



(51) Clasificación internacional de patentes:

G01N 15/02 (2006.01) G01N 21/75 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01) G01N 21/59 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01) G01N 15/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2018/070392

(22) Fecha de presentación internacional:
30 de mayo de 2018 (30.05.2018)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(71) Solicitantes: **PRAGMATIC DIAGNOSTICS, S.L.** [ES/ES]; Ps General Estartús, 6, 17178 SANT PRIVAT D'EN BAS (Girona) (ES). **SEPMAG SYSTEMS, S.L.** [ES/ES]; Centre d'Empreses de Noves Tecnologies - Parc

Tecnologic del Vallès, 08290 CERDANYOLA DEL VALLÈS (Barcelona) (ES).

(72) Inventores: **BENELMEKKI ERRETTY, Maria**; PRAGMATIC DIAGNOSTICS, S.L., Ps General Estartús, 6, 17178 SANT PRIVAT D'EN BAS (Girona) (ES). **GASSÓ PONS, Sergi**; PRAGMATIC DIAGNOSTICS, S.L., Ps General Estartús, 6, 17178 SANT PRIVAT D'EN BAS (Girona) (ES). **MARTÍNEZ GARCÍA, Lluís Miquel**; SEPMAG SYSTEMS, S.L., Centre d'Empreses de Noves Tecnologies - Parc Tecnologic del Vallès, 08290 CERDANYOLA DEL VALLÈS (Barcelona) (ES).

(74) Mandatario: **CARPINTERO LOPEZ, Mario**; Herrero & Asociados, S.L., Cedaceros, 1, 28014 MADRID (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG,

(54) Title: OPTO-MAGNETOPHORETIC METHOD FOR THE DETECTION OF BIOLOGICAL AND CHEMICAL SUBSTANCES

(54) Título: MÉTODO OPTOMAGNETOFORÉTICO PARA LA DETECCIÓN DE SUSTANCIAS BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS

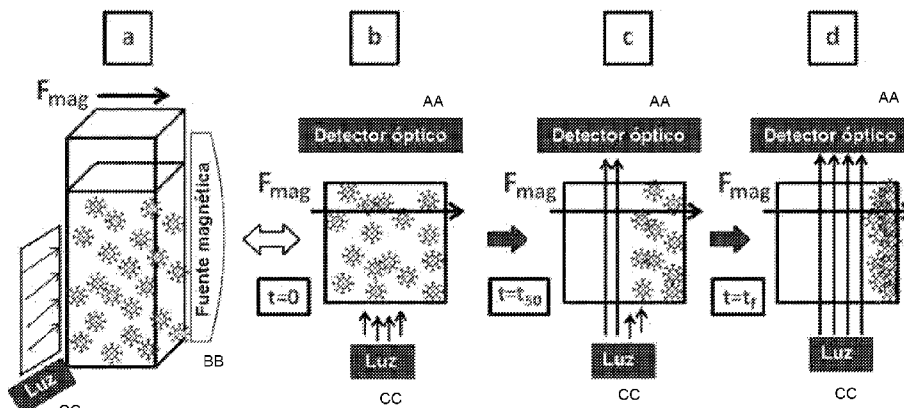


FIG. 1

AA Optical detector
BB Magnetic source
CC Light

(57) Abstract: Method for detecting the presence or absence of a biological or chemical substance in a particular sample mixed with a suspension with functionalized magnetic particles, comprising: providing a light source and a detector, providing a constant magnetic force perpendicular to the light propagation direction by applying a constant magnetic field gradient, with an absolute value which is higher than 0.1 T, and measuring the change in the transparency of the suspension of magnetic particles as a function of time and comparing it with the change as a function of time in the absence of the target biological or chemical substance. The method of the invention makes it possible to monitor transparency irrespectively of the emitted wavelength and the optical properties of the particles.



AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

(57) Resumen: Método para detectar la presencia o ausencia de una sustancia biológica o química en una muestra particular mezclada con una suspensión con partículas magnéticas funcionalizadas, que comprende: proporcionar una fuente de luz y un detector, proporcionar una fuerza magnética constante perpendicular a la dirección de propagación de la luz aplicando un gradiente de campo magnético constante, y con un valor absoluto que es mayor de 0, 1 T y medir el cambio de la transparencia de la suspensión de partículas magnéticas frente al tiempo y compararlo con la variación en el tiempo en ausencia de la sustancia biológica o química diana. El método de la invención permite monitorizar la transparencia independientemente de la longitud de onda emitida y las propiedades ópticas de las partículas.

MÉTODO OPTOMAGNETOFORÉTICO PARA LA DETECCIÓN DE SUSTANCIAS
BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a un método para la detección de sustancias (orgánicas, inorgánicas o biológicas). En particular, la invención usa una técnica magnetoforética novedosa, en la que los materiales en una muestra se mezclan con partículas magnéticas funcionalizadas, de manera que se monitoriza la variación de las propiedades ópticas frente al tiempo y se compara con la variación en el tiempo en ausencia de la sustancia biológica o química seleccionada como diana.

15 Descripción de la técnica relacionada

20 Los últimos años han sido testigo de un aumento en el uso de métodos de diagnóstico clínicos que implican procedimientos inmunológicos porque son específicos y tienen alta sensibilidad. De los muchos métodos de ensayo inmunológico heterogéneos y homogéneos disponibles, los ensayos homogéneos basados en la aglutinación de partículas de látex continúan usándose ampliamente en biología y medicina para la detección de pequeñas cantidades de un anticuerpo o antígeno en una muestra de prueba fluida. Algunas ventajas de estos ensayos son que los procedimientos son sencillos, aplicables ampliamente, no peligrosos y los resultados de las pruebas se obtienen en un tiempo muy corto. La reacción de aglutinación implica la agregación *in vitro* de partículas portadoras microscópicas (habitualmente de naturaleza polimérica, denominadas látex). Esta agregación está mediada por la reacción específica entre dos moléculas, tales como anticuerpos y antígenos, uno de los cuales se inmoviliza sobre la superficie de las partículas de látex para potenciar la sensibilidad y ampliar el punto de equivalencia. Se introduce un fluido que contiene el ligando de interés en una suspensión de las partículas portadoras sensibilizadas, y la aglutinación se señala como indicativa del ligando. La reacción de aglutinación puede usarse de varios modos diferentes para detectar el ligando de interés, y cada uno tiene sus propias limitaciones y aplicaciones.

30

Hay varias técnicas basadas en los fenómenos de dispersión de la luz para

detectar la aglutinación de partículas de látex: turbidimetría, nefelometría, anisotropía angular y espectroscopía de correlación de fotones. La turbidimetría implica la medición de la intensidad del haz incidente cuando pasa a través de la muestra. El haz de luz puede pasar a través de una suspensión o puede absorberse, reflejarse o dispersarse por las partículas. Como consecuencia, la intensidad de la luz disminuye a medida que se propaga a través de la suspensión. Para las partículas no absorbentes, la disminución en la intensidad de la luz debido a la dispersión se expresa como turbidez. Esta técnica es rápida y fácil de usar. De hecho, la turbidimetría no requiere ningún equipo especial distinto de un espectrofotómetro, que está disponible generalmente en laboratorios clínicos.

Hay espectrofotómetros completamente automáticos que no sólo miden la luz transmitida automáticamente en un tiempo deseado, sino que también diluyen, pipetean y transfieren a la cubeta los volúmenes convenientes de tampones de reactivos y muestras, incuban a una temperatura programada y realizan los cálculos necesarios usando las curvas de calibración y algoritmos seleccionados. La posibilidad de realizar pruebas de aglutinación de látex en estos analizadores automáticos permite el procesamiento de cientos de muestras en un tiempo corto sin invertir en nueva instrumentación o personal.

Sin embargo, para optimizar el cambio de turbidez, que se produce durante la aglutinación, es importante seleccionar el tamaño de partícula apropiado. Por ejemplo, el número de puentes de antígeno-anticuerpo entre pares de partículas durante la inmunoaglutinación es de aproximadamente 2–10. Con partículas más grandes, los esfuerzos cortantes a través de estos puentes pueden dar como resultado la alteración de los materiales aglutinados cuando se bombean a alta velocidad en máquinas automáticas. Por tanto, las partículas de diámetro más pequeño pueden producir ensayos más robustos. Para que las partículas se aglutinen, en primer lugar deben colisionar de modo que puedan formarse puentes antígeno-anticuerpo. Para moléculas y partículas pequeñas la difusión es lo suficientemente rápida como para producir las colisiones iniciales necesarias para la formación del agregado. Si las partículas son grandes, la difusión es reducida (es decir, la cinética de aglutinación) porque el coeficiente de difusión es inversamente proporcional al tamaño de partícula. Son deseables partículas pequeñas debido a la necesidad de aumentar la frecuencia de colisión entre partículas o agregados para potenciar la tasa de producción de inmunoagregados.

La detección turbidimétrica depende fuertemente del tamaño de partícula y de la longitud de onda de la luz incidente. Es importante seleccionar cuidadosamente las partículas (tamaño) adecuadas para una longitud de onda adecuada, puesto que la turbidez alcanza un máximo con el tiempo. El máximo se produce cuando el cambio de señal supera los límites ópticos del sistema de medición. Se ha observado mediante espectroscopía de correlación de fotones que los cambios en el tamaño de los agregados continúan más allá de la meseta observada en ensayos turbidimétricos. El rendimiento óptimo puede ser una función de la razón del diámetro de partícula con respecto a la longitud de onda incidente, y el índice de refracción de la partícula. Por tanto, la selección del material de partícula, el tamaño de partícula y la longitud de onda de detección de la reacción de aglutinación son todos ellos factores importantes en la optimización de la sensibilidad del ensayo. Para partículas que son pequeñas en comparación con la longitud de onda de luz, la dispersión aumenta con la cuarta potencia inversa de la longitud de onda. Longitudes de onda más cortas, tales como 340 nm, dan diferencias de señal más grandes durante la aglutinación que longitudes de onda más largas, tales como 450 nm. Por otra parte, cuanto mayor es el índice de refracción de las partículas a la longitud de onda de elección, mayor es la señal de dispersión de la luz.

