍光強さの完璧な二次方程式的依存性が見いだされた。このように、この例では、計測された蛍光が疑う余地なく 2 光子励起に起因し、この実験条件下、バックグラウンド信号なしで、この 2 光子蛍光を励起することができるということが実証された。

【0167】

例 2: 2 格子励起のための光学系

発光波長 810 nm の高出力レーザーダイオード (ファイバ結合、10 W) を励起光源として使用した。ファイバの背後に (光の伝播方向で) 位置するビーム成形光学部品により、所望の形状の平行な励起光束を生成し、光学構造の導波層 (a) への内結合のための結合角で格子 (格子周期 360 nm、格子深さ 12 nm) に照射した。ガラス基板 (光学層 (b)、810 nm で $n = 1.496$) における内結合角は -21.7° であり、外投射角は -34.1° であった。導波層 (a) は 150 nm 五酸化タンタル (810 nm で $n = 2.09$) であった。これらのパラメータを使用して、24% の部分を層 (a) 中に結合することができ、層 (a) の表面における励起光強さは 2 格子励起にとって十分であった。

【図面の簡単な説明】

【0168】

【図 1】本発明の導波構造による 2 光子励起ののち生成された、裸眼で見ることができる蛍光の CCD カメラ画像を示す図である。

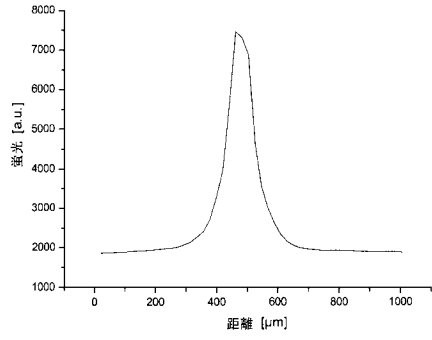
【図 2】異なる程度に平行化された励起光線を使用して励起を実施した場合に 2 光子励起によって生成される蛍光の断面プロフィールを示す図である。

【図 3】異なる程度に平行化された励起光線を使用して励起を実施した場合に 2 光子励起によって生成される蛍光の断面プロフィールを示す図である。

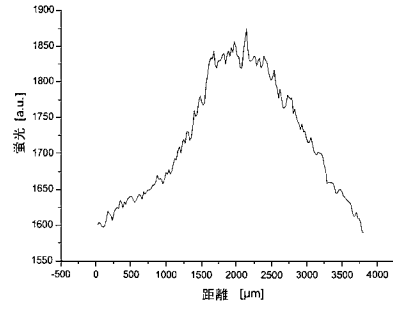
【図 4】光学構造の格子線に対して平行に拡大された励起光線を使用する励起ののち、2 光子蛍光によって生成された蛍光の断面プロフィールを示す図である。

【図 5】励起光の強さに対する計測された蛍光強さの二次方程式的依存性を示す図である。

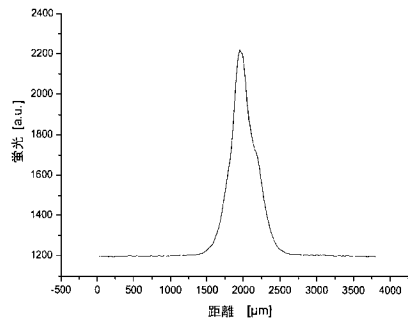
【 図 2 】



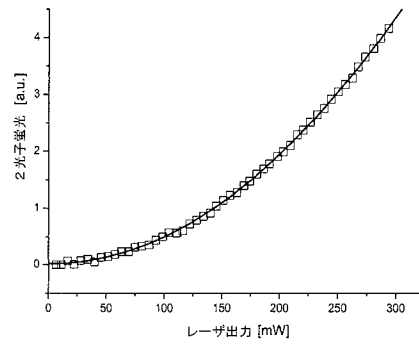
【 図 4 】



【 図 3 】



【 図 5 】



【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. Oktober 2002 (10.10.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/079765 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: G01N 21/77,
21/55, 21/64

Markus [CH/CH]; Im Brühl 6, CH-4312 Magden (CH),
MAROWSKY, Gerd [DE/DE]; Mühlspielweg 19, 37077
Göttingen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/02958

(74) Gemeinsamer Vertreter: ZEPTOSENS AG; Benken-
strasse 254, CH-4108 Witterswil (CH).

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. März 2002 (18.03.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GI,
GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
0617701 2. April 2001 (02.04.2001) CH
0689701 12. April 2001 (12.04.2001) CH

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GI,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
europäisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): ZEPTOSENS AG [CH/CH]; Benkenstrasse 254,
CH-4108 Witterswil (CH).

(72) Erfinder: und
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): DUVENECK, Gert,
L. [DE/DE]; Lzmattenweg 34, 79189 Bad Krozingen
(DE). BOPP, Martin, A. [CH/CH]; Brunnmatstrasse
5, CH-4053 Basel (CH). PAWLAK, Michael [DE/DE];
Andelsbachstrasse 5, 79225 Laufenburg (DE). EHRAT,

Veröffentlicht:
*ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: OPTICAL STRUCTURE FOR MULTI-PHOTON EXCITATION AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: OPTISCHE STRUKTUR ZUR MULTI-PHOTONEN-ANREGUNG UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to a variable embodiment of an optical structure, comprising an optical waveguide with a wave-guiding layer (a) that is transparent at least one excitation wavelength. Said optical structure is characterised in that the intensity of excitation light that is input into the layer (a) and guided through said layer (a) is sufficiently high and in said layer (a) to excite molecules capable of luminescence and/or photoreactive molecules located on the surface of the layer (a) or at a distance of less than 200 nm from the latter (a), by means of multi-photon excitation, preferably two-photon excitation. Preferred embodiments are those which allow a linear or planar multi-photon excitation along the excitation light that is guided through the layer (a). The invention also relates to various embodiments of optical systems and analytical systems comprising an excitation light source and an inventive embodiment of an optical structure and to methods based thereon, in particular to luminescence excitation and to the luminescent detection of one or several analytes by means of multi-photon excitation, in addition to the use of said embodiments and methods.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine variable Ausführungsform einer optischen Struktur, umfassend einen optischen Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die Schicht (a) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche, lumineszenzfähige und/oder photoreaktive Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung, vorzugsweise 2-Photonen-Anregung, anzuregen. Bevorzugt sind dabei solche Ausführungsformen, welche eine linienhafte oder flächenhafte Multi-Photonen-Anregung, längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts, ermöglichen. Die Erfindung betrifft auch verschiedene Ausführungsformen optischer Systeme und analytischer Systeme mit einer Anregungslichtquelle und einer erfindungsgemässen Ausführung einer optischer Struktur sowie darauf basierende Verfahren, insbesondere zur Lumineszenzanregung sowie zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten mittels Multi-Photonen-Anregung, sowie deren Verwendung.

WO 02/079765 A2

WO 02/079765 A2 

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

Optische Struktur zur Multi-Photonen-Anregung und deren Verwendung

Die Erfindung betrifft eine variable Ausführungsform einer optischen Struktur, umfassend einen optischen Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die Schicht (a) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche, lumineszenzfähige und / oder photoreaktive Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung, vorzugsweise 2-Photonen-Anregung, anzuregen. Bevorzugt sind dabei solche Ausführungsformen, welche eine linienhafte oder flächenhafte Multi-Photonen-Anregung, längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts, ermöglichen. Die Erfindung betrifft auch verschiedene Ausführungsformen optischer Systeme und analytischer Systeme mit einer Anregungslichtquelle und einer erfindungsgemässen Ausführung einer optischen Struktur sowie darauf basierende Verfahren, insbesondere zur Lumineszenzanregung sowie zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten mittels Multi-Photonen-Anregung, sowie deren Verwendung.

Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von optischen Strukturen und einfach durchführbaren optischen Verfahren, um im Nahfeld der wellenleitenden Schicht der Struktur, d.h. auf dieser Struktur oder in einem Abstand von weniger als etwa 200 nm, eine Multi-Photonen-Anregung lumineszenzfähiger und / oder photoreaktiver Moleküle zu ermöglichen.

Im Rahmen dieser Erfindung wird unter einer „Multi-Photonen-Anregung“ verstanden, dass ein Molekül (oder eine molekulare Gruppe) mehrere Photonen einer eingestrahnten Anregungswellenlänge absorbiert, bevor es (sie) aus dem daraus resultierenden angeregten Zustand in einen anderen Zustand, insbesondere den Grundzustand,

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

2

zurückkehrt. Das Resultat einer solchen Multi-Photonen-Anregung kann eine bei der Rückkehr in den Grundzustand ausgestrahlte Lumineszenz, insbesondere Fluoreszenz, mit kürzerer Wellenlänge als der eingestrahlten Anregungswellenlänge sein. Es kann aber auch in der Überwindung der Aktivierungsenergie zum Übergang in einen photoreaktiven Zustand bestehen. Dieser photoreaktive Zustand kann zur Ausbildung von molekularen Bindungen zu anderen Molekülen oder Molekülkomplexen führen (z. B. in Form einer Photopolymerisation) oder auch zum Bruch bestehender Bindungen (Photodissoziation, gegebenenfalls gefolgt von einer Desorption). Entsprechend wird unter einer „Ein-Photonen-Anregung“ verstanden, dass ein Molekül durch Absorption eines einzelnen Photons in besagten angeregten Zustand angeregt wird.

Unter dem Begriff Molekül soll nachfolgend, sofern nicht explizit anders bezeichnet, der Begriff „molekulare Gruppe“ (wie z. B. ein Fluoreszenzlabel als Teil eines fluoreszenzmarkierten Moleküls) subsumiert sein.

Beispielsweise in der biochemischen Analytik besteht ein hoher Bedarf nach Anordnungen und Methoden, mit denen, unter Verwendung von auf einer Oberfläche immobilisierten biochemischen oder biologischen oder synthetischen Erkennungselementen, ein in einer zugeführten Probe befindlicher Analyt mit hoher Selektivität und Empfindlichkeit nachgewiesen werden kann. Viele bekannte Nachweismethoden stützen sich dabei auf die Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen in Anwesenheit des Analyten.

Mit dem Begriff „Lumineszenz“ wird dabei in dieser Anmeldung die spontane Emission von Photonen im ultravioletten bis infraroten Bereich nach optischer oder nichtoptischer, wie beispielsweise elektrischer oder chemischer oder biochemischer oder thermischer Anregung, bezeichnet. Beispielsweise sind Chemilumineszenz, Biolumineszenz, Elektrolumineszenz und insbesondere Fluoreszenz und Phosphoreszenz unter dem Begriff „Lumineszenz“ mit eingeschlossen.

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

3

Der Begriff "optische Transparenz eines Materials" wird im folgenden in dem Sinne verwendet, dass die Transparenz dieses Materials bei mindestens einer Anregungswellenlänge gefordert wird. Bei einer längeren oder kürzeren Wellenlänge kann dieses Material auch absorbierend sein.

Mittels hochbrechender Dünnschichtwellenleiter, basierend auf einem nur einige hundert Nanometer dünnen wellenleitenden Film auf einem transparenten Trägermaterial, konnte in den letzten Jahren die Empfindlichkeit deutlich gesteigert werden. Beispielsweise wird in der WO 95/33197 eine Methode beschrieben, in der das Anregungslicht über ein Reliefgitter als diffraktives optisches Element in den wellenleitenden Film eingekoppelt wird. Die Oberfläche der Sensorplattform wird mit einer den Analyten enthaltenden Probe in Kontakt gebracht, und die isotrop abgestrahlte Lumineszenz in der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes befindlicher lumineszenzfähiger Substanzen wird mittels geeigneter Messvorrichtungen wie zum Beispiel Photodioden, Photomultiplier oder CCD-Kameras gemessen. Es ist auch möglich, den in den Wellenleiter rückgekoppelten Anteil der evaneszent angeregten Strahlung über ein diffraktives optisches Element, zum Beispiel ein Gitter, auszukoppeln und zu messen. Diese Methode ist zum Beispiel in der WO 95/33198 beschrieben.

Die Begriffe "evaneszentes Feld" und "Nahfeld" werden nachfolgend synonym verwendet.

Ein Nachteil aller oben im Stand der Technik, insbesondere in der WO 95/33197 und WO 95/33198 beschriebenen Verfahren zur Detektion evaneszent angeregter Lumineszenz liegt darin, dass auf der als homogener Film ausgebildeten wellenleitenden Schicht der Sensorplattform jeweils nur eine Probe analysiert werden kann. Um weitere Messungen auf derselben Sensorplattform durchführen zu können, sind fortlaufend aufwendige Wasch- bzw. Reinigungsschritte notwendig. Dieses gilt insbesondere, wenn ein von der ersten Messung verschiedener Analyt detektiert werden soll. Im Falle eines Immunoassays bedeutet dieses im allgemeinen, dass die gesamte immobilisierte Schicht

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

4

auf der Sensorplattform ausgetauscht oder gleich eine neue Sensorplattform als Ganzes verwendet werden muss.

Es besteht daher zugleich das Bedürfnis, ein Verfahren zu entwickeln, welches es erlaubt, parallel, das heisst gleichzeitig oder direkt hintereinander ohne zusätzliche Reinigungsschritte, mehrere Proben zu analysieren.

Zur gleichzeitigen oder aufeinanderfolgenden Durchführung von ausschliesslich lumineszenzbasierenden Mehrfachmessungen mit im wesentlichen monomodalen, planaren anorganischen Wellenleitern sind, z. B. in der WO 96/35940, Vorrichtungen (Arrays) bekannt geworden, in denen auf einer Sensorplattform wenigstens zwei getrennte wellenleitende Bereiche angeordnet sind, die getrennt mit Anregungslicht bestrahlt werden. Die Aufteilung der Sensorplattform in getrennte wellenleitende Bereiche hat allerdings nachteilig zur Folge, dass der Platzbedarf für diskrete Messbereiche, in diskreten wellenleitenden Bereichen auf der gemeinsamen Sensorplattform relativ gross ist und daher wieder nur eine verhältnismässige geringe Dichte unterschiedlicher Messfelder (oder sogenannter "features") erreicht werden kann.

Es besteht daher ausserdem der Bedarf nach einer Vergrösserung der Feature-Dichte bzw. nach einer Verkleinerung der erforderlichen Fläche pro Messbereich.

Basierend auf einfachen Glas- oder Mikroskop-Plättchen, ohne zusätzliche wellenleitende Schichten, sind Arrays mit einer sehr hohen Feature-Dichte bekannt. Beispielsweise werden in der US 5445934 (Affymax Technologies) Arrays von Oligonukleotiden mit einer Dichte von mehr als 1000 Features pro Quadratzentimeter beschrieben und beansprucht. Die Anregung und das Auslesen solcher Arrays beruht auf klassischen optischen Anordnungen und Methoden. Es kann das ganze Array gleichzeitig mit einem aufgeweiteten Anregungslichtbündel beleuchtet werden, was jedoch zu einer relativ geringen Empfindlichkeit führt, da die Anregung nicht auf die wechselwirkende Oberfläche beschränkt ist und da ausserdem der Streulichtanteil relativ gross ist und Streulicht oder Untergrundfluoreszenzlicht aus dem Glassubstrat auch in den Bereichen

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

5

erzeugt wird, in denen sich keine zur Bindung des Analyten immobilisierten Oligonukleotide befinden. Um die Anregungsintensität zu erhöhen und die Empfindlichkeit bei der Detektion zu verbessern, werden vielfach konfokale Messanordnungen eingesetzt und die verschiedenen Features sequentiell mittels "Scannen" ausgelesen. Dieses hat jedoch einen grösseren Zeitaufwand zum Auslesen eines grossen Arrays und einen relativ komplexen optischen Aufbau zur Folge.

Es besteht daher das Bedürfnis nach einer Ausgestaltung der Sensorplattform und nach einer optischen Messanordnung, womit eine ebenso hohe oder sogar noch höhere Empfindlichkeit erzielt werden kann, wie diese mit Sensorplattformen basierend auf Dünnschichtwellenleitern erreicht wurde, und mit der zugleich die Messfläche pro Feature minimiert werden kann.

In einer co-pendenden Anmeldung (PCT/EP 00/04869) wird eine Sensorplattform mit einem Schichtwellenleiter, umfassend eine optisch transparente Schicht (a) auf einer zweiten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und einer in der optisch transparenten Schicht (a) modulierten Gitterstruktur (c) mit darauf erzeugten Messbereichen beschrieben. Dabei kann durch geeignete Wahl der Parameter, insbesondere der Gittertiefe, nach Einkopplung von Anregungslicht zu den Messbereichen und damit verbundener Lumineszenzanregung im Nahfeld der Schicht (a) das in die Schicht (a) rückgekoppelte Lumineszenzlicht über kürzeste Strecken, d.h. wenige hundert Mikrometer vollständig ausgekoppelt und damit an einer weiteren Ausbreitung in der wellenleitenden Schicht (a) gehindert werden.

Durch diese Anordnung ist es möglich, einen hochempfindlichen gleichzeitigen Nachweis einer Vielzahl von Analyten auf sehr engem Raum durchzuführen. Durch Optimierung der Strahlengänge und Ausblenden von Reflexionen oder Streulicht kann die Empfindlichkeit weiter gesteigert werden, jedoch bleiben schliesslich die Untergrundsignale und das damit verbundene Rauschen des Untergrunds limitierend. Dieses ist für diese, ebenso wie für alle vorgenannten Anregungs- und Detektionskonfigurationen, unter anderem dadurch bedingt, dass bei den meisten verwendeten

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

6

Lumineszenzfarbstoffen der spektrale Abstand zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge (Stokes-Shift) relativ gering ist, typischerweise zwischen 20 nm und 50 nm. Zwar sind einige Lumineszenzfarbstoffe bekannt, welche einen grossen Stokes-Shift, bis etwa 300 nm, aufweisen, wie beispielsweise einige Lanthanid-Komplexe. Diese besitzen nachteilig jedoch im allgemeinen eine relativ niedrige Quantenausbeute und / oder Photostabilität.

Ausserdem ist bei den bekannten Anordnungen basierend auf hochbrechenden Dünnschichtwellenleitern, beispielsweise basierend auf wellenleitenden Schichten aus Ta_2O_5 oder TiO_2 , mit herkömmlicher Anregung nachteilig, dass die Ausbreitungsverluste dieser Wellenleiter, wie auch die Eigenfluoreszenz dieser Dünnschichtwellenleiter (beispielsweise durch Spuren von fluoreszenten Verunreinigungen in der Schicht (b)), bei kurzen Anregungswellenlängen drastisch ansteigen. So ist hier kurzwellige Anregung bei etwa 450 nm bis 500 nm limitiert. Es wäre jedoch eine Anordnung wünschenswert, mit der Fluorophore auch bei kürzeren Wellenlängen angeregt werden und ihre Lumineszenzen mit einem möglichst niedrigen oder bestenfalls sogar ohne Untergrund detektiert werden können.

