

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 899 225**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

B82Y 30/00 (2011.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2016 PCT/EP2016/071953**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2017 WO17046320**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2016 E 16766311 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.08.2021 EP 3350597**

54 Título: **Utilización de sustratos para reforzar la fluorescencia**

30 Prioridad:

16.09.2015 AT 507932015

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

10.03.2022

73 Titular/es:

**FIANOSTICS GMBH (50.0%)
Viktor-Kaplan-Straße 2
2700 Wiener Neustadt, AT y
STRATEC CONSUMABLES GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MAURACHER, CHRISTOPH;
BAUER, GEORG;
PRINZ, ADRIAN;
AICHINGER, GOTTFRIED y
HAWA, GERHARD**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 899 225 T3

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

DESCRIPCIÓN

Utilización de sustratos para reforzar la fluorescencia

La presente invención se refiere al empleo de superficies nano-estructuradas que son apropiadas de modo especialmente ventajoso para reforzar la fluorescencia de moléculas apropiadas en la aproximación de estas moléculas a estas superficies. Este efecto se conoce también como fluorescencia reforzada por metal (MEF, "Metal Enhanced Fluorescence") o fluorescencia reforzada en superficie (SEF, "Surface Enhanced Fluorescence").

MEF y SEF se basan en una interacción electromagnética de la luz incidente (de excitación), casi siempre coherente (es decir, láser) con el plasma de electrones de estructuras nanometálicas. Esto conduce a un refuerzo del rendimiento lumínico de moléculas fluorescentes en su aproximación (por ejemplo enlace) a una superficie que presenta tales estructuras metálicas. De este modo, las moléculas unidas a la superficie brillan más intensamente, ya que se refuerza su fluorescencia.

Mediante el refuerzo de la fluorescencia se pueden medir moléculas unidas a su superficie en concentraciones mínimas. A modo de ejemplo, se puede seguir directamente el enlace de un anticuerpo con marcaje fluorescente en forma de su cinética de enlace.

La medida del refuerzo es dependiente de la forma, el tamaño y la distancia de las estructuras nanometálicas y del tipo de metal empleado (por ejemplo Au, Ag, Al, etc.). De este modo, en la bibliografía se encuentran descripciones de estructuras metálicas esféricas (frecuentemente coloides, véase, por ejemplo, B Yang et al Small 6(2010):1038-43; Corrigan T et al J Fluorescence 15(2005):777-784) triangulares, o bien piramidales (véase, por ejemplo, Pompea et al. Nature Nanotechnology 1(2006):126 - 130; Cade et al. Nanotechnology. 15(2009):20(28)) o en forma de alambre, o bien varilla, que no son cohesivas y forman las denominadas islas metálicas. No obstante, los factores de refuerzo obtenidos oscilan en gran medida y las estructuras nanometálicas no son reproducibles en la mayor parte de los casos.

En el documento US 2005/214841 se describen sustratos que presentan un gran número de depresiones y están revestidos con un metal al menos parcialmente. El sustrato puede estar constituido por los más diversos materiales, como por ejemplo vidrio, cerámica o metal. Sobre la superficie del sustrato según el documento US 2005/214841, en especial en sus depresiones, se aplican engarces que pueden inmovilizar sustancias biológicas debido a sus grupos funcionales. En esta solicitud US no se menciona que los sustratos descritos en ella refuerzan la fluorescencia de moléculas.

En el documento US 6,902,705 se describen sustratos que pueden estar comprender asimismo depresiones y estar revestidos con un metal (por ejemplo oro). La superficie de los sustratos se modifica para posibilitar el enlace de moléculas biológicas (por ejemplo ADN) en la superficie del sustrato. La previsión de depresiones en el sustrato parece tener la ventaja de que de este modo se pueden realizar medidas de fluorescencia sin recibir señales molestas e interferentes. No obstante, con estos sustratos no se puede obtener un refuerzo de la señal de fluorescencia.

En el documento WO 2009/059204 se dan a conocer sustratos que se pueden emplear para el refuerzo de la fluorescencia de unas o varias moléculas fluorescentes. La superficie de estos sustratos puede presentar depresiones en las que se pueden introducir las moléculas a detectar.

En el documento WO 2007/094817 se describen elementos con los que se puede reforzar la fluorescencia de moléculas fluorescentes y que comprenden un sustrato revestido con una capa metálica. La capa metálica presenta al menos una depresión y un grosor de aproximadamente 100 nm. Las depresiones dadas a conocer en este documento tienen un diámetro de aproximadamente 200 nm y una profundidad de 150 nm.

En Liu Y et al. (Nanotechn 15 (2004):1368-1374) se describen biosensores que presentan depresiones en su superficie y pueden reforzar la fluorescencia de moléculas fluorescentes en su superficie. El diámetro de estas depresiones se indica con aproximadamente 200 nm, la distancia de las depresiones entre sí se indica con aproximadamente 1 μ m. De modo comparable con Liu Y et al., también en Liu Y et al. (Opt Lett 28(2003): 507-509), Brolo AG et al. (J Am Chem Soc 127(2005):14936-14941) y Schmidt TM et al. (J Phys Chem 118(2014):2138-2145) se indican sustratos comparables.

En Gartia MR et al. (Adv Optical Mater 1 (2013):68-76) se dan a conocer matrices en cuya superficie están dispuestas "nanocopas de ligurco" ("Nano Lygurgus Cups"). Estas matrices se pueden emplear para resonancia por plasmones de imagen colorimétrica ("colorimetric plasmon resonance imaging"). En la publicación publicada más tarde Seo S et al. (J Phys Chem C 119(2015):18518-18526) se sostiene que se puede recurrir a los sustratos descritos en Gartia MR et al. para el refuerzo de la fluorescencia.

La presente invención se refiere al empleo de un sustrato para el refuerzo de la fluorescencia de una o varias moléculas fluorescentes, comprendiendo el sustrato un soporte polimérico sólido con un gran número de depresiones separadas entre sí y estando revestido el soporte sólido al menos parcialmente con plata o aleaciones

que comprenden plata, presentando las depresiones una distancia entre sí de 0,2 μm a 2,5 μm y una profundidad de 0,1 μm a 5 μm , y presentando la capa metálica en el soporte sólido un grosor de 10 nm a 60 nm.

Sorprendentemente se ha demostrado que los sustratos con la estructura según la invención pueden aumentar significativamente el rendimiento de fluorescencia (rendimiento cuántico) de una molécula fluorescente, o bien de un fluoróforo, con y sin empleo de luz coherente si la al menos una molécula fluorescente, o bien fluoróforo, se encuentra en la proximidad (fluorescencia reforzada por metal; MEF). Se entiende por “rendimiento de fluorescencia”, o bien “rendimiento cuántico” la relación entre el número de fotones emitidos y absorbidos.

El rendimiento de fluorescencia con los sustratos es incluso más elevado en un múltiplo que el rendimiento bajo empleo de sustratos conocidos hasta el momento, en cuya superficie se encuentran generalmente islas metálicas. Este aumento en el rendimiento de fluorescencia es sorprendente en el sentido de que hasta el momento se partía de que el efecto MEF solo se puede realizar en superficies que presentan islas metálicas en formas de coloides depositados que contienen metal u otras zonas revestidas con metal aisladas entre sí en una superficie (Matveeva E. et al., *Anal Biochem*_334 (2004):303-11; Geddes CD., et al. *J Fluoresc* 12 (2002):121-129). Los sustratos con una capa metálica continua, o bien sin elevaciones, son conocidos por no mostrar o mostrar un efecto MEF muy reducido debido a un efecto de extinción de fluorescencia de la propia superficie metálica (Pineda E.C., et al. *J. Chem. Phys.* 83(1985):5330-5337; Barnes W.L., *J Mod Opt*, 45(1998):661-699). Por este motivo, un especialista –sin conocimiento de la presente invención– habría seleccionado un soporte sólido con elevaciones y no un soporte sólido con depresiones para el revestimiento con un metal.

Según la invención, el sustrato se emplea para el refuerzo de la fluorescencia de fluoróforos. Es decir, según la invención, los sustratos se aplican donde se desea el refuerzo de la fluorescencia (es decir, un aumento del rendimiento de fluorescencia). Por lo tanto, el sustrato se puede emplear en inmunoensayos, cualquier forma de diagnóstico molecular por medio de ácidos nucleicos (PCR, RT-PCR), bioensayos basados en células (como se presentan frecuentemente en High-Throughput-Screening (prueba de alto rendimiento), investigaciones histológicas o celulares, sistemas de ensayo de multiplexación (por ejemplo LUMINEX), si se emplea fluorescencia para la identificación de moléculas objetivo.

Según una forma preferente de realización de la presente invención, el refuerzo de la fluorescencia se efectúa a una distancia de 0 a 50 nm, preferentemente de 1 a 50 nm, de modo aún más preferente de 1 a 40 nm, de modo aún más preferente de 2 a 40 nm, de modo aún más preferente de 1 a 30 nm, de modo aún más preferente de 2 a 30 nm, de modo aún más preferente de 3 a 30 nm, de modo aún más preferente de 1 a 20 nm, de modo aún más preferente de 2 a 20 nm, de modo aún más preferente de 3 a 20 nm, de modo aún más preferente de 5 a 20 nm, de modo aún más preferente de 5 a 15 nm respecto al metal que se encuentra en la superficie del sustrato sólido polimérico.

Se encuentran en la categoría de “moléculas fluorescentes”, como se emplean en este caso, moléculas según la invención que emiten espontáneamente luz, como por ejemplo luz de una determinada longitud de onda, tras excitación mediante ondas electromagnéticas. A este respecto “fluoróforos” es un concepto genérico y un sinónimo de tales moléculas y, por consiguiente, comprende también moléculas que son fluorescentes, o bien ligeramente fluorescentes, y que no se denominan fluoróforos en la mayor parte de los casos. Son ejemplos de tales moléculas proteínas o ácidos nucleicos cuya fluorescencia (“fluorescencia intrínseca”) se aporta a través de estructuras aromáticas (por ejemplo a través de los ácidos nucleicos triptófano o tirosina).

Según la invención, el “soporte sólido” puede estar constituido por cualquier material polimérico, siempre que este se pueda revestir con un metal o siempre que se puedan generar depresiones. A modo de ejemplo, el soporte sólido polimérico comprende o está constituido por polímeros sintéticos como poliestireno, cloruro de polivinilo o policarbonato, cicloolefina, metacrilato de polimetilo, polilactato o combinaciones de estos. En principio, también serían empleables soportes no poliméricos como metales, cerámicas o también vidrio, siempre que estos se puedan revestir con un metal y siempre que se puedan generar depresiones.

El soporte sólido comprende al menos un material seleccionado a partir del grupo constituido por el grupo de polímeros termoplásticos y de policondensados.

Según una forma preferente de realización de la presente invención, el polímero termoplástico se selecciona a partir del grupo constituido por poliolefinas, polímeros vinílicos, polímeros de estireno, poliacrílatos, polivinilcarbazol, poliactal y plásticos fluorados.

El policondensado se selecciona preferentemente a partir del grupo constituido por policondensados termoplásticos, policondensados duroplásticos y poliaductos.

Según una forma especialmente preferente de realización de la presente invención, el material del soporte polimérico sólido comprende aditivos y/o materiales de relleno orgánicos y/o inorgánicos, seleccionándose estos preferentemente a partir del grupo constituido por TiO_2 , vidrio, carbono, pigmentos colorantes, lípidos y ceras.

Un sustrato para el refuerzo de la fluorescencia de un fluoróforo se puede producir conforme a un procedimiento según la presente divulgación.

Los soportes sólidos, incluyendo depresiones, se pueden producir en principio con diferentes procedimientos (véase la Fig. 15).

- (a) Los soportes sólidos se fabrican con todas las depresiones en un paso (por ejemplo moldeo por inyección) (véase la Fig. 15(a)).
- (b) Las depresiones se introducen en un soporte sólido existente en pasos de proceso adicionales (por ejemplo estampado en caliente, litografía de haz de electrones o "Extreme Ultra Violet" (EUV) en combinación con corrosión iónica o ablación por láser) (véase la Fig. 15 (b)).
- (c) Sobre un soporte sólido se aplica una capa polimérica estructurable en la que se introducen las depresiones, como por ejemplo en la producción de BD-50 Blu-ray Disc (litografía de nanoimpresión UV) (véase la Fig. 15 (c)).

También se aplica de modo especialmente preferente para la producción de estas estructuras la denominada litografía de nanoestampado (Chou S. et al., Nanoimprint lithography, Journal of Vacuum Science & Technology B volumen 14, nº. 6, 1996, páginas 4129-4133). Para la producción de nanoestructuras por medio de litografía de nanoestampado se requiere un positivo, en la mayor parte de los casos un monómero o polímero, así como un sello nanoestructurado ("maestro"). El sello en sí se puede producir mediante nanolitografía, pudiéndose producir este alternativamente también mediante corrosión. El positivo se aplica sobre un sustrato y a continuación se calienta por encima de la temperatura de transición vítrea, es decir, se licúa, antes de imprimir el sello. Para conseguir un calentamiento controlable (y breve), frecuentemente se emplea láser, o bien luz UV. Debido a la viscosidad del positivo en el calentamiento, los espacios intermedios del sello se llenan completamente de este modo. Tras el enfriamiento se retira de nuevo el sello. El positivo, que representa al soporte sólido del sustrato, se reviste con metal por medio del procedimiento de pulverización catódica.

