

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 960 530**

51 Int. Cl.:

H01F 1/00 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C01G 49/08 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

B82Y 25/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2018 PCT/EP2018/079829**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.05.2019 WO19086517**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2018 E 18795635 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2023 EP 3704723**

54 Título: **Partículas magnéticas mejoradas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

31.10.2017 EP 17199299

31.10.2017 US 201762579380 P

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

05.03.2024

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

HUG, STEPHAN;

LIU, FANGBING;

SCHOENBRUNNER, NANCY y

SILVESTRE, MARTIN EDUARDO

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 960 530 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

Partículas magnéticas mejoradas y usos de las mismas

5 **Campo de la divulgación**

Se divulgan partículas de vidrio magnéticas mejoradas para su uso en un tubo de procesamiento de muestras configurado para realizar análisis, captura, enriquecimiento y purificación de ácidos nucleicos.

10 **Antecedentes de la divulgación**

15 Muchos materiales biológicos, especialmente los ácidos nucleicos, presentan desafíos especiales en términos de aislamiento respecto de su entorno natural. Por una parte, a menudo, están presentes en concentraciones muy pequeñas y, por otra parte, a menudo, se encuentran en presencia de muchas otras sustancias sólidas y disueltas que dificultan su aislamiento o medición, en particular, en ensayos bioespecíficos.

En el campo de la purificación de ácidos nucleicos, las partículas de sílice magnéticas son ampliamente utilizadas. Las nanopartículas ferrimagnéticas comúnmente no están disponibles comercialmente y solo se conocen a partir de publicaciones académicas. Dichas publicaciones incluyen nanopartículas con recubrimientos de sílice (Chen *et al.*; J. of alloys and compound 497 (2010) 221-227; Wang *et al.*; Bioresource Technology 101 (2010) 8931-8935; Reza *et al.*; Cent. Eu. J. Chem. 5 (2010) 1041-1048). Sin embargo, numerosas partículas de sílice magnéticas están disponibles comercialmente, la mayoría de las cuales muestran un comportamiento superparamagnético. Las partículas disponibles comercialmente normalmente están hechas de núcleos magnéticos con un recubrimiento de silano de acuerdo con el procedimiento de Støber (Støber *et al.*, J. Colloid Interface Sci., 1968, 26, 20 62). En los pocos ejemplos conocidos, la fuente de sílice se basa en silicatos solubles (vidrio líquido) (Philipse *et al.*, Langmuir, 1994, 10, 92-99; Bolle *et al.*, 2015, documento EP2916327B1). Para el núcleo magnético, típicamente, se usan nanopartículas que oscilan entre 3 y 10 nm con comportamiento superparamagnético o nanopartículas mayores de 60 nm con comportamiento ferromagnético. Un ejemplo de nanopartículas mayores de 60 nm con comportamiento superparamagnético se muestra en Liu *et al.* (Angew. Chem. Int. Ed., 2009, 48, 5875-5879), aunque dichas partículas no se han usado para la purificación de ácidos nucleicos. El documento EP2110175 divulga el uso de perlas magnéticas recubiertas en aplicaciones de PCR, en las que las perlas magnéticas tienen un núcleo magnético constituido por metales o aleaciones revestidas con un polímero o un recubrimiento de sílice. Sin embargo, el documento EP2110175 no divulga ninguna propiedad preferente de las perlas (por ejemplo, propiedades superparamagnéticas) ni la producción solvotérmica de dichas perlas. El documento WO2014/090838 divulga partículas magnéticas que tienen una superficie que contiene SiO₂ que representa del 25 % al 85 % (en peso) de las partículas de sílice magnéticas y que tienen un tamaño de partícula de 30 µm o menos. En el presente documento, las partículas de núcleo magnético se producen usando una reacción de precipitación. En una segunda etapa, las partículas se recubren con sílice, en la que varias partículas del núcleo o aglomerados de las mismas se recubren para formar partículas de sílice magnéticas. Por lo tanto, las partículas de sílice magnéticas presentan un recubrimiento de sílice grueso. Además, el procedimiento de producción divulgado en el documento WO 2014/090838 no permite la producción de suprapartículas (es decir, agregados definidos de nanopartículas magnéticas), en el que solo las suprapartículas se revisten con un fino recubrimiento de sílice. Sin embargo, se ha demostrado que las partículas que tienen un recubrimiento grueso no resultan adecuadas en sistemas con condiciones de reacción difíciles y exigentes. El documento US 2017/159043 divulga partículas magnéticas, en las que las partículas sólidas de magnetita de Fe₃O₄ se revisten con una capa de sílice ultrafina cerrada y un procedimiento para producir dichas partículas magnéticas. Sin embargo, no hay divulgación de partículas que tengan un núcleo magnético, que sea un agregado definido de nanopartículas magnéticas de tamaño particular y, además, las partículas divulgadas en el documento US 2017/159043 no presentan propiedades superparamagnéticas. El documento WO 01/88540 divulga nanopartículas recubiertas de sílice y un procedimiento para producir dichas nanopartículas recubiertas de sílice usando una microemulsión y un agente de recubrimiento. Sin embargo, para que tenga propiedades superparamagnéticas, el núcleo de las partículas debe seleccionarse para que tenga un tamaño de núcleo inferior a de 50 a 80 nm. El uso de dichas partículas en la purificación de ácidos nucleicos bajo determinadas condiciones (como las que se pueden encontrar en un tubo de procesamiento de muestras y/o según sea necesario para permitir un tiempo de respuesta corto) requiere que las partículas muestren una fuerte respuesta magnética, baja remanencia magnética y una capacidad de unión alta y rápida para ácidos nucleicos en combinación con propiedades de elución rápida de los ácidos nucleicos, lo que no es el caso de dichas partículas disponibles comercialmente. Por lo tanto, el objetivo de la presente descripción es proporcionar partículas que proporcionen estas propiedades.