Seit kurzem sind Methoden bekannt geworden, welche eine nahezu hintergrundfreie Lumineszenzdetektion erlauben und auf Multi-Photonen-Anregung, insbesondere 2-Photonen-Anregung beruhen. Eine 2-Photonen-Anregung erfordert jedoch extrem hohe Feldstärken bzw. Intensitäten des Anregungslichts. Diese erreicht man in den beschriebenen Anordnungen mit leistungsstarken Pulslasern extrem kurzer Pulslängen (typischerweise von Femtosekunden). Diese optischen Anordnungen sind jedoch mit sehr hohen Systemkosten verbunden und stellen hohe Anforderungen an die fachliche Qualifikation des Benutzers. Sie sind daher für routinemässige Anwendungen, ausserhalb des Forschungsbereichs, nicht geeignet. Beispielsweise wird in einer sehr frühen Arbeit, in der US 3572941 aus dem Jahre 1967, zur Entwicklung von Anordnungen für 3-dimensionale Bildwiedergabe und -speicherung, beschrieben, dass beispielsweise zur (permanenten) Änderung der optischen Dichte eines Speichermediums, z. B. eines Einkristalles, beispielsweise CaF_2 dotiert mit La,

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

7

Anregungsintensitätsdichten in der Grössenordnung von mindestens 20 MW/cm^2 erforderlich sind. Solche Intensitätsdichten sind beispielsweise mit gepulsten Hochleistungslasern in konfokalen mikroskopischen Anordnungen erreicht und beschrieben worden, wie zum Beispiel in der US 5034613 mit einem Laserfokussdurchmesser von weniger als einem Mikrometer in der Fokusebene des Mikroskops. Die Ausmessung einer ausgedehnten Fläche mittels Scannens erfordert jedoch wiederum neben dem grossen instrumentellen Aufwand nachteilig auch einen hohen Zeitaufwand.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass mit einer optischen Struktur, basierend auf einem Dünnschichtwellenleiter mit einer bei mindestens bei der Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) bei geeigneter Wahl der physikalischen Parameter und unter Einsatz ausreichend hoher Anregungslichtintensitäten die Intensität eines in die Schicht (a) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung zur Lumineszenz anzuregen.

Mit einer bevorzugten Ausführungsform einer erfindungsgemässen optischen Struktur, ausgebildet als ein planarer Dünnschicht-Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer in Schicht (a) modulierten Gitterstruktur (c), konnte überraschend gezeigt werden, dass die Intensität eines unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) eingestrahlten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) sogar längs des gesamten Ausbreitungsweges des Anregungslichts in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um linienhaft und sogar flächenhaft längs dieses Ausbreitungsweges eine 2-Photonen-Anregung auf der Schicht (a) immobilisierter lumineszenzfähiger Moleküle zu ermöglichen. Dabei kann durch 2-

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

8

Photonen-Absorption eine so starke Lumineszenz erzeugt werden, dass sie sogar bei Raumlicht mit bloßem Auge erkennbar ist.

Während bis jetzt eine Multi-Photonen-Anregung nur auf kleinstem Raum, nämlich im Fokus leistungsstarker (im allgemeinen mit hoher Repetitionsrate gepulster) Laser (typischerweise Femtosekunden-Laser) möglich war, ermöglicht die vorliegende Erfindung eine gleichzeitige 2-Photonen-Lumineszenz-Anregung und -Beobachtung in makroskopischen Ausdehnungen, d.h. über Längen von Millimetern bis Zentimetern und auf Flächen von Quadratmillimetern bis Quadratzentimetern. Zugleich können dank der vorliegenden Erfindung die Anforderungen an die Pulsenergien der Anregungslichtquellen während eines einzigen Pulses deutlich gesenkt werden, was bedeutet, dass auch die Verwendung längerpulsiger Laser (z. B. von Pikosekunden- oder sogar Nanosekunden-Lasern anstelle von Femtosekunden-Lasern) oder sogar von kontinuierlich emittierenden (cw) Lasern zur Multi-Photonen-Lumineszenzanregung mit einer erfindungsgemäßen optischen Struktur möglich wird.

Ein wesentlicher Vorteil einer Lumineszenzanregung, insbesondere zum Analytnachweis mithilfe oberflächengebundener Erkennungselemente für den Analyten, mittels Multi-Photonen-Anregung im evaneszenten Feld eines Wellenleiters, im Vergleich zur klassischen Anregung mittels Ein-Photonen-Absorption, ist eine nochmals deutlich verschärfte Selektivität der Anregung mit wachsendem Abstand von der hochbrechenden Wellenleiter-Oberfläche. Während die Stärke des evaneszenten Feldes, und (proportional dazu) damit die Intensität einer in diesem Feld nach klassischer Ein-Photonen-Anregung erzeugten Lumineszenz, exponentiell mit dem Abstand x abfällt, ist die Abnahme bei Lumineszenz nach n -Photonen-Absorption proportional zu $1 / e^{nx}$, für den Fall der 2-Photonen-Anregung also proportional zu $1 / e^{2x}$.

Aufgrund der mit relativ geringem Aufwand erreichbaren sehr hohen, oberflächengebundenen Anregungslichtintensitäten, die aufgrund der sehr hohen Verstärkungsfaktoren selbst für vergleichsweise niedrige eingestrahlte Anregungsintensitäten erreicht werden können, eignen sich erfindungsgemäße optische

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

9

Strukturen für den Einsatz in einer Vielzahl verschiedener technischer Gebiete, auch ausserhalb der Bioanalytik, beispielsweise zur Untersuchung photophysikalischer oder photochemischer Eigenschaften insbesondere neuer Materialien unter dem Einfluss hoher Anregungslichtintensitäten.

Insbesondere können, wie nachfolgend genauer für die verschiedenen Ausführungsformen der Erfindung beschrieben, photoreaktive Moleküle oder Molekülgruppen innerhalb des genannten sehr kleinen Abstands von der wellenleitenden Schicht der Struktur (z-Richtung) mittels Multi-Photonen-Anregung, vorzugsweise 2-Photonen-Anregung, zu chemischen Reaktionen angeregt werden. Diese können in der Ausbildung chemischer Bindungen zu benachbarten Molekülen bestehen, beispielsweise mit dem Ergebnis einer Photopolymerisation, mit welcher auf einfache Weise räumliche Strukturen mit Abmessungen von molekularer Grösse in z-Richtung erzeugt werden, oder in dem oberflächennahen, selektiven Aufbrechen molekularer Bindungen auf einer makroskopischen Grundfläche, woraus sich beispielsweise neue vereinfachte Methoden für die Massenspektrometrie, insbesondere MALDI/TOF-MS (matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry) sowie für molekulare Trennungen, als eine neue, optische Chromatographie-Methode, ergeben.

Erster Gegenstand der Erfindung ist eine optische Struktur, umfassend einen optischen Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die Schicht (a) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle oder molekulare Gruppen mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

Vorzugsweise handelt es sich bei besagtem optischem Wellenleiter um einen optischen Dünnschichtwellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

10

Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a).

Eine Gruppe von Ausführungsformen der erfindungsgemässen optischen-Struktur ist dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) durch Multi-Photonen-Anregung angeregten Molekülen um photoreaktive, d.h. nach Lichtanregung chemisch reaktive Moleküle oder molekulare Gruppen handelt. Diese photoreaktiven Moleküle können beispielsweise sogenannte Photo-Initiatoren sein, welche bei Einstrahlung eines geeigneten, typischerweise kurzwelligen Anregungslichts (z.B. UV-Licht) eine Photopolymerisation auslösen. Diese besondere Ausführungsform ist also dadurch gekennzeichnet, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine Photopolymerisation ausgelöst wird. Gegenüber dem Stand der Technik ergeben sich daraus zweierlei Vorteile. Zum einen kann, unter Einstrahlung verhältnismässig geringer Anregungsintensitäten in Oberflächennähe (definiert durch den Abstand z von der wellenleitenden Schicht (a) der Struktur, innerhalb dessen für die betreffende Verbindung eine 2-Photonen-Anregung möglich ist) effizient eine Polymerisation angeregt werden. Andererseits können, gegeben durch den Abstand z, auf einfache Weise äusserst flache (d.h. von molekularer Grösse) räumliche Strukturen erzeugt werden. Die linien- oder flächenhafte Ausdehnung, parallel zur Oberfläche der optischen Struktur, wird dabei begrenzt durch die Ausbreitungslänge des eingestrahnten Anregungslichts innerhalb der wellenleitenden Schicht (a). Sofern der Prozess der Photopolymerisation auf einer in der Schicht (a) modulierten Gitterstruktur, zur gleichzeitigen Ein- und Auskopplung des Anregungslichts (siehe ausführlichere Beschreibung weiter unten) stattfindet, können auch Polymerstrukturen sehr kleiner lateraler Ausdehnungen (in der Grössenordnung von Mikrometern) erzeugt oder „geschrieben“ werden (durch laterale Bewegung der optischen Struktur bezüglich des eingestrahnten Anregungslichts).

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

11

Kennzeichen einer anderen Ausführungsform einer erfindungsgemässen optischen Struktur ist, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine Photodissoziation, d.h. Aufspaltung eines bis zu der Multi-Photonen-Anregung bestehenden Moleküls oder molekularen Komplexes auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zu der Schicht (a) ausgelöst wird.

Eine besondere Variante besteht dabei darin, dass besagte photoreaktive Moleküle Bestandteil einer Molekülmatrix zur Einbettung von Molekülen höheren Molekulargewichts, insbesondere von natürlichen und künstlichen Polymeren bzw. von biologischen Molekülen wie Proteinen, Polypeptiden und Nukleinsäuren, sind. Besonders bevorzugt ist dabei eine solche Ausführungsform, welche darin besteht, dass es sich bei der optischen Struktur um einen Probenträger für die Massenspektrometrie, vorzugsweise für MALDI/TOF-MS (matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry) handelt.

Eine andere bevorzugte Ausführungsform ist eine optische Struktur, umfassend einen optischen Dünnschicht-Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die Schicht (a) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung zur Lumineszenz anzuregen.

Die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) kann über ein oder mehrere optische Einkoppelemente aus der Gruppe erfolgen, die von Prismenkopplern, evaneszenten Kopplern mit zusammengebrachten optischen Wellenleitern mit überlappenden evaneszenten Feldern, Stirnflächenkopplern mit vor einer Stirnseite der

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

12

wellenleitenden Schicht angeordneten fokussierenden Linsen, vorzugsweise Zylinderlinsen, und Gitterkopplern gebildet wird.

Es wird bevorzugt, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) erfolgt.

Ausserdem wird bevorzugt, dass es sich bei der optischen Struktur um eine planare Dünnschicht-Wellenleiter-Struktur handelt.

Besonders bevorzugt wird eine Ausführungsform der erfindungsgemässen optischen Struktur, umfassend einen planaren Dünnschicht-Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer in Schicht (a) modulierten Gitterstruktur (c), welche dadurch gekennzeichnet ist, dass die Intensität eines unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) eingestrahltten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) zumindest im Bereich der Gitterstruktur (c) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

Bevorzugt handelt es sich bei der Multi-Photonen-Anregung um eine 2-Photonen-Anregung.

Mithilfe einer erfindungsgemässen optischen Struktur wird es ermöglicht, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle linienhaft, das heisst gleichzeitig längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts, mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

Besonders vorteilhaft sind solche Ausführungsformen, welche linienhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

13

weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen längs einer Distanz von mindestens 5 nm, gerechnet vom Ort der Einkopplung des Anregungslichts in die Schicht (a), ermöglichen.

Von besonderem Vorteil ist dabei auch, wenn, unter Einstrahlung eines aufgeweiteten Anregungslichts, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle gleichzeitig längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts mittels Multi-Photonen-Anregung angeregt werden können. Im Falle der Lichteinkopplung über ein Gitter (c) in die Schicht (a) ist dabei das Anregungslichtbündel vorzugsweise parallel zu den Gitterlinien aufgeweitet.

Es wird bevorzugt, dass eine erfindungsgemäße optische Struktur gleichzeitige flächenhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen auf einer Fläche von mindestens 1 mm^2 , stärker bevorzugt auf einer Fläche von mindestens 10 mm^2 , noch stärker bevorzugt auf einer Fläche von mindestens 1 cm^2 ermöglicht.

Die sehr grosse oberflächengebundene bzw. oberflächennahe Anregungsintensität, insbesondere zur Ermöglichung einer Multi-Photonen-Anregung, ist für eine Vielzahl verschiedener Anwendungen nützlich, insbesondere in der Biosensorik, wie später genauer ausgeführt, aber auch in der Nachrichten- und (Tele-)Kommunikationstechnik.

Weiterhin wird bevorzugt, dass die Struktur gleichförmige, unmodulierte Bereiche der Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind. Insbesondere kann die Struktur so gestaltet sein, dass sie eine Vielzahl von Gitterstrukturen (c) gleicher oder unterschiedlicher Periode mit optional daran anschliessenden gleichförmigen, unmodulierten Bereichen der Schicht (a) auf einem gemeinsamen, durchgehenden Substrat umfasst. Dadurch ist es, im Falle der Lumineszenzanregung durch Multi-Photonen-Anregung, auch möglich, dass eine auf oder im Nahfeld der Schicht (a) durch Multi-Photonen-Absorption erzeugte Lumineszenz

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

14

mindestens teilweise in die Schicht (a) einkoppelt und durch Leitung in der Schicht (a) zu benachbarten Bereichen auf besagter optischer Struktur geführt wird.

Für bestimmte Anwendungen ist es wünschenswert, gleichzeitig oder sequentiell Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlänge für dieselbe optische Struktur zu verwenden. Dann kann es von Vorteil sein, wenn diese eine Überlagerung von 2 oder mehreren Gitterstrukturen unterschiedlicher Periodizität mit zueinander paralleler oder nicht paralleler, vorzugsweise nicht paralleler Ausrichtung der Gitterlinien umfasst, welche der Einkopplung von Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlänge dient, wobei im Falle von 2 überlagerten Gitterstrukturen deren Gitterlinien vorzugsweise senkrecht zueinander ausgerichtet sind.

Die Höhe der Ausbreitungsverluste eines in einer optisch wellenleitenden Schicht (a) geführten Modes wird in hohem Masse von der Oberflächenrauigkeit einer darunter liegenden Trägerschicht sowie von Absorption durch möglicherweise in dieser Trägerschicht vorhandene Chromophoren bestimmt, was zusätzlich das Risiko der Anregung von für viele Anwendungen unerwünschter Lumineszenz in dieser Trägerschicht, durch Eindringen des evaneszenten Feldes des in der Schicht (a) geführten Modes, in sich birgt. Weiterhin kann es zum Auftreten thermischer Spannungen infolge unterschiedlicher thermischer Ausdehnungskoeffizienten der optisch transparenten Schichten (a) und (b) kommen. Im Falle einer chemisch empfindlichen optisch transparenten Schicht (b), sofern sie beispielsweise aus einem transparenten thermoplastischen Kunststoff besteht, ist es wünschenswert, ein Eindringen von Lösungsmitteln, welche die Schicht (b) angreifen könnten, durch eventuell in der optisch transparenten Schicht (a) vorhandene Mikroporen zu verhindern.

Im Falle eines aus mehreren Schichten ((a) und (b)) bestehenden Wellenleiters ist es daher von Vorteil, wenn sich zwischen den optisch transparenten Schichten (a) und (b) und in Kontakt mit Schicht (a) eine weitere optisch transparente Schicht (b') mit niedrigerem Brechungsindex als dem der Schicht (a) und einer Stärke von 5 nm - 10 000 nm, vorzugsweise von 10 nm - 1000 nm, befindet. Durch die Einführung dieser

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

15

Zwischenschicht können eine Vielzahl von Aufgaben erfüllt werden: Verringerung der Oberflächenrauhigkeit unter der Schicht (a), Verminderung des Eindringens des evaneszenten Feldes von in Schicht (a) geführtem Licht in die eine oder mehrere darunter liegende Schichten, Verbesserung der Haftung der Schicht (a) auf der einen oder mehreren darunter liegenden Schichten, Verminderung von thermisch hervorgerufenen Spannungen innerhalb der Wellenleiter-Struktur, chemische Isolation der optisch transparenten Schicht (a) von darunter liegenden Schichten mittels Abdichten von Mikroporen in der Schicht (a) gegen darunter liegende Schichten.

Die Gitterstruktur (c) einer erfindungsgemässen optischen Struktur kann ein diffraktives Gitter mit einer einheitlichen Periode oder ein multidiffraktives Gitter sein. Es ist auch möglich, dass die Gitterstruktur (c) eine senkrecht oder parallel zur Ausbreitungsrichtung des in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelten Anregungslichts räumlich variierende Periodizität aufweist.

Es gibt zahlreiche unterschiedliche Materialien, welche für die optisch transparente Schicht (a) geeignet sind. Wesentlichste Voraussetzungen sind weitestmögliche Absorptions- und Lumineszenzfreiheit zumindest bei der Wellenlänge des eingestrahlten Anregungslichts und die Fähigkeit zur Lichtleitung zumindest über Distanzen in der Grössenordnung von Millimetern bis Zentimetern.

Für bestimmte Ausführungsformen einer erfindungsgemässen optischen Struktur wird bevorzugt, dass das Material der optisch transparenten Schicht (a) aus Glas, Quarz oder einem transparenten Kunststoff besteht, beispielsweise aus der Gruppe, welche Polycarbonat, Polyamid, Polyimid, Polymethylmethacrylat, Polypropylen, Polystyrol, Polyethylen, Polyacrylsäure, Polyacrylester, Polythioester, Polyphenylensulfid Polyethylenterephthalat (PET) und Polyurethan sowie deren Derivate umfasst.

Die optisch transparente Schicht (a) kann auch ein Material aus der Gruppe von TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 , oder ZrO_2 , besonders bevorzugt aus TiO_2 oder Nb_2O_5 oder Ta_2O_5 , umfassen.

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

16

Es wird weiterhin bevorzugt, dass der Brechungsindex der optisch transparenten Schicht (a) grösser als 1.8 ist

Die optisch transparente Schicht (a) kann in einer Vielzahl verschiedener „äusserer“ Ausführungsformen vorliegen. Es kann sich hierbei um einen faserförmigen oder einen planaren Wellenleiter handeln. Auch andere technisch herstellbare Geometrien sind möglich.

Die optisch transparente Schicht (a) kann selbsttragend sein, beispielsweise mit einer Dicke (oder Durchmesser im Falle faserförmiger Wellenleiter) in der Grössenordnung von Mikrometern bis Millimetern. Die Schicht (a) kann auch Bestandteil eines Mehrschichtsystems sein, mit an die Schicht (a) angrenzenden Schichten niedrigeren Brechungsindex als Schicht (a), wobei wiederum beispielsweise sowohl faserförmige als auch planare Ausführungsformen möglich sind.