En general, el índice de refracción de un material es mayor a longitudes de onda más cortas. Se han propuesto partículas con un núcleo de polivinilnaftaleno para potenciar la sensibilidad de los ensayos de inmunoaglutinación de látex. Galvin *et al.* reivindicaron que para los límites de detección más bajos, las partículas deben estar en el intervalo de tamaño de 40–70 nm, con un alto índice de refracción pero baja absorbancia a la longitud de onda de luz usada.

Este equilibrio entre el tamaño y el índice de refracción de las partículas (material), y la longitud de onda de la luz incidente puede ser decisivo para la sensibilidad de la prueba. Como consecuencia, pueden ser necesarios detectores más avanzados (por ejemplo, detectores de múltiples longitudes de onda de alta resolución) para concluir la prueba. Desgraciadamente, estos detectores son más caros y por tanto más difíciles de implementar, especialmente en países en vías de desarrollo. Además, la selección de las partículas más adecuadas para cada prueba puede requerir un alto nivel de conocimiento óptico y un acceso fácil a una gran selección de partículas.

Se ha realizado un progreso sustancial en el desarrollo de tecnologías en el campo de las microesferas magnéticas y las nanoesferas magnéticas. Estas nanoesferas y microesferas magnéticas que contienen núcleos superparamagnéticos en una matriz no magnética (a continuación en el presente documento, partículas magnéticas) se usan en numerosas aplicaciones biológicas. Se usan, por ejemplo, como portadores, que pueden dirigirse a un sitio particular usando un campo magnético externo.

Las partículas magnéticas mencionadas anteriormente se diseñan para crear partículas magnéticas con gran respuesta superparamagnética. De hecho, estas partículas magnéticas normalmente se obtienen incluyendo nanocristales superparamagnéticos en una matriz no magnética tal como poliestireno y sílice nanoporosa. Las partículas magnéticas resultantes conservan la respuesta superparamagnética de sus nanocristales superparamagnéticos constituyentes y muestran una magnetización mayor cuando se aplica un campo magnético externo. Además, no se observa ni coercitividad ni remanencia a la temperatura de trabajo. Sin embargo, además del comportamiento superparamagnético intrínseco de los nanocristales constituyentes, deben considerarse las interacciones entre los nanocristales dentro de la matriz de esqueleto debido a proximidad y efectos de superficie debido al recubrimiento; estos pueden conducir a cambios en la respuesta magnética global de la partícula coloidal.

La separación biomagnética (usando las partículas magnéticas descritas anteriormente) tiene numerosas aplicaciones en las ciencias biológicas. Desde la separación celular hasta el diagnóstico molecular, esta tecnología puede usarse con volúmenes que oscilan entre algunos nanolitros (laboratorio en un chip) y decenas de litros (producción de reactivos de IVD). Uno de los problemas de trabajar con tubos pequeños y separados magnéticos clásicos (o imanes sencillos) es la falta de definición de la fuerza magnética. Cuando el campo magnético y su gradiente cambian con la distancia, la fuerza de la partícula magnética en la suspensión no es constante y las variaciones en el comportamiento de la suspensión son difíciles de controlar.

El documento EP0339623 da a conocer un método de inmunoensayo magnético por láser y un sistema basado en reacciones antígeno-anticuerpo. Para este método, son necesarias nanopérlas y se usan electroimanes para generar la fuerza magnética. El uso de nanopartículas magnéticas ($D \ll 100$ nm) implica que

su momento magnético es muy pequeño, por tanto cada partícula se mueve in
interaccionar magnéticamente con sus vecinas. La velocidad de separación es
entonces $v=(D^2/18n)*\mu_0*M(H)*\nabla(H)*\rho$, donde D es el diámetro de partícula, n la
viscosidad del tampón y ρ la densidad de la partícula. Este comportamiento
5 magnetoforético individual implica una velocidad de separación lenta y una fuerte
dependencia de las características de nanopérlas individuales. Esto implica una
gran variabilidad debido a la dispersión inherente del tamaño de un conjunto de
partículas magnéticas reales. Además, la velocidad también sería dependiente del
perfil de campo magnético. El uso de electroimanes, con piezas polares
10 ferromagnéticas blandas, hace muy difícil generar variaciones de campo magnético
bien controladas, por tanto el intervalo que puede lograrse de gradientes de campo
magnético es limitado, y de ese modo la fuerza magnética que puede lograrse.
Dado que la permeabilidad de las piezas polares también dependería fuertemente
del valor local del campo (incluyendo la histéresis inherente de los materiales
15 ferromagnéticos), la trayectoria de flujo magnético cambiaría suavemente de un
punto a otro. El valor local del campo magnético en las piezas polares (y como
consecuencia en el entrehierro) también variará con la fuerza magnetomotriz
aplicada (Amperio-vuelta) y sus valores anteriores. El valor de la fuerza magnética
sobre una nanopérla magnética individual dependería del valor de la intensidad
20 aplicada en el electroimán, pero sería diferente si la corriente está aumentando o
disminuyendo, y si las piezas polares se han saturado o no (es decir, la corriente
eléctrica aplicada ha alcanzado un valor suficientemente alto como para alcanzar la
magnetización máxima del material de las piezas polares). Todos estos efectos
implican que para un conjunto dado de pérlas individuales, su gran variación en el
25 tiempo necesario para alcanzar la posición final (o cualquier punto específico), e
incluso para tener exactamente la misma distribución de características físicas
(tamaño, densidad, propiedades magnéticas), la reproducibilidad requeriría un
control preciso de la corriente eléctrica y un control minucioso sobre cómo se aplica
al electroimán.

30 Todas estas variaciones enmascararían, parcial o totalmente, los cambios
magnetoforéticos inducidos en las pérlas debido a la diana inmunocapturada.

Además, el uso de un láser hace que el sistema óptico sea costoso y
complejo, ya que la necesidad de enfocar el láser a un solo punto y medir la luz
posterior dispersada requiere un entorno óptico bien controlado. Además, los

voluminosos electroimanes usados para generar la fuerza magnética necesaria requieren un alto consumo de energía que genera calor que es difícil de manejar.

SUMARIO DE LA INVENCION

5 La presente invención proporciona un método para detectar la presencia o
ausencia de una sustancia biológica o química basado en una técnica de opto-
magnetoforesis, en el que los materiales se hacen reaccionar con partículas
magnéticas funcionalizadas en el intervalo de 10-1000 nm en presencia de un
10 gradiente de campo magnético uniforme. El método no depende del índice de
refracción de la matriz no magnética de las partículas magnéticas, como en las
técnicas turbidimétricas conocidas, y el dispositivo no necesita un láser ni
electroimanes, resolviendo por tanto la invención los problemas comentados
anteriormente. El método comprende las etapas de proporcionar una fuente de luz y
un detector, proporcionar una fuerza magnética perpendicular a la dirección de
15 propagación de la luz con un gradiente de campo magnético constante, con un
valor absoluto que es mayor de 0,1 T, y medir el cambio de la transparencia de la
suspensión de partículas magnéticas frente al tiempo. Los sistemas para poner la
invención en práctica comprenden una fuente de luz y un detector, un generador de
fuerza magnética compuesto por imanes permanentes para generar una fuerza
20 magnética perpendicular a la dirección de propagación de la luz, con un gradiente
de campo magnético constante y con un valor absoluto que es mayor de 0,1 T y
medios de procesamiento para medir el cambio de la transparencia de la
suspensión de partículas magnéticas frente al tiempo. En una realización, el
generador de fuerza magnética está formado por al menos cuatro imanes
25 permanentes que siguen la progresión de Hallbach para un cuadrupolo en un
soporte cilíndrico. En otra realización, el generador de fuerza magnética está
formado por dos imanes permanentes con polaridades opuestas y la light y el
detector es un espectrofotómetro.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para completar la descripción y proporcionar la mejor comprensión de la
invención, se proporciona un conjunto de dibujos. Dichos dibujos ilustran una
realización preferida de la invención, que no debe interpretarse como restrictiva del
alcance de la invención, sino sólo como un ejemplo de cómo puede llevarse a cabo

la invención.

Las figuras 1a-1d muestran el principio de trabajo de un sistema según la invención.

5 La figura 2a es una vista desde arriba del generador de fuerza magnética usado en la invención.

La figura 2b es una representación del área de trabajo descrita en la figura anterior.

La figura 3a muestra una vista desde arriba de la invención cuando se incorporan cuatro recipientes.

10 La figura 3b muestra una vista desde arriba de la realización anterior cuando ha terminado el procedimiento de separación.

La figura 3c muestra dos vistas laterales de la realización anterior.

La figura 4a muestra una segunda realización de la invención con una configuración lineal en lugar de una circular.

15 La figura 4b es una vista desde arriba de la realización anterior.

La figura 4c es una representación del área de trabajo descrita en la figura anterior.

20 La figura 5 muestra los datos de la transparencia frente al tiempo durante la separación magnética para una suspensión que contiene perlas magnéticas funcionalizadas con anticuerpos anti-proteína C reactiva (CRP).

La figura 6 muestra los datos de transparencia frente al tiempo durante la separación magnética de partículas magnéticas usando el dispositivo descrito en las figuras 4a-4b.

25 DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

En la presente invención, se hacen reaccionar materiales en una muestra con partículas magnéticas (disponibles comercialmente) que están funcionalizadas para unirse específicamente al material biológico en disolución seleccionado como diana para producir un agregado coloidal magnético. Las partículas magnéticas
30 pueden recubrirse con antígenos proteicos y hacerse reaccionar con el anticuerpo correspondiente, o con oligonucleótidos complementarios o no complementarios para la detección de enfermedades genéticas y patógenas. Otras agregaciones se basan en la interacción electrostática entre las partículas magnéticas y los materiales biológicos, o mediante la absorción del material sobre la superficie de las

partículas magnéticas. En el caso de microorganismos, las partículas magnéticas se absorben sobre la superficie del microorganismo. El agregado se dirige por las fuerzas magnéticas hacia las paredes del recipiente transparente que contiene la suspensión induciendo una mayor transparencia en la suspensión. La transparencia progresiva de la suspensión se monitoriza en tiempo real. La velocidad de separación en la presente invención depende de la magnetización y el tamaño de las partículas. Estos parámetros pueden ajustarse ajustando el tamaño y el contenido magnético de las partículas. Las partículas más adecuadas para su uso con la invención son partículas de 200-300 nm de diámetro con un contenido magnético del 20-60%.