La estructuración del sello para la litografía se puede efectuar a su vez con nanoimpresión. En este caso se emplea vidrio o plástico transparente como materiales.

Es especialmente preferente la producción del soporte sólido, incluyendo depresiones, por medio de moldeo por inyección. Los insertos de molde a tal efecto se extraen típicamente por medio de galvanotecnia de Ni de una oblea de Si producida mediante litografía.

El soporte sólido puede presentar en principio cualquier forma (por ejemplo esférica, plana), siendo especialmente preferente una forma plana.

Una "depresión", como se emplea en este caso, se refiere al nivel de la superficie del soporte sólido que rodea la depresión, y se extiende en el soporte y no fuera de este como una elevación o un aumento. Una depresión en el sentido de la presente invención presenta un fondo, que está limitado por medio de las paredes laterales. Por consiguiente, la profundidad es la distancia de la superficie hasta un fondo de la depresión. Las depresiones en el soporte sólido pueden presentar diferentes formas (por ejemplo redonda, ovalada, cuadrada, rectangular).

Un "gran número" de depresiones, como se emplea en este caso, significa que el soporte sólido presenta al menos una, preferentemente al menos dos, de modo aún más preferente al menos 5, de modo aún más preferente al menos 10, de modo aún más preferente al menos 20, de modo aún más preferente al menos 30, de modo aún más preferente al menos 50, de modo aún más preferente al menos 100, de modo aún más preferente al menos 150, de modo aún más preferente al menos 200 depresiones. Estas depresiones pueden estar previstas en un área del soporte sólido de 1000 μm^2 , preferentemente de 500 μm^2 , de modo aún más preferente de 200 μm^2 , de modo aún más preferente de 100 μm^2 . De manera alternativa, las depresiones se pueden extender a lo largo de una longitud preferentemente de 1000 μm , de modo aún más preferente de 500 μm , de modo aún más preferente de 200 μm , de modo aún más preferente de 100 μm .

"Depresiones separadas entre sí", como se emplea en este caso, significa que las depresiones se pueden separar entre sí mediante sus límites laterales y no presentan una unión respectivamente, tampoco en la superficie del soporte sólido.

Según una forma preferente de realización de la presente invención, las depresiones del soporte sólido presentan una longitud y una anchura, ascendiendo la relación de longitud respecto a anchura a 2:1 hasta 1:2, en especial aproximadamente 1:1.

Las depresiones en el soporte sólido pueden presentar en principio cualquier forma. No obstante, son especialmente preferentes depresiones que presentan una relación de longitud respecto a anchura de 2:1 a 1:2, preferentemente 1,8:1, preferentemente 1,6:1, preferentemente 1,5:1, preferentemente 1,4:1, preferentemente 1,3:1, preferentemente 1,2:1, preferentemente 1,1:1, preferentemente 1:1,8, preferentemente 1:1,6, preferentemente 1:1,5, preferentemente 1:1,4, preferentemente 1:1,3, preferentemente 1:1,2, preferentemente 1:1,1, en especial 1:1.

Según otra forma preferente de realización de la presente invención, la longitud y la anchura de las depresiones asciende a 0,1 μm hasta 2 μm , preferentemente 0,2 μm a 2 μm , preferentemente 0,3 μm a 2 μm , preferentemente 0,1 μm a 1,8 μm , preferentemente 0,2 μm a 1,8 μm , preferentemente 0,3 μm a 1,8 μm , preferentemente 0,1 μm a 1,5 μm , preferentemente 0,2 μm a 1,5 μm , preferentemente 0,3 μm a 1,5 μm , preferentemente 0,1 μm a 1,2 μm ,

preferentemente 0,2 μm a 1,2 μm , preferentemente 0,2 μm a 1,2 μm , preferentemente 0,1 μm a 1 μm , preferentemente 0,2 μm a 1 μm , preferentemente 0,3 μm a 1 μm , preferentemente 0,1 μm a 0,8 μm , preferentemente 0,2 μm a 0,8 μm , preferentemente 0,3 μm a 0,8 μm , preferentemente 0,1 μm a 0,6 μm , preferentemente 0,2 μm a 0,6 μm , preferentemente 0,3 μm a 0,6 μm , del modo más preferente 0,2 μm a 0,6 μm .

- 5 De modo especialmente preferente, las depresiones del soporte sólido presentan una forma esencialmente redonda, incluyendo "esencialmente redonda" también formas ovaladas y elipsoidales. La forma de la depresión es identificable en una vista superior sobre la superficie del soporte sólido.

Las depresiones presentan una profundidad de 0,1 μm bis 5 μm , preferentemente de 0,1 μm a 4 μm , preferentemente de 0,1 μm a 3 μm , preferentemente de 0,1 μm a 2 μm , preferentemente de 0,1 μm a 1,5 μm , preferentemente de 0,1 μm a 1,2 μm , preferentemente de 0,1 μm a 1 μm , preferentemente de 0,1 μm a 0,9 μm , preferentemente de 0,1 μm a 0,8 μm , preferentemente de 0,2 μm a 5 μm , preferentemente de 0,2 μm a 4 μm , preferentemente de 0,2 μm a 3 μm , preferentemente de 0,2 μm a 2 μm , preferentemente de 0,2 μm a 1,5 μm , preferentemente de 0,2 μm a 1,2 μm , preferentemente de 0,2 μm a 1 μm , preferentemente de 0,2 μm a 0,9 μm , preferentemente de 0,2 μm a 0,8 μm , preferentemente de 0,3 μm a 5 μm , preferentemente de 0,3 μm a 4 μm , preferentemente de 0,3 μm a 3 μm , preferentemente de 0,3 μm a 2 μm , preferentemente de 0,3 μm a 1,5 μm , preferentemente de 0,3 μm a 1,2 μm , preferentemente de 0,3 μm a 1 μm , preferentemente de 0,3 μm a 0,9 μm , preferentemente de 0,3 μm a 0,8 μm . La profundidad de la depresión es la distancia de la superficie del soporte sólido vaporizado con metal hasta el fondo de la depresión.

Según una forma preferente de realización de la presente invención, las depresiones presentan una distancia ("periodo") entre sí de 0,3 μm a 1,4 μm , preferentemente de 0,4 μm a 1,3 μm , auf. En otra forma preferente de realización de la presente invención, las depresiones presentan una distancia entre sí de 0,2 μm a 2 μm , preferentemente de 0,2 μm a 1,8 μm , preferentemente de 0,2 μm a 1,6 μm , preferentemente de 0,2 μm a 1,5 μm , preferentemente de 0,2 μm a 1,4 μm , preferentemente de 0,2 μm a 1,3 μm , preferentemente de 0,3 μm a 2,5 μm , preferentemente de 0,3 μm a 2 μm , preferentemente de 0,3 μm a 1,8 μm , preferentemente de 0,3 μm a 1,6 μm , preferentemente de 0,3 μm a 1,5 μm , preferentemente de 0,3 μm a 1,3 μm , preferentemente de 0,4 μm a 2,5 μm , preferentemente de 0,4 μm a 2 μm , preferentemente de 0,4 μm a 1,8 μm , preferentemente de 0,4 μm a 1,6 μm , preferentemente de 0,4 μm a 1,5 μm , preferentemente de 0,4 μm a 1,4 μm , preferentemente de 0,5 μm a 2,5 μm , preferentemente de 0,5 μm a 2 μm , preferentemente de 0,5 μm a 1,8 μm , preferentemente de 0,5 μm a 1,6 μm , preferentemente de 0,5 μm a 1,5 μm , preferentemente de 0,5 μm a 1,4 μm , preferentemente de 0,5 μm a 1,3 μm , preferentemente de 0,6 μm a 2,5 μm , preferentemente de 0,6 μm a 2 μm , preferentemente de 0,6 μm a 1,8 μm , preferentemente de 0,6 μm a 1,6 μm , preferentemente de 0,6 μm a 1,5 μm , preferentemente de 0,6 μm a 1,4 μm , preferentemente de 0,6 μm a 1,3 μm , preferentemente de 0,7 μm a 2,5 μm , preferentemente de 0,7 μm a 2 μm , preferentemente de 0,5 μm a 1,8 μm , preferentemente de 0,7 μm a 1,6 μm , preferentemente de 0,7 μm a 1,5 μm , preferentemente de 0,7 μm a 1,4 μm , preferentemente de 0,7 μm a 1,3 μm , presentando las depresiones del modo más preferente una distancia de 0,2 μm a 1,4 μm , o bien 0,3 μm a 1,3 μm entre sí. La distancia entre las depresiones ("periodo") se mide desde el punto medio de la depresión.

Según otra forma preferente de realización de la presente invención, la capa metálica en el soporte sólido presenta un grosor de 10 nm a 50 nm, preferentemente de 15 nm a 60 nm, preferentemente de 15 nm a 50 nm, preferentemente de 20 nm a 60 nm, preferentemente de 20 nm a 50 nm. Según la invención, el soporte polimérico sólido está revestido "al menos parcialmente" con al menos un metal. "Al menos parcialmente", como se emplea en este caso, significa que aquella zona del soporte sólido en la que las depresiones se encuentran al menos en 20 %, preferentemente al menos en 30 %, de modo aún más preferente al menos en 40 %, de modo aún más preferente al menos en 50 %, de modo aún más preferente al menos en 60 %, de modo aún más preferente al menos en 70 %, de modo aún más preferente al menos en 80 %, de modo aún más preferente al menos en 90 %, de modo aún más preferente al menos en 95 %, de modo aún más preferente al menos en 98 %, en especial en 100 %, está revestida con plata o aleaciones que comprenden plata. Ya que el efecto MEF presupone una superficie metálica, es especialmente preferente que la superficie del soporte sólido esté revestida al menos en la zona de las depresiones con al menos un metal. En este caso, el soporte sólido puede comprender también varios (por ejemplo al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco) capas metálicas superpuestas constituidas por el mismo o por diferentes metales. Una ventaja del empleo de varias capas de metal en el soporte sólido es que la primera capa metálica (por ejemplo cromo), que se aplica directamente sobre el soporte, puede mejorar la adherencia de las demás capas metálicas.

El concepto "superpuestas", como se emplea en este caso, significa que una capa metálica está dispuesta directa o indirectamente sobre otra capa metálica. De este modo resulta un sistema multicapa constituido por capas metálicas del mismo metal o diferentes metales.

Las capas metálicas son preferentemente continuas y no están interrumpidas. No obstante, según la invención se pudo verificar que la capa metálica o las capas metálicas en el soporte sólido polimérico también pueden estar interrumpidas sin que se reduzca el efecto de refuerzo de la fluorescencia. La capa metálica interrumpida se puede efectuar, a modo de ejemplo, mediante una medición de la conductividad de la superficie del sustrato según la invención. Una conductividad más reducida, o bien nula, significa que la(s) capa(s) metálica(s) en la superficie del sustrato están interrumpidas. Se pueden producir capas metálicas interrumpidas, a modo de ejemplo,

poniéndose en contacto un sustrato revestido con metal esencialmente por completo con una disolución que contiene sales preferentemente, como por ejemplo tampón fosfato 10 mM con NaCl 150 mM durante un determinado intervalo de tiempo (10-90 minutos).

El soporte sólido está revestido al menos con plata o una aleación que comprende plata.

- 5 La capa metálica comprende preferentemente al menos dos, de modo aún más preferente al menos tres, de modo aún más preferente al menos cuatro, de modo aún más preferente al menos cinco metales diferentes. Los metales se pueden aplicar sobre el soporte sólido con métodos conocidos en el estado de la técnica, empleándose preferentemente pulverización catódica (atomización catódica) o vaporización térmica, vaporización por haz de electrones, vaporización por rayo láser, vaporización por arco voltaico, epitaxia de haz molecular, deposición apoyada por haz iónico y plaqueado iónico.

10 El metal adicional se puede seleccionar a partir del grupo constituido por oro, aluminio, cromo, indio, cobre, níquel, paladio, platino, zinc, estaño y aleaciones que comprenden uno o varios de estos metales.

- 15 Estos metales, o bien las aleaciones de los mismos, se pueden emplear para el revestimiento del soporte sólido. Corresponde a la invención el revestimiento del soporte sólido con plata o aleaciones que comprenden plata, ya que la plata, o bien sus aleaciones, muestran un efecto de refuerzo especialmente grande. Es especialmente preferente una aleación que comprende plata, indio y estaño. Las aleaciones que contienen plata presentan preferentemente un contenido en plata de más de 10 %, de modo aún más preferente de más de 30 %, de modo aún más preferente de más de 50 %, de modo aún más preferente de más de 70 %, de modo aún más preferente de más de 80 %, de modo aún más preferente de más de 90 %.

- 20 Tras el revestimiento del soporte sólido con al menos un metal o antes del empleo del sustrato, o bien del soporte sólido, el soporte sólido, o bien el sustrato, se trata preferentemente con una composición acuosa que comprende al menos un ácido o una sal de un halógeno seleccionado a partir del grupo constituido por flúor, cloro, bromo y yodo.

- 25 Se ha demostrado que el refuerzo de la fluorescencia se puede intensificar de nuevo mediante el tratamiento previo del sustrato, o bien del soporte sólido, con una disolución acuosa (por ejemplo un tampón) que comprende al menos un ácido de un halógeno o su sal del mismo. Por lo tanto, es especialmente preferente tratar previamente el soporte sólido, o bien el sustrato, con una disolución que contiene ácido, o bien sal.