Von besonderem Vorteil insbesondere ist es, wenn die optisch transparente Schicht (a) ein niedermodaler Wellenleiter ist, d.h. weniger als die ersten 10 Moden einer vorgegebenen Polarisation einer eingestrahlten Anregungswellenlänge führen kann.

Besonders bevorzugt wird, wenn die optisch transparente Schicht (a) ein niedermodaler Wellenleiter ist, welcher nur 1 - 3 Moden einer vorgegebenen Polarisation einer eingestrahlten Anregungswellenlänge führen kann.

Wie bereits vorangehend ausgeführt, werden besonders Ausführungsformen einer erfindungsgemässen optischen Struktur als (planarer) optischer Dünnschichtwellenleiter bevorzugt.

Dann wird bevorzugt, dass das Material der optisch transparenten Schicht (b) der erfindungsgemässen optischen Struktur aus Glas, Quarz oder einem transparenten thermoplastischen oder spritzbaren Kunststoff, beispielsweise aus der Gruppe besteht, die

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

17

von Polycarbonat, Polyimid, Polymethylmethacrylat, Polypropylen, Polystyrol, Polyethylen, Polyethylenterephthalat (PET) oder Polyurethan gebildet wird.

Neben dem Brechungsindex der wellenleitenden optisch transparenten Schicht (a) ist deren Dicke der zweite massgebliche Parameter zur Erzeugung eines möglichst starken evaneszenten Feldes an deren Grenzflächen zu benachbarten Schichten mit niedrigerem Brechungsindex sowie einer möglichst hohen Energiedichte innerhalb der Schicht (a). Dabei nimmt die Stärke des evaneszenten Feldes mit abnehmender Dicke der wellenleitenden Schicht (a) zu, solange die Schichtdicke ausreicht, um mindestens einen Mode der Anregungswellenlänge zu führen. Dabei ist die minimale "Cut-off"-Schichtdicke zur Führung eines Modes abhängig von der Wellenlänge dieses Modes. Sie ist für längerwelliges Licht grösser als für kurzwelliges Licht. Mit Annäherung an die "Cut-off"-Schichtdicke nehmen allerdings auch ungewünschte Ausbreitungsverluste, (insbesondere durch Streuung an Streuzentren) stark zu, was die Auswahl der bevorzugten Schichtdicke zusätzlich nach unten begrenzt. Diese Ausbreitungsverluste sind für längerwelliges Licht allerdings im allgemeinen geringer als für kurzwelliges Licht. Bevorzugt sind solche Schichtdicken der optisch transparenten Schicht (a), welche nur die Führung von 1 bis 3 Moden einer vorgegebenen Anregungswellenlänge ermöglichen, ganz besonders bevorzugt sind Schichtdicken, welche zu monomodalen Wellenleitern für diese Anregungswellenlänge führen. Dabei ist klar, dass sich der diskrete Modencharakter des geführten Lichts nur auf die transversalen Moden bezieht.

Diese Anforderungen führen dazu, dass vorteilhaft das Produkt aus der Dicke der Schicht (a) und ihrem Brechungsindex ein Zehntel bis ein Ganzes, bevorzugt ein Zehntel bis zwei Drittel, der Anregungswellenlänge eines in die Schicht (a) einzukoppelnden Anregungslichts beträgt.

Bei vorgegebenen Brechungsindices der wellenleitenden, optisch transparenten Schicht (a) und der benachbarten Schichten ist der Resonanzwinkel für die Einkopplung des Anregungslichts entsprechend der oben genannten Resonanzbedingung abhängig von der einzukoppelnden Beugungsordnung, der Anregungswellenlänge sowie der Gitterperiode.

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

18

Zum Erreichen einer hohen Einkoppeleffizienz ist die Einkopplung der ersten Beugungsordnung vorteilhaft. Neben der Höhe der Beugungsordnung ist für die Höhe der Einkoppeleffizienz die Gittertiefe massgebend. Prinzipiell vergrössert sich die Koppeleffizienz mit steigender Gittertiefe. Da der Prozess der Auskopplung völlig reziprok zur Einkopplung erfolgt, erhöht sich jedoch zugleich auch die Auskoppeleffizienz, so dass es beispielsweise zur Anregung von Lumineszenz in einem auf der Gitterstruktur (c) angeordneten oder an diese angrenzenden Messbereich (d) (gemäss nachfolgender Definition), in Abhängigkeit von der Geometrie der Messbereiche und der eingestrahnten Anregungslichtbündel, ein Optimum gibt. Aufgrund dieser Randbedingungen ist es von Vorteil, wenn das Gitter (c) eine Periode von 200 nm – 1000 nm aufweist und die Modulationstiefe des Gitters (c) 3 bis 100 nm, bevorzugt 10 bis 30-nm beträgt.

Weiterhin wird bevorzugt, dass das Verhältnis von Modulationstiefe zur Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) gleich oder kleiner als 0,2 ist.

Dabei kann die Gitterstruktur (c) ein Reliefgitter mit Rechteck-, Dreieck- oder halbkreisförmigem Profil oder ein Phasen- oder Volumengitter mit einer periodischen Modulation des Brechungsindex in der im wesentlichen planaren optisch transparenten Schicht (a) sein.

Weiterhin kann es von Vorteil sein, wenn auf der optischen Struktur optisch oder mechanisch erkennbare Markierungen zur Erleichterung der Justierung in einem optischen System und / oder zur Verbindung mit Probenbehältnissen als Teil eines analytischen Systems aufgebracht sind.

Die erfindungsgemässe optische Struktur eignet sich insbesondere für den Einsatz in der biochemischen Analytik, zum hochempfindlichen Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer oder mehreren zugeführten Proben. Dazu werden biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungskennungselemente zur Erkennung und Bindung nachzuweisender Analyten auf der optischen Struktur immobilisiert. Dieses

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

19

kann grossflächig, eventuell über der gesamten Struktur, oder in diskreten sogenannten Messbereichen geschehen.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung sollen räumlich getrennte Messbereiche (d) durch die Fläche definiert werden, die dort immobilisierte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselementen zur Erkennung eines oder mehrerer Analyten aus einer flüssigen Probe einnehmen. Diese Flächen können dabei eine beliebige Geometrie, beispielsweise die Form von Punkten, Kreisen, Rechtecken, Dreiecken, Ellipsen oder Linien, haben. Es ist möglich, dass in einer 2-dimensionalen Anordnung bis zu 1 000 000 Messbereiche auf einer erfindungsgemässen optischen Struktur angeordnet sind, wobei ein einzelner Messbereich beispielsweise eine Fläche von $0.001 \text{ mm}^2 - 6 \text{ mm}^2$ einnehmen kann. Innerhalb eines einzelnen Messbereichs können gleichartige Erkennungselemente für Erkennung und Bindung bzw. Nachweis eines einzelnen Analyten auf diesem Messbereich, oder auch unterschiedliche Erkennungselemente, zur Erkennung verschiedener Analyten, immobilisiert sein. Es können als Erkennungselemente auch solche Verbindungen verwendet werden, welche mehrere (d.h. zwei oder mehr) unterschiedliche Bereiche oder Abschnitte aufweisen, an welche unterschiedliche Analyten binden können.

Beispielsweise im Falle eines planaren optischen Dünnschichtwellenleiters mit einer oder mehreren Gitterstrukturen (c) zur Einkopplung von Anregungslicht als Wellenleiter-Struktur können die Messbereiche auf einer solchen Gitterstruktur oder auf einem gleichförmigen, unmodulierten Bereich, in Ausbreitungsrichtung des geführten Anregungslichts nachfolgend auf eine solche Gitterstruktur, angeordnet sein.

Um gleichzeitig mehrere Analyten in einer Probe nachzuweisen, kann es von Vorteil sein, zwei oder mehrere räumlich getrennte Messbereiche jeweils zu Segmenten auf der optischen Struktur zusammenzufassen. Verschiedene Segmente können durch Gitterstrukturen (c) oder durch andere auf der optischen Struktur erzeugte Unterteilungen, beispielsweise absorbierende Streifen eines aufgetragenen Pigments oder die Zwischenwände von Strukturen zur Erzeugung von Probenbehältnissen mit der

wellenleitenden Schicht (a) der optischen Struktur als Grundfläche, insbesondere optisch voneinander getrennt sein, wenn ein Übersprechen von in benachbarten Segmenten erzeugtem und in die Schicht (a) rückgekoppeltem Lumineszenzlicht verhindert werden soll. Zusätzlich können verschiedene Segmente durch eine aufgebrachte Berandung, welche zur fluidischen Abdichtung gegen Nachbarbereiche und / oder zu einer weiteren Verminderung optischen Übersprechens zwischen benachbarten Segmenten beiträgt, gegeneinander abgegrenzt werden.

Es gibt eine Vielzahl von Methoden zur Aufbringung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente auf die optisch transparente Schicht (a). Beispielsweise kann dieses durch physikalische Adsorption bzw. durch elektrostatische Wechselwirkung erfolgen. Die Orientierung der Erkennungselemente ist dann im allgemeinen statistisch. Ausserdem besteht die Gefahr, dass bei unterschiedlicher Zusammensetzung der den Analyten enthaltenden Probe oder der im Nachweisverfahren eingesetzten Reagentien ein Teil der immobilisierten Erkennungselemente fortgespült wird. Daher kann es von Vorteil sein, wenn zur Immobilisierung biologischer oder biochemischer oder synthetischer Erkennungselemente (e) auf der optisch transparenten Schicht (a) eine Haftvermittlungsschicht (f) aufgebracht ist. Diese Haftvermittlungsschicht sollte ebenfalls optisch transparent sein. Insbesondere sollte die Haftvermittlungsschicht nicht über die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes aus der wellenleitenden Schicht (a) in das darüber liegende Medium hinausragen. Daher sollte die Haftvermittlungsschicht (f) eine Stärke von weniger als 200 nm, vorzugsweise von weniger als 20 nm, haben. Sie kann beispielsweise chemische Verbindungen aus der Gruppe Silane, Epoxide, funktionalisierte, geladene oder polare Polymere und "selbstorganisierte funktionalisierte Monoschichten" umfassen.

Wie in der Definition der Messbereiche festgestellt, ist es möglich, durch räumlich selektive Aufbringung von biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf der optischen Struktur räumlich getrennte Messbereiche (d) zu erzeugen. Im Kontakt mit einem lumineszenzfähigen Analyten oder eines mit dem Analyten um die Bindung an die immobilisierten Erkennungselemente konkurrierenden

lumineszenzmarkierten Analogen des Analyten oder eines weiteren lumineszenzmarkierten Bindungspartners in einem mehrstufigen Assay werden diese lumineszenzfähigen Moleküle nur selektiv in den Messbereichen an die Oberfläche der optischen Struktur binden, welche durch die Flächen definiert werden, die von den immobilisierten Erkennungselementen eingenommen werden.

Zur Aufbringung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen können eines oder mehrere Verfahren verwendet werden aus der Gruppe von Verfahren, die von "Ink jet spotting, mechanischem Spotting, micro contact printing, fluidische Kontaktierung der Messbereiche mit den biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen durch deren Zufuhr in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen", gebildet werden.

Als biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselementen können beispielsweise, ohne Einschränkung der Allgemeinheit, Komponenten aus der Gruppe aufgebracht werden, die von Nucleinsäuren (beispielsweise DNA, RNA, Oligonucleotiden), Nucleinsäureanalogen (z. B. PNA), Antikörpern und Antikörperfragmenten, Aptameren, Peptiden und Polypeptiden, membran-gebundenen und isolierten Rezeptoren, deren Liganden, Antigenen für Antikörper, "Histidin-Tag-Komponenten", durch chemische Synthese erzeugten Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, natürlichen und künstlichen Polymeren, etc. gebildet wird. Unter der letztgenannten Art von Erkennungselementen sind Kavitäten zu verstehen, die in einem Verfahren hergestellt werden, welches als "molecular imprinting" in der Literatur beschrieben wurde. Dazu wird, meistens in organischer Lösung, der Analyt oder ein Analogon des Analyten, in einer Polymerenstruktur eingekapselt. Man bezeichnet ihn dann als "Imprint". Dann wird der Analyt oder sein Analogon unter Zugabe geeigneter Reagentien aus der Polymerenstruktur wieder herausgelöst, so dass er dort eine leere Kavität zurücklässt. Diese leere Kavität kann dann als eine Bindungsstelle mit hoher sterischer Selektivität in einem späteren Nachweisverfahren eingesetzt werden.

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

22

Selbstverständlich eignet sich auch jede andere Verbindung als Erkennungselement, welche entsprechend der gewünschten und für die jeweilige Anwendung erforderlichen Selektivität einen nachzuweisenden Analyten erkennt und mit ihm wechselwirkt.

Es ist auch möglich, dass als biochemische oder biologische Erkennungselemente ganze Zellen oder Zellfragmente oder zelluläre Substrukturen aufgebracht werden.

Besagte Erkennungselemente können direkt auf der optischen Struktur oder vermittelt über eine Haftvermittlungsschicht, wie vorangehend beschrieben, auf der optischen Struktur aufgebracht werden.

Ausserdem ist die Funktion von „Erkennungselement“ und „Analyt“ auch in der Weise austauschbar, dass, gegebenenfalls nach einer entsprechenden chemischen Vorbehandlung, die in einer auf ihre Bestandteile zu untersuchenden Verbindungen in einer Probe auf einer erfindungsgemässen optischen Struktur immobilisiert werden und in einem nachfolgenden Schritt die entsprechenden biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente damit in Kontakt gebracht werden. Diskrete Messbereiche können dabei beispielsweise nach Aufteilung einer Probe in einzelne Aliquots durch deren anschliessende Aufbringung in diskreten Flächen auf der optischen Struktur erzeugt werden. In diesem Falle wäre typischerweise in jedem Messbereich eine Mischung verschiedener Verbindungen immobilisiert.

In vielen Fällen wird die Nachweisgrenze eines analytischen Verfahrens limitiert durch Signale sogenannter unspezifischer Bindung, d. h. durch Signale, welche durch Bindung des Analyten oder anderer zum Nachweis des Analyten eingesetzter Verbindungen erzeugt werden, welche nicht nur im Bereich der eingesetzten immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente, sondern auch in davon unbedeckten Bereichen einer optischen Struktur gebunden werden, beispielsweise durch hydrophobe Adsorption oder durch elektrostatische Wechselwirkungen. Daher ist es von Vorteil, wenn zwischen den räumlich getrennten Messbereichen (d) gegenüber dem Analyten „chemisch neutrale“ Verbindungen zur

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

23

Verminderung unspezifischer Bindung oder Adsorption aufgebracht sind. Als "chemisch neutrale" Verbindungen werden dabei solche Stoffe bezeichnet, welche selbst keine spezifischen Bindungsstellen zur Erkennung und Bindung des Analyten oder eines Analogens des Analyten oder eines weiteren Bindungspartners in einem mehrstufigen Assay aufweisen und durch ihre Anwesenheit den Zugang des Analyten oder seines Analogens oder der weiteren Bindungspartner zur Oberfläche der optischen Struktur blockieren.

Als "chemisch neutrale" Verbindungen können beispielsweise Stoffe aus den Gruppen eingesetzt werden, die von Albuminen, insbesondere Rinderserumalbumin oder Humanserumalbumin, nicht mit zu analysierenden Polynukleotiden hybridisierender, fragmentierter natürlicher oder synthetischer DNA, wie beispielsweise von Herings- oder Lachsperma, oder auch ungeladenen, aber hydrophilen Polymeren, wie beispielsweise Polyethylenglycole oder Dextrane, gebildet werden.

Insbesondere die Auswahl der genannten Stoffe zur Verminderung unspezifischer Hybridisierung in Polynukleotid-Hybridisierungsassays (wie Herings- oder Lachsperma) wird dabei durch die empirische Bevorzugung von für die zu analysierenden Polynukleotide möglichst weitgehend verschiedener DNA bestimmt, über die keine Wechselwirkungen mit den nachzuweisenden Polynukleotidsequenzen bekannt ist.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein optisches System zur Multi-Photonen-Anregung, umfassend mindestens eine Anregungslichtquelle und eine erfindungsgemäße optische Struktur, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

Eine Gruppe von Ausführungsformen eines erfindungsgemäßen optischen Systems ist dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in

einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) der optischen Struktur durch Multi-Photonen-Anregung angeregten Moleküle um photoreaktive, d.h. nach Lichtanregung chemisch reaktive Moleküle oder molekulare Gruppen handelt. Dabei besteht eine Variante darin, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine Photopolymerisation ausgelöst wird. Als photoreaktive Moleküle eignen sich hierfür beispielsweise Verbindungen mit photolabilen Schutzgruppen.

Kennzeichen einer anderen Variante ist, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine Photodissoziation, d.h. Aufspaltung eines bis zu der Multi-Photonen-Anregung bestehenden Moleküls oder molekularen Komplexes auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zu der Schicht (a) ausgelöst wird. Hierbei können besagte photoreaktive Moleküle oder Molekülgruppen beispielsweise sogenannte photolabile Crosslinker sein.

Eine besondere Variante besteht dabei darin, dass besagte photoreaktive Moleküle Bestandteil einer Molekülmatrix zur Einbettung von Molekülen höheren Molekulargewichts, insbesondere von natürlichen und künstlichen Polymeren bzw. von biologischen Molekülen wie Proteinen, Polypeptiden und Nukleinsäuren, sind. Besonders bevorzugt ist dabei eine solche Ausführungsform, welche darin besteht, dass es sich bei der optischen Struktur um einen Probenträger für die Massenspektrometrie, vorzugsweise für MALDI/TOF-MS (matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry) handelt.

Bevorzugt ist ein optisches System zur Multi-Photonen-Anregung, umfassend mindestens eine Anregungslichtquelle und eine erfindungsgemäße optische Struktur, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a)

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

25

oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung zur Lumineszenz anzuregen.

Das erfindungsgemäße optische System ist typischerweise so gestaltet, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über ein oder mehrere optische Einkoppelemente aus der Gruppe erfolgt, die von Prismenkopplern, evaneszenten Kopplern mit zusammengebrachten optischen Wellenleitern mit überlappenden evaneszenten Feldern, Stimflächenkopplern mit vor einer Stirnseite der wellenleitenden Schicht angeordneten fokussierenden Linsen, vorzugsweise Zylinderlinsen, und Gitterkopplern gebildet wird.

Es wird bevorzugt, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) erfolgt.

Ausserdem wird bevorzugt, dass es sich bei der optischen Struktur um eine planare Dünnschicht-Wellenleiter-Struktur handelt.

Besonders bevorzugt wird eine solche Ausführungsform eines erfindungsgemässen optischen Systems, umfassend mindestens eine Anregungslichtquelle und eine optische Struktur nach einer der vorgenannten Ausführungsformen, welche dadurch gekennzeichnet ist, dass die Intensität eines unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) auf eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) der optischen Struktur eingestrahlt Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) zumindest im Bereich der Gitterstruktur (c) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

Bevorzugt handelt es sich bei der Multi-Photonen-Anregung um eine 2-Photonen-Anregung.