Cuando las partículas magnéticas se funcionalizan y se mezclan con el analito, se forman agregados coloidales que contienen las partículas magnéticas y el analito. Estos agregados, cuando se llevan bajo un gradiente de campo magnético uniforme, se mueven a una velocidad mayor que las partículas magnéticas monodispersas iniciales (coloides sin analito). Tal como describe Andreu *et al* (J. S. Andreu *et al*, PHYSICAL REVIEW E 84, 021402 (2011)), el movimiento de las partículas magnéticas es un fenómeno cooperativo en el que la partícula individual tiene un momento magnético suficiente como para tener una interacción magnética dipolo-dipolo con sus vecinas, suficientemente fuerte como para superar la agitación térmica. Si esto ocurre, las partículas magnéticas forman cadenas que se mueven mucho más rápido que las partículas magnéticas aisladas. El número promedio de partículas que forman una cadena puede estimarse a partir de la fórmula $N = \sqrt{(\Phi_0 * e^{(\Gamma-1)})}$, donde Φ_0 es la concentración de partículas y Γ es la razón entre la energía magnética y térmica $\Gamma = (\mu_0 \pi D^3 M_s^2) / (72 k_B T)$, donde D es el diámetro de partícula y M_s es la magnetización de saturación. Cuando $N > 1$, las partículas magnéticas interaccionan y se mueven mucho más rápido que cuando $N \ll 1$ y cada partícula se mueve aislada. Por tanto, seleccionando el diámetro y la magnetización de saturación correctos para la partícula magnética seleccionada, es posible tenerla moviéndose como una partícula aislada (lenta) cuando no está aglutinada, pero moviéndose cooperativamente (rápida) cuando está aglutinada. Las partículas unidas a través de reacción con el analito actúan como partículas que tienen un diámetro más grande. Debe indicarse que el aumento en el diámetro tiene un mayor efecto sobre el valor de Γ (aún cuando la M_s efectiva sería menor para el material aglutinado) y su efecto sobre N es exponencial.

Este comportamiento induce una diferencia importante en el tiempo de separación magnética de los agregados formados y las partículas magnéticas monodispersas. Esta diferencia en el tiempo de separación magnética se monitoriza ópticamente midiendo la transparencia de la suspensión en tiempo real. En el caso de la formación del agregado, la suspensión alcanza mayores grados de transparencia en tiempos más cortos en comparación con la suspensión de las partículas magnéticas monodispersas. Esta monitorización óptica (transparencia de la suspensión) puede realizarse en luz blanca (combinación de diferentes longitudes de onda en el espectro electromagnético), o a longitudes de onda específicas tales como el espectro de UV-visible (350 nm, 580 nm). La monitorización óptica a una longitud de onda específica tiene una ventaja adicional sobre la monitorización óptica usando luz blanca, ya que permite la detección de agregados a concentraciones de tan solo el 0,001%. Además, a medida que los agregados se concentran en las paredes del recipiente transparente, en la región donde el campo magnético es máximo, este comportamiento permite su recogida para el análisis posterior.

En la técnica de turbidimetría clásica, dado que los agregados permanecen en la suspensión aumentando su turbidez (menor transmitancia), deben elegirse cuidadosamente las características de las partículas y la longitud de onda de la luz incidente para evitar superar los límites ópticos del sistema de medición. En comparación, en la presente invención, no es necesario seleccionar las partículas para una longitud de onda adecuada. Dado que los agregados son magnéticos y se eliminan por la fuerza magnética de la suspensión, los resultados de los experimentos no dependen de la interacción de la luz incidente con el agregado. Además, pueden usarse muchos tipos de partículas magnéticas (materiales compuestos de nanopartículas de óxido de hierro incluidas en matrices no magnéticas).

Las figuras 1a y 1b muestran una vista lateral y desde arriba del procedimiento de magnetoforesis según la invención. La luz se propaga en una dirección perpendicular a la fuerza magnética (F_{mag}) a través de la suspensión hasta alcanzar el detector óptico colocado en el otro lado del recipiente transparente. En 1c, los agregados dispersos homogéneamente comienzan a moverse hacia la pared del recipiente debido a la fuerza magnética (F_{mag}). Al final del procedimiento en 1d, todas las partículas magnéticas están cerca de la pared del recipiente y la

suspensión se vuelve transparente a la luz incidente. La luz transmitida se detecta mediante un detector óptico que indica el final del procedimiento de separación.

Para evaluar la dependencia del tiempo de la transparencia de muestras con y sin agregados, se genera una fuerza magnética constante en la totalidad del volumen de muestra. Para obtener una fuerza magnética constante es necesario cumplir dos condiciones: un gradiente de campo magnético constante, y la saturación del momento magnético de las partículas magnéticas. La fuerza magnética debe ser perpendicular a la dirección de propagación de la luz.

La fuerza magnética que actúa sobre las partículas magnéticas es el gradiente del producto del momento magnético por el campo magnético aplicado. Si el momento magnético de las partículas es constante, la fuerza es constante cuando el gradiente de campo magnético también es constante. Al mismo tiempo, el momento magnético de las partículas depende del campo magnético aplicado. Cuando el campo aplicado es pequeño, el momento magnético es proporcional a este último. El momento magnético resultante es entonces el producto del volumen (o la masa) de la partícula por el valor de la magnetización de las nanopartículas magnéticas incluidas en la matriz no magnética (partículas magnéticas). La magnetización es el producto de la susceptibilidad magnética (una constante que es intrínseca al material) multiplicada por el campo aplicado. Cuando el campo magnético alcanza un valor particular, la magnetización permanece casi constante, es decir se satura, y el momento magnético de cada partícula es constante. El valor del campo magnético aplicado donde el momento magnético cambia su respuesta desde lineal hasta saturado se conoce como campo de saturación (B_s).

El generador de fuerza magnética según la invención es una fuente de campo magnético que genera un campo magnético con un gradiente constante y un valor absoluto mayor que el campo de saturación en la región donde se colocan las muestras para medir los cambios de transparencia. Para fines prácticos, es suficiente un campo de 0,1 T para garantizar la saturación de cualquier partícula comercial adecuada para su uso con la invención. La velocidad de las partículas magnéticas colocadas en el portamuestras es el resultado de la competencia entre la fuerza magnética y la fuerza de arrastre generada por la viscosidad de la suspensión de tampón. La velocidad resultante del equilibrio de estas fuerzas es proporcional al cuadrado del diámetro de la perla magnética, el gradiente del campo magnético aplicado, la magnetización y la densidad de la partícula, y es

inversamente proporcionar a la viscosidad del tampón. Para perlas más grandes (manteniendo constantes las otras características), la velocidad de separación es por tanto más rápida debido al diámetro más grande. Los agregados actúan como partículas más grandes y se mueven por tanto más rápido que las partículas individuales.

Para el intervalo adecuado de diámetro perlas magnéticas y carga magnética seleccionada para esta aplicación (es decir, perlas que se mueven como partículas aisladas cuando no se unen por la captura de la diana, pero tienen un movimiento magnetoforético cooperativo cuando se agregan por la captura de la sustancia diana), son necesarios gradientes de campo magnético de entre 1 T/m y 100 T/m a lo largo de grandes volúmenes si la separación va a realizarse en pocos minutos y no en varias horas. Estos gradientes (en entrehierros relativamente grandes) son muy difíciles de obtener con electroimanes debido a las limitaciones inherentes al uso de piezas polares ferromagnéticas blandas. Sin embargo, usando imanes permanentes anisotrópicos magnetocristalinos actuales, como materiales basados en tierras raras, es posible añadir el efecto de las fuentes de campo magnético con diferentes direcciones sin afectar a la dirección de magnetización de los imanes vecinos, generando así altas variaciones de campo magnético espacial, incluyendo gradientes constantes lineales mayores que los que pueden obtenerse con electroimanes más grandes y más voluminosos y sin necesidad de usar fuentes de alimentación. Obsérvese que para perlas magnéticas muy pequeñas como las usadas para la separación celular activada por magnetismo o la patente EP0339623, estos gradientes de campo magnético pueden no ser suficientemente altos como para realizar la separación suficientemente rápida para las aplicaciones prácticas.

Cuando la fuerza magnética generada es homogénea en la posición de la muestra (es decir, el gradiente magnético es constante y el campo magnético es mayor que el campo de saturación), todas las perlas se mueven a la misma velocidad. Por tanto, una vez que las perlas más rápidas comienzan a moverse, su movimiento marca el límite entre el tampón transparente y la región opaca. Dado que todas las perlas se mueven a la misma velocidad, la densidad óptica en la región delante del límite es constante. En estas condiciones, los cambios en la transparencia como función del tiempo son fáciles de parametrizar. Esto conduce a un modo más fácil de correlacionar la presencia/ausencia de los agregados y por

consiguiente, la presencia del analito de interés.

Los medios ópticos pueden ser tan sencillos como un LED que genera la luz y un detector tal como un fotodiodo o una resistencia dependiente de la luz que mide la cantidad de luz transmitida a través de la muestra. Esta disposición sencilla
5 permite colocar una muestra con su propia fuente de luz y un detector para medir un solo analito, o varias muestras (cada una con fuente de luz y detector) dentro de una cavidad cilíndrica, lo que permite que un ensayo de múltiples analitos o un número medio de analitos pueda medir simultáneamente múltiples analitos en una sola serie del ensayo. Esto se distingue de los procedimientos que miden un analito
10 a la vez.