60 **Sumario de la divulgación**

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición de perlas magnéticas que comprende (a) un estabilizador y un núcleo magnético producido en condiciones solvotérmicas, (b) un recubrimiento de vidrio líquido, en el que la perla magnética es superparamagnética, en el que el núcleo magnético es un agregado definido de nanopartículas magnéticas, dichas nanopartículas magnéticas tienen un tamaño inferior a 30 nm y en el que el diámetro del núcleo magnético es de entre 100 y 400 nm; y en el que el recubrimiento de vidrio líquido comprende

un silicato y tiene un espesor de 20 nm o inferior.

En algunos modos de realización, el diámetro es de entre aproximadamente 150 y 450 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 200 y 400 nm e, incluso más específicamente, de entre aproximadamente 250 y 400 nm. En determinados modos de realización, la perla magnética tiene un tamaño de partícula de entre 200 y 400 nm. En algunos modos de realización, el diámetro del núcleo magnético es de entre aproximadamente 150 y 350 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 200 y 350 nm. En modos de realización particulares, el núcleo magnético es de entre aproximadamente 250 y 320 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 260 y 300 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 270 y 290 nm. En algunos modos de realización, la perla magnética tiene una magnetización de saturación de 30 a 80 Am²/kg, más específicamente, de 50 a 70 Am²/kg. En algunos modos de realización, la perla magnética tiene una remanencia magnética inferior a 5 Am²/kg, más específicamente, inferior a 3 Am²/kg, incluso más específicamente, inferior a 2 Am²/kg. En algunos modos de realización, la perla magnética tiene una remanencia magnética inferior a 3 Am²/kg. En modos de realización particulares, el silicato se selecciona del grupo que consiste en silicato de sodio, silicato de potasio, silicato de calcio, silicato de litio y silicato de magnesio. En algunos modos de realización, el silicato es silicato de sodio. En determinados modos de realización, el recubrimiento de vidrio líquido tiene un espesor de 10 nm o inferior. En algunos modos de realización, el estabilizador se selecciona del grupo que consiste en citrato, histidina, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC), oleato de sodio y ácido poliacrílico. En un modo de realización particular, el estabilizador es citrato de sodio. El núcleo magnético es un agregado definido de nanopartículas magnéticas con al menos un estabilizador. En algunos modos de realización, el núcleo magnético es un agregado definido de nanopartículas magnéticas, en el que las nanopartículas magnéticas tienen un tamaño de <30 nm y en el que el diámetro del agregado definido de nanopartículas magnéticas es de entre aproximadamente 150 y 350 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 200 y 350 nm. En el presente documento, el núcleo magnético proporciona propiedades superparamagnéticas. En un modo de realización, el estabilizador está presente o se agrega *in situ* durante la formación de dicho agregado definido de nanopartículas magnéticas. En algunos modos de realización, el al menos un estabilizador se selecciona del grupo que consiste en citrato, histidina, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC), oleato de sodio, ácido poliacrílico o mezclas de dos o más de los mismos. En un modo de realización particular, la mezcla de estabilizadores comprende citrato de sodio. En algunos modos de realización, el núcleo magnético es de Fe₃O₄, α-Fe₂O₃, γ-Fe₂O₃, MnFe_xO_y, CoFe_xO_y, NiFe_xO_y, CuFe_xO_y, ZnFe_xO_y, CdFe_xO_y, BaFe_xO y SrFe_xO, en el que x e y varían dependiendo del procedimiento de síntesis, y en el que x es preferentemente un número entero entre 1 y 3, más preferentemente, 2, y en el que y es preferentemente 3 o 4, lo más preferentemente, Fe₃O₄. En modos de realización particulares, el núcleo magnético es un núcleo de magnetita. En algunos modos de realización, las condiciones solvotérmicas son condiciones que incluyen 190-250 °C y una presión incrementada de entre 1 y 20 bar. En algunos modos de realización, las perlas magnéticas son sustancialmente esféricas.