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

26

Bevorzugt werden solche Ausführungsformen, welche es ermöglichen, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle linienhaft, das heisst gleichzeitig längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts, mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

Besonders vorteilhaft sind dabei solche Ausführungsformen, welche linienhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen längs einer Distanz von mindestens 5 nm, gerechnet vom Ort der Einkopplung des Anregungslichts in die Schicht (a), ermöglichen.

Ausserdem wird bevorzugt, dass, unter Einstrahlung eines aufgeweiteten Anregungslichts, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle gleichzeitig flächenhaft längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts mittels Multi-Photonen-Anregung angeregt werden können. Sofern die Lichteinkopplung in die Schicht (a) über eine darin modulierte Gitterstruktur (c) erfolgt, ist dabei das Anregungslichtbündel vorteilhaft parallel zu den Gitterlinien aufgeweitet.

Von besonderem Vorteil sind auch solche Ausführungsformen eines erfindungsgemässen optischen Systems, mit denen gleichzeitige flächenhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen auf einer Fläche von mindestens 1 mm², stärker bevorzugt auf einer Fläche von mindestens 10 mm², noch stärker bevorzugt auf einer Fläche von mindestens 1 cm² möglich ist.

Ebenfalls bevorzugte Ausführungsformen eines erfindungsgemässen optischen Systems sind dadurch gekennzeichnet, dass die optische Struktur, als Teil dieses Systems, gleichförmige, unmodulierte Bereiche der Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind. Wiederum ist auch für viele

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

27

Anwendungen vorteilhaft, wenn die optische Struktur eine Vielzahl von Gitterstrukturen (c) gleicher oder unterschiedlicher Periode mit optional daran anschliessenden gleichförmigen, unmodulierten Bereichen der Schicht (a) auf einem gemeinsamen, durchgehenden Substrat umfasst.

Ein wesentliches Kennzeichen zahlreicher Ausführungsformen eines erfindungsgemässen optischen Systems zur Lumineszenzanregung ist auch, dass eine auf oder im Nahfeld der Schicht (a) der optischen Struktur durch Multi-Photonen-Absorption erzeugte Lumineszenz mindestens teilweise in die Schicht (a) einkoppelt und durch Leitung in der Schicht (a) zu benachbarten Bereichen auf besagter optischer Struktur geführt wird.

Typischerweise umfasst ein erfindungsgemässes optisches System zusätzlich mindestens einen Detektor zur Erfassung einer oder mehrerer Lumineszenzen von der optischen Struktur.

Für die Geometrie der Strahlführung des Anregungslichts bis zum Auftreffen auf der erfindungsgemässen optischen Struktur gibt es eine Vielzahl möglicher verschiedener Ausführungsformen. Eine der bevorzugten Ausführungen ist dadurch gekennzeichnet, dass das von der mindestens einen Anregungslichtquelle ausgesandte Anregungslicht im wesentlichen parallel ist und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von mindestens einer Lichtquelle mit einer Aufweitungsoptik zu einem im wesentlichen parallelen Strahlenbündel aufgeweitet wird und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf eine grossflächige in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird.

Eine andere bevorzugte Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von der mindestens einen Lichtquelle durch ein oder, im Falle mehrerer

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

28

Lichtquellen, gegebenenfalls mehrere diffraktive optische Elemente, vorzugsweise Dammann-Gitter, oder refraktive optische Elemente, vorzugsweise Mikrolinsen-Arrays, in eine Vielzahl von Einzelstrahlen möglichst gleicher Intensität der von einer gemeinsamen Lichtquelle stammenden Teilstrahlen zerlegt wird, welche jeweils im wesentlichen parallel zueinander auf Gitterstrukturen (c) unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) eingestrahlt werden.

Für bestimmte Anwendungen wird bevorzugt, dass als Anregungslichtquellen zwei oder mehrere Lichtquellen mit gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden.

Für solche Anwendungen, in denen zwei oder mehr unterschiedliche Anregungswellenlängen eingesetzt werden sollen, wird eine solche Ausführungsform des optischen System bevorzugt, welche dadurch gekennzeichnet ist, dass das Anregungslicht von 2 oder mehr Lichtquellen gleichzeitig oder sequentiell aus verschiedenen Richtungen auf eine Gitterstruktur (c) eingestrahlt und über diese in die Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelt wird, welche eine Überlagerung von Gitterstrukturen mit unterschiedlicher Periodizität umfasst.

Es wird bevorzugt, dass zur Detektion mindestens ein ortsauflösender Detektor verwendet wird, beispielsweise aus der Gruppe, die von CCD-Kameras, CCD-Chips, Photodioden-Arrays, Avalanche-Dioden-Arrays, Multichannelplates und Vielkanal-Photomultipliern gebildet wird.

Gemäss dieser Erfindung umfasst das optische System solche Ausführungsformen, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass zwischen der einen oder mehreren Anregungslichtquellen und der erfindungsgemässen optischen Struktur und /oder zwischen besagter optischer Struktur und dem einen oder mehreren Detektoren optische Komponenten aus der Gruppe verwendet werden, die von Linsen oder Linsensystemen zur Formgestaltung der übertragenen Lichtbündel, planaren oder gekrümmten Spiegeln zur Umlenkung und gegebenenfalls zusätzlich zur Formgestaltung von Lichtbündeln,

Prismen zur Umlenkung und gegebenenfalls zur spektralen Aufteilung von Lichtbündeln, dichroischen Spiegeln zur spektral selektiven Umlenkung von Teilen von Lichtbündeln, Neutralfiltern zur Regelung der übertragenen Lichtintensität, optischen Filtern oder Monochromatoren zur spektral selektiven Übertragung von Teilen von Lichtbündeln oder polarisationsselektiven Elementen zur Auswahl diskreter Polarisationsrichtungen des Anregungs- und / oder Lumineszenzlichts gebildet werden.

Es ist möglich, dass die Einstrahlung des Anregungslichts in Pulsen mit einer Dauer zwischen 1 fsec und 10 Minuten erfolgt und gegebenenfalls das Emissionslicht aus den Messbereichen zeitlich aufgelöst gemessen wird. Dabei kann, unter Einsatz von Detektoren geeigneter zeitlicher Auflösung, die Messung des Emissionslichts aus den Messbereichen korreliert mit der gepulsten Einstrahlung des Anregungslichts erfolgen. Während in den bekannten Anordnungen zur 2-Photonen-Fluoreszenzanregung im typischerweise beugungsbegrenzten Fokaldurchmesser des Anregungs-Lasers in hoher Pulsfolge betriebene Femtosekunden-Puls-Laser Verwendung fanden, ist das erfindungsgemäße optische System mit einer erfindungsgemäßen optischen Struktur dadurch gekennzeichnet, dass auch Laser längerer Pulsdauer (z. B. Pikosekunden- oder sogar Nanosekunden-Laser) bei gegebenenfalls auch niedrigerer Pulsfrequenz als Anregungslichtquelle zur Multi-Photonen-Lumineszenzanregung (vorzugsweise 2-Photonen-Anregung) verwendet werden können.

Bei Verwendung sehr kurzpulsiger Laser ist die Abhängigkeit der spektralen Bandbreite des Anregungspulses von der Pulslänge (als Folge der Unschärferelation) zu beachten, um die Einkopplung des Anregungslichts eines solchen Laser in eine erfindungsgemäße optische Struktur auf maximale Einkoppleffizienz zu optimieren. Beispielsweise kann typischerweise ein 100 fs-Laser eine Bandbreite in der Größenordnung von 5 – 15 nm haben. Bezogen auf eine erreichbare Einkoppleffizienz in eine Wellenleiter-Struktur über ein Koppelgitter (c) bedeutet dieses, dass – im Falle flacher Gitter von beispielsweise < 10 nm – bei einem eingestellten Winkel nur für einen kleinen Anteil des eingestrahlten Spektrums die Resonanzbedingung zur Einkopplung erfüllt ist und damit die Effizienz der Einkopplung gering ist. Durch die Verwendung tieferer Gitter kann die

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

30

Schärfe der Resonanzbedingung, sowohl hinsichtlich der Winkel- als auch der Spektralakzeptanz, verringert werden. Als Grundregel bedeutet dieses, dass bei Laserpulsdauern von weniger als ca. 1 – 10 psec (in Abhängigkeit von den übrigen Systemparametern) dieser Zusammenhang bei der Optimierung der Gitterparameter berücksichtigt werden muss, wobei tendenziell zur effizienten Einkopplung von Licht mit kürzeren Pulsdauern grössere Gittertiefen erforderlich sind.

Weitere bevorzugte Ausführungsformen eines erfindungsgemässen optischen Systems zeichnen sich dadurch aus, dass zur Referenzierung Lichtsignale aus der Gruppe gemessen werden, die von Anregungslicht am Ort der Lichtquellen oder nach ihrer Aufweitung oder nach ihrer Unterteilung in Teilstrahlen, Streulicht bei der Anregungswellenlänge aus dem Bereich der einen oder mehreren räumlich getrennten Messbereiche, und über die Gitterstruktur (c) neben den Messbereichen ausgekoppeltem Licht der Anregungswellenlänge gebildet werden. Insbesondere ist dabei von Vorteil, wenn die Messbereiche zur Bestimmung des Emissionslichts und des Referenzsignals identisch sind.

Es ist möglich, dass die Einstrahlung des Anregungslichts auf und Detektion des Emissionslichts von einem oder mehreren Messbereichen sequentiell für einzelne oder mehrere Messbereiche erfolgt. Dieses kann insbesondere dadurch realisiert werden, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung beweglicher optischer Komponenten erfolgt, die aus der Gruppe von Spiegeln, Umlenkprismen und dichroischen Spiegeln gebildet wird.

Bestandteil der Erfindung ist auch ein solches optisches System, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung eines im wesentlichen winkel- und fokusgetreuen Scanners erfolgt. Ausserdem ist es möglich, dass die optische Struktur zwischen Schritten der sequentiellen Anregung und Detektion bewegt wird.

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

31

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein analytisches System zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten, mittels Multi-Photonen-Anregung des Analyten oder eines seiner Bindungspartner oder der die Analytmoleküle umgebenden Moleküle einer Probenmatrix, in mindestens einer Probe auf einem oder mehreren Messbereichen auf einer optischen Struktur, umfassend einen optischen Wellenleiter, mit

- einer erfindungsgemässen optischen Struktur nach einer der genannten Ausführungsformen und
- einem erfindungsgemässen optischen System nach einer der vorgenannten Ausführungsformen.

Vorzugsweise handelt es sich bei besagtem optischem Wellenleiter wiederum um einen optischen Dünnschichtwellenleiter.

Eine spezielle Ausführungsform eines solchen erfindungsgemässen analytischen Systems ist dadurch gekennzeichnet, dass es sich hierbei um ein massenspektrometrisches Messsystem, vorzugsweise MALDI/TOF-MS (matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry), und bei besagter optischer Struktur um einen Probenträger für die Massenspektrometrie handelt, wobei die nachzuweisenden Analytmoleküle, vorzugsweise Moleküle höheren Molekulargewichts, insbesondere natürliche und künstliche Polymeren bzw. biologische Moleküle wie Proteine, Polypeptide und Nukleinsäuren, eingebettet sind in eine Matrix photoreaktiver Moleküle, aus der sie mittels Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle dissoziiert bzw. desorbiert werden können.

Eine andere Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine Photopolymerisation ausgelöst wird.

Kenzeichen einer weiteren Variante ist, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger

als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine Photodissoziation, d.h. Aufspaltung eines bis zu der Multi-Photonen-Anregung bestehenden Moleküls oder molekularen Komplexes auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zu der Schicht (a) ausgelöst wird.

Bevorzugt wird ein analytisches System zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten, mittels Multi-Photonen-Anregung des Analyten oder eines seiner Bindungspartner, in mindestens einer Probe auf einem oder mehreren Messbereichen auf einer optischen Struktur, umfassend einen optischen Wellenleiter (vorzugsweise ausgebildet als Dünnschichtwellenleiter), mit

- einer erfindungsgemässen optischen Struktur
- einem erfindungsgemässen optischen System sowie
- Zuführungsmitteln, um die eine oder mehrere Proben mit den Messbereichen auf der optischen Struktur in Kontakt zu bringen.

Dabei wird bevorzugt, dass das analytische System zusätzlich eine oder mehrere Probenbehältnisse umfasst, welche mindestens im Bereich der einen oder mehreren Messbereiche oder der zu Segmenten zusammengefassten Messbereiche zur optischen Struktur hin geöffnet sind, wobei die Probenbehältnisse vorzugsweise jeweils ein Volumen von 0.1 nl – 100 µl haben.

Eine mögliche Ausführungsform besteht darin, dass die Probenbehältnisse auf der von der optisch transparenten Schicht (a) abgewandten Seite, mit Ausnahme von Ein- und / oder Auslassöffnungen für die Zufuhr oder den Auslass der Proben und gegebenenfalls zusätzlicher Reagentien, geschlossen sind und die Zufuhr oder der Auslass von Proben und gegebenenfalls zusätzlicher Reagentien in einem geschlossenen Durchflusssystem erfolgen, wobei im Falle der Flüssigkeitszufuhr zu mehreren Messbereichen oder Segmenten mit gemeinsamen Einlass- und Auslassöffnungen diese bevorzugt spalten- oder zeilenweise adressiert werden.

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

33

Eine andere mögliche Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass die Probenbehältnisse auf der von der optisch transparenten Schicht (a) abgewandten Seite Öffnungen zur lokal adressierten Zugabe oder Entfernung der Proben oder anderer Reagentien besitzen.

Eine Weiterentwicklung des erfindungsgemässen analytischen Systems ist so gestaltet, dass Behältnisse für Reagentien vorgesehen sind, welche während des Verfahrens zum Nachweis des einen oder mehrerer Analyten benetzt und mit den Messbereichen in Kontakt gebracht werden

Insbesondere für („High-Through-Put“-) Screening-Applikationen, beispielsweise zur Auswahl bindungsfähiger Substanz für eine sogenannte Zielverbindung („Target“) und deren Anreicherung in nachfolgenden Verfahrensschritten, geeignet ist ein erfindungsgemässes analytisches System zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten, mittels Lumineszenzanregung des Analyten oder eines seiner Bindungspartner, in mindestens einer Probe auf einem oder mehreren Messbereichen auf einer optischen Struktur, umfassend einen optischen Wellenleiter (vorzugsweise einen Dünnschichtwellenleiter), mit

- einer erfindungsgemässen optischen Struktur
- einem erfindungsgemässen optischen System
- Zuführungsmitteln, um die eine oder mehrere Proben mit den Messbereichen auf der optischen Struktur in Kontakt zu bringen
- einem oder mehreren Probenbehältnissen zur Aufnahme der einen oder mehreren Proben und gegebenenfalls zusätzlicher Reagentien sowie
- Mitteln zur Entfernung der in den Probenbehältnissen enthaltenen Flüssigkeit,

dadurch gekennzeichnet, dass nach dem Nachweis der Bindung eines oder mehrerer Analyten in einem oder mehreren Messbereichen der von diesem Analyten mit dem betreffenden immobilisierten Erkennungselement und gegebenenfalls weiteren Bindungspartnern gebildete Molekülkomplex mittels Photodissoziation nach Multi-Photonen-Anregung aufgespalten oder von der optischen Struktur abgespalten werden kann und besagter Molekülkomplex als ganzer oder in Teilen, nach Elution aus dem

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

34

betreffenden Probenbehältnis, einer weiteren analytischen oder präparativen Behandlung zugeführt werden kann.

Bevorzugt wird dabei eine solche Ausführungsform eines erfindungsgemässen analytischen Systems, welche dadurch gekennzeichnet ist, dass diese eine Auftrennung verschiedener auf besagter optischer Struktur gebundener Molekülkomplexe mit in einer oder mehreren zugeführten Proben nachgewiesenen Analyten, oder von Teilen dieser Molekülkomplexe, nach der Höhe des Absorptionsquerschnitts dieser Molekülkomplexe für eine Photodissoziation mittels Multi-Photonen-Anregung ermöglicht.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Multi-Photonen-Anregung, unter Verwendung einer erfindungsgemässen optischen Struktur und / oder eines erfindungsgemässen optischen Systems und / oder eines erfindungsgemässen analytischen Systems, jeweils nach einer der vorgenannten Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

Eine Gruppe von Ausführungsformen des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) der optischen Struktur befindliche Moleküle photoreaktiv sind und durch Multi-Photonen-Anregung zu einer chemischen Reaktion angeregt werden.

Dabei besteht eine Variante darin, dass auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) der optischen Struktur befindliche Moleküle durch Multi-Photonen-Anregung zu einer Bindung mit anderen Molekülen angeregt werden. Kennzeichen einer speziellen Ausführungsform ist dabei, dass auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a)

der optischen Struktur befindliche Moleküle durch Multi-Photonen-Anregung zu einer Photopolymerisation angeregt werden.

Kennzeichen einer anderen Variante des Verfahrens ist, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine Photodissoziation, d.h. Aufspaltung eines bis zu der Multi-Photonen-Anregung bestehenden Moleküls oder molekularen Komplexes auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zu der Schicht (a) ausgelöst wird.

Eine spezielle Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagtem analytischen System um ein massenspektrometrisches Messsystem, vorzugsweise MALDI/TOF-MS (matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry), und bei besagter optischen Struktur um einen Probenträger für die Massenspektrometrie handelt, wobei die nachzuweisenden Analytmoleküle, vorzugsweise Moleküle höheren Molekulargewichts, insbesondere natürliche und künstliche Polymeren bzw. biologische Moleküle wie Proteine, Polypeptide und Nukleinsäuren, eingebettet sind in eine Matrix photoreaktiver Moleküle, aus der sie mittels Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle dissoziiert bzw. desorbiert werden können.

Eine bevorzugte Ausführungsform ist ein Verfahren zur Lumineszenzanregung, unter Verwendung einer erfindungsgemässen optischen Struktur und / oder eines erfindungsgemässen optischen und / oder eines erfindungsgemässen analytischen Systems, jeweils nach einer der vorgenannten Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung zur Lumineszenz anzuregen.

Besonders bevorzugt wird ein Verfahren zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten in einer oder mehreren Proben auf einem oder mehreren Messbereichen auf einer erfindungsgemässen optischen Struktur nach einem der entsprechenden Ausführungsformen zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen von einem Messbereich oder von einem Array aus mindestens zwei oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, auf besagter optischer Struktur, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um ein auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliches Molekül mittels Multi-Photonen-Anregung zur Lumineszenz anzuregen.