En una primera realización, el dispositivo tiene una configuración cilíndrica. En este caso, el campo magnético requerido es cuadrupolar. De este modo, el gradiente de campo magnético radial es constante, con intensidad cero en el eje del cilindro. Esto también tiene la ventaja de que el perfil de campo magnético obtenido
15 sea lo suficientemente grande como para colocar varias muestras, donde cada muestra tiene su fuente de luz y sensor óptico. Para este fin, se colocan varios imanes en un soporte de tipo anillo que sigue la progresión de Hallbach para un cuadrupolo: la dirección de magnetización de cada imán debe ser 3 veces el ángulo con respecto a la posición angular de su centro en los sistemas de coordenadas cilíndricas definidos por la cavidad, tal como se describe en la figura 2a.
20

En una realización preferida, para una fabricación más sencilla y más fácil, se usan imanes de sección cuadrada. Se colocan N imanes idénticos, siendo N mayor de 4, magnetizados a lo largo de uno de sus lados, a la misma distancia radial, R, desde el centro del eje del cilindro y se distribuyen a intervalos angulares
25 regulares, θ , donde $\theta=2\pi/N$. La posición angular del imán permanente podría ser entonces $n\theta$, para $n=1,\dots,N$, y la dirección de magnetización para cada imán se define por $\gamma(n)=3n\theta$. (Figura 2a). Si es necesario un gradiente de campo magnético mayor, pueden añadirse varios anillos concéntricos. Con esta configuración, es fácil obtener gradientes en el intervalo de entre 1 y 100 T/m. Las muestras se colocan a
30 distancias radiales donde el campo magnético es mayor que el campo de saturación de la nanopartícula magnética (B_s). Cuando las muestras se colocan a una distancia $r>r_s$ ($r_s=B_s/\nabla|B|$), donde $\nabla|B|$ es el valor de la componente radial del gradiente de campo magnético constante generado por el conjunto de imán permanente (figura 2b).

Un generador cilíndrico de fuerza magnética según una realización de la invención usa 12 imanes permanentes de NdFeB de 40 mm de altura y una sección cuadrada de 20x20 mm magnetizados a lo largo de sus lados. Los imanes pueden colocarse con sus centros a lo largo de una circunferencia de 56 mm, con una distancia angular de 30° entre ellos. Tal como se describe, la magnetización debe rotar 90° (30°x3) entre imanes sucesivos. Este generador de fuerza magnética generaría un gradiente magnético de 8 T/m en el plano central del cilindro definido por los imanes.

Para un gradiente de campo magnético radialmente constante de 8 T/m en una cavidad cilíndrica de 8 cm de diámetro, el recipiente transparente que contiene los agregados puede colocarse a una distancia mayor de 1,25 cm de radio ($0,1/8=0,0125$ m) desde el eje cilíndrico de la cavidad. Cuando las nanopartículas se mueven en la dirección radial, el sistema óptico se alinea perpendicular a ella, es decir tangencial a la circunferencia definida por el centro del portamuestras (figuras 3 a-c).

Las figuras 3a y 3b muestran esquemas en vista desde arriba del dispositivo magnetoóptico. Se introducen en el dispositivo cuatro cubetas que contienen las muestras. Cada muestra se ilumina desde un lado, mientras que el detector óptico se coloca en el lado opuesto del recipiente transparente (muestra). La fuerza magnética es perpendicular a la dirección de la propagación de la luz. La figura 3a representa el estado inicial ($t=0$) de las muestras cuando se introducen en el sistema. Las muestras son opacas a la luz incidente, y entonces no se transmite luz al sensor óptico. Al final del procedimiento de separación ($t=t_f$), todas las partículas magnéticas quedan atrapadas en una pared del recipiente transparente (figura 3b), entonces la suspensión se vuelve transparente a la luz incidente, lo que indica el final del procedimiento. La figura 3c, la etapa 1 y la etapa 2, muestran vistas laterales de las figuras 3a y 3b, respectivamente.

Al final del procedimiento de separación, se obtiene una curva sigmoidea que muestra el comportamiento de transparencia de la suspensión frente al tiempo t . La diferencia en la velocidad de separación magnética debido a la presencia/ausencia de agregados se determina midiendo el tiempo necesario para alcanzar un determinado nivel de transparencia, por ejemplo el 50% entre la transparencia mínima y la máxima. El tiempo de referencia se obtiene usando una suspensión de perlas magnéticas sin el analito. Cuando es necesario someter a

prueba una nueva muestra para determinar la presencia del analito, se añade la misma cantidad de perlas magnéticas, para mantener constante la concentración. La muestra se incuba y se introduce en el generador de fuerza magnética. Se monitoriza el cambio en la transparencia y el tiempo necesario para lograr el nivel definido de transparencia determinada. Este tiempo puede ser igual al tiempo de referencia: esto indicaría la ausencia de agregados que no se formarían si el analito no está presente en la muestra de prueba. El segundo resultado posible es que el tiempo necesario para alcanzar el nivel definido de transparencia es más corto que el tiempo de referencia. Este segundo resultado indica la presencia de agregados (que se mueven más rápido durante el procedimiento de separación), formados porque el analito está presente en la muestra sometida a prueba.

Para mejorar la sensibilidad, los datos experimentales pueden ajustarse a la curva sigmoidea usando el método de mínimos cuadrados (u otro algoritmo similar). Los datos pueden normalizarse entonces entre la transparencia máxima y la mínima. Los parámetros de ajuste permiten obtener una curva analítica y determinar con más precisión el valor del tiempo. Por ejemplo, los puntos experimentales (transparencia frente a tiempo) pueden ajustarse mediante la expresión $V(t) = V_0 + (V_f - V_0) / (1 + (t/t_{50})^p)$ usando el método de mínimos cuadrados. Los parámetros de ajuste serían V_0 , la salida del sensor óptico al comienzo del procedimiento (valor menor de la transparencia); V_f , la salida del sensor óptico a $t = \infty$ (transparencia máxima); t_{50} , el tiempo cuando la salida del sensor es exactamente el promedio de V_0 y V_f ; y p , un exponente proporcional a la pendiente de la curva en t_{50} . La curva de transparencia frente al tiempo puede normalizarse ($V_0 = 0\%$, $V_f = 100\%$), $V_n = 100\% / (1 + (t/t_{50})^p)$. Si el nivel seleccionado de transparencia es del 50%, este ajuste proporcionaría directamente el valor del tiempo (t_{50}).

Para experimentos donde la determinación del tiempo de separación se realiza a longitudes de onda específicas, se propone un generador de fuerza magnética rectangular, de manera que puede incorporarse en un espectrofotómetro. Se proporcionan dos conjuntos de imanes permanentes que comprenden dos imanes cada uno, lo que genera una fuerza magnética homogénea. Los imanes tienen diferente grosor incorporado en dos superficies paralelas y con polaridades opuestas (figura 4a-4b). La fuente de luz para esta realización es una fuente de luz de espectrofotómetro (habitualmente luz UV-visible). La luz se transmite como antes en una dirección perpendicular a la

dirección de la fuerza magnética. El conjunto genera un gradiente constante en el volumen de muestra (obsérvese que el volumen requerido es relativamente pequeño) (figura 4a), del mismo modo que en la realización anterior. Mediante el uso de imanes con grosores diferentes y mediante la colocación de la muestra más cerca del imán más grueso, se genera un gradiente de campo magnético constante y un campo magnético mayor que el campo de saturación de la muestra, tal como se muestra en la figura 4c. Esta configuración rectangular presenta las mismas propiedades que la configuración cilíndrica (descrita en la figura 2a en lo que se refiere a la generación de una fuerza magnética homogénea en el volumen de la muestra tal como se muestra en las figuras 4a-ab). El diseño de este dispositivo rectangular permite la inserción de la muestra en el área de trabajo donde el campo magnético B_r es mayor que el campo de saturación magnético B_s (tal como se muestra en la figura 4c). El uso de una culata de hierro (o cualquier otro material ferromagnético blando) permite la maximización de la fuerza del gradiente de campo magnético sin aumentar el tamaño del dispositivo, lo que facilita la integración dentro de los espectrofotómetros comerciales (tal como se muestra en las figuras 4a-4b).

En una realización particular, se colocan 2 imanes de NdFeB de 20x20x40 mm sobre una placa de hierro de 5 mm de grosor. Ambos imanes se magnetizan a lo largo de uno de los lados más cortos. Los imanes se colocan de manera que sus lados más largos son paralelos, separados por 1 mm, alineados en su parte superior, y con la dirección de magnetización señalando hacia fuera de la placa de hierro. Un segundo conjunto de imanes de NdFeB, con dimensiones de 10x10x40 mm, se colocan sobre una segunda placa de hierro de 5 mm de grosor. Los 4 imanes se magnetizan a lo largo de una de las direcciones de 10 mm, y se colocan paralelos a lo largo del lado de 40 mm (separados 1 mm) y alineados en la parte superior. La dirección de magnetización señala la placa de hierro. Las caras internas de las dos placas de hierro (las que tienen los imanes unidos) deben colocarse paralelas y con el centro de los imanes alineados. Con esta configuración, el gradiente de campo magnético es constante en el área central, con un valor de 7 T/m. El valor del campo magnético es cero a 20 mm de la superficie de los imanes de 10x10x40, que está a 15 mm del plano equidistante a las caras internas de las placas de hierro. Como consecuencia, el campo en el centro (donde se coloca la muestra para la monitorización óptica) es de 0,113

Tesla, suficientemente alto como para saturar las perlas magnéticas.

La ventaja de este diseño rectangular con respecto a la realización anterior es la posibilidad de su fácil incorporación en cualquier espectrofotómetro comercial, y luego la selección de longitudes de onda específicas para medir la variación de transmitancia de la suspensión en función del tiempo mientras que las nanopartículas magnéticas están moviéndose hacia la posición de retención. Usando esta combinación de conjunto de imán permanente y óptica de espectrofotómetro, es posible distinguir muestras con/sin agregados incluso con una concentración de nanopartículas magnéticas por debajo de 0,001% (p/v) comparando sólo la dependencia del tiempo de la transmitancia.