Alternativamente, también durante la medición se puede emplear la disolución acuosa (por ejemplo un tampón) que comprende al menos un ácido o una sal de un halógeno en lugar de otras disoluciones.

- 30 Según la invención son apropiados todos los ácidos del grupo de halógenos o sus sales, aunque en la práctica no se deseen los halógenos radioactivos. Por lo tanto, de modo especialmente preferente se emplean los ácidos o las sales de los halógenos flúor, cloro, bromo y yodo, del modo más preferente cloruros, en especial cloruros metálicos. De modo especialmente preferente, los ácidos o las sales empleados según la invención son sales de metales alcalinos o de metales alcalinotérreos, en especial sales de sodio, potasio o litio.

- 35 Según una forma especialmente preferente de realización de la presente invención, la composición acuosa comprende al menos un ácido o una sal seleccionados a partir del grupo constituido por HCl, HF, HBr, HJ, NaCl, NaF, NaBr, NaJ, KCl, KF, KBr y KJ.

- 40 La composición acuosa que comprende al menos un ácido de un halógeno o su sal puede comprender otras sustancias, como por ejemplo otros ácidos o sales, aparte del al menos un ácido o su sal. De modo especialmente preferente se emplean sustancias que cumplen una función tampón (por ejemplo hidrogenofosfato disódico, dihidrogenofosfato potásico, carbonatos).

- 45 Según otra forma preferente de realización de la presente invención, el soporte sólido se trata con la composición acuosa durante al menos 1, preferentemente durante al menos 2, de modo aún más preferente durante al menos 5, de modo aún más preferente durante al menos 10, de modo aún más preferente durante al menos 20 minutos.

- 50 Según la invención se ha demostrado que el efecto de refuerzo de la fluorescencia del soporte revestido con plata o una aleación que comprende plata es especialmente elevado si el soporte sólido se incuba durante al menos 1 minuto con la composición acuosa que comprende al menos un ácido de un halógeno o su sal, preferentemente a temperatura ambiente (22°C). Si la incubación se efectúa a temperaturas más elevadas (por ejemplo entre 30°C y 40°C), el tiempo de incubación se puede reducir correspondientemente (por ejemplo al menos 30 segundos). No obstante, si la incubación se efectúa a temperaturas más bajas (por ejemplo entre 10°C y 20°C), el tiempo de incubación se puede prolongar correspondientemente (por ejemplo al menos 2 minutos).

Según una forma de realización preferente, la parte de sustrato es un capilar, una placa de microtitulación, un chip microfluídico, una tira de ensayo (para "Lateral Flow Assays"), un soporte (por ejemplo portaobjetos) para la

microscopía de fluorescencia, en especial para procedimientos de alta resolución como la microscopía láser confocal según el principio de escáner por puntos, así como la microscopía 4Pi y el microscopio STED (Stimulated Emission Depletion), un conjunto de sensores u otro campo de detección óptico.

5 Es especialmente preferente el empleo del sustrato en placas de microtitulación, pudiendo comprender las placas de microtitulación 6, 12, 24, 48, 96, 384 o 1536 pocillos. Las placas de microtitulación se emplean para las más diversas mediciones y ensayos en los que se mida también frecuentemente la fluorescencia de muestras. Mediante la previsión del sustrato en los pocillos de placas de microtitulación se puede aumentar significativamente el rendimiento de fluorescencia de las muestras. Los sustratos se pueden introducir y fijar en los pocillos con los más diversos métodos. En este caso, los sustratos se fijan en los pocillos preferentemente por medio de adhesión, técnicas de soldadura (por ejemplo soldadura por láser) y unión térmica.

10 Según una forma especialmente preferente de realización de la presente invención, el soporte sólido comprende o está constituido por un copolímero de cicloolefina o un polímero de cicloolefina, y es parte de una placa de microtitulación, o bien parte de los pocillos de una placa de microtitulación. En este caso ha demostrado ser especialmente apropiado COP 1060R (Zeonor® 1060R). En este caso, el soporte está revestido preferentemente con 10 a 60 nm, de modo preferente con hasta 40 nm de metal (por ejemplo plata).

Determinadas mediciones con sustancias fluorescentes, como fluoróforos, se realizan en capilares. Por lo tanto es preferente prever los sustratos en capilares. Una aplicación ejemplar es la citometría, o bien la citometría de flujo, en la que se determina el número o también el tipo de células fluorescentes o células con marcaje fluorescente con ayuda de una medición de la fluorescencia.

20 Numerosas aplicaciones para la medición de la fluorescencia se efectúan en chips microfluídicos (por ejemplo como aplicación "Lab-on-a-chip"), pudiendo estar previstos los sustratos según la invención en la zona de detección de tales chips.

También en cubetas convencionales pueden estar previstos los sustratos según la invención. De este modo se puede aumentar significativamente el rendimiento de fluorescencia en mediciones de fluorescencia, de modo que en una muestra se pueden medir cantidades mínimas de sustancias fluorescentes. Según la invención se puede emplear cualquier forma de cubeta.

25 También en sistemas de tiras de ensayo ("Lateral Flow Assays"), que se emplean para ensayos rápidos o en ensayos en campo (Point of Care), se pueden emplear los sustratos según la invención (por ejemplo en la zona de detección ("Detection Line"), para reforzar la fluorescencia de un analito marcado (por ejemplo de un anticuerpo con marcaje fluorescente) y mejorar de este modo la sensibilidad del ensayo.

30 En otra forma preferente de realización de la invención, los sustratos se aplican sobre portaobjetos como los empleados en la microscopía, en especial la microscopía de fluorescencia. De este modo se pudo intensificar selectivamente la fluorescencia de los fluoróforos empleados para el marcaje y mejorar de manera drástica la resolución óptica de los métodos, ya que se requiere menor intensidad luminosa, lo que optimizaría la relación señal/ruido. Serían campos de aplicación procedimientos de alta resolución como la microscopía láser confocal según el principio de escáner por puntos, así como la microscopía 4Pi y el microscopio STED (Stimulated Emission Depletion).

35 Según otra forma preferente de realización de la presente invención, el revestimiento metálico comprende al menos parcialmente moléculas para la unión directa y/o indirecta de moléculas fluorescentes en la superficie del sustrato.

Los sustratos pueden reforzar la fluorescencia de moléculas fluorescentes, o bien de fluoróforos, si los fluoróforos se encuentran en la proximidad espacial (preferentemente menos de 20 nm) de los sustratos. En este caso, los fluoróforos, o bien las sustancias fluorescentes, se pueden mover libremente en un líquido, efectuándose el aumento de fluorescencia solo si estos fluoróforos, o bien las moléculas fluorescentes, se aproximan al sustrato.

45 Para aumentar la probabilidad de aproximación de los fluoróforos, o bien de las moléculas fluorescentes al sustrato, es especialmente ventajoso que en la superficie del sustrato (es decir, en el revestimiento metálico) se puedan unir moléculas de manera irreversible o reversible, el fluoróforo, o bien la propia molécula fluorescente ("enlace directo") o una molécula a la que está acoplado un fluoróforo o una molécula fluorescente (por ejemplo anticuerpo con marcaje fluorescente; "enlace indirecto"). Los procedimientos para el enlace de tales moléculas a estructuras metálicas son bastante conocidos. En el más sencillo de los casos, el enlace se efectúa mediante adsorción fisicoquímica (mediada a través de interacciones iónicas e hidrófobas) de las proteínas en la superficie metálica (por ejemplo Nakanishi K. et al. J Biosci Bioengin 91 (2001): 233-244). También son conocidos métodos covalentes para la inmovilización de proteínas tras derivatización de las superficies metálicas (por ejemplo GB Sigal et al. Anal Chem 68 (1996): 490-7).

55 Las moléculas para el enlace directo y/o indirecto de moléculas fluorescentes, o bien fluoróforos, se seleccionan preferentemente a partir del grupo constituido por anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, preferentemente fragmentos Fab, F(ab)'2 o scFv, ácidos nucleicos, enzimas, lípidos, partículas víricas, aptámeros y combinaciones

de estos.

Por una parte, estas moléculas pueden enlazar directamente fluoróforos, o bien moléculas fluorescentes (por ejemplo anticuerpos y fragmentos de los mismos, ácidos nucleicos, enzimas), por otra parte estas moléculas también pueden enlazar también otras moléculas que están provistas de un fluoróforo, o bien una sustancia fluorescente.

“Sustrato fluorescente para una enzima”, como se emplea en este caso, es un sustrato que se puede enlazar en o al centro activo de la enzima, con lo cual el sustrato puede adquirir propiedades fluorescentes. Naturalmente, el sustrato también puede presentar propiedades fluorescentes antes de su adición a la enzima.

Los soportes sólidos con las depresiones, como se definen anteriormente, se revisten a continuación con uno o varios metales (por ejemplo dos, tres, cuatro o cinco metales). En el mundo técnico son bastante conocidos procedimientos para el revestimiento de soportes sólidos con metales, empleándose de modo especialmente preferente procedimientos PVD (PVD; “Physical Vapor Deposition), como procedimientos de pulverización catódica o deposición de vapor.

El al menos un metal se puede aplicar sobre la superficie del soporte sólido por medio de un procedimiento de pulverización catódica o vaporización térmica, con vaporización por haz de electrones, vaporización por rayo láser, vaporización por arco voltaico, epitaxia de haz molecular, deposición apoyada por haz iónico o con plaquedo iónico u otro procedimiento según el respectivo estado de la técnica actual.

Para posibilitar el enlace directo y/o indirecto de fluoróforos u otras sustancias fluorescentes sobre la superficie del sustrato, sobre el revestimiento metálico se aplican al menos parcialmente moléculas para el enlace directo y/o indirecto de fluoróforos a través de derivatización por adsorción o química covalente de la superficie en la superficie del sustrato.

“Al menos parcialmente”, como se emplea en este caso, significa que al menos 10 %, preferentemente al menos 30 %, de modo aún más preferente al menos 50 %, de modo aún más preferente 70 %, de modo aún más preferente al menos 90 %, de modo aún más preferente al menos 90 %, en especial 100 % del soporte sólido revestido con metal está provisto de moléculas para el enlace directo y/o indirecto de fluoróforos.

Según una forma preferente de realización de la presente invención, las moléculas para el enlace directo y/o indirecto de fluoróforos se seleccionan a partir del grupo constituido por anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, preferentemente fragmentos Fab, F(ab)² o scFv, ácidos nucleicos, enzimas, lípidos, partículas víricas, aptámeros y combinaciones de estos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación o para la cuantificación de al menos un analito en una muestra que comprende los pasos:

- a) marcaje directo o indirecto opcional de al menos un analito con al menos un fluoróforo,
- b) aplicación de al menos un analito marcado a partir del paso a) o de un analito fluorescente sobre un sustrato según la presente invención,
- c) excitación de al menos un fluoróforo mediante irradiación del sustrato con luz de longitud de onda apropiada, y
- d) medición de la fluorescencia para la determinación de la presencia de al menos un analito en la muestra.

El sustrato, que puede aumentar significativamente el rendimiento de fluorescencia de fluoróforos y otras moléculas o sustancias fluorescentes, se puede emplear para procedimientos en los que se deba medir la fluorescencia de muestras. Mediante el empleo según la invención del sustrato en tales procedimientos se puede aumentar significativamente la sensibilidad de tales procedimientos, de modo que no solo se puede determinar la presencia de cantidades mínimas de analitos a determinar, sino que también se puede realizar la cuantificación (cantidades reducidas) de analitos de manera más exacta.

En un primer paso se marcan directa o indirectamente los analitos a determinar, o bien los analitos a cuantificar en una muestra, con un fluoróforo o una sustancia fluorescente. En el caso de un marcaje directo del analito, el al menos un fluoróforo o la al menos una sustancia fluorescente se une mediante enlace covalente o no covalente (por ejemplo mediante enlace por puentes de hidrógeno, enlace electrostático, fuerzas de Van-der-Waals, interacciones hidrófobas) a los analitos a determinar, o bien a cuantificar. En el caso de un marcaje indirecto, en la muestra se introducen moléculas con marcaje fluorescente (por ejemplo anticuerpos o fragmentos de los mismos), que se pueden unir a los analitos. Este primer paso de procedimiento es opcional, ya que existen analitos a determinar, o bien a cuantificar, que ya son fluorescentes de por sí en el caso de correspondiente excitación. Las muestras que comprenden tales analitos se pueden aplicar sobre el sustrato directamente o tras una preparación de muestra (véase paso b) del procedimiento según la invención).

Tras aplicación del al menos un analito marcado del paso a) o del analito fluorescente sobre el sustrato, el fluoróforo, o bien la sustancia fluorescente o el analito fluorescente se excita por medio de irradiación del sustrato con luz coherente o no coherente (por ejemplo láser o lámpara de descarga de xenón) de longitud de onda

apropiada para la emisión de fluorescencia.

“Luz de longitud de onda apropiada”, como se emplea en este caso, significa que la luz empleada en el procedimiento según la invención presenta una longitud de onda que es apropiada para inducir la emisión de fluorescencia de una sustancia en la puesta en contacto. A modo de ejemplo, luz con una longitud de onda de 485 es apropiada para inducir la emisión de fluorescencia de isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Tras excitación de las sustancias fluorescentes por medio de luz, estas sustancias emiten luz (fluorescencia) de una determinada longitud de onda. Esta luz emitida de una longitud de onda definida se mide y se puede emplear para la cuantificación o para la determinación de la presencia de un analito en una muestra. La luz emitida se puede medir con ayuda de un detector (por ejemplo fotomultiplicador). A este respecto se pueden emplear aparatos de lectura de placas de microtitulación comerciales (Tecan F200pro, BioTek Synergy, Molecular Devices serie FilterMax o SpectraMax, etc.), escáner de fluorescencia de lecho plano (por ejemplo Tecan LS-Reloaded, microscopía de fluorescencia o cualquier otro sistema de análisis propietario (Roche COBAS, Abbot AxSYM, Behring Opus Plus), si se integra un detector de fluorescencia correspondiente).