In dem erfindungsgemässen Verfahren kann die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über ein oder mehrere optische Einkoppelemente aus der Gruppe erfolgen, die von Prismenkopplern, evaneszenten Kopplern mit zusammengebrachten optischen Wellenleitern mit überlappenden evaneszenten Feldern, Stirnflächenkopplern mit vor einer Stirnseite der wellenleitenden Schicht angeordneten fokussierenden Linsen, vorzugsweise Zylinderlinsen, und Gitterkopplern gebildet wird.

Es wird bevorzugt, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) erfolgt.

Vorzugsweise handelt es sich bei der optischen Struktur um eine planare Dünnschicht-Wellenleiter-Struktur.

Besonders bevorzugt wird ein Verfahren mit einer optischen Struktur umfassend einen planaren Dünnschicht-Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer in Schicht (a) modulierten

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

37

Gitterstruktur (c), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) eingestrahlt Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) zumindest im Bereich der Gitterstruktur (c) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

Es wird bevorzugt, dass es sich bei der Multi-Photonen-Anregung um eine 2-Photonen-Anregung handelt.

Vorteilhaft sind solche Ausführungsformen des erfindungsgemässen Verfahrens, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass auf der Oberfläche der Schicht (a) der optischen Struktur oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle linienhaft, das heisst gleichzeitig längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts, mittels Multi-Photonen-Anregung angeregt werden können.

Besonders vorteilhaft sind dabei solche Ausführungsformen, welche linienhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen längs einer Distanz von mindestens 5 nm, gerechnet vom Ort der Einkopplung des Anregungslichts in die Schicht (a), ermöglichen.

Ausserdem wird bevorzugt, dass, unter Einstrahlung eines aufgeweiteten Anregungslichts, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle gleichzeitig flächenhaft längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts mittels Multi-Photonen-Anregung angeregt werden können. Dabei ist das Anregungslichtbündel im Falle der Lichteinkopplung in die Schicht (a) über eine darin modulierte Gitterstruktur (c) vorzugsweise wiederum parallel zu den Gitterlinien aufgeweitet.

Von besonderem Vorteil sind auch solche Ausführungsformen eines erfindungsgemässen Verfahrens, mit denen gleichzeitige flächenhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen auf einer Fläche von mindestens 1 mm², stärker bevorzugt auf einer Fläche von mindestens 10 mm², noch stärker bevorzugt auf einer Fläche von mindestens 1 cm² möglich ist.

Dafür kann es für verschiedene Ausführungsformen des erfindungsgemässen Verfahrens vorteilhaft sein, wenn die optische Struktur, als Teil des optischen Systems, gleichförmige, unmodulierte Bereiche der Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind. Insbesondere kann es vorteilhaft sein, wenn die optische Struktur eine Vielzahl von Gitterstrukturen (c) gleicher oder unterschiedlicher Periode mit gegebenenfalls daran anschliessenden gleichförmigen, unmodulierten Bereichen der Schicht (a) auf einem gemeinsamen, durchgehenden Substrat umfasst. In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens ist das optische System dabei so gestaltet, dass eine auf oder im Nahfeld der Schicht (a) der optischen Struktur durch Multi-Photonen-Absorption erzeugte Lumineszenz mindestens teilweise in die Schicht (a) einkoppelt und durch Leitung in der Schicht (a) zu benachbarten Bereichen auf besagter optischer Struktur geführt wird.

Bei den vorgenannten Verfahren zur Lumineszenzdetektion ist es möglich, dass (1) die isotrop abgestrahlte Lumineszenz oder (2) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelte und über Gitterstrukturen (c) ausgekoppelte Lumineszenz oder Lumineszenzen beider Anteile (1) und (2) gleichzeitig gemessen werden.

In dem erfindungsgemässen Verfahren kann zur Erzeugung der Lumineszenz oder Fluoreszenz ein Lumineszenz- oder Fluoreszenzlabel verwendet werden, das bei einer Wellenlänge zwischen 200 nm und 1100 nm angeregt werden kann.

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

39

Bei den Lumineszenz- oder Fluoreszenzlabeln kann es sich um herkömmliche Lumineszenz- oder Fluoreszenzfarbstoffe oder auch um sogenannte lumineszente oder fluoreszente Nanopartikel, basierend auf Halbleitern (W. C. W. Chan und S. Nie, "Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection", *Science* 281 (1998) 2016 – 2018) handeln. Selbstverständlich eignen sich solche Lumineszenzlabel am besten, welche bei der eingesetzten Anregungswellenlänge einen besonders grossen Multi-Photonen-Absorptionsquerschnitt, im Falle der bevorzugten 2-Photonen-Anregung einen besonders grossen 2-Photonen-Absorptionsquerschnitt, und dabei zugleich eine möglichst hohe Photostabilität aufweisen.

Es wird bevorzugt, dass besagtes Lumineszenzlabel mittels 2-Photonen-Absorption angeregt wird. Insbesondere wird dabei bevorzugt, dass besagtes Lumineszenzlabel durch 2-Photonen-Absorption eines Anregungslichts im Sichtbaren oder nahen Infraroten zu einer ultraviolethen oder blauen Lumineszenz angeregt wird.

Das Lumineszenzlabel kann an den Analyten oder in einem kompetitiven Assay an einen Analogen des Analyten oder in einem mehrstufigen Assay an einen der Bindungspartner der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen oder an die biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen gebunden sein.

Zusätzlich können ein zweites oder noch weitere Lumineszenzlabel mit gleicher oder unterschiedlicher Anregungswellenlänge wie das erste Lumineszenzlabel und gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden. Hierbei kann es vorteilhaft sein, wenn das zweite oder noch weitere Lumineszenzlabel bei der gleichen Wellenlänge wie das erste Lumineszenzlabel angeregt werden können, aber bei anderen Wellenlängen emittieren.

Für andere Applikationen ist es vorteilhaft, wenn die Anregungsspektren und Emissionsspektren der eingesetzten Lumineszenzlabel nur wenig oder gar nicht überlappen.

In dem erfindungsgemässen Verfahren kann es weiterhin vorteilhaft sein, wenn zum Nachweis des Analyten Ladungs- oder optischer Energietransfer von einem als Donor dienenden ersten Lumineszenzlabel zu einem als Akzeptor dienenden zweiten Lumineszenzlabel verwendet wird.

Eine besondere Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten beruht darauf, dass die Eigenfluoreszenz („Autofluoreszenz“) fluoreszenzfähiger Biomoleküle, wie beispielsweise von Proteinen mit fluoreszenzfähigen Aminosäuren wie z. B. Tryptophan, Tyrosin oder Phenylalanin, welche sich auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befinden, durch Multi-Photonen-Absorption (vorzugsweise 2-Photonen-Absorption) angeregt werden kann. Unter dieser Gruppe bevorzugt ist Tryptophan mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von ca. 5600 ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) bei 280 nm und einer Quantenausbeute der Emission, um 360 nm, von 20 %. Typischerweise ist daher eine Anregung der Tryptophan-Fluoreszenz in einem klassischen Ein-Photonen-Absorptionsprozess im evaneszenten Feld eines hochbrechenden Wellenleiters nicht möglich, da Anregungslicht einer so kurzen Wellenlänge im Wellenleiter nicht über signifikante Entfernungen geführt, sondern absorbiert oder ausgestreut wird. Oft ist es auch nicht möglich, derart kurzwelliges Anregungslicht an den Wellenleiter heranzuführen, beispielsweise dann nicht, wenn zuvor ein bei dieser Wellenlänge absorbierendes Material (wie beispielsweise die meisten Kunststoffe) durchstrahlt werden muss. Dem erfindungsgemässen Verfahren folgend, ist es jedoch möglich, für einen Multi-Photonen-Absorptionsprozess Anregungslicht geeigneter längerer Wellenlänge zu verwenden, welches in der wellenleitenden Schicht (a) über längere Strecken geführt wird, und damit die kurzwellige Fluoreszenz anzuregen. Ein besonderer Vorteil dieser Variante des Verfahrens ist, dass sich damit die chemische Verknüpfung des Analyten, oder eines seiner Bindungspartner in einem Nachweisverfahren, mit einem Lumineszenzlabel erübrigt. Stattdessen kann der Nachweis direkt auf der Detektion lumineszenzfähiger biologischer Verbindungen beruhen, welche als natürlicher Bestandteil dieser Verbindungen vorliegen oder, z. B.

durch Punktmutationen einzelner Aminosäuren in einem biologischen Erzeugungsprozess in den Analyten oder einen seiner Bindungspartner eingebaut werden.

Für diese besondere Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens gibt es wiederum zahlreiche mögliche Untervarianten. Beispielsweise können die zum Analytnachweis immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente so ausgewählt sein, dass sie keine oder nur möglichst geringe Eigenlumineszenz durch Multi-Photonen-Anregung aufweisen (unter den jeweiligen Versuchsbedingungen). Damit ist es möglich, ein möglichst niedriges Hintergrundsignal beim Schritt des Analytnachweises durch eine Lumineszenzanregung mittels Multiphotonen-Absorption des Analyten selbst oder eines der im Nachweisverfahren eingesetzten Bindungspartner zu erhalten. Eine andere vorteilhafte Ausführungsform beruht darauf, mithilfe einer in einem Multi-Photonen-Absorptionsprozess angeregten Eigenlumineszenz (Eigen- oder Auto-Fluoreszenz) der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente deren Immobilisierungsdichte in den Messbereichen zu bestimmen. Damit ist es möglich, das im Analytnachweisschritt (durch Multi-Photonen-Absorption oder auch Ein-Photonen-Absorption) angeregte Lumineszenzsignal des Analyten oder eines seiner Bindungspartner bezüglich der Anzahl oder Dichte der verfügbaren Bindungsstellen zu korrigieren bzw. zu normieren.

Insbesondere kann bei geeigneten Absorptionsspektren der Analyten bzw. derer Bindungspartner sowie der immobilisierten Erkennungselemente für die Ein- bzw. Multi-Photonen-Absorption ein- und derselbe Laser zur (gleichzeitigen oder sequentiellen) Ein-Photonen-Anregung und einer Multi-Photonen-Anregung von Lumineszenz eingesetzt werden, wobei im Falle einer sequentiellen solchen Anregung deren bevorzugte Reihenfolge in Abhängigkeit von der jeweiligen Applikation unterschiedlich sein kann.

Bei sehr hoher Energiedichte an der Oberfläche der Schicht (a) und unter Bereitstellung von Luminophoren mit geeigneten Absorptionsquerschnitten ist es vorstellbar, dass eine Lumineszenzanregung gleichzeitig bei bis zu drei verschiedenen Wellenlängen stattfindet, beispielsweise mit einem Laser mit 1064 nm Emissionswellenlänge Anregung

eines NIR-Farbstoffs durch Ein-Photonen-Absorption, Anregung eines Farbstoffs im Sichtbaren (etwa 532 nm) durch Zwei-Photonen-Absorption und eines UV-Farbstoffs durch Drei-Photonen-Absorption (bei etwa 355 nm). Entsprechende Wellenlängen bei Einsatz eines Lasers mit Emission bei 780 nm wären 390 nm für die Zwei-Photonen-Absorption und 260 nm für die Drei-Photonen-Absorption.

Das erfindungsgemäße Verfahren der Multi-Photonen-Anregung kann also mit einem gleichzeitigen oder entsprechend sequentiell durchzuführenden Lumineszenznachweis der Emission von lumineszenzfähigen Molekülen, welche in einem Ein-Photonen-Absorptionsprozess bei der eingestrahlten Anregungswellenlänge angeregt werden können, kombiniert werden.

Zusätzlich kann es von Vorteil sein, wenn die einen oder mehreren Lumineszenzen und / oder Bestimmungen von Lichtsignalen bei der Anregungswellenlänge polarisationsselektiv vorgenommen werden. Weiterhin erlaubt das Verfahren die Möglichkeit, dass die einen oder mehreren Lumineszenzen bei einer anderen Polarisation als der des Anregungslichts gemessen werden.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens mit einem analytischen System zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten, mittels Lumineszenzanregung des Analyten oder eines seiner Bindungspartner (nach Ein- oder Multi-Photonen-Anregung), in mindestens einer Probe auf einem oder mehreren Messbereichen auf einer optischen Struktur, umfassend einen optischen Wellenleiter (vorzugsweise einen Dünnschichtwellenleiter), mit

- einer erfindungsgemässen optischen Struktur
- einem erfindungsgemässen optischen System
- Zuführungsmitteln, um die eine oder mehrere Proben mit den Messbereichen auf der optischen Struktur in Kontakt zu bringen
- einem oder mehreren Probenbehältnissen zur Aufnahme der einen oder mehreren Proben und gegebenenfalls zusätzlicher Reagentien sowie
- Mitteln zur Entfernung der in den Probenbehältnissen enthaltenen Flüssigkeit,

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

43

dadurch gekennzeichnet, dass nach dem Nachweis der Bindung eines oder mehrerer Analyten in einem oder mehreren Messbereichen der von diesem Analyten mit dem betreffenden immobilisierten Erkennungselement und gegebenenfalls weiteren Bindungspartnern gebildete Molekülkomplex mittels Photodissoziation nach Multi-Photonen-Anregung aufgespalten oder von der optischen Struktur abgespalten werden kann und besagter Molekülkomplex als ganzer oder in Teilen, nach Elution aus dem betreffenden Probenbehälter, einer weiteren analytischen oder präparativen Behandlung zugeführt werden kann.

Eine spezielle Variante des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass während der Multi-Photonen-Anregung von an der Oberfläche der Schicht (a) oder innerhalb eines Abstandes von weniger als 200 nm von der Schicht (a) befindliche Moleküle innerhalb dieses Abstandes gefangen gehalten werden, indem die oberflächennahe hohe Anregungsintensität und deren ansteigender Gradient in Richtung der Oberfläche auf diese Moleküle den Effekt einer „optischen Pinzette“ („optical tweezers“) ausübt.

Das erfindungsgemässe Verfahren nach einer der voranstehenden Ausführungsformen ermöglicht eine gleichzeitige und / oder sequentielle, quantitative und / oder qualitative Bestimmung eines oder mehrerer Analyten aus der Gruppe von Antikörpern oder Antigenen, Rezeptoren oder Liganden, Chelatoren oder "Histidin-Tag-Komponenten", Oligonukleotiden, DNA- oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymfaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlehydraten.

Die zu untersuchenden Proben können natürlich vorkommende Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Lymphe oder Urin oder Eigelb sein.

Eine zu untersuchende Probe kann aber auch eine optisch trübe Flüssigkeit, Oberflächenwasser, ein Boden- oder Pflanzenextrakt, eine Bio- oder Syntheseprozessbrühe sein.

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

44

Die zu untersuchenden Proben können auch aus biologischen Gewebeteilen entnommen sein.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemässen optischen Struktur und / oder eines erfindungsgemässen optischen Systems und / oder eines erfindungsgemässen analytischen Systems und / oder eines erfindungsgemässen Verfahrens, jeweils nach einer der vorgenannten Ausführungsformen, zu quantitativen und / oder qualitativen Analysen zur Bestimmung chemischer, biochemischer oder biologischer Analyten in Screeningverfahren in der Pharmaforschung, der Kombinatorischen Chemie, der Klinischen und Präklinischen Entwicklung, zu Echtzeitbindungsstudien und zur Bestimmung kinetischer Parameter im Affinitätscreening und in der Forschung, zu qualitativen und quantitativen Analytbestimmungen, insbesondere für die DNA- und RNA-Analytik, für die Erstellung von Toxizitätsstudien sowie für die Bestimmung von Expressionsprofilen sowie zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Pathogenen oder Bakterien in der pharmazeutischen Produktentwicklung und Forschung, der Human- und Veterinärmedizin, der Agrochemischen Produktentwicklung und Forschung, der symptomatischen und präsymptomatischen Pflanzendiagnostik, zur Patientenstratifizierung in der pharmazeutischen Produktentwicklung und für die therapeutische Medikamentenauswahl, zum Nachweis von Pathogenen, Schadstoffen und Erregern, insbesondere von Salmonellen, Prionen und Bakterien, in der Lebensmittel- und Umweltanalytik.

Weiterer Gegenstand dieser Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemässen optischen Struktur und / oder eines erfindungsgemässen optischen Systems und / oder eines erfindungsgemässen Verfahrens in der nichtlinearen Optik oder in der Telekommunikation oder der Nachrichtentechnik.

Ganz allgemein eignen sich eine erfindungsgemässe optische Struktur und / oder ein erfindungsgemässes optisches System und / oder ein erfindungsgemässes analytisches System und / oder ein erfindungsgemässes Verfahren ausserdem für

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

45

oberflächengebundene Untersuchungen, welche den Einsatz sehr hoher Anregungslichtintensitäten und / oder Anregungsdauern erfordern, wie beispielsweise Studien zur Photostabilität von Materialien, photokatalytische Prozesse etc.

Mit dem nachfolgenden Ausführungsbeispiel soll die Erfindung genauer erläutert und demonstriert werden, ohne dass durch die dargestellten spezifischen Ausführungsformen die Allgemeinheit der Erfindung eingeschränkt werden soll.

Es zeigen

Fig. 1 eine Kamera-Aufnahme einer mit bloßem Auge sichtbaren, mithilfe einer erfindungsgemäßen optischen Struktur erzeugten Fluoreszenz nach 2-Photonen-Anregung;

Fig. 2 und Fig. 3 Querschnittsprofile der durch 2-Photonen-Anregung erzeugten Fluoreszenz, nach Anregung durch unterschiedlich stark kollimierte Anregungslichtstrahlen;

Fig. 4 das Querschnittsprofil der durch 2-Photonen-Anregung erzeugten Fluoreszenz, nach Anregung durch den parallel zu den Gitterlinien der optischen Struktur aufgeweiteten Anregungslichtstrahl;

Fig. 5 die quadratische Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzintensität von der Anregungslichtintensität.

Beispiel 1:**1. Optische Struktur zur 2-Photonen-Anregung**

Die optische Struktur besteht aus einem Glassubstrat (AF45-Glas als optische Schicht (b), $n = 1.496$ bei 800 nm) mit einer darauf aufgebracht 150 nm dünnen Schicht (b) aus Tantalpentoxid (wellenleitende Schicht (a), $n = 2.092$ bei 800 nm). Zur Ein- und Auskoppelung von Licht in bzw. aus der wellenleitenden Schicht (a) dienen im Abstand von 9 nm in der Schicht (a) erzeugte Koppelgitter in der Form von Reliefgittern (Gitterperiode 360 nm , Gittertiefe 12 nm). Unter diesen Bedingungen beträgt der Einkoppelwinkel vom Glassubstrat (optische Schicht (b), $n = 1.496$ bei 810 nm) zur wellenleitenden Schicht (a) -20.4° ; der äussere Einstrahlwinkel auf die Schicht (b) (gemessen zur Normalen der optischen Struktur) beträgt -31.4° .