En una realización preferida, para una prueba de inmunoensayo, las partículas magnéticas se funcionalizan con un anticuerpo o antígeno, luego se mezclan con la muestra que va a analizarse (que contiene el analito). Tras la incubación, un tiempo de separación más corto indica la aglutinación de las partículas magnéticas, que puede ser directa o indirectamente proporcional al contenido en analito presente en la muestra, dependiendo de si el formato es de tipo inmunosándwich o competitivo, respectivamente. El sistema también podría funcionar sin el uso de anticuerpo o antígeno como captura de molécula, sino con el uso de aptámeros (basados en nucleótidos o en péptidos), con pares biológicos usados ampliamente (tales como estreptavidina y biotina...), con moléculas que presentan una capacidad natural para unirse a otra molécula, y con cualquier otra alternativa donde hay una unión específica o no específica entre partículas funcionalizadas o no funcionalizadas con el analito presente en la muestra. El método incluye la aplicación a microorganismos y bacterias mediante el mezclado de partículas magnéticas funcionalizadas que reconocen el microorganismo en la muestra que va a analizarse. Las partículas magnéticas pueden funcionalizarse con anticuerpos (o cualquier molécula que pueda reconocer y unirse específicamente a determinadas moléculas expuestas en el microorganismo de interés). Entonces, se forman agregados de microorganismos-partículas magnéticas y se monitorizan por el sistema magnetoóptico. Además, pueden recogerse los agregados de microorganismos separados para su incubación y análisis posteriores.

En otra realización preferida, para la prueba de hibridación de oligonucleótidos, se funcionalizan dos poblaciones de partículas magnéticas cada una con oligonucleótidos complementarios o no complementarios y se mezclan con

la muestra que va a analizarse, que podría contener un oligonucleótido complementario con uno o ambos recubiertos sobre las partículas magnéticas. Esta muestra podría ser el producto de una amplificación de nucleótidos (ADN) por PCR, el resultado de la extracción de ADN o ARN de una célula o microorganismo particular, o cualquier otra fuente de ADN o ARN. Tras la incubación de la mezcla, si el tiempo de separación es más corto que el tiempo de separación de las partículas magnéticas, esto indica la formación de aglomerados, y luego la hibridación de los oligonucleótidos de ambas partículas, lo que indica que la muestra no contiene el oligonucleótido complementario. Alternativamente, la agregación de las partículas podría deberse a la hibridación o formación de puentes entre el ADN/ARN presente en la muestra y los oligonucleótidos conjugados con las partículas.

Ejemplos

La figura 5 muestra los datos de la transparencia frente al tiempo durante la separación magnética para dos suspensiones con una concentración del 0,1% p/v. Las partículas tienen 230 nm de diámetro y el 60% de contenido en magnetita, y el procedimiento de separación se realizó usando un generador de fuerza magnética cilíndrico con un gradiente radial de 14 T/m. La transparencia se mide iluminando la muestra con LED blancos y colocando una LDR en el lado opuesto. La muestra, los LED y el detector están alineados y son perpendiculares al radio del cilindro definido por el generador de fuerza magnética. Los símbolos rellenos son los datos de transparencia frente al tiempo obtenidos para una perla magnética funcionalizada con una suspensión de anticuerpos anti-proteína C reactiva (CRP) incubada con una muestra sin CRP. La curva de símbolos rellenos corresponde a la suspensión incubada con una muestra sin CRP. La curva de símbolos no rellenos corresponde a la suspensión incubada con una muestra con CRP. Al inicio del procedimiento de separación ($t=0$), ambas suspensiones son opacas y no se transmite luz al detector óptico. Tras 10-20 s aproximadamente, las suspensiones se vuelven parcialmente transparentes y la luz incidente se transmite parcialmente al detector y tras 60 segundos ambas suspensiones son casi completamente transparentes. Los datos experimentales se han ajustado, usando el método de mínimos cuadrados para la expresión, $V(t)=V_0+(V_f-V_0)/(1+(t/t_{50})^p)$, donde V_0 y V_f son la transparencia mínima y máxima.

El valor de t_{50} para la muestra sin la presencia de CRP (símbolo relleno) es de 14,5 segundos. La curva de símbolos no rellenos tiene un t_{50} de 8,7 segundos, más corto que el valor de referencia de 14,5 segundos, indicando por tanto la presencia de agregados de perlas magnéticas debido a la presencia de CRP en la muestra. El método puede aplicarse para la detección de proteínas, moléculas pequeñas, microorganismos y ADN entre otros.

La figura 6 muestra los datos de transparencia frente al tiempo durante la separación magnética de partículas magnéticas (240 nm de diámetro y el 40% de contenido en ferrita), usando el dispositivo descrito en las figuras 4a-4b. El dispositivo descrito genera un gradiente de campo magnético de 7 T/m. Se prepararon dos suspensiones de partículas magnéticas (el 0,001% p/v) y se realizó el procedimiento de separación magnética en un espectrofotómetro comercial a 350 nm de longitud de onda. En una de las suspensiones no está presente la secuencia de ADN de interés (símbolos rellenos). Para la segunda (símbolos no rellenos), está presente la secuencia de ADN de interés. Al inicio del procedimiento de separación ($t=0$), las partículas magnéticas en la suspensión absorben la luz incidente y luego la luz se transmite parcialmente al detector (el detector del espectrofotómetro). A medida que las partículas magnéticas comienzan a moverse hacia la pared bajo la fuerza magnética aplicada, se transmite más luz al detector. Al final del procedimiento, la transmitancia alcanza su máximo lo que indica el final del procedimiento. Los datos experimentales se han ajustado, usando el método de mínimos cuadrados, para la expresión $V(t)=V_0+(V_f-V_0)/(1+(t/t_{50})^p)$, donde V_0 y V_f son la transparencia mínima y máxima. Para la muestra sin la secuencia de ADN diana, el t_{50} obtenido es de 219 segundos. Para el gráfico de símbolos sin rellenar, se obtuvo un t_{50} de 176 segundos, lo que indica la presencia de agregados producidos por la presencia de la secuencia de ADN. En comparación con el ejemplo para detectar CRP (figura 4), los tiempos de separación son más largos debido a la menor concentración de las partículas magnéticas en las suspensiones. Los tiempos de separación pueden acortarse usando generadores de fuerzas magnética con gradientes magnéticos mayores.

Tal como se usa en el presente documento, el término “comprende” y derivaciones del mismo (tal como “que comprende”, etc.) no deben entenderse en un sentido excluyente, es decir, estos términos no deben interpretarse como que excluyen la posibilidad de que lo que se describe y se define puede incluir

elementos, etapas, etc. adicionales.

5 Por otra parte, la invención no se limita obviamente a la(s) realización/realizaciones específica(s) descrita(s) en el presente documento, sino que también engloba cualquier variación que cualquier experto en la técnica puede considerar (por ejemplo, en lo que se refiere a la elección de materiales, dimensiones, componentes, configuración, etc.) que está dentro del alcance general de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar la presencia o ausencia de una sustancia biológica o química en una muestra particular mezclada con una suspensión con partículas magnéticas funcionalizadas, teniendo las partículas un diámetro de entre 10 y 1000 nm, mediante la monitorización de las propiedades ópticas de la suspensión, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - proporcionar una fuente de luz y un detector;
 - proporcionar una fuerza magnética constante perpendicular a la dirección de propagación de la luz aplicando un gradiente de campo magnético constante, y con un valor absoluto del campo magnético que es mayor de 0,1 T;
 - medir el cambio de la transparencia de la suspensión de partículas magnéticas frente al tiempo.
 - comparar la variación a lo largo del tiempo de la transparencia de la suspensión de partículas magnéticas en presencia y en ausencia de la sustancia biológica o química de interés.
2. Método para detectar la presencia de una sustancia biológica o química en una suspensión con partículas magnéticas funcionalizadas, según la reivindicación 1, en el que la fuerza magnética se proporciona por un generador de fuerza magnética que comprende imanes permanentes.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el generador de fuerza magnética está formado por al menos cuatro imanes permanentes que siguen la progresión de Hallbach para un cuadrupolo en un soporte cilíndrico.
4. Método según la reivindicación 2, en el que el generador de fuerza magnética está formado por dos conjuntos de imanes con polaridades opuestas.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el detector es un espectrofotómetro.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el momento magnético de las partículas es de menos de 10^{-16} A/m²
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la fuente de luz es una fuente de UV-visible.