Según una forma preferente de realización de la presente invención, el al menos un fluoróforo presenta una longitud de onda de excitación en el intervalo de 360 a 780 nm, preferentemente de 490 a 680 nm.

Según otra forma preferente de realización de la presente invención, el al menos un fluoróforo presenta una longitud de onda de emisión en el intervalo de 410 a 800 nm, preferentemente de 510 a 710 nm.

El al menos un fluoróforo se selecciona preferentemente a partir del grupo constituido por metoxicumarina, aminocumarina, Cy2, Alexa Fluor 488, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 532, Cy3, Alexa Fluor 555, 5-TAMRA, Alexa Fluor 546, ficoeritrina (PE), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), Cy3.5, rodamina, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Cy5, Alexa Fluor 660, Cy5.5, Alexa Fluor 680 y Cy7, preferentemente a partir del grupo constituido por isotiocianato de fluoresceína (FITC), Cy3, ficoeritrina (PE), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), Cy5 y Alexa Fluor 680.

Según una forma preferente de realización de la presente invención, el marcaje indirecto del analito con al menos un fluoróforo se efectúa por medio de una molécula marcada con fluoróforo y que se une al analito.

Según otra forma preferente de realización de la presente invención, la molécula que se une al analito se selecciona a partir del grupo constituido por anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, preferentemente fragmentos Fab, F(ab)² o scFv, ácidos nucleicos, enzimas, lípidos, partículas víricas, aptámeros y combinaciones de estos.

La presente invención se explica más detalladamente por medio de las siguientes figuras y ejemplos, pero sin estar limitada a estos.

La Fig. 1 muestra una representación AFM (“Atomic Force Microscope”; microscopio de fuerza atómica) de un soporte sólido plano revestido con metal (véase Ejemplo 1).

La Fig. 2 muestra el efecto MEF en función del tipo de fluoróforo y un grosor de capa de plata de 0,20 y 50 nm de Ag. El efecto MEF se expresa en el “aumento relativo” observado, es decir, la relación de la señal al final del tiempo de medición tras 600 segundos (t600) respecto a la señal al comienzo de la medición t(0). Un aumento relativo de 1,0 significa una modificación de señal nula y, de este modo un MEF nulo. Cuanto más elevado es el aumento relativo, tanto más fuerte es el efecto MEF. Es una tendencia general observar MEF más elevado con grosor de capa metálica creciente, que varía, no obstante, de fluoróforo a fluoróforo.

La Fig. 3 muestra la dependencia de MEF respecto al grosor de capa de plata en pasos de 5 nm para AlexaFluor 680 (véase Ejemplo 2). A partir de un grosor de capa de 5 nm se puede observar un claro aumento del efecto MEF.

Las Fig. 4 y 5 muestran imágenes AFM de sustratos/estructuras que comprenden depresiones de diferente periodo.

La Fig. 6 muestra la dependencia del efecto MEF respecto al periodo (0,8 a 2,2 μ m) de las estructuras.

La Fig. 7 muestra la dependencia de MEF respecto a la profundidad de las estructuras.

Las Fig. 8 y 9 muestran los factores de refuerzo de MEF obtenidos en comparación con superficies revestidas con coloide y superficies MEF del estado de la técnica (firma PLASMONIX; Quanta-Wells 2; “estructura competidora”).

La Fig. 10 muestra una cinética de MEF en nanopilares (nanocolumnas, elevaciones) y nanopilares invertidos (depresiones).

La Fig. 11 muestra la realización de un inmunoensayo de fluorescencia Anti-Hasen IgG bajo empleo de un sustrato.

La Fig. 12 muestra el sustrato que comprende un soporte sólido que está revestido con una capa metálica. El soporte sólido presenta depresiones con una profundidad, una anchura y una longitud. Las depresiones se encuentran en el soporte sólido a una determinada distancia (periodo) entre sí.

5 La Fig. 13 muestra una vista superior (A) y una sección transversal (B) de un soporte sólido. Las depresiones en el soporte sólido están caracterizadas por una anchura, longitud y profundidad, y presentan una determinada distancia (periodo) entre sí.

La Fig. 14 muestra el efecto MEF en el caso de empleo de diversos tampones.

La Fig. 15 muestra diferentes procedimientos con los que se pueden producir los sustratos sólidos, incluyendo depresiones.

10 Ejemplos:

Ejemplo 1 (no parte de la invención)

: producción del sustrato

15 Partiendo del estado de la técnica conocido (véase, entre otros, Pompea et al. Nature Nanotechnology 1 (2006): 126-130; Cade et al. Nano-technology. 15 (2009): 20 (28), US 2009/0262640) se intentó producir estructuras lo más elevadas posible, delgadas, en forma de torre, o bien columna ("nanopilares"), para poder llegar a una reducción de la capa metálica en la deposición por vapor y de este modo a la formación de las estructuras de isla metálicas necesarias para el efecto MEF según la bibliografía mediante una gran relación (1:2 a 1:3) del diámetro de la base respecto a la altura de la estructura ("relación de aspecto"). Por lo tanto, se produjeron "pilares" (columnas; elevaciones) con diferente diámetro de base (250-550 nm) y diferente altura (250-850 nm).

20 Para la producción de los sustratos se aplicó una forma especial de moldeo por inyección, es decir, inyección estampada. En la inyección estampada se introduce la fusión de material sintético termoplástico en una herramienta ligeramente abierta con proceso de prensado simultáneo (= estampado). El sello nanoestructurado para el moldeo por inyección se extrajo de un maestro de silicio producido por litografía por medio de galvanotecnia de níquel. En este caso se entiende por maestro de silicio una oblea de silicio revestida con un barniz positivo, que se expuso por medio de "litografía por láser" y se reveló a continuación.

25 Sorprendentemente, los soportes sólidos con depresiones (INPs) revestidos con metal mostraban ahora un claro efecto MEF, mientras que los sustratos basados en un soporte sólido con depresiones mostraban un efecto MEF nulo o mínimo (véase Fig. 10). Por lo tanto, las estructuras INP se analizaron ulteriormente.

Ejemplo 2: influencia del grosor de la capa metálica

30 Para analizar qué influencia tiene el grosor de capa metálica sobre la superficie de un soporte sólido con depresiones con un diámetro de aproximadamente 450 nm se depositaron por vapor diferentes grosores de capa de plata.

35 La adsorción directa de anticuerpos con marcaje fluorescente sobre una superficie es la vía más sencilla para comparar superficies estructuradas de diferente manera respecto a sensibilidad y factor de refuerzo. En este caso, el efecto MEF se mostró en que, al contrario que una superficie sin MEF, se pudo seguir directamente la cinética de enlace ("cinética MEF") del anticuerpo en tiempo real. Esto se posibilitó al brillar más intensamente solo las moléculas en la proximidad de la superficie, pero no las moléculas más alejadas, no enlazadas. En este caso, la disolución con el anticuerpo marcado con fluorescencia se aplicó gota a gota sobre la correspondiente superficie nanoestructurada y se siguió la modificación de señal durante el tiempo con un aparato de medición de fluorescencia apropiado (Tecan 200F pro).

40 Aparte del parámetro "cinética MEF", mediante la comparación de la señal de una determinada concentración de anticuerpo marcado con fluorescencia sobre una superficie con estructura nanometálica con la señal del mismo anticuerpo sobre una superficie sin esta estructura se puede definir un factor de refuerzo. En este caso solo se puede asegurar que la densidad de recubrimiento efectiva, es decir, la verdadera cantidad de anticuerpo sobre las superficies, es la misma.

Esto se puede efectuar fácilmente mediante detección del anticuerpo enlazado (cabra anti-conejo FITC) con un anticuerpo secundario marcado (un anticuerpo de burro anti-cabra marcado con fosfatasa alcalina) y no proporcionó diferencias significativas en las densidades de recubrimiento de anticuerpo de las superficies sometidas a ensayo.

50 En el caso de las variantes de densidad de capa metálica producidas, ahora se mostró que el efecto MEF aumenta significativamente en el intervalo de 0-50 nm de Ag independientemente del fluoróforo sometido a ensayo (véase Fig. 2; aumento rel. de 1 significa efecto MEF nulo).

La Fig. 3 muestra que es necesaria una densidad de capa mínima de 5 nm para obtener un MEF. La Fig. 3 muestra además que se puede observar un aumento continuo del efecto MEF en el caso de un aumento del grosor de capa metálica en pasos de 5 nm.

Ejemplo 3: influencia de estructura-periodo

- 5 La distancia de las depresiones entre sí (“periodo”) podía tener una influencia sobre el efecto MEF del sustrato según la invención. Por lo tanto, se revistieron diferentes soportes sólidos, a modo de ejemplo con plata, con distintos periodos.

Campo	Periodo [μm]
1	0,8
2	1,0
3	1,4
4	1,6
5	1,8
6	2,0
7	2,2

- 10 Las Fig. 4 y 5 muestran respectivamente una imagen AFM de dos sustratos según la invención con un periodo de 0,8 μm , o bien 2,2 μm , y un grosor de capa de plata de 50 nm.

Para identificar el efecto MEF se elaboraron para todos los campos 1 a 7 cinéticas MEF de AlexaFluor 680 (13 nM en PBS 10 mM, pH 7,4) (véase Fig. 6). En este caso se pudo verificar que el efecto MEF era máximo con un periodo de 0,8 y 1,0 μm . A partir de un periodo de 1,2 μm , el efecto MEF era claramente menor, pero aún estaba presente.

- 15 La siguiente tabla refleja los aumentos relativos (señal t = 300 s / señal t = 0 s) de mediciones de cinética MEF de diferentes anticuerpos con marcaje fluorescente para el campo 1 (0,8 μm) y 2 (1,0). El grosor de capa de plata en los INPs ascendía a 20 nm para estas mediciones, empleándose un anticuerpo de cabra marcado con el respectivo fluoróforo de manera dirigida contra conejo IgG (diluido en PBS 10 mM pH 7,4; c = 13 nM).

	Campo 1	Campo 2
FITC	1,6	1,6
Cy5	1,9	2,1
TRITC	1,8	1,5
PE	1,3	1,3
Cy3	2,3	3,2
AlexaFl680	1,7	1,7

- 20 Por consiguiente, se pudo demostrar el efecto MEF en los INPs para los más diversos fluoróforos en la zona de longitudes de onda Ex/Em de 485/520 (FITC) hasta 680/720 (AlexaFluor 680). La aplicación de INPs no está limitada a fluoróforos especiales.

Ejemplo 4: influencia de la profundidad de las depresiones sobre el efecto MEF

- 25 Para analizar la influencia de la profundidad de las depresiones (nanopilares invertidos; INPs) se produjeron soportes sólidos con diferentes profundidades de depresión (60 nm, 240 nm, 550 nm, 755 nm y 874 nm) y se vaporizaron con plata (20 nm de grosor de capa).

Los ensayos de adsorción con anticuerpos con marcaje fluorescente (“cinética MEF”) mostraron que el efecto MEF asciende igualmente con profundidad de depresión creciente. En soportes sólidos con depresiones de menos de 60 nm de profundidad se observó un efecto MEF, pero este era claramente menor en comparación con

los demás soportes (véase Fig. 7).

Ejemplo 5: ensayos comparativos

5 En comparación con estructuras empleadas convencionalmente, los sustratos según la invención muestran un efecto MEF reforzado. Para demostrar esto se revistieron placas de microtitulación con coloides de plata según un procedimiento conocido por la bibliografía (Direct monitoring of molecular recognition processes using fluorescence enhancement at colloid-coated microplates., C Lobmaier et al julio 2001; 14(4): 215-22) y se determinaron sus factores de refuerzo (definidos como relación de las señales sobre la superficie sin y con coloides de plata con la misma concentración superficial de anticuerpos) en comparación con las estructuras con depresiones (20 nm de Ag, periodo de 0,8 μm). Adicionalmente se analizó el único sistema de placas de microtitulación comercial basado en MEF según datos del fabricante (firma PLASMONIX; Quant-Wells 2).

10 Los factores de refuerzo del sustrato según la invención, como se muestra en la Fig. 9, se situaban alrededor de 10 veces por encima de los de placas de coloide o placas de PLASMONIX. Aparte de los factores de refuerzo claramente más reducidos, las placas de microtitulación de PLASMONIX tampoco muestran la cinética MEF típica (véase Fig. 9 en comparación con Fig. 7).