Zur Erzeugung und Demonstration der Eignung dieser optischen Struktur für eine 2-Photonen-Anregung werden zwischen zwei Gitterstrukturen auf der Schicht (a) 1 Tropfen von je $0.5 \mu\text{l}$ einer Rhodamin-Lösung ($15.9 \mu\text{M}$ Rhodamin B in Ethanol) aufgebracht, so dass die Rhodamin-Moleküle als Beispiel für lumineszenzfähige Moleküle nach Verdampfen des Ethanol auf der Schicht (a) verbleiben.

2. Optisches System zur 2-Photonen-Anregung, Messverfahren zur 2-Photonen-Anregung und dessen Ergebnisse

Als Anregungslichtquelle dient ein gepulster Titan-Saphir-Laser mit Emission bei ca. 800 nm (Pulslänge: 100 fsec , Repetitionsrate: 80 MHz , eingesetzte mittlere Leistung: bis 0.6 W , spektrale Pulsbreite: 8 nm). Die Intensität des vom Laser ausgestrahlten Anregungslichts kann mit einem elektrooptischen Modulator kontinuierlich zwischen 0% und 100% der Ausgangsleistung reguliert werden; sie kann auch computergesteuert in diesem Bereich herauf- oder heruntergefahren werden.

Nach dem elektrooptischen Modulator können im Anregungsstrahlengang (in Richtung der optischen Struktur) Linsen eingesetzt werden, um auf dem Einkoppelgitter (c) der optischen Struktur parallel eingestrahlt Anregungslichtbündel gewünschter Geometrie zu erzeugen. Das eingestrahlt Anregungslicht wird über einen Spiegel umgelenkt auf das Einkoppelgitter (c) der optischen Struktur, welche auf einem Justierelement montiert ist, welches Translation in x- y- und z-Richtung (parallel und in den Achsen senkrecht zu den Gitterlinien) und Rotation (mit Drehachse übereinstimmend mit den Gitterlinien des Einkoppelgitters) erlaubt.

Zunächst wird, bei einer eingestrahlt Durchschnittsleistung von 0.4 W, ein kollimierter Strahl unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung auf das Einkoppelgitter geleitet. Dazu wird der Strahl mit einer Linse ($f = 12.7$ cm) leicht fokussiert, mit dem Einkoppelgitter (Ebene der optischen Struktur) im „beam waste“, so dass das Anregungslicht dort als eine ebene Welle auftritt. Überraschenderweise wird, längs des in der optischen Struktur geführten Modes, im Bereich des immobilisierten Lumineszenz-Farbstoffs, eine so starke 2-Photonen-Fluoreszenz angeregt, dass sie sogar bei Raumlicht mit bloßem Auge beobachtbar ist. (Fig. 1, aufgenommen ohne Filter). Der Bildausschnitt zeigt die Halterung mit der darin montierten optischen Struktur. Der linke helle Lichtfleck markiert die Einkoppelposition des Anregungslichts auf dem Einkoppelgitter. Da dieses Bild ohne jegliche Filter aufgenommen wurde, ist die Intensität des am Gitter gestreuten Anregungslichts stark genug, dass es von der Kamera trotz abnehmender Empfindlichkeit bei langen Wellenlängen noch aufgezeichnet wird. Der eingekoppelte Mode (bei einer Wellenlänge von 800 nm) breitet sich in der Bildebene von links nach rechts aus. Bis zum Erreichen des Gebietes, in dem der Rhodamin-Farbstoff immobilisiert ist, ist der geführte Mode unsichtbar. In Mode-Ausbreitungsrichtung folgend, nach rechts, ist dann deutlich die mittels 2-Photonen-Anregung erzeugte Fluoreszenz des Rhodamin-Farbstoffs zu erkennen. Die zu beobachtende Lichtspur entspricht einer Länge von ca. 8 mm, bis zur nächsten Gitterstruktur, an der das geführte Anregungslicht wieder ausgekoppelt wird. Eine signifikante Abschwächung des geführten Lichts bzw. der angeregten 2-Photonen-Fluoreszenz ist längs der gesamten Distanz nicht erkennbar.

Fig. 2 zeigt in einem Querschnitt, parallel zu den Gitterlinien, das Profil der angeregten 2-Photonen-Fluoreszenz, aufgenommen mit einem IR-blockierenden Filter (BG 39) vor einer CCD-Kamera als Detektor. Das Anregungsstrahlprofil auf dem Gitter war auf eine theoretische Breite von ca. 100 μm eingestellt, was gut mit der gemessenen Halbwertsbreite der Fluoreszenzspur (100 μm) übereinstimmt. In diesem Beispiel konnte also linienhaft über eine Strecke von 8 mm (auf einer Fläche von etwa 2 mm^2 , bei Zugrundelegung der Basisbreite des Fluoreszenzprofils, mittels 2-Photonen-Anregung Fluoreszenz erzeugt werden. Es ist zu beachten, dass die Ausbreitungslänge des geführten Anregungslichts und damit die Anregungsstrecke für die 2-Photonen-Anregung lediglich durch das Auskoppelgitter begrenzt ist.

Fig. 3 zeigt ein entsprechendes Fluoreszenzprofil für den direkt, ohne weitere strahlformende Linsen, eingestrahnten Laserstrahl. In diesem Fall beträgt die Halbwertsbreite des Fluoreszenzprofils ca. 360 μm , die Basisbreite ca. 800 μm , entsprechend einer (längs des Moden-Laufweges von 8 mm) auf einer Gesamtfläche von ca. 6 mm^2 mit 2-Photonen-Anregung erzeugten Fluoreszenz.

In einem weiteren Schritt wird dann der Laserstrahl mit einer Zylinderlinse ($f = 40 \text{ mm}$) parallel zu den Gitterlinien aufgeweitet. Aus dem entsprechenden Fluoreszenzprofil (Fig. 4) ergeben sich eine Halbwertsbreite von ca. 1.7 mm und eine Basisbreite von ca. 3 mm, entsprechend einer flächenhaft auf mehr als 20 mm^2 mittels 2-Photonen-Anregung erzeugten Fluoreszenz.

Ein wichtiges Kriterium zur zweifelsfreien Zurückführung einer angeregten Fluoreszenz auf 2-Photonen-Anregung ist die quadratische Abhängigkeit ihrer Intensität von der eingestrahnten Anregungsintensität. Dazu wird, anstelle der CCD-Kamera, eine Si-Photodiode, verbunden mit einem Lock-in-Verstärker (Chopper-Frequenz: 2 kHz), als Detektor verwendet. Die isotrop abgestrahlte, mittels 2-Photonen-Anregung im evaneszenten Feld der Wellenleiter-Struktur erzeugte Fluoreszenz wird mit einer Linse auf besagte Photodiode, vor der sich wiederum ein IR-blockierender Filter (BG 39)

befindet, fokussiert. Mithilfe des computergesteuerten elektrooptischen Modulators wird die auf die optische Struktur eingestrahlte Anregungsintensität in Inkrementen von ca. 6 mW von 0 auf nahe 300 mW (eingestrahlte Durchschnittsleistung) erhöht und jeweils die erzeugte Fluoreszenzintensität gemessen. Fig. 5 zeigt die gemessenen Fluoreszenzintensitäten und – als durchgezogene Linie – eine Kurvenanpassung der Intensität nach der Gleichung $y = ax^2$ (mit y entsprechend der Fluoreszenzintensität, x entsprechend der Anregungsintensität, a entsprechend einem Fitparameter). Es zeigt sich überraschenderweise eine perfekte quadratische Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzintensität von der Anregungslichtintensität, ohne jeglichen Offset, welcher einem zusätzlichen Hintergrundsignal entsprechen würde. Damit demonstriert dieses Beispiel, dass die gemessene Fluoreszenz eindeutig auf 2-Photonen-Anregung zurückzuführen ist und diese, unter diesen Versuchsbedingungen, frei von Hintergrundsignalen, angeregt werden kann.

Beispiel 2: Weiteres optisches System zur 2-Photonen-Anregung

Als Anregungslichtquelle dient eine Hochleistungslaserdiode mit Emissionswellenlänge 810 nm (fasergekoppelt, 10 W). Mit einer nach der Faser angeordneten Strahlformungsoptik wird ein paralleles Anregungsstrahlenbündel gewünschter Form erzeugt und unter dem Koppelwinkel für die Einkopplung in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur auf das Gitter (Periode 360 nm, Gittertiefe 12 nm) eingestrahlt. Der Einkoppelwinkel im Glassubstrat (optische Schicht (b), $n = 1.496$ bei 810 nm) beträgt -21.7° (beim Übergang des Lichts von der Schicht (b) zur Schicht (a)); der äussere Einstrahlwinkel beträgt -34.1° . Die wellenleitende Schicht (a) beträgt 150 nm Tantalpentoxid ($n = 2.09$ bei 810 nm). Mit diesen Parametern kann ein Anteil von 24 % in die Schicht (a) eingekoppelt werden, und die Anregungsintensität an der Oberfläche der Schicht (a) ist ausreichend für eine 2-Photonen-Anregung.

Patentansprüche

1. Optische Struktur, umfassend einen optischen Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die Schicht (a) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle oder molekulare Gruppen mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.
2. Optische Struktur nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem optischen Wellenleiter um einen optischen Dünnschichtwellenleiter handelt, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a).
3. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 – 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) durch Multi-Photonen-Anregung angeregten Molekülen um photoreaktive, d.h. nach Lichtanregung chemisch reaktive Moleküle oder molekulare Gruppen handelt.
4. Optische Struktur nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine Photopolymerisation ausgelöst wird.
5. Optische Struktur nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine Photodissoziation, d.h. Aufspaltung eines bis zu der Multi-Photonen-Anregung

bestehenden Moleküls oder molekularen Komplexes auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zu der Schicht (a) ausgelöst wird.

6. Optische Struktur nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass besagte photoreaktive Moleküle Bestandteil einer Molekülmatrix zur Einbettung von Molekülen höheren Molekulargewichts, insbesondere von natürlichen und künstlichen Polymeren bzw. von biologischen Molekülen wie Proteinen, Polypeptiden und Nukleinsäuren, sind.
7. Optische Struktur nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich hierbei um einen Probenträger für die Massenspektrometrie, vorzugsweise für MALDI/TOF-MS (matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry) handelt.
8. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 – 7, umfassend einen optischen Dünnschicht-Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die Schicht (a) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung zur Lumineszenz anzuregen.
9. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über ein oder mehrere optische Einkoppelemente aus der Gruppe erfolgt, die von Prismenkopplern, evaneszenten Kopplern mit zusammengebrachten optischen Wellenleitern mit überlappenden evaneszenten Feldern, Stirnflächenkopplern mit vor einer Stirnseite der wellenleitenden Schicht angeordneten fokussierenden Linsen, vorzugsweise Zylinderlinsen, und Gitterkopplern gebildet wird.

10. Optische Struktur nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) erfolgt.
11. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 – 10, dadurch gekennzeichnet, dass es sich hierbei um eine planare Dünnschicht-Wellenleiter-Struktur handelt.
12. Optische Struktur nach Anspruch 11, umfassend einen planaren Dünnschicht-Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer in Schicht (a) modulierten Gitterstruktur (c), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) eingestrahlten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) zumindest im Bereich der Gitterstruktur (c) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.
13. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 – 12, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Multi-Photonen-Anregung um eine 2-Photonen-Anregung handelt.
14. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 – 13, dadurch gekennzeichnet, dass sie es ermöglicht, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle linienhaft, das heisst gleichzeitig längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts, mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.
15. Optische Struktur nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass sie linienhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen längs einer

Distanz von mindestens 5 mm, gerechnet vom Ort der Einkopplung des Anregungslichts in die Schicht (a), ermöglicht.

16. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 – 15, dadurch gekennzeichnet, dass sie es ermöglicht, unter Einstrahlung eines aufgeweiteten Anregungslichts, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle gleichzeitig flächenhaft längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.
17. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 16, dadurch gekennzeichnet, dass sie gleichzeitige flächenhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen auf einer Fläche von mindestens 1 mm^2 ermöglicht.
18. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 16, dadurch gekennzeichnet, dass sie gleichzeitige flächenhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen auf einer Fläche von mindestens 10 mm^2 ermöglicht.
19. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 16, dadurch gekennzeichnet, dass sie gleichzeitige flächenhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen auf einer Fläche von mindestens 1 cm^2 ermöglicht.
20. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 10 – 19, dadurch gekennzeichnet, dass sie gleichförmige, unmodulierte Bereiche der Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind.
21. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 10 – 20, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Vielzahl von Gitterstrukturen (c) gleicher oder unterschiedlicher Periode mit

optional daran anschliessenden gleichförmigen, unmodulierten Bereichen der Schicht (a) auf einem gemeinsamen, durchgehenden Substrat umfasst.

22. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 8 – 21, dadurch gekennzeichnet, dass eine auf oder im Nahfeld der Schicht (a) durch Multi-Photonen-Anregung erzeugte Lumineszenz mindestens teilweise in die Schicht (a) einkoppelt und durch Leitung in der Schicht (a) zu benachbarten Bereichen auf besagter optischer Struktur geführt wird.
23. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 12 - 22, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Überlagerung von 2 oder mehreren Gitterstrukturen unterschiedlicher Periodizität mit zueinander paralleler oder nicht paralleler, vorzugsweise nicht paralleler Ausrichtung der Gitterlinien umfasst, welche der Einkopplung von Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlänge dient, wobei im Falle von 2 überlagerten Gitterstrukturen deren Gitterlinien vorzugsweise senkrecht zueinander ausgerichtet sind.
24. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 2 - 23, dadurch gekennzeichnet, dass sich zwischen den optisch transparenten Schichten (a) und (b) und in Kontakt mit Schicht (a) eine weitere optisch transparente Schicht (b') mit niedrigerem Brechungsindex als dem der Schicht (a) und einer Stärke von 5 nm – 10 000 nm, vorzugsweise von 10 nm - 1000 nm, befindet.
25. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 10 – 22 oder 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) ein diffraktives Gitter mit einer einheitlichen Periode oder ein multidiffraktives Gitter ist.
26. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 10 - 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) eine senkrecht oder parallel zur Ausbreitungsrichtung des in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelten Anregungslichts räumlich variierende Periodizität aufweist.

27. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 26, dadurch gekennzeichnet, dass das Material der optisch transparenten Schicht (a) aus Glas, Quarz oder einem transparenten Kunststoff besteht, beispielsweise aus der Gruppe, welche Polycarbonat, Polyamid, Polyimid, Polymethylmethacrylat, Polypropylen, Polystyrol, Polyethylen, Polyacrylsäure, Polyacrylester, Polythioester, Polyphenylsulfid Polyethylenterephthalat (PET) und Polyurethan sowie deren Derivate umfasst.
28. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 27, dadurch gekennzeichnet, dass die optisch transparente Schicht (a) ein Material aus der Gruppe von TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 , oder ZrO_2 , besonders bevorzugt aus TiO_2 oder Nb_2O_5 oder Ta_2O_5 , umfasst.
29. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 28, dadurch gekennzeichnet, dass der Brechungsindex der optisch transparenten Schicht (a) grösser als 1.8 ist.
30. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 29, dadurch gekennzeichnet, dass die optisch transparente Schicht (a) selbsttragend ist.
31. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 29, dadurch gekennzeichnet, dass die optisch transparente Schicht (a) ein niedermodaler Wellenleiter ist, d.h. weniger als die ersten 10 Moden einer vorgegebenen Polarisation einer eingestrahnten Anregungswellenlänge führen kann.
32. Optische Struktur nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass die optisch transparente Schicht (a) ein niedermodaler Wellenleiter ist, welcher nur 1 - 3 Moden einer vorgegebenen Polarisation einer eingestrahnten Anregungswellenlänge führen kann.
33. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 2 - 32, dadurch gekennzeichnet, dass das Material der optisch transparenten Schicht (b) aus Glas, Quarz oder einem

transparenten thermoplastischen oder spritzbaren Kunststoff, beispielsweise aus der Gruppe besteht, die von Polycarbonat, Polyimid, Polymethylmethacrylat, Polypropylen, Polystyrol, Polyethylen, Polyethylenterephthalat (PET) oder Polyurethan gebildet wird.

34. Optische-Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 33, dadurch gekennzeichnet, dass das Produkt aus der Dicke der Schicht (a) und ihrem Brechungsindex ein Zehntel bis ein Ganzes, bevorzugt ein Zehntel bis zwei Drittel, der Anregungswellenlänge eines in die Schicht (a) einzukoppelnden Anregungslichts beträgt.
35. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 10 - 34, dadurch gekennzeichnet, dass in der Schicht (a) modulierte Gitterstrukturen (c) eine Periode von 200 nm - 1000 nm aufweisen und ihre Modulationstiefe 3 bis 100 nm, bevorzugt 10 bis 30 nm beträgt.
36. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 10 - 35, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis von Modulationstiefe zur Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) gleich oder kleiner als 0,2 ist.
37. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 10 - 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) ein Reliefgitter mit Rechteck-, Dreieck- oder halbkreisförmigem Profil oder ein Phasen- oder Volumengitter mit einer periodischen Modulation des Brechungsindex in der im wesentlichen planaren optisch transparenten Schicht (a) ist.
38. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 37, dadurch gekennzeichnet, dass sie mit optisch oder mechanisch erkennbaren Markierungen zur Erleichterung der Justierung in einem optischen System und / oder zur Verbindung mit Probenbehältnissen als Teil eines analytischen Systems versehen ist.
39. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 38, dadurch gekennzeichnet, dass zur Immobilisierung biologischer oder biochemischer oder synthetischer Erkennungselemente (e) zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer

zugeführten Probe auf der optisch transparenten Schicht (a) eine Haftvermittlungsschicht (f) mit einer Stärke von vorzugsweise weniger als 200 nm, besonders bevorzugt von weniger als 20 nm aufgebracht ist, und dass die Haftvermittlungsschicht (f) vorzugsweise eine chemische Verbindung aus den Gruppen umfasst, die Silane, Epoxide, funktionalisierte, geladene oder polare Polymere und "selbstorganisierte funktionalisierte Monoschichten" umfasst.

40. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 39, dadurch gekennzeichnet, dass räumlich getrennte Messbereiche (d) durch räumlich selektive Aufbringung von biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf besagter Wellenleiter-Struktur erzeugt werden, vorzugsweise unter Verwendung eines oder mehrerer Verfahren aus der Gruppe von Verfahren, die von "Ink jet spotting, mechanischem Spotting, micro contact printing, fluidische Kontaktierung der Messbereiche mit den biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen durch deren Zufuhr in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen", gebildet wird.
41. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 40, dadurch gekennzeichnet, dass als besagte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente Komponenten aus der Gruppe aufgebracht werden, die von Nukleinsäuren (beispielsweise DNA, RNA, Oligonukleotiden) und Nukleinsäureanalogen (z. B. PNA), Antikörpern oder Antikörperfragmenten, Aptameren, membrangebundenen und isolierten Rezeptoren, deren Liganden, Antigenen für Antikörper, "Histidin-Tag-Komponenten", durch chemische Synthese erzeugte Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, natürlichen und künstlichen Polymeren, etc. gebildet wird, oder dass als biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente ganze Zellen oder Zellfragmente aufgebracht werden, wobei diese Erkennungselemente direkt auf der optischen Struktur oder vermittelt über eine Haftvermittlungsschicht nach Anspruch 39 auf der optischen Struktur aufgebracht werden.

42. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 40 - 41, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen den räumlich getrennten Messbereichen (d) gegenüber dem Analyten "chemisch neutrale" Verbindungen aufgebracht sind, vorzugsweise beispielsweise bestehend aus den Gruppen, die von Albuminen, insbesondere Rinderserumalbumin oder Humanserumalbumin, nicht mit zu analysierenden Polynukleotiden hybridisierender, fragmentierter natürlicher oder synthetischer DNA, wie beispielsweise von Herings- oder Lachssperma, oder auch ungeladenen, aber hydrophilen Polymeren, wie beispielsweise Polyethylenglycole oder Dextrane, gebildet werden.
43. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 40 - 42, dadurch gekennzeichnet, dass zwei oder mehrere räumlich getrennte Messbereiche jeweils zu Segmenten auf der optischen Struktur zusammengefasst sind und dass bevorzugt verschiedene Segmente zusätzlich durch eine aufgebrachte Berandung, welche zur fluidischen Abdichtung gegen Nachbarbereiche und / oder zu einer weiteren Verminderung optischen Übersprechens zwischen benachbarten Segmenten beiträgt, gegeneinander abgegrenzt sind.
44. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 40 - 43, dadurch gekennzeichnet, dass in einer 2-dimensionalen Anordnung bis zu 1 000 000 Messbereiche angeordnet sind und ein einzelner Messbereich eine Fläche von $0.001 - 6 \text{ nm}^2$ einnimmt.
45. Optisches System zur Multi-Photonen-Anregung, umfassend mindestens eine Anregungslichtquelle und eine optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 44, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

46. Optisches System zur Multi-Photonen-Anregung nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung zur Lumineszenz anzuregen.
47. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 - 46, dadurch gekennzeichnet, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über ein oder mehrere optische Einkoppelemente aus der Gruppe erfolgt, die von Prismenkopplern, evaneszenten Kopplern mit zusammengebrachten optischen Wellenleitern mit überlappenden evaneszenten Feldern, Stirnflächenkopplern mit vor einer Stirnseite der wellenleitenden Schicht angeordneten fokussierenden Linsen, vorzugsweise Zylinderlinsen, und Gitterkopplern gebildet wird.
48. Optisches System nach Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) erfolgt.
49. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 - 48, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagter optischer Struktur um eine planare Dünnschicht-Wellenleiter-Struktur handelt.
50. Optisches System nach Anspruch 49, umfassend mindestens eine Anregungslichtquelle und eine optische Struktur nach einem der Ansprüche 10 - 44, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) auf eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) der optischen Struktur eingestrahltten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) zumindest im Bereich der Gitterstruktur (c) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

60

51. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 - 50, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Multi-Photonen-Anregung um eine 2-Photonen-Anregung handelt.
52. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 - 51, dadurch gekennzeichnet, dass es ermöglicht, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle linienhaft, das heisst gleichzeitig längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts, mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.
53. Optisches System nach Anspruch 52, dadurch gekennzeichnet, dass es linienhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen längs einer Distanz von mindestens 5 mm, gerechnet vom Ort der Einkopplung des Anregungslichts in die Schicht (a), ermöglicht.
54. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 - 53, dadurch gekennzeichnet, dass es ermöglicht, unter Einstrahlung eines aufgeweiteten Anregungslichts, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle gleichzeitig flächenhaft längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.
55. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 - 54, dadurch gekennzeichnet, dass es gleichzeitige flächenhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen auf einer Fläche von mindestens 1 mm² ermöglicht.
56. Optisches System nach einem der Ansprüche 46 - 54, dadurch gekennzeichnet, dass eine auf oder im Nahfeld der Schicht (a) der optischen Struktur durch Multi-Photonen-Absorption erzeugte Lumineszenz mindestens teilweise in die Schicht (a)

einkoppelt und durch Leitung in der Schicht (a) zu benachbarten Bereichen auf besagter optischer Struktur geführt wird.

57. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 – 56, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich mindestens einen Detektor zur Erfassung einer oder mehrerer Lumineszenzen von der optischen Struktur umfasst.
58. Optisches System nach einem der Ansprüche 48 – 57, dadurch gekennzeichnet, dass das von der mindestens einen Anregungslichtquelle ausgesandte Anregungslicht im wesentlichen parallel ist und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird.
59. Optisches System nach einem der Ansprüche 48 – 58, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von mindestens einer Lichtquelle mit einer Aufweitungsoptik zu einem im wesentlichen parallelen Strahlenbündel aufgeweitet wird und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf eine grossflächige in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird.
60. Optisches System nach einem der Ansprüche 48 – 59, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von der mindestens einen Lichtquelle durch ein oder, im Falle mehrerer Lichtquellen, gegebenenfalls mehrere diffraktive optische Elemente, vorzugsweise Damman-Gitter, oder refraktive optische Elemente, vorzugsweise Mikrolinsen-Arrays, in eine Vielzahl von Einzelstrahlen möglichst gleicher Intensität der von einer gemeinsamen Lichtquelle stammenden Teilstrahlen zerlegt wird, welche jeweils im wesentlichen parallel zueinander auf Gitterstrukturen (c) unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) eingestrahlt werden.
61. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 – 60, dadurch gekennzeichnet, dass als Anregungslichtquellen zwei oder mehrere Lichtquellen mit gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden.

62. Optisches System nach Anspruch 61 mit einer optischen Struktur nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von 2 oder mehr Lichtquellen gleichzeitig oder sequentiell aus verschiedenen Richtungen auf eine Gitterstruktur (c) eingestrahlt und über diese in die Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelt wird, welche eine Überlagerung von Gitterstrukturen mit unterschiedlicher Periodizität umfasst.
63. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 - 62, dadurch gekennzeichnet, dass zur Detektion mindestens ein ortsauflösender Detektor verwendet wird, beispielsweise aus der Gruppe, die von CCD-Kameras, CCD-Chips, Photodioden-Arrays, Avalanche-Dioden-Arrays, Multichannelplates und Vielkanal-Photomultipliern gebildet wird.
64. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 - 63, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der einen oder mehreren Anregungslichtquellen und der optischen Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 44 und /oder zwischen besagter optischer Struktur und dem einen oder mehreren Detektoren optische Komponenten aus der Gruppe verwendet werden, die von Linsen oder Linsensystemen zur Formgestaltung der übertragenen Lichtbündel, planaren oder gekrümmten Spiegeln zur Umlenkung und gegebenenfalls zusätzlich zur Formgestaltung von Lichtbündeln, Prismen zur Umlenkung und gegebenenfalls zur spektralen Aufteilung von Lichtbündeln, dichroischen Spiegeln zur spektral selektiven Umlenkung von Teilen von Lichtbündeln, Neutralfiltern zur Regelung der übertragenen Lichtintensität, optischen Filtern oder Monochromatoren zur spektral selektiven Übertragung von Teilen von Lichtbündeln oder polarisationsselektiven Elementen zur Auswahl diskreter Polarisationsrichtungen des Anregungs- und / oder Lumineszenzlichts gebildet werden.
65. Optisches System nach einem der Ansprüche 46 - 64, dadurch gekennzeichnet, dass die Einstrahlung des Anregungslichts in Pulsen mit einer Dauer zwischen 1 fsec und

10 Minuten erfolgt und gegebenenfalls das Emissionslicht aus den Messbereichen zeitlich aufgelöst gemessen wird.

66. Optisches System nach einem der Ansprüche 46 - 65, dadurch gekennzeichnet, dass zur Referenzierung Lichtsignale aus der Gruppe gemessen werden, die von Anregungslicht am Ort der Lichtquellen oder nach ihrer Aufweitung oder nach ihrer Unterteilung in Teilstrahlen, Streulicht bei der Anregungswellenlänge aus dem Bereich der einen oder mehreren räumlich getrennten Messbereiche, und über die Gitterstruktur (c) neben den Messbereichen ausgekoppeltem Licht der Anregungswellenlänge gebildet werden.
67. Optisches System nach einem der Ansprüche 46 - 66, dadurch gekennzeichnet, dass die Messbereiche zur Bestimmung des Emissionslichts und eines Referenzsignals identisch sind.
68. Optisches System nach einem der Ansprüche 46 - 67, dadurch gekennzeichnet, dass die Einstrahlung des Anregungslichts auf und Detektion des Emissionslichts von einem oder mehreren Messbereichen sequentiell für einzelne oder mehrere Messbereiche erfolgt.
69. Optisches System nach Anspruch 68, dadurch gekennzeichnet, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung beweglicher optischer Komponenten erfolgt, die aus der Gruppe von Spiegeln, Umlenkprismen und dichroischen Spiegeln gebildet wird.
70. Optisches System nach Anspruch 69, dadurch gekennzeichnet, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung eines im wesentlichen winkel- und fokusgetreuen Scanners erfolgt.

71. Optisches System nach einem der Ansprüche 68 - 70, dadurch gekennzeichnet, dass die optische Struktur zwischen Schritten der sequentiellen Anregung und Detektion bewegt wird.
72. Verfahren zur Multi-Photonen-Anregung, unter Verwendung einer optischen Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 44 und / oder eines optischen Systems nach einem der Ansprüche 45 - 71, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.
73. Verfahren nach Anspruch 72, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) der optischen Struktur befindliche Moleküle photoreaktiv sind und durch Multi-Photonen-Anregung zu einer chemischen Reaktion angeregt werden.
74. Verfahren nach Anspruch 73, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) der optischen Struktur befindliche Moleküle durch Multi-Photonen-Anregung zu einer Bindung mit anderen Molekülen angeregt werden.
75. Verfahren nach Anspruch 74, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) der optischen Struktur befindliche Moleküle durch Multi-Photonen-Anregung zu einer Photopolymerisation angeregt werden.
76. Verfahren nach Anspruch 73, dadurch gekennzeichnet, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine

Photodissoziation, d.h. Aufspaltung eines bis zu der Multi-Photonen-Anregung bestehenden Moleküls oder molekularen Komplexes auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zu der Schicht (a) ausgelöst wird.

77. Verfahren zur Lumineszenzanregung, unter Verwendung einer optischen Struktur nach einem der Ansprüche 1 – 44 und / oder eines optischen Systems nach einem der Ansprüche 45 – 71, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung zur Lumineszenz anzuregen.
78. Verfahren zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten in einer oder mehreren Proben auf einem oder mehreren Messbereichen auf einer optischen Struktur nach einem der Ansprüche 39 – 44 zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen von einem Messbereich oder von einem Array aus mindestens zwei oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, auf besagter optischer Struktur, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung zur Lumineszenz anzuregen.
79. Verfahren nach einem der Ansprüche 72 - 78, dadurch gekennzeichnet, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über ein oder mehrere optische Einkoppelemente aus der Gruppe erfolgt, die von Prismenkopplern, evaneszenten Kopplern mit zusammengebrachten optischen Wellenleitern mit überlappenden evaneszenten Feldern, Stirnflächenkopplern mit vor einer Stirnseite der

wellenleitenden Schicht angeordneten fokussierenden Linsen, vorzugsweise Zylinderlinsen, und Gitterkopplern gebildet wird.

80. Verfahren nach einem der Ansprüche 72 – 79, dadurch gekennzeichnet, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) erfolgt.
81. Verfahren nach einem der Ansprüche 72 – 80, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der optischen Struktur um eine planare Dünnschicht-Wellenleiter-Struktur handelt.
82. Verfahren nach Anspruch 81 mit einer optischen Struktur umfassend einen planaren Dünnschicht-Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer in Schicht (a) modulierten Gitterstruktur (c), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) eingestrahlten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) zumindest im Bereich der Gitterstruktur (c) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.
83. Verfahren nach einem der Ansprüche 72 – 82, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Multi-Photonen-Anregung um eine 2-Photonen-Anregung handelt.
84. Verfahren nach einem der Ansprüche 72 – 83, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche der Schicht (a) der optischen Struktur oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle linienhaft, das heisst gleichzeitig längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts, mittels Multi-Photonen-Anregung angeregt werden können.

85. Verfahren nach Anspruch 84, dadurch gekennzeichnet, dass linienhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen längs einer Distanz von mindestens 5 mm, gerechnet vom Ort der Einkopplung des Anregungslichts in die Schicht (a), möglich ist.
86. Verfahren nach einem der Ansprüche 80 - 85, dadurch gekennzeichnet, dass, unter Einstrahlung eines aufgeweiteten Anregungslichts, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle gleichzeitig flächenhaft längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts mittels Multi-Photonen-Anregung angeregt werden können.
87. Verfahren nach einem der Ansprüche 72 - 86, dadurch gekennzeichnet, dass es gleichzeitige flächenhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen auf einer Fläche von mindestens 1 mm² ermöglicht.
88. Verfahren nach einem der Ansprüche 72 - 87, dadurch gekennzeichnet, dass es gleichzeitige flächenhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen auf einer Fläche von mindestens 1 cm² ermöglicht.
89. Verfahren nach einem der Ansprüche 80 - 88, dadurch gekennzeichnet, dass die optische Struktur gleichförmige, unmodulierte Bereiche der Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind.
90. Verfahren nach einem der Ansprüche 80 - 89, dadurch gekennzeichnet, dass die optische Struktur eine Vielzahl von Gitterstrukturen (c) gleicher oder unterschiedlicher Periode mit optional daran anschliessenden gleichförmigen,

unmodulierten Bereichen der Schicht (a) auf einem gemeinsamen, durchgehenden Substrat umfasst.

91. Verfahren nach einem der Ansprüche 80 – 90, dadurch gekennzeichnet, dass eine auf oder im Nahfeld der Schicht (a) der optischen Struktur durch Multi-Photonen-Absorption erzeugte Lumineszenz mindestens teilweise in die Schicht (a) einkoppelt und durch Leitung in der Schicht (a) zu benachbarten Bereichen auf besagter optischer Struktur geführt wird.
92. Verfahren nach einem der Ansprüche 77 - 91, dadurch gekennzeichnet, dass zur Erzeugung der Lumineszenz ein Lumineszenzfarbstoff oder lumineszentes Nanopartikel als Lumineszenzlabel verwendet wird, das bei einer Wellenlänge zwischen 200 nm und 1100 nm angeregt werden kann.
93. Verfahren nach Anspruch 92, dadurch gekennzeichnet, dass besagtes Lumineszenzlabel mittels 2-Photonen-Absorption angeregt wird.
94. Verfahren nach Anspruch 93, dadurch gekennzeichnet, dass besagtes Lumineszenzlabel durch 2-Photonen-Absorption eines Anregungslichts im Sichtbaren oder nahen Infraroten zu einer ultraviolethen oder blauen Lumineszenz angeregt wird.
95. Verfahren nach einem der Ansprüche 92 - 94, dadurch gekennzeichnet, dass das Lumineszenzlabel an den Analyten oder in einem kompetitiven Assay an einen Analog des Analyten oder in einem mehrstufigen Assay an einen der Bindungspartner der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen oder an die biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen gebunden ist.
96. Verfahren nach einem der Ansprüche 92 – 95, dadurch gekennzeichnet, dass ein zweites oder noch weitere Lumineszenzlabel mit gleicher oder unterschiedlicher

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

69

Anregungswellenlänge wie das erste Lumineszenzlabel und gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden.

97. Verfahren nach einem der Ansprüche 77 – 91, dadurch gekennzeichnet, dass die Eigenfluoreszenz („Autofluoreszenz“) fluoreszenzfähiger Biomoleküle, wie beispielsweise von Proteinen mit fluoreszenzfähigen Aminosäuren, mittels Multi-Photonen-Absorption angeregt wird.
98. Verfahren nach Anspruch 97, dadurch gekennzeichnet, dass besagte fluoreszenzfähigen Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe, die von Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin gebildet wird.
99. Verfahren nach einem der Ansprüche 77 – 98, dadurch gekennzeichnet, dass mithilfe einer mittels Multi-Photonen-Absorption angeregten Eigenlumineszenz (Eigen- oder Auto-Fluoreszenz) der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente deren Immobilisierungsdichte in den Messbereichen bestimmt wird.
100. Verfahren nach einem der Ansprüche 77 – 99, dadurch gekennzeichnet, dass das im Analytnachweis schritt (durch Multi-Photonen-Absorption oder auch Ein-Photonen-Absorption) angeregte Lumineszenzsignal des Analyten oder eines seiner Bindungspartner bezüglich der Anzahl oder Dichte der verfügbaren Bindungsstellen anhand der gemessenen, durch Multi-Photonen-Absorption angeregten Eigenlumineszenz der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente korrigiert bzw. normiert wird.
101. Verfahren nach einem der Ansprüche 77 – 100, dadurch gekennzeichnet, dass die einen oder mehreren Lumineszenzen und / oder Bestimmungen von Lichtsignalen bei der Anregungswellenlänge polarisationsselektiv vorgenommen werden, wobei vorzugsweise die einen oder mehreren Lumineszenzen bei einer anderen Polarisation als der des Anregungslichts gemessen werden.

102. Verfahren nach einem der Ansprüche 72 – 101, dadurch gekennzeichnet, dass während der Multi-Photonen-Anregung von an der Oberfläche der Schicht (a) oder innerhalb eines Abstandes von weniger als 200 nm von der Schicht (a) befindliche Moleküle innerhalb dieses Abstandes gefangen gehalten werden, indem die oberflächennahe hohe Anregungsintensität und deren ansteigender Gradient in Richtung der Oberfläche auf diese Moleküle den Effekt einer „optischen Pinzette“ („optical tweezers“) ausübt.
103. Verfahren nach einem der Ansprüche 72 – 102 zur gleichzeitigen und / oder sequentiellen, quantitativen und / oder qualitativen Bestimmung eines oder mehrerer Analyten aus der Gruppe von Antikörpern oder Antigenen, Rezeptoren oder Liganden, Chelatoren oder “Histidin-tag-Komponenten”, Oligonukleotiden, DNA- oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymfaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlehydraten.
104. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 72 – 103, dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchenden Proben natürlich vorkommende Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Lymphe oder Urin oder Eigelb oder optisch trübe Flüssigkeiten oder Oberflächenwasser oder Boden- oder Pflanzenextrakte oder Bio- oder Syntheseprozessbrühen oder aus biologischen Gewebeteilen entnommen sind.
105. Verwendung einer optischen Struktur nach einem der Ansprüche 1 – 44 und / oder eines optischen Systems nach einem der Ansprüche 45 – 71 und / oder eines Verfahrens nach mindestens einem der Ansprüche 72 – 104 zu quantitativen und / oder qualitativen Analysen zur Bestimmung chemischer, biochemischer oder biologischer Analyten in Screeningverfahren in der Pharmaforschung, der Kombinatorischen Chemie, der Klinischen und Präklinischen Entwicklung, zu Echtzeitbindungsstudien und zur Bestimmung kinetischer Parameter im Affinitätscreening und in der Forschung, zu qualitativen und quantitativen

Analytbestimmungen, insbesondere für die DNA- und RNA-Analytik, für die Erstellung von Toxizitätsstudien sowie für die Bestimmung von Expressionsprofilen sowie zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Pathogenen oder Bakterien in der pharmazeutischen Produktentwicklung und -forschung, der Human- und Veterinärmedizin, der Agrochemischen Produktentwicklung und -forschung, der symptomatischen und präsymptomatischen Pflanzendiagnostik, zur Patientenstratifikation in der pharmazeutischen Produktentwicklung und für die therapeutische Medikamentenauswahl, zum Nachweis von Pathogenen, Schadstoffen und Erregern, insbesondere von Salmonellen, Prionen und Bakterien, in der Lebensmittel- und Umweltanalytik.