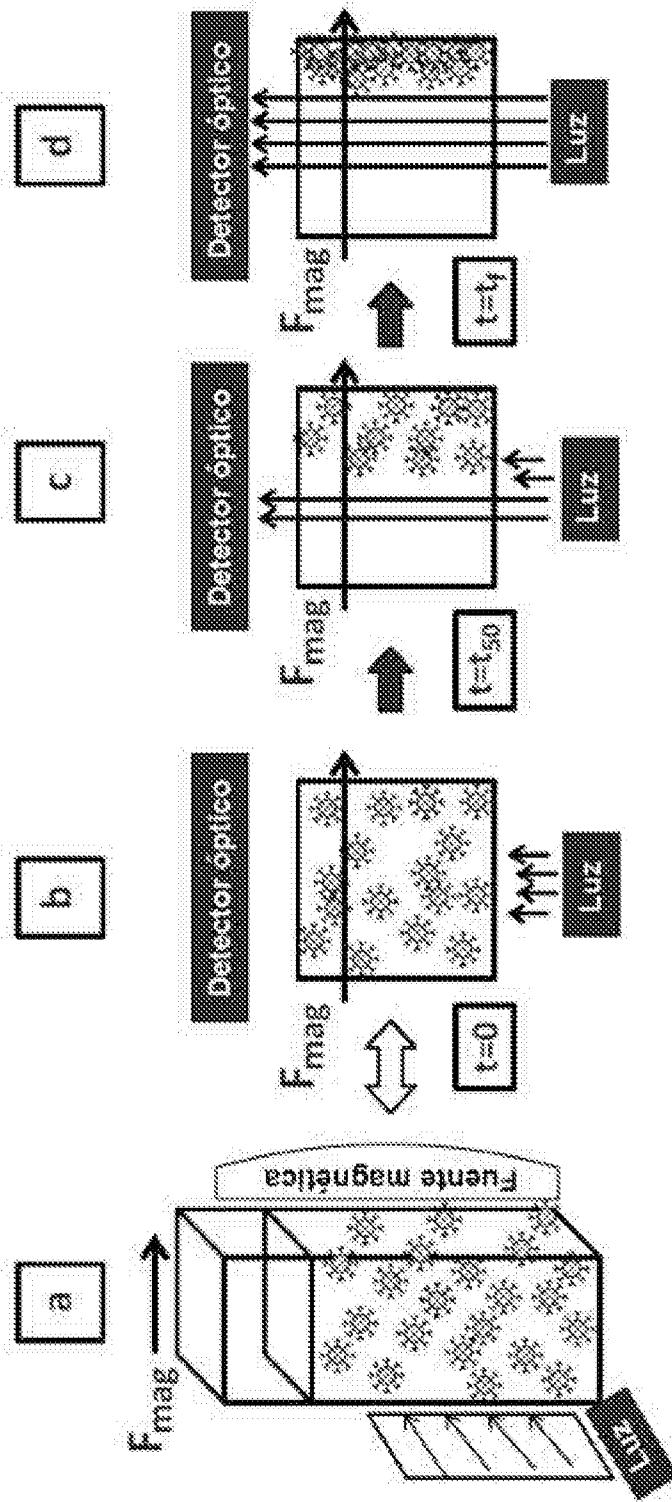


FIG. 1

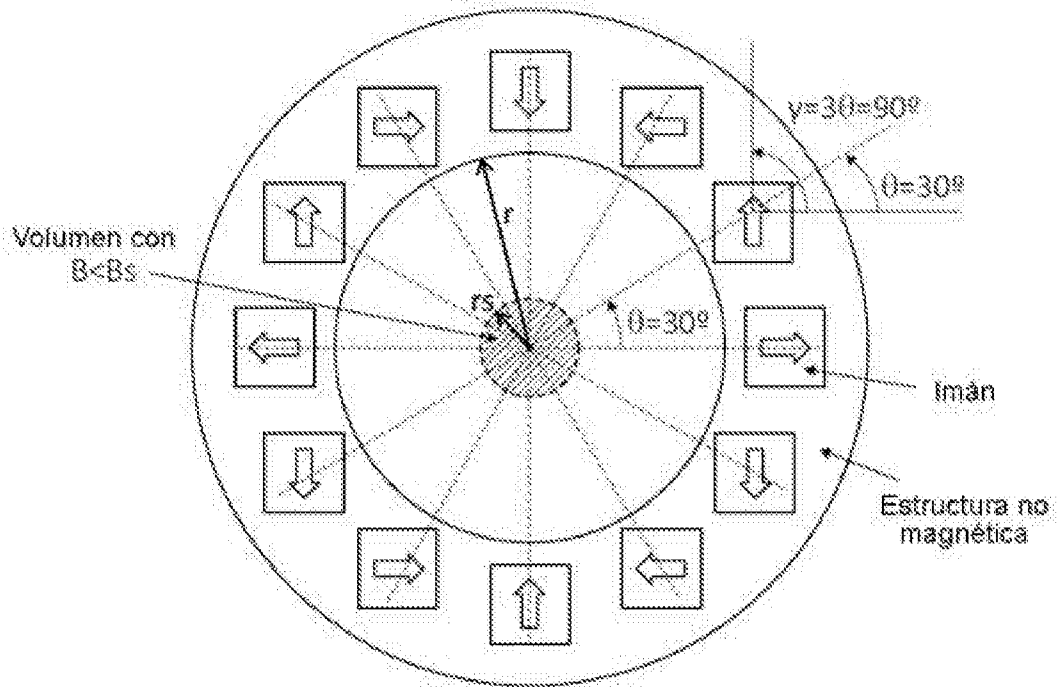


FIG. 2a

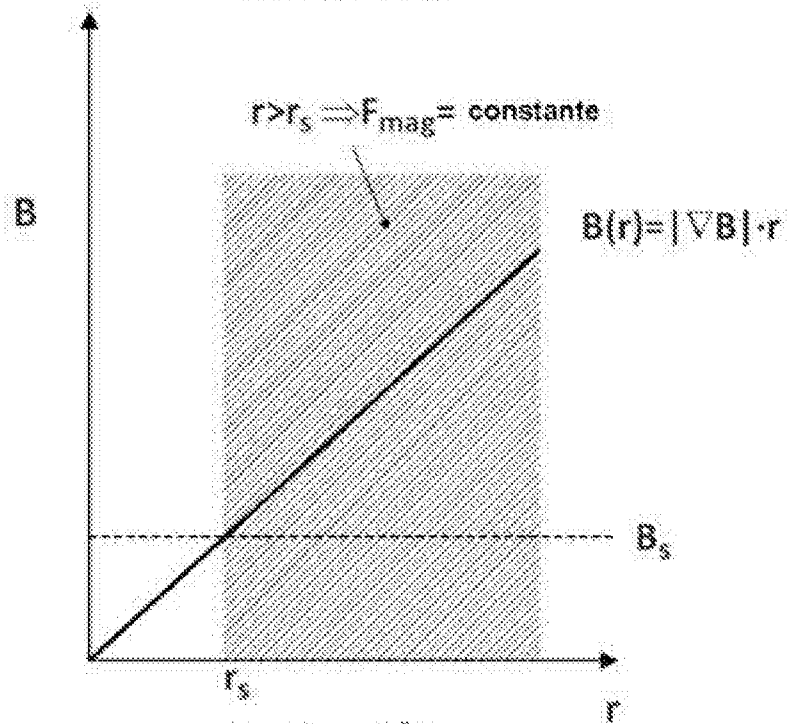


FIG. 2b

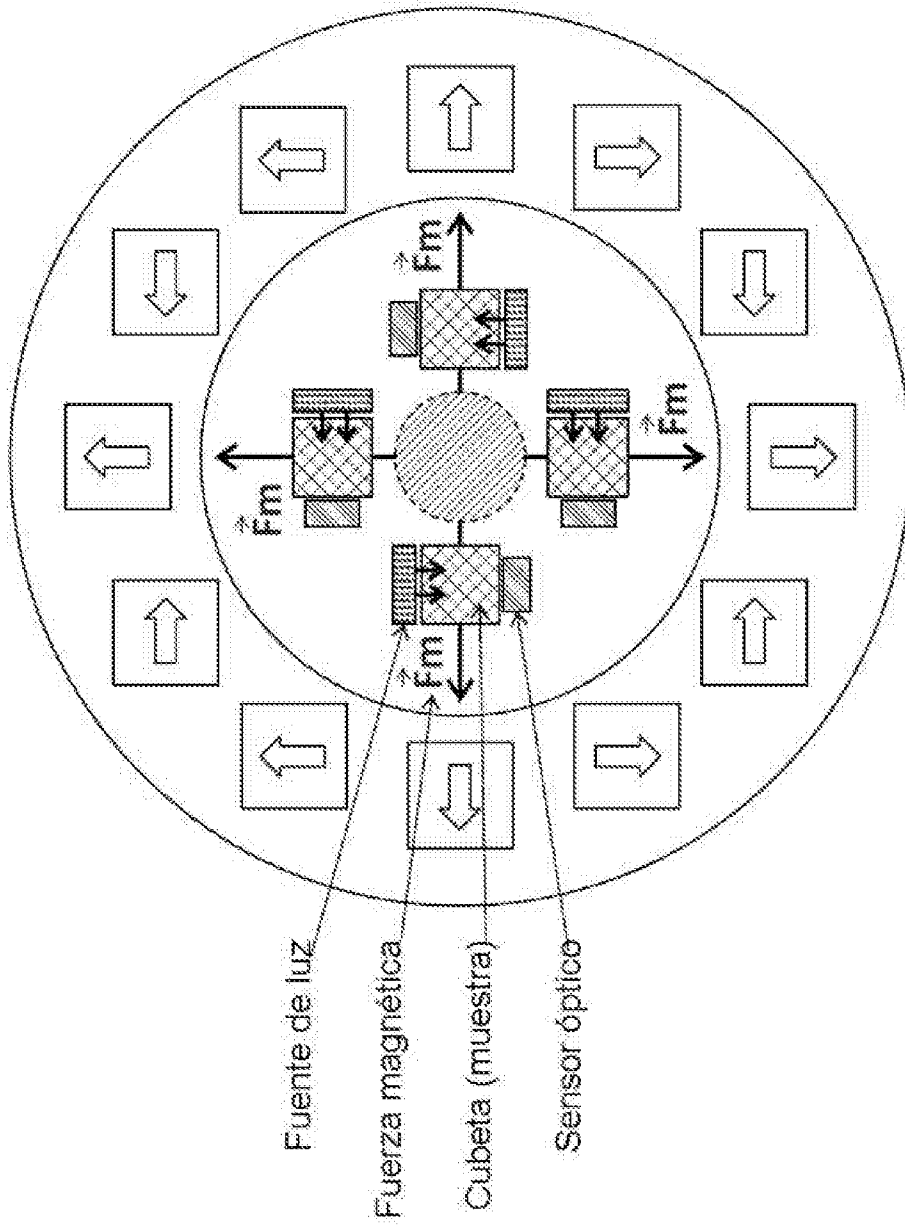


FIG. 3a

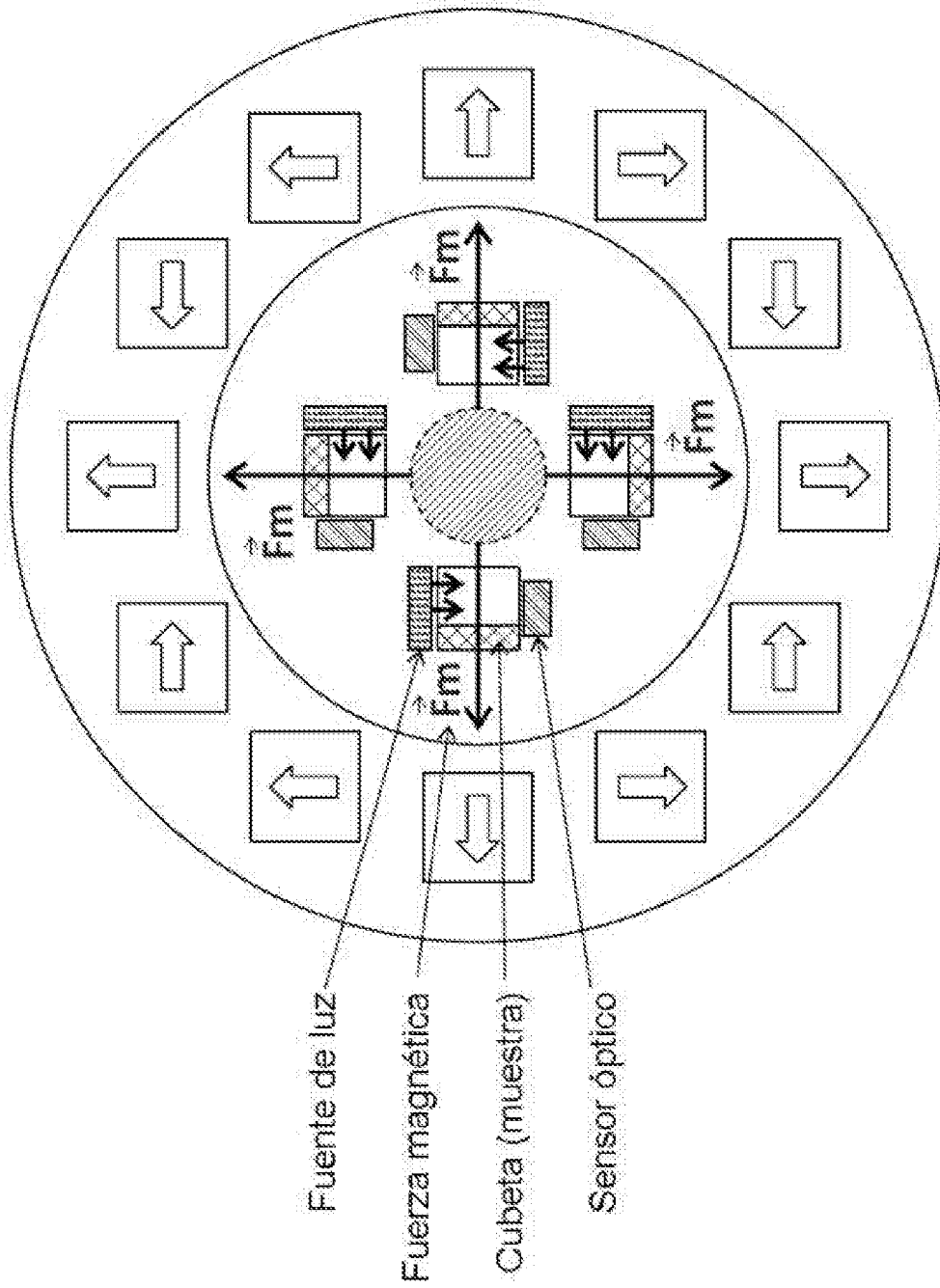


FIG. 3b

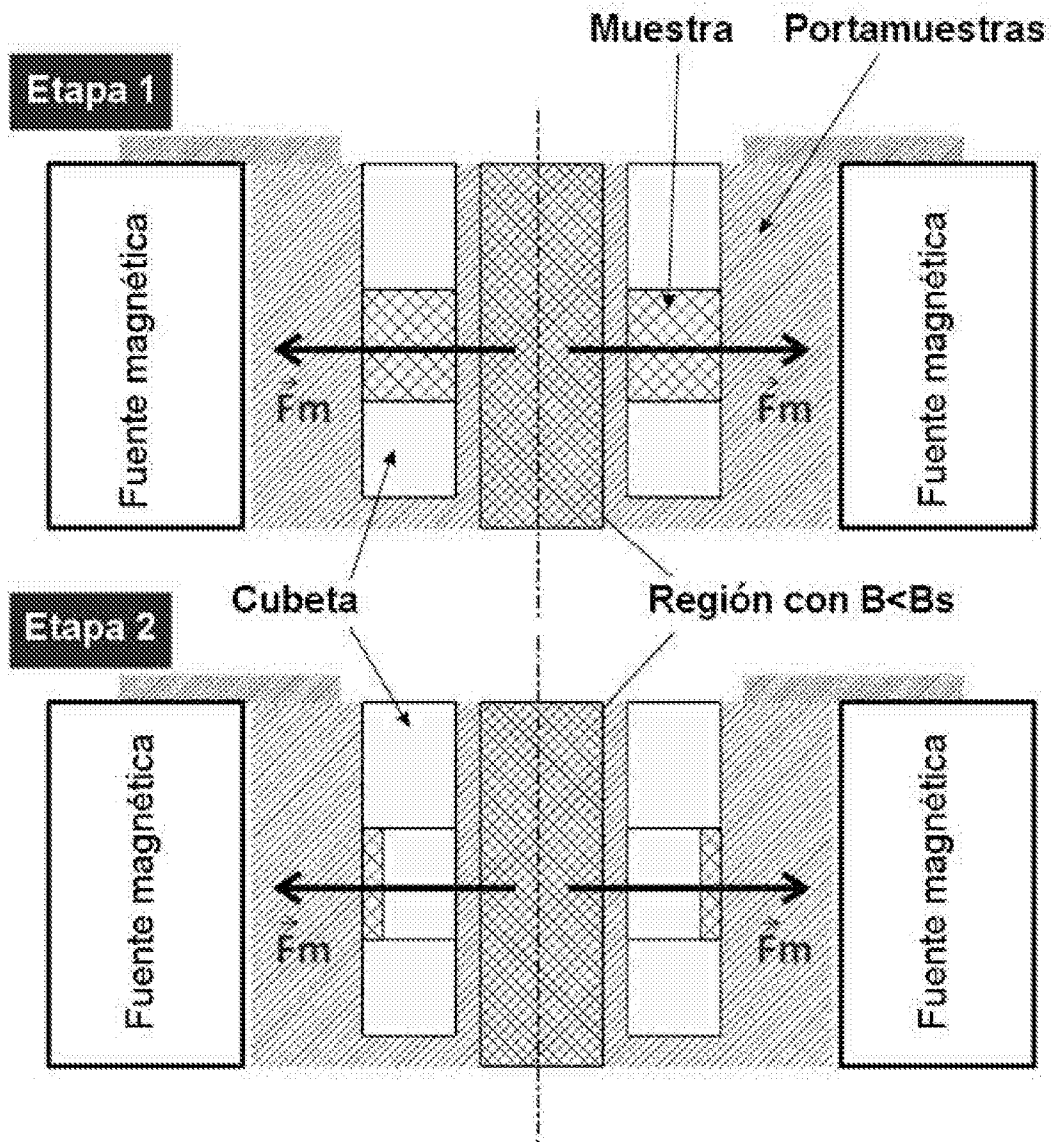


FIG. 3c

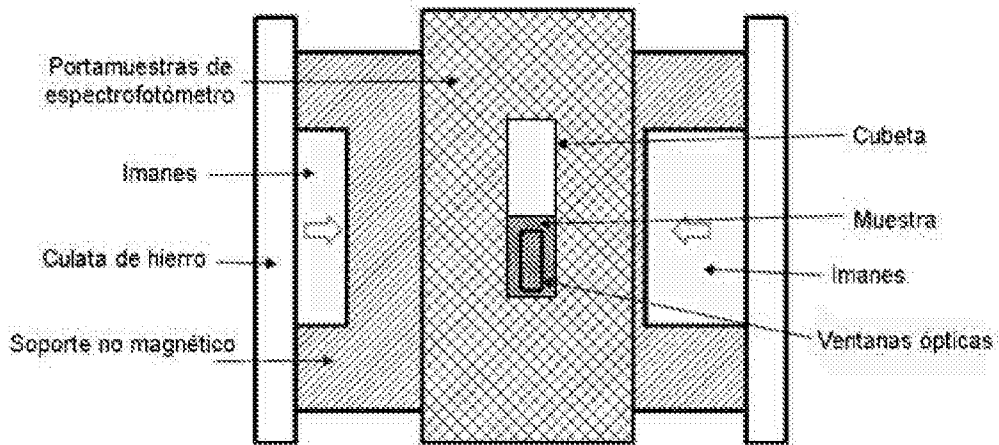


FIG. 4a

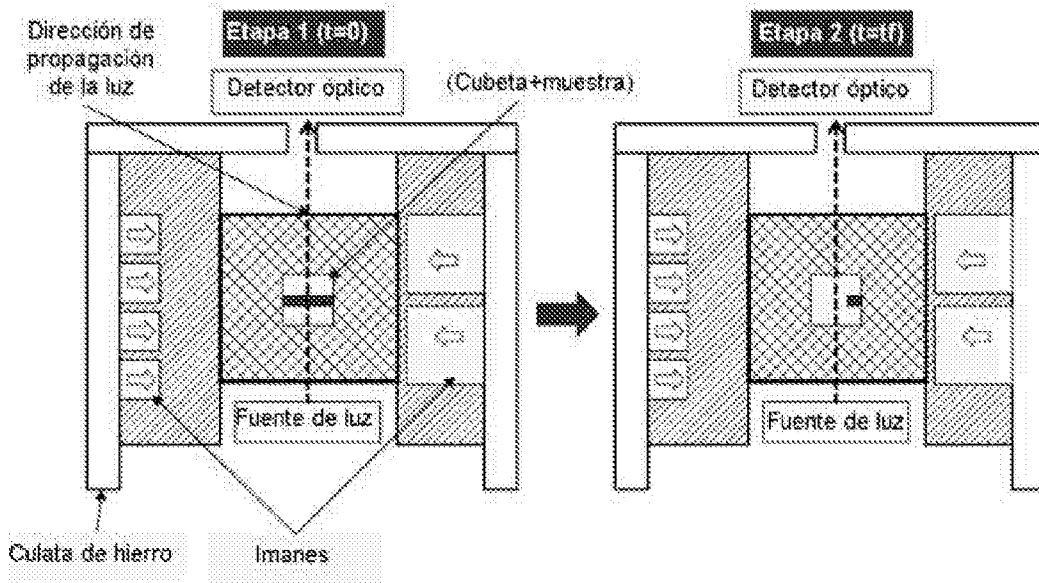


FIG. 4b

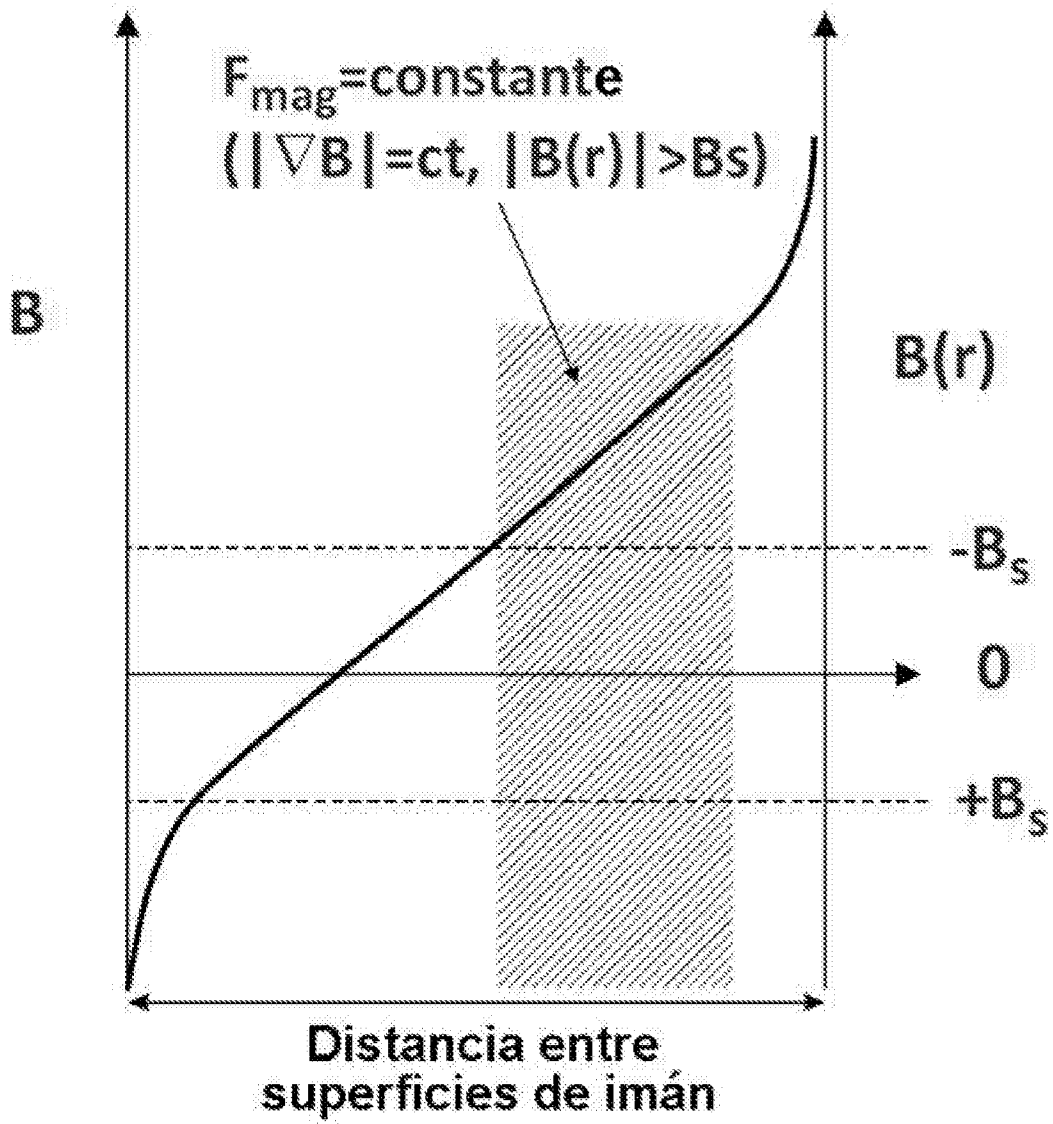


FIG. 4c

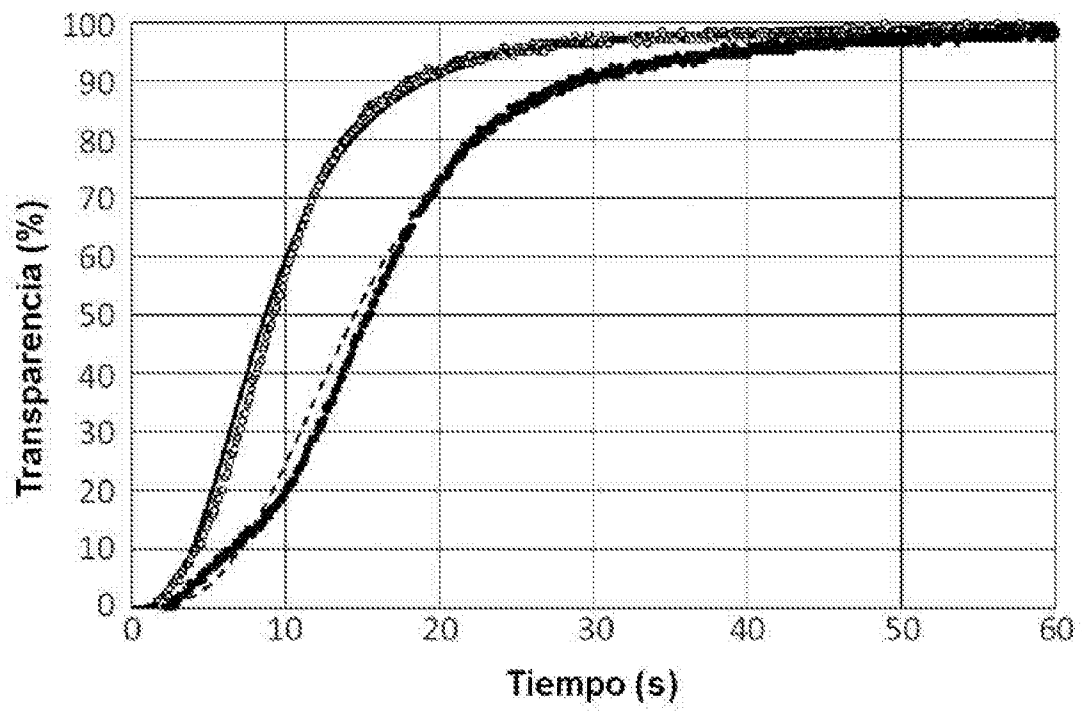


FIG. 5

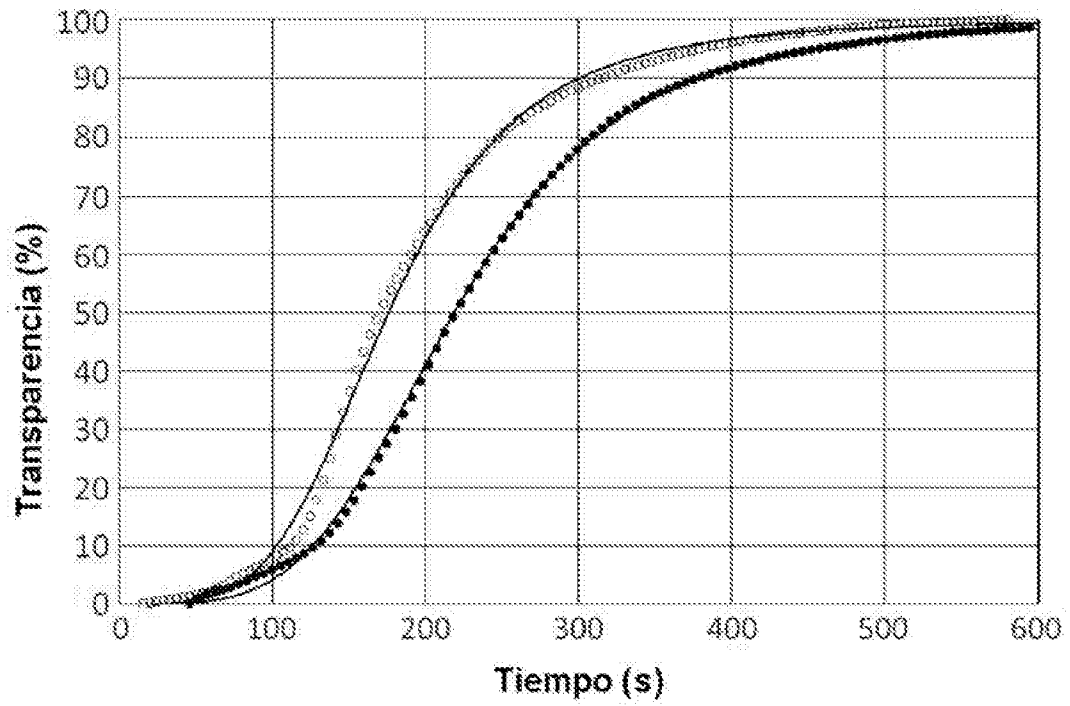


FIG. 6

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ES2018/070392

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. G01N15/02

ADD. B01L3/00 G01N33/543 G01N21/75 G01N21/59 G01N15/00

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

B01L G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones N° |