15 Ejemplo 6: inmunoensayo de fluorescencia de anti-conejo IgG

Las superficies de un sustrato según la invención, una placa de microtitulación revestida con coloide (MTP) y una placa de microtitulación estándar de la firma Greiner, como se emplea según el estado de la técnica para inmunoensayos, se pusieron en contacto con una disolución de conejo IgG (2 $\mu\text{g/ml}$) en PBS (tampón fosfato 10 mM con NaCl 150 mM pH 7,4) durante 2 h a temperatura ambiente. Después se eliminó la disolución, se lavó la superficie con PBS que contenía 0,1 % de Triton X-100 y se puso en contacto con una disolución de polivinilpirrolidona al 5 % durante 1 h para el bloqueo de enlaces inespecíficos. Tras un paso de lavado ulterior con PBS/Triton X100 se efectuó una incubación con anticuerpo de anti-conejo IgG marcado con biotina de diferente concentración durante 1 h a RT. El enlace de este anticuerpo de anti-conejo IgG se identificó finalmente tras un paso de lavado final mediante una medición de cinética MEF con estreptavidina marcada con Cy3 durante un intervalo de tiempo de 600 segundos (véase Fig. 11). Se puede observar claramente que en la placa de microtitulación estándar no se produce cinética MEF y, por lo tanto, el inmunoensayo tampoco es realizable. La placa de microtitulación revestida con coloide muestra una cinética MEF débil, por el contrario, el sustrato según la invención muestra la misma claramente más pronunciada y, por lo tanto, también un inmunoensayo con curva de calibrado sensiblemente más inclinada, es decir, sensibilidad sensiblemente superior.

30 El sustrato según la invención empleado en este ejemplo mostraba conductividad eléctrica antes de su revestimiento con anticuerpos. Una vez efectuada la medición de la cinética MEF no se pudo observar conductividad eléctrica del sustrato. Esto podía ser debido a la formación de cloruro de plata en el contacto con tampón PBS.

Ejemplo 7: efecto MEF en función del tampón empleado

35 Para analizar la dependencia del efecto MEF respecto al tampón empleado se observó como en el Ejemplo 3 la cinética MEF debida a la adsorción de un anticuerpo con marcaje fluorescente (anticuerpo de cabra anti-conejo, marcado con Cy5), empleándose un tampón fosfato puro (PB; tampón fosfato 10 mM) en lugar del tampón PBS, disolución acuosa de citrato de sodio al 1 % (w/v) y diH_2O . Se realizaron los ensayos en sustratos con un periodo de 1 μm (correspondientemente al campo 2, véase Ejemplo 3). Como se puede verificar en la Fig. 14, la adsorción de PBS proporcionaba ciertamente el máximo aumento de señal relativo, pero también se podían observar señales claras en el caso de adsorción del anticuerpo de las otras disoluciones. Esto podría ser una consecuencia de la posible formación de una capa de cloruro de plata, también descrita en el Ejemplo 6, que influye positivamente sobre el efecto de refuerzo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Empleo de un sustrato para el refuerzo de la fluorescencia de una o varias moléculas con marcaje fluorescente, caracterizado por que el sustrato comprende un soporte polimérico sólido con un gran número de depresiones separadas entre sí y el soporte sólido está revestido al menos parcialmente con plata o aleaciones que comprenden plata, presentando las depresiones una distancia entre sí de 0,2 μm a 2,5 μm y una profundidad de 0,1 μm a 5 μm , y presentando la capa metálica en el soporte sólido un grosor de 10 nm a 60 nm.
2. Empleo según la reivindicación 1, caracterizado por que las depresiones del soporte sólido presentan una longitud y una anchura, ascendiendo la relación de longitud respecto a anchura a 2:1 hasta 1:2, en especial aproximadamente 1:1.
- 10 3. Empleo según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que las depresiones del soporte sólido presentan una longitud y una anchura, ascendiendo la longitud y la anchura de las depresiones a 0,1 μm hasta 2 μm .
4. Empleo según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que las depresiones presentan una forma esencialmente redonda.
- 15 5. Empleo según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el soporte sólido comprende al menos un material seleccionado a partir del grupo constituido por polímeros termoplásticos y policondensados.
6. Empleo según la reivindicación 5, caracterizado por que el material del soporte polimérico sólido comprende aditivos y/o materiales de relleno orgánicos y/o inorgánicos, seleccionándose estos preferentemente a partir del grupo constituido por TiO_2 , vidrio, carbono, pigmentos colorantes, lípidos y ceras.
- 20 7. Empleo según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que el sustrato es parte de un capilar, una placa de microtitulación, un chip microfluídico, una tira de ensayo, un soporte para la microscopía de fluorescencia, un conjunto de sensores u otro campo de detección óptico.
8. Empleo según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que el revestimiento metálico comprende en la superficie del sustrato al menos parcialmente moléculas para el enlace directo y/o indirecto de moléculas fluorescentes.
- 25 9. Procedimiento para la determinación o para la cuantificación de al menos un analito en una muestra que comprende los pasos:
- a) marcaje directo o indirecto opcional de al menos un analito con al menos un fluoróforo,
- b) aplicación de al menos un analito marcado a partir del paso a) o de un analito fluorescente sobre un sustrato como se define en una de las reivindicaciones 1 a 8,
- 30 c) excitación de al menos un fluoróforo mediante irradiación del sustrato con luz de longitud de onda apropiada, y
- d) medición de la fluorescencia para la determinación de la presencia o para la cuantificación de al menos un analito en la muestra.
- 35 10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado por que el al menos un fluoróforo presenta una longitud de onda de excitación en el intervalo de 360 a 780 nm, preferentemente de 490 a 680 nm.
11. Procedimiento según la reivindicación 9 o 10, caracterizado por que el al menos un fluoróforo presenta una longitud de onda de emisión en el intervalo de 410 a 800 nm, preferentemente de 510 a 710 nm.
- 40 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado por que el al menos un fluoróforo se selecciona a partir del grupo constituido por metoxicumarina, aminocumarina, Cy2, Alexa Fluor 488, isocianato de fluoresceína (FITC), Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 532, Cy3, Alexa Fluor 555, 5-TAMRA, Alexa Fluor 546, ficoeritrina (PE), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), Cy3.5, rodamina, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Cy5, Alexa Fluor 660, Cy5.5, Alexa Fluor 680 y Cy7, preferentemente a partir del grupo constituido por isocianato de fluoresceína (FITC), Cy3, ficoeritrina (PE), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), Cy5 y Alexa Fluor 680.
- 45 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizado por que el marcaje indirecto del analito con al menos un fluoróforo se efectúa por medio de una molécula marcada con fluoróforo y que se une al analito.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que la molécula que se une al analito se selecciona a partir del grupo constituido por anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, preferentemente fragmentos Fab, F(ab)'2 o scFv, ácidos nucleicos, enzimas, lípidos, partículas víricas, aptámeros y combinaciones de estos.