106. Verwendung einer optischen Struktur nach einem der Ansprüche 1 – 44 und / oder eines optischen Systems nach einem der Ansprüche 45 – 71 und / oder eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 72 – 104 für oberflächengebundene Untersuchungen, welche den Einsatz sehr hoher Anregungslichtintensitäten und / oder Anregungsdauern und / oder Mehr-Photonen-Anregung erfordern, wie beispielsweise Untersuchungen der photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften insbesondere neuer Materialien, Studien zur Photostabilität von Materialien, photokatalytische Prozesse etc.

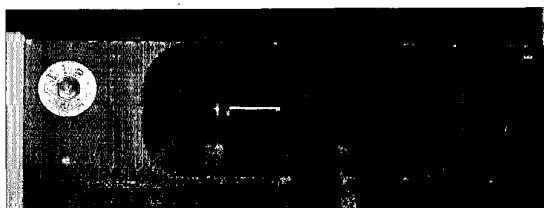


Fig. 1

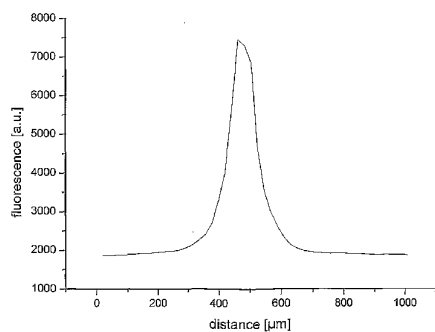


Fig. 2

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

2 / 3

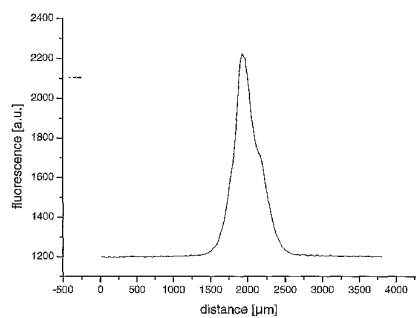


Fig. 3

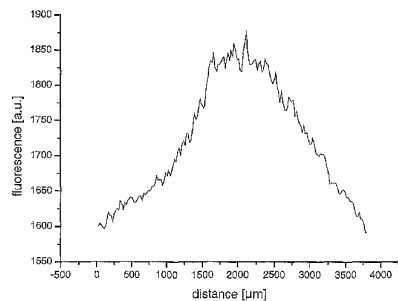


Fig. 4

WO 02/079765

PCT/EP02/02958

3 / 3

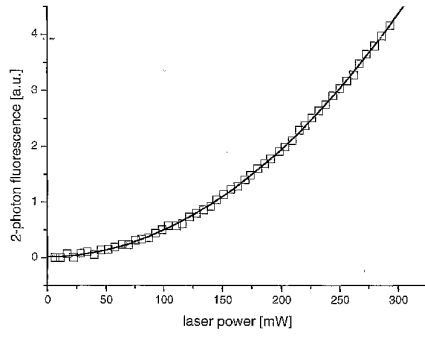


Fig. 5

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. Oktober 2002 (10.10.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/079765 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 21/77, MAROWSKY, Gerd [DE/DE]; Mühlspielweg 19, 37077
21/85, 21/64, G02B 6/34 Göttingen (DU).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/02958 (74) Gemeinsamer Vertreter: ZEPTOSENS AG; Benken-
strasse 254, CH-4108 Witterswil (CH).

(22) Internationales Anmeldedatum: 18. März 2002 (18.03.2002) (81) Bestimmungsstaaten (national): AT, AG, AI., AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

(25) Einreichungssprache: Deutsch CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, GR, HU, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ,

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch LG, LK, LR, LS, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,

(30) Angaben zur Priorität: 0617/01 2. April 2001 (02.04.2001) CH (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GI,
0689/01 12. April 2001 (12.04.2001) CH GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): ZEPTOSENS AG [CH/CH]; Benkenstrasse 254,
CH-4108 Witterswil (CH).

(72) Erfinder: und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DUVENECK, Gert,
L. [D/DE]; Lzmattenweg 34, 79189 Bad Krozingen
(DE). BOPP, Martin, A. [CH/CH]; Brunnmatstrasse
5, CH-4053 Basel (CH). PAWLAK, Michael [DE/DE];
Andelsbachstrasse 5, 79225 Laufenburg (DE). EHRAT,
Markus [CH/CH]; Im Bätli 6, CH-4312 Magden (CH).

Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 30. Januar 2003

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: OPTICAL STRUCTURE FOR MULTI-PHOTON EXCITATION AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: OPTISCHE STRUKTUR ZUR MULTI-PHOTONEN-ANREGUNG UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to a variable embodiment of an optical structure, comprising an optical waveguide with a wave-guiding layer (a) that is transparent at least one excitation wavelength. Said optical structure is characterised in that the intensity of excitation light that is input into the layer (a) and guided through said layer (a) is sufficiently high on and in said layer (a) to excite molecules capable of luminescence and/or photoreactive molecules located on the surface of the layer (a) or at a distance of less than 200 nm from the latter (a), by means of multi-photon excitation, preferably two-photon excitation. Preferred embodiments are those which allow a linear or planar multi-photon excitation along the excitation light that is guided through the layer (a). The invention also relates to various embodiments of optical systems and analytical systems comprising an excitation light source and an inventive embodiment of an optical structure and to methods based thereon, in particular to luminescence excitation and to the luminescent detection of one or several analytes by means of multi-photon excitation, in addition to the use of said embodiments and methods.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine variable Ausführungsform einer optischen Struktur, umfassend einen optischen Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die Schicht (a) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche, lumineszenzfähige und/oder photoreaktive Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung, vorzugsweise 2-Photonen-Anregung, anzuregen. Bevorzugt sind dabei solche Ausführungsformen, welche eine linienhafte oder flächenhafte Multi-Photonen-Anregung, längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts, ermöglichen. Die Erfindung betrifft auch verschiedene Ausführungsformen optischer Systeme und analytischer Systeme mit einer Anregungslichtquelle und einer erfindungsgemässen Ausführung einer optischer Struktur sowie darauf basierende Verfahren, insbesondere zur Lumineszenzanregung sowie zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten mittels Multi-Photonen-Anregung, sowie deren Verwendung.



WO 02/079765 A3

WO 02/079765 A3



*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 02/02958
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N21/77 G01N21/55 G01N21/64 G02B6/34		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G02B G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, COMPENDEX, PAJ, WPI Data, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00 75644 A (ABEL ANDREAS P ;EHRAT MARKUS (CH); ZEPTOSENS AG (CH); NEUSCHAEFER) 14 December 2000 (2000-12-14)	1, 2, 8-13, 16-19, 22-36, 38-60, 63-72, 77-83, 86-88, 91, 92, 95, 96, 103-106
A	claims 1-66 --- -/-	93, 94, 97
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 September 2002		Date of mailing of the international search report 08/10/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5316 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Verdoedt, E

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 02/02958

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>GRYCZYNSKI I ET AL: "TWO-PHOTON EXCITATION BY THE EVANESCENT WAVE FROM TOTAL INTERNAL REFLECTION" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 247, no. 1, 5 April 1997 (1997-04-05), pages 69-76, XP001008562 ISSN: 0003-2697</p> <p>page 74, left-hand column, line 8 - line 11 page 71, left-hand column, last paragraph right-hand column, line 2 abstract</p>	<p>1,2, 8-13, 16-19, 22-36, 38-60, 63-72, 77-83, 86-88, 91-92, 95-96, 103-106</p>
A	<p>DUVENECK G L ET AL: "Novel bioaffinity sensors for trace analysis based on luminescence excitation by planar waveguides" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, vol. 38, no. 1-3, 1997, pages 88-95, XP004083676 ISSN: 0925-4005 the whole document</p>	1-106
A	<p>WO 95 33197 A (CIBA GEIGY AG ;DUVENECK GERT L (DE); NEUSCHAEFER DIETER (CH); EHRA) 7 December 1995 (1995-12-07) the whole document</p>	1-106
P,X	<p>WO 01 79821 A (BOPP MARTIN ;EHRAT MARKUS (CH); ZEPTOSENS AG (CH); DUVENECK GERT ()) 25 October 2001 (2001-10-25) the whole document</p>	1-106

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 02/02958

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0075644 A	14-12-2000	AU 5526500 A	28-12-2000
		WO 0075644 A1	14-12-2000
		EP 1190236 A1	27-03-2002
		US 2002074513 A1	20-06-2002
WO 9533197 A	07-12-1995	AT 172300 T	15-10-1998
		AT 216491 T	15-05-2002
		AU 2317995 A	21-12-1995
		AU 689604 B2	02-04-1998
		AU 2734695 A	21-12-1995
		CA 2190362 A1	07-12-1995
		CN 1149335 A	07-05-1997
		CN 1149336 A	07-05-1997
		CZ 9603471 A3	11-06-1997
		CZ 9603472 A3	12-03-1997
		DE 69505370 D1	19-11-1998
		DE 69505370 T2	01-04-1999
		DE 69526438 D1	23-05-2002
		DK 760944 T3	05-08-2002
		WO 9533197 A1	07-12-1995
		EP 0759159 A1	26-02-1997
		EP 0760944 A1	12-03-1997
		FI 964664 A	24-01-1997
		FI 964684 A	27-01-1997
		HU 76407 A2	28-08-1997
		HU 76406 A2	28-08-1997
		WO 9533198 A1	07-12-1995
		JP 10501616 T	10-02-1998
		JP 10501617 T	10-02-1998
		PL 317379 A1	01-04-1997
		PL 317402 A1	14-04-1997
		SK 151296 A3	09-07-1997
		SK 151396 A3	09-07-1997
		US 5959292 A	28-09-1999
		US 5822472 A	13-10-1998
ZA 9504325 A	27-11-1995		
ZA 9504327 A	27-11-1995		
WO 0179821 A	25-10-2001	AU 6217801 A	30-10-2001
		WO 0179821 A1	25-10-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/EP 02/02958
A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N21/77 G01N21/55 G01N21/64 G02B6/34		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G02B G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, COMPENDEX, PAJ, WPI Data, INSPEC		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bez. Anspruch Nr.
Y	WO 00 75644 A (ABEL ANDREAS P ;EHRAT MARKUS (CH); ZEPTOSENS AG (CH); NEUSCHAEFER) 14. Dezember 2000 (2000-12-14)	1, 2, 8-13, 16-19, 22-36, 38-60, 63-72, 77-83, 86-88, 91, 92, 95, 96, 103-106
A	Ansprüche 1-66 --- -/--	93, 94, 97
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders herausragend anzusehen ist *C* ältestes Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie angegeben) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht korrespondiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts
25. September 2002		08/10/2002
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5019 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-3040, Fax. (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Verdoodt, E

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1995)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/02958

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Behr. Anspruch Nr.
Y	<p>GRYCZYNSKI I ET AL: "TWO-PHOTON EXCITATION BY THE EVANESCENT WAVE FROM TOTAL INTERNAL REFLECTION" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, Bd. 247, Nr. 1, 5. April 1997 (1997-04-05), Seiten 69-76, XP001008562 ISSN: 0003-2697</p> <p>Seite 74, linke Spalte, Zeile 8 - Zeile 11 Seite 71, linke Spalte, letzter Absatz - rechte Spalte, Zeile 2 Zusammenfassung</p>	<p>1,2, 8-13, 16-19, 22-36, 38-60, 63-72, 77-83, 86-88, 91,92, 95,96, 103-106</p>
A	<p>DUVENECK G L ET AL: "Novel bioaffinity sensors for trace analysis based on luminescence excitation by planar waveguides" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, Bd. 38, Nr. 1-3, 1997, Seiten 88-95, XP004083676 ISSN: 0925-4005 das ganze Dokument</p>	1-106
A	<p>WO 95 33197 A (CIBA GEIGY AG ;DUVENECK GERT L (DE); NEUSCHAEFER DIETER (CH); EHRA) 7. Dezember 1995 (1995-12-07) das ganze Dokument</p>	1-106
P,X	<p>WO 01 79821 A (BOPP MARTIN ;EHRAT MARKUS (CH); ZEPTOSENS AG (CH); DUVENECK GERT ()) 25. Oktober 2001 (2001-10-25) das ganze Dokument</p>	1-106

1

Formblatt PCT/ISA210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1995)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Abkürzungen

PCT/EP 02/02958

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0075644 A	14-12-2000	AU 5526500 A	28-12-2000
		WO 0075644 A1	14-12-2000
		EP 1190236 A1	27-03-2002
		US 2002074513 A1	20-06-2002
WO 9533197 A	07-12-1995	AT 172300 T	15-10-1998
		AT 216491 T	15-05-2002
		AU 2317995 A	21-12-1995
		AU 689604 B2	02-04-1998
		AU 2734695 A	21-12-1995
		CA 2190362 A1	07-12-1995
		CN 1149335 A	07-05-1997
		CN 1149336 A	07-05-1997
		CZ 9603471 A3	11-06-1997
		CZ 9603472 A3	12-03-1997
		DE 69505370 D1	19-11-1998
		DE 69505370 T2	01-04-1999
		DE 69526438 D1	23-05-2002
		DK 760944 T3	05-08-2002
		WO 9533197 A1	07-12-1995
		EP 0759159 A1	26-02-1997
		EP 0760944 A1	12-03-1997
		FI 964664 A	24-01-1997
		FI 964684 A	27-01-1997
		HU 76407 A2	28-08-1997
		HU 76406 A2	28-08-1997
		WO 9533198 A1	07-12-1995
		JP 10501616 T	10-02-1998
		JP 10501617 T	10-02-1998
		PL 317379 A1	01-04-1997
		PL 317402 A1	14-04-1997
		SK 151296 A3	09-07-1997
		SK 151396 A3	09-07-1997
US 5959292 A	28-09-1999		
US 5822472 A	13-10-1998		
ZA 9504325 A	27-11-1995		
ZA 9504327 A	27-11-1995		
WO 0179821 A	25-10-2001	AU 6217801 A	30-10-2001
		WO 0179821 A1	25-10-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 27/64	G 0 1 N 21/64	G
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 21/75	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 27/62	K
G 0 1 N 33/532	G 0 1 N 27/62	V
	G 0 1 N 27/64	B
	G 0 1 N 33/15	Z
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/532	B

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ボップ, マルティン・アー
 スイス国、ツェーハー - 4 0 5 3 バーゼル、ブルンマツトシュトラッセ 5

(72) 発明者 パウラク, ミヒャエル
 ドイツ国、7 9 2 2 5 ローフェンブルク、アンデルスバッハシュトラッセ 5

(72) 発明者 エーラート, マルクス
 スイス国、ツェーハー - 4 3 1 2 マグデン、イム・ブリューエル 6

(72) 発明者 マロースキー, ゲルト
 ドイツ国、3 7 0 7 7 ゲッティンゲン、ミュールシュピュールヴェーク 1 9

F ターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA03 DA02 DA06 EA01 FA03 FA06 GA03 GB02
 GB16 HA01 HA02 HA03 HA05 HA07 JA02 JA04 JA05 KA01
 KA02 KA03 KA08 LA02 LA03 MA01
 2G054 AA02 AA07 AA08 AB04 CA27 EA03 FA16 FA18 FA27 GB10

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004530125A5	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2002577546	申请日	2002-03-18
[标]申请(专利权)人(译)	ZEPTOSENS		
申请(专利权)人(译)	Tsueputozensu股份公司		
[标]发明人	ドゥフェネクゲルトエル ポップマルティンアー パウラクミヒャエル エーラートマルクス マロースキーゲルト		
发明人	ドゥフェネク,ゲルト・エル ポップ,マルティン・アー パウラク,ミヒャエル エーラート,マルクス マロースキー,ゲルト		
IPC分类号	G01N27/62 G01N13/14 G01N21/55 G01N21/64 G01N21/75 G01N21/77 G01N21/78 G01N27/64 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/532 G02B6/12		
CPC分类号	G01N21/648 G01N21/552 G01N21/6428 G01N21/774 G01N2021/6419 G01N2021/7709 G01N2021/7786 G01N2021/7793 G02B2006/12107		
FI分类号	G01N21/78.ZCC.C G01N13/14.A G01N21/64.A G01N21/64.B G01N21/64.F G01N21/64.G G01N21/75.Z G01N27/62.K G01N27/62.V G01N27/64.B G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/532.B		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/CA03 2G043/DA02 2G043/DA06 2G043/EA01 2G043/FA03 2G043/FA06 2G043/GA03 2G043/GB02 2G043/GB16 2G043/HA01 2G043/HA02 2G043/HA03 2G043/HA05 2G043/HA07 2G043/JA02 2G043/JA04 2G043/JA05 2G043/KA01 2G043/KA02 2G043/KA03 2G043/KA08 2G043/LA02 2G043/LA03 2G043/MA01 2G054/AA02 2G054/AA07 2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/CA27 2G054/EA03 2G054/FA16 2G054/FA18 2G054/FA27 2G054/GB10		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	2001000617 2001-04-02 CH 2001000689 2001-04-12 CH		
其他公开文献	JP2004530125A		

摘要(译)

本发明涉及一种光学结构的可变实施例，该光学结构包括具有波导层 (a) 的光波导，该波导层在至少一个激发波长下是透明的。光学结构的特征在于，输入层 (a) 并在层 (a) 中引导的激发光的强度施加到层 (a) 上和层 (a) 中的层的表面上。位于距后者 (a) 小于200nm的距离的发光分子和/或光反应分子被转换成多光子激发，优选双光子激发。因此，它的特点是足够高以激发。优选实施例是允许沿层 (a) 中感应的激发光线性或平面多光子激发的实施例。本发明还涉及包括激发光源和分析系统的光学系统的各种实施例，以及光学结构的新颖实施例和基于其的方法，特别是通过多光子激发的一种或多种分析物的发光激发。和发光检测，以及所述实施方案和方法的使用。