|------------|---|--|
| A | <p>ZICHEN ZHAO ET AL: "Visual detection of nucleic acids based on Mie scattering and the magnetophoretic effect", THE ANALYST, vol. 140, no. 23, 1 de enero de 2015 (2015-01-01), páginas. 7876-7885, XP055559069, UK ISSN: 0003-2654, DOI: 10.1039 / C5AN01123J Figura 1</p> | 1-7 |

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

| | |
|--|--|
| <p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p> | <p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p> |
|--|--|

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
05 de marzo de 2019

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
14/03/2019

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado
Mauritz, Jakob

N° de fax

N° de teléfono

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2018/070392

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. G01N15/02
 ADD. B01L3/00 G01N33/543 G01N21/75 G01N21/59 G01N15/00

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)
 B01L 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 practicable, search terms used)
 EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | ZICHEN ZHAO ET AL: "Visual detection of nucleic acids based on Mie scattering and the magnetophoretic effect", THE ANALYST, vol. 140, no. 23, 1 January 2015 (2015-01-01), pages 7876-7885, XP055559069, UK ISSN: 0003-2654, DOI: 10.1039/C5AN01123J figure 1 ----- | 1-7 |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family 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 application or patent 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 5 March 2019 | Date of mailing of the international search report 14/03/2019 |
|---|--|

| | |
|--|--|
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Mauritz, Jakob |
|--|--|