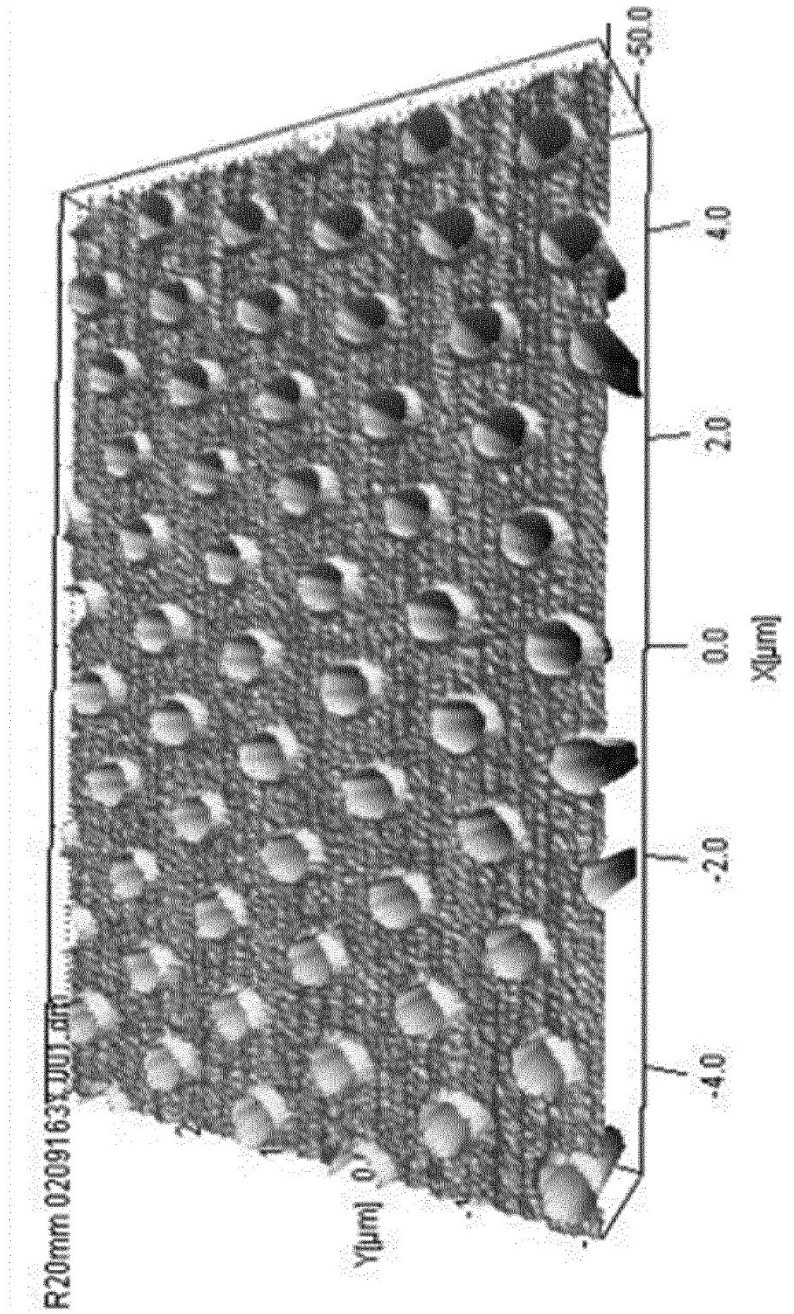


Fig. 1

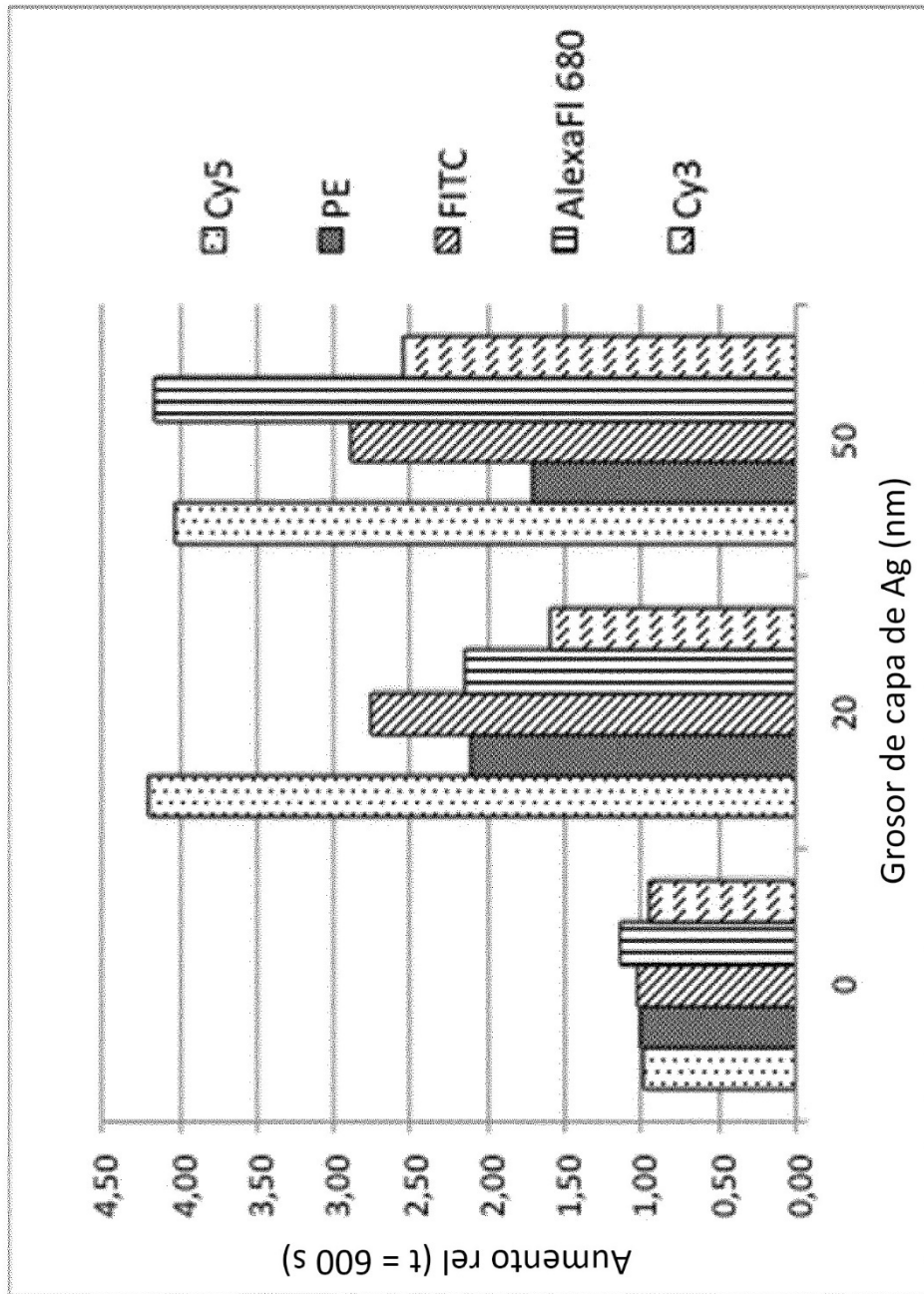


Fig. 2

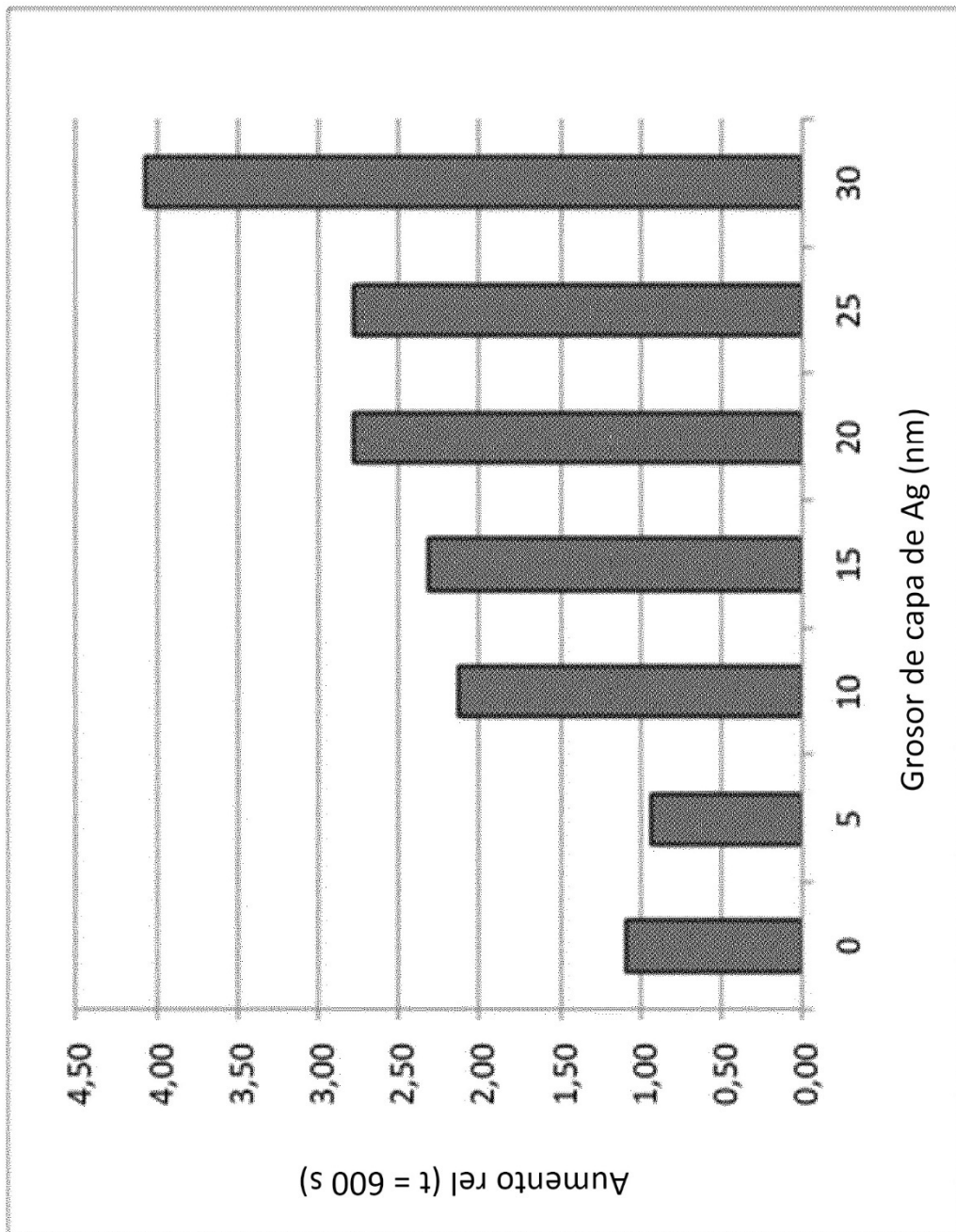


Fig. 3

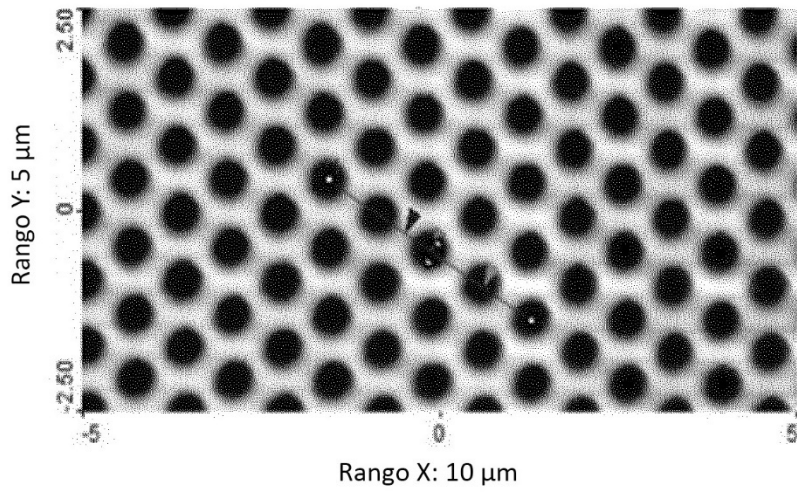


Fig. 4

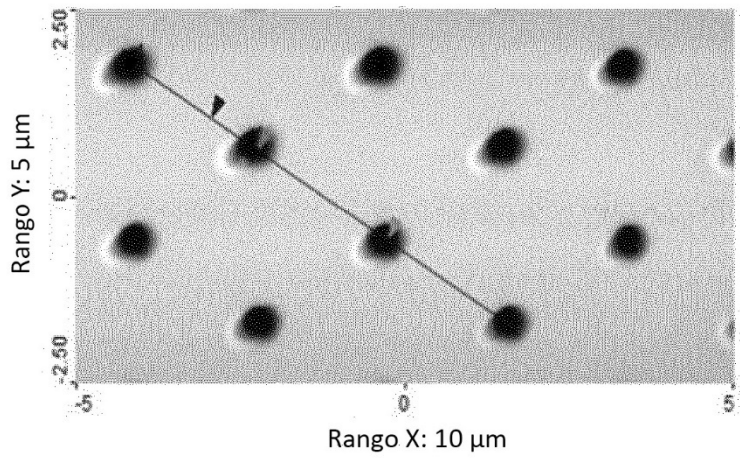


Fig. 5

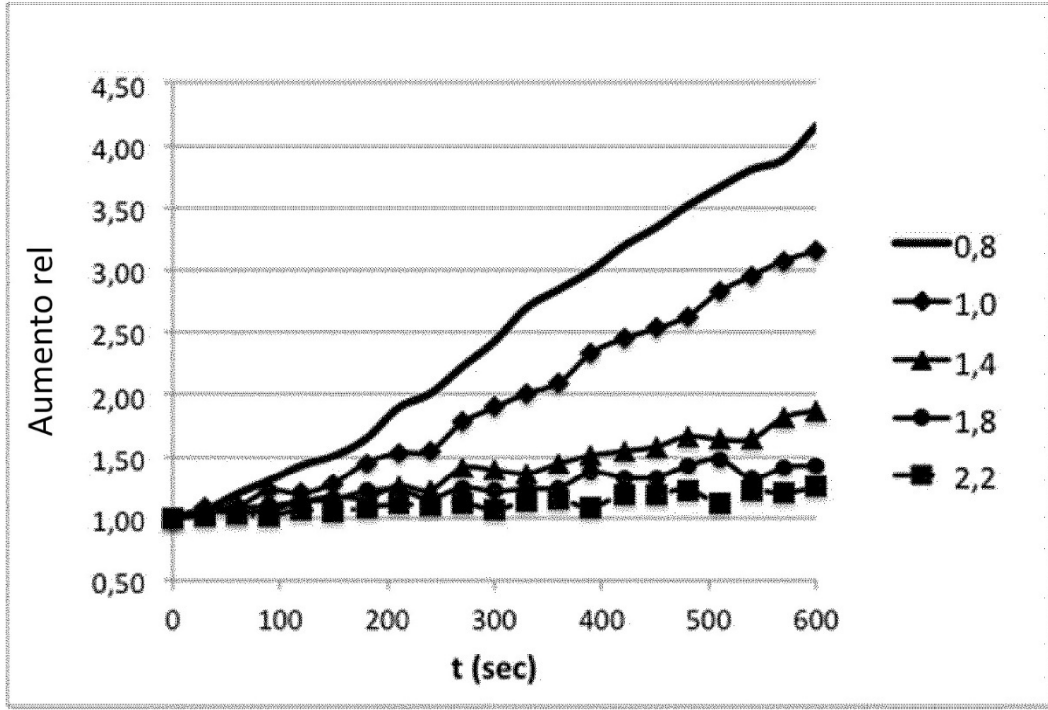
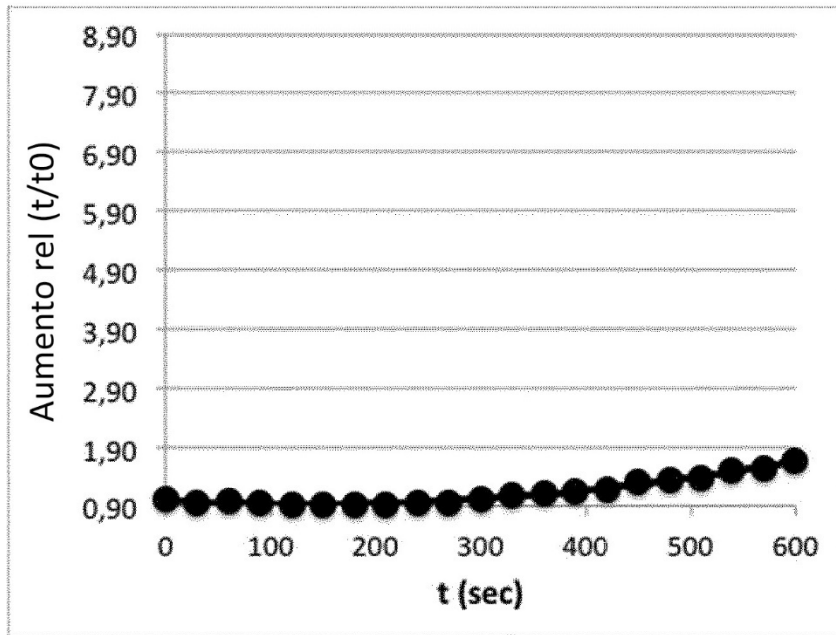
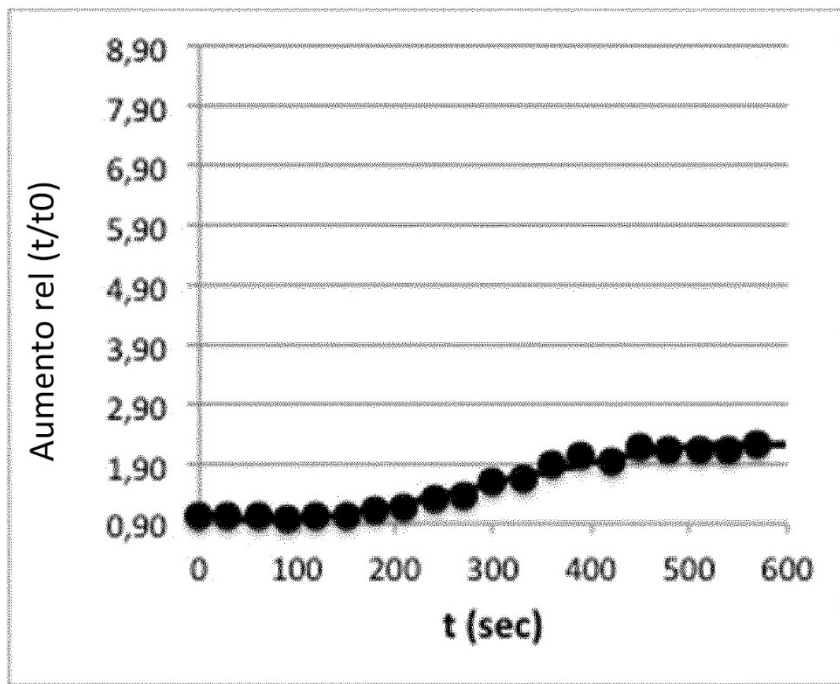


Fig. 6

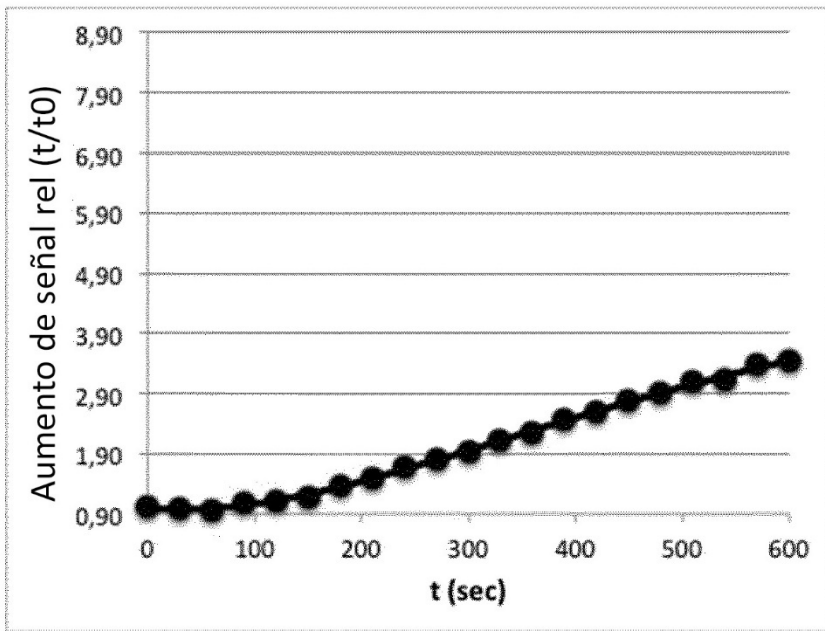


A (<100 nm)

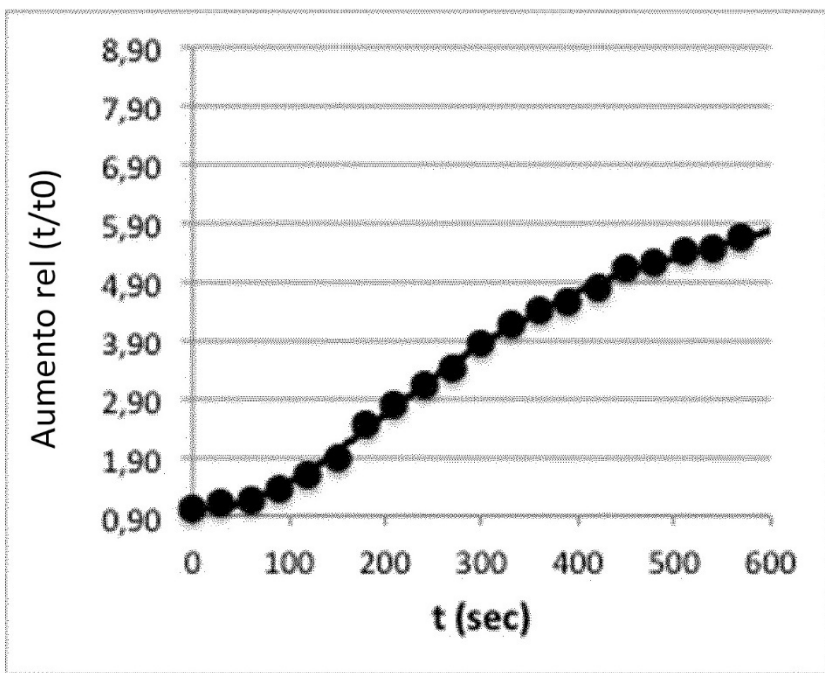


B (240 nm)

Fig. 7

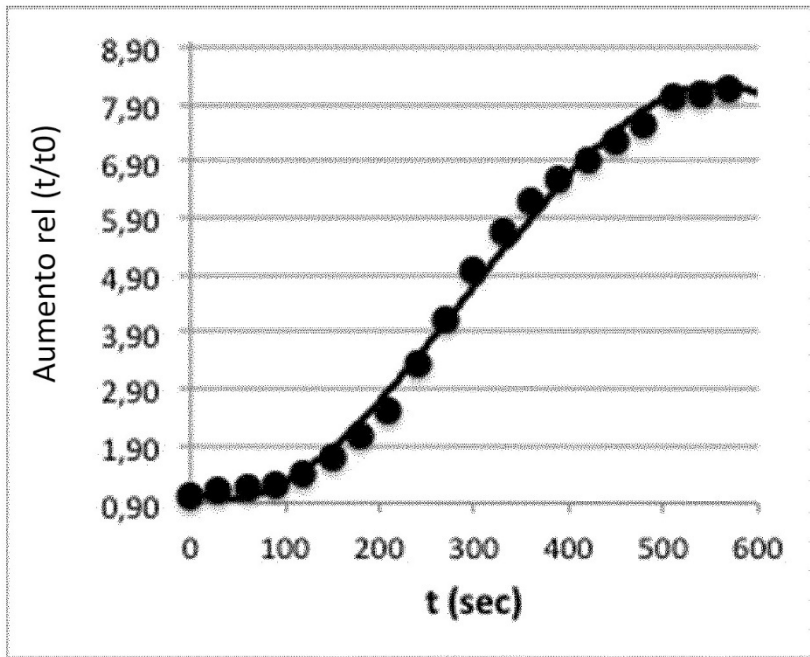


C (550 nm)



D (755 nm)

Fig. 7 (continuación)



E (874 nm)

Fig. 7 (continuación)

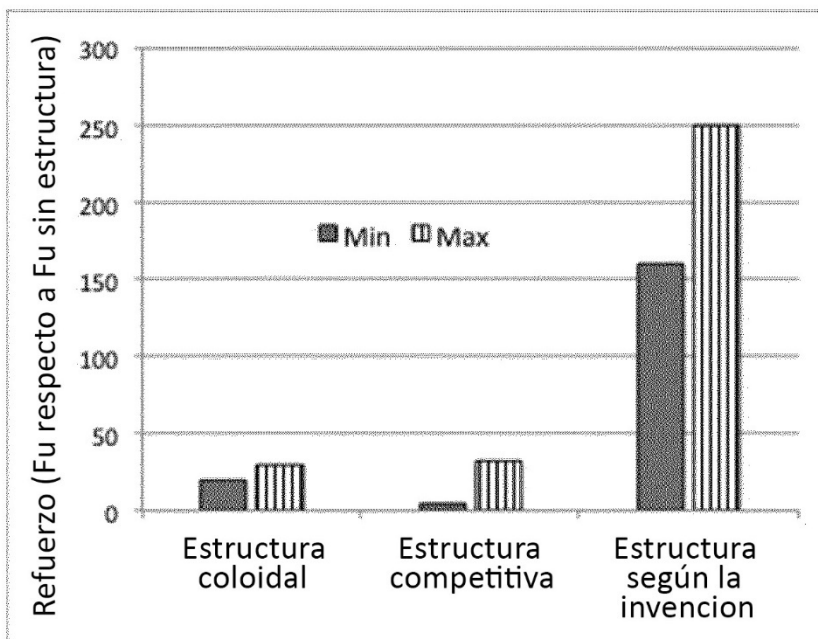


Fig. 8

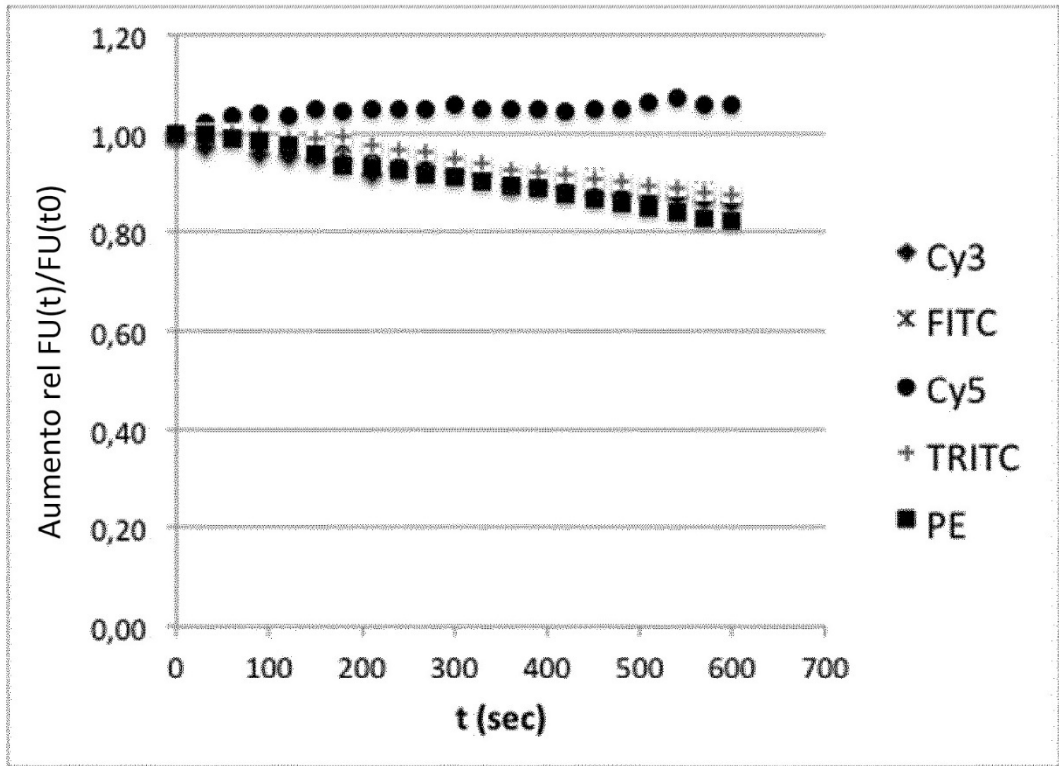


Fig. 9

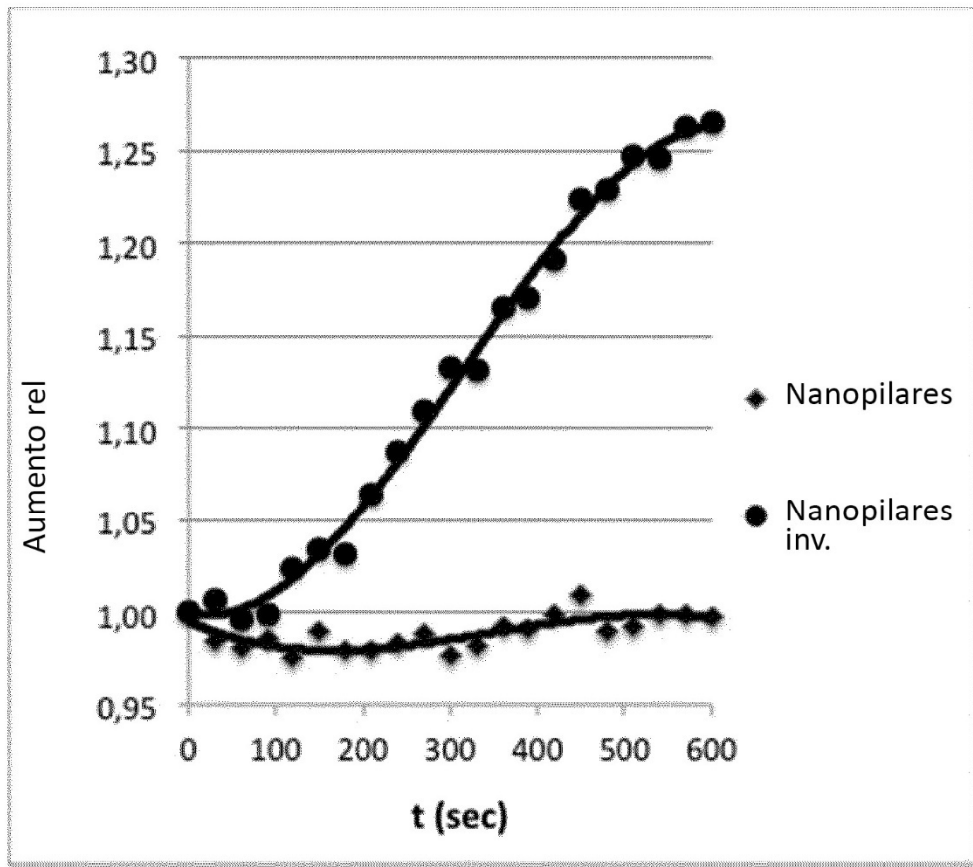


Fig. 10

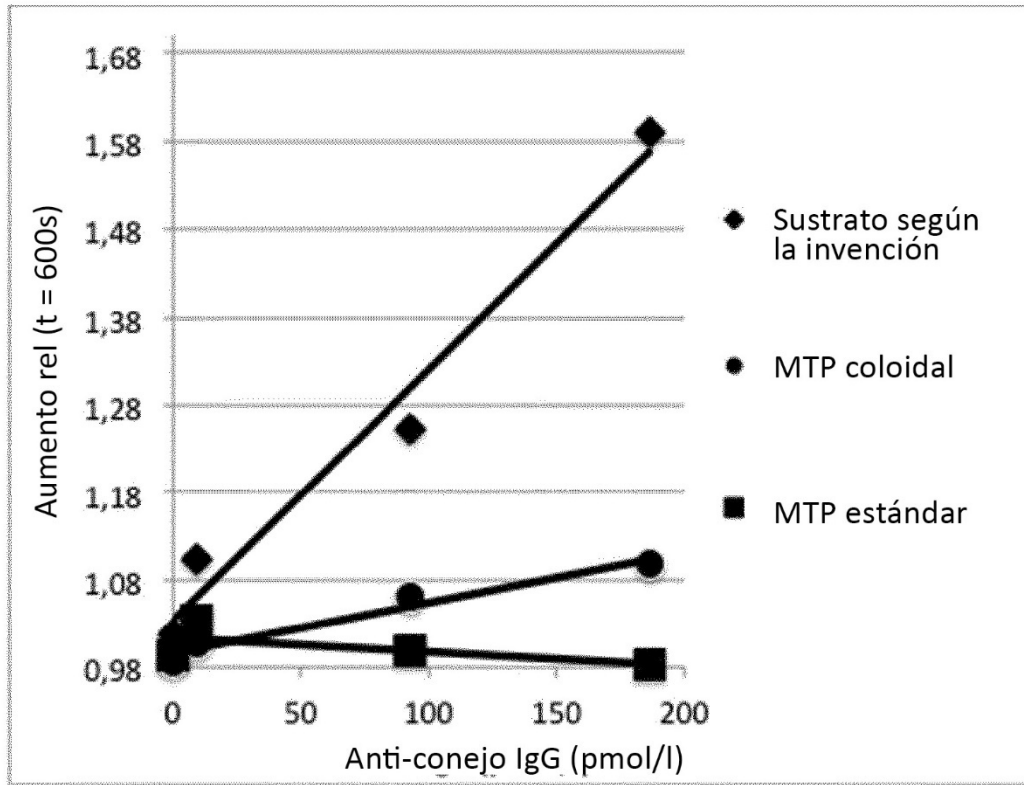


Fig. 11

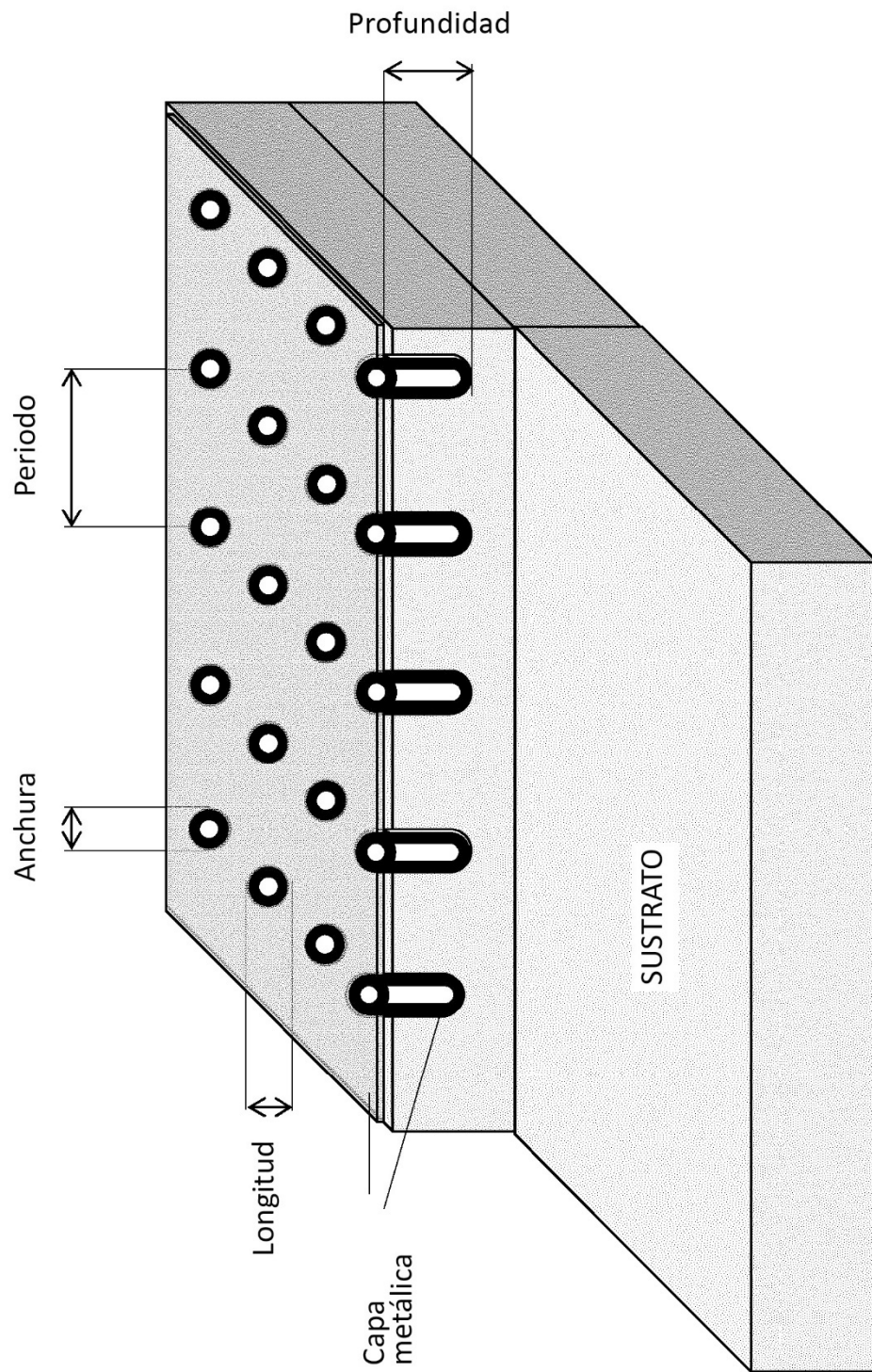


Fig. 12

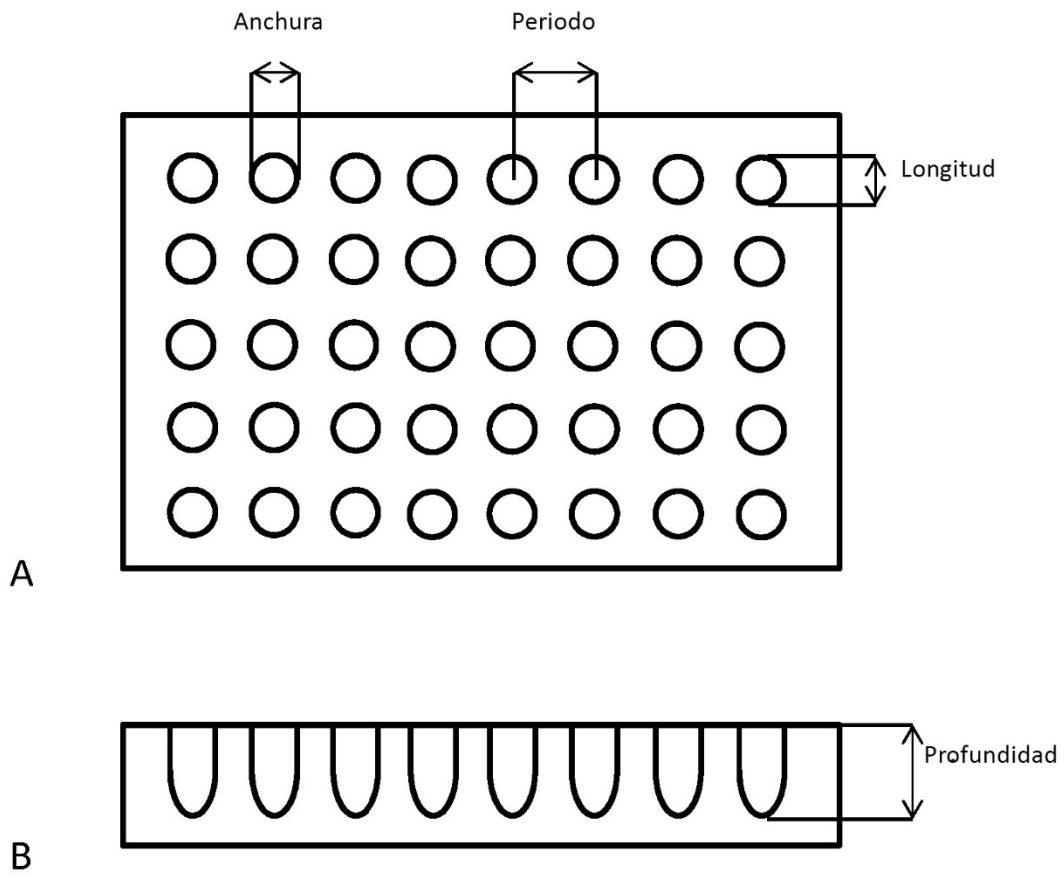


Fig. 13

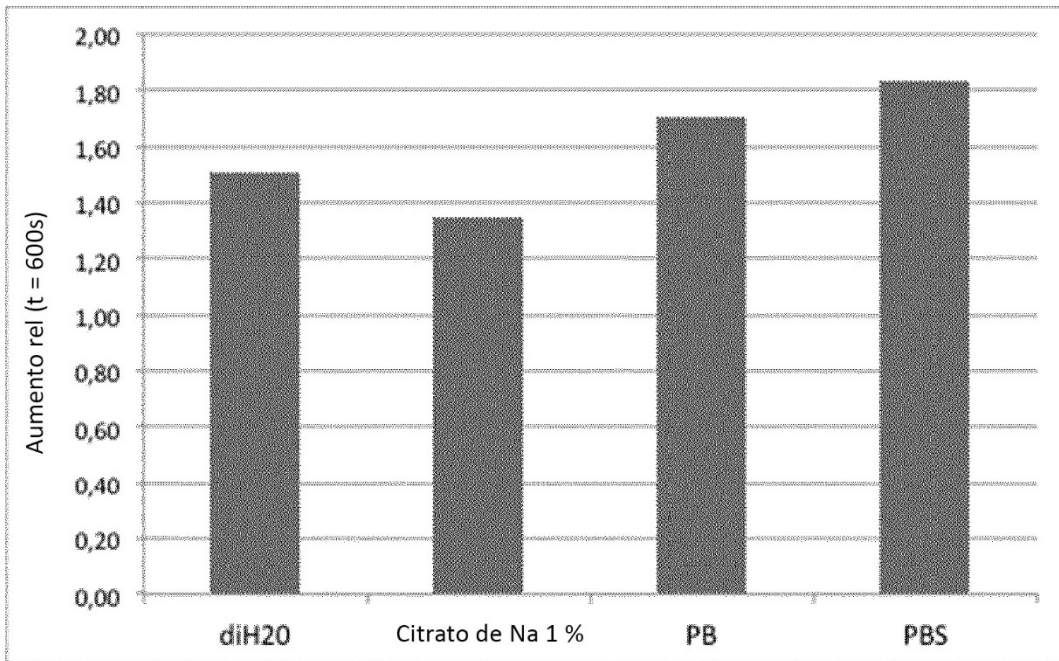


Fig. 14

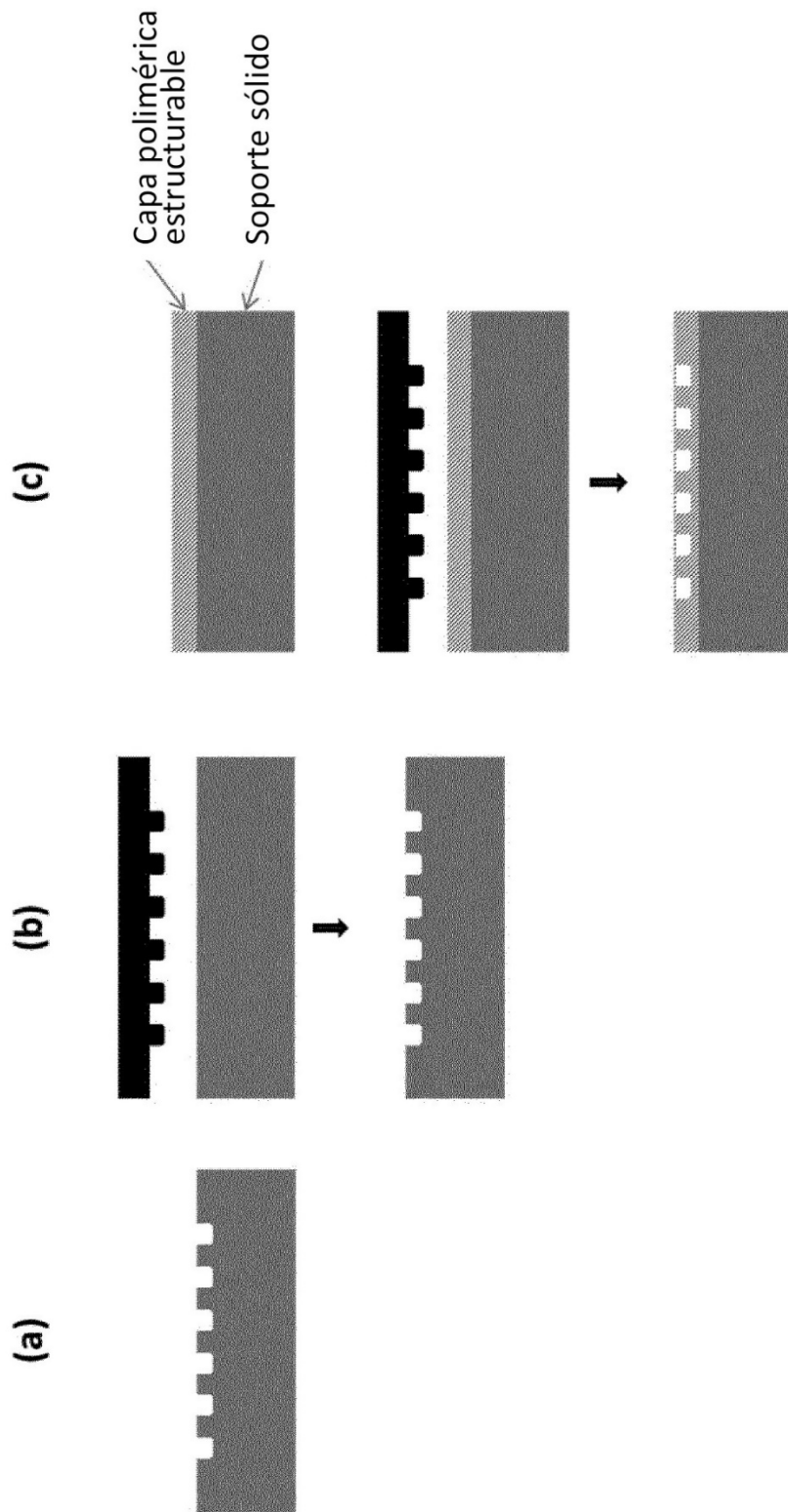


Fig. 15