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una suspensión de perlas magnéticas que comprende una composición indicada anteriormente y un líquido, en la que la suspensión se mezcla hasta la homogeneidad. En algunos modos de realización, la suspensión comprende entre 5 y 200 mg/ml de perlas magnéticas. En otros modos de realización, la suspensión comprende entre 5 y 100 mg/ml de perlas magnéticas. En otros modos de realización, la suspensión comprende entre 5 y 60 mg/ml de perlas magnéticas. En determinados modos de realización, la suspensión comprende entre 25 y 50 mg/ml de perlas magnéticas. En algunos modos de realización, el líquido comprende una solución acuosa tamponada. En algunos modos de realización, la solución tamponada acuosa comprende tris-hidroximetilamina (TRIS), fosfato, ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico)(HEPES) y mezclas de los mismos. En algunos modos de realización, la solución tamponada acuosa comprende además un agente caotrópico. En determinados modos de realización, el agente caotrópico está presente en la suspensión en una concentración de entre 2 y 8 mol/l. En algunos modos de realización, el agente caotrópico se selecciona del grupo que consiste en yoduro de sodio, perclorato de sodio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio y clorhidrato de guanidinio.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un dispositivo configurado para realizar un análisis de ácidos nucleicos de una muestra, en el que dicho dispositivo comprende

- a. un puerto de introducción de muestra adaptado para recibir una parte alícuota de muestra;
- b. un compartimento que comprende una composición que comprende perlas magnéticas, como se describe en el presente documento; y
- c. una región de análisis de PCR que comprende uno o más compartimentos adicionales, cada uno configurado para llevar a cabo una o más etapas de dicho análisis de PCR, que comprende la preparación de reactivos, el enriquecimiento en dianas, la eliminación de inhibidores, la extracción de ácidos nucleicos, la amplificación y la detección en tiempo real.

La presente divulgación proporciona un kit que comprende un dispositivo como se describe en el presente documento. En la divulgación, el kit incluye cualquier artículo fabricado (por ejemplo, un envase o un recipiente) que incluye al menos un dispositivo para amplificar, capturar, etiquetar/convertir o detectar específicamente una

secuencia de ácido nucleico diana, como se describe en el presente documento, en el que se incluyen las composiciones descritas en el presente documento en el dispositivo o se proporcionan como un componente, vial o recipiente separado del kit. En la divulgación, el kit incluye además uno cualquiera de instrucciones de uso, reactivos complementarios, materiales de control y/o componentes o módulos usados en los procedimientos de amplificación descritos en el presente documento o una etapa de los mismos.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit que comprende la composición divulgada anteriormente. En algunos modos de realización, la composición se puede proporcionar en un dispositivo descrito en el presente documento. En algunos modos de realización, la composición se proporciona en un envase o recipiente. En algunos modos de realización, el kit incluye además al menos uno de los siguientes componentes: nucleósidos trifosfato, polimerasa de ácido nucleico y tampones necesarios para la función de la polimerasa de ácido nucleico. En algunos modos de realización, los componentes del kit se incluyen en el kit como componentes separados, en viales o recipientes separados. En algunos modos de realización, uno o más de los componentes del kit se incluyen en el kit en el mismo vial o recipiente. En algunos modos de realización, el kit comprende además un eluyente o tampón de elución. En algunos modos de realización, el kit comprende además una enzima polimerasa que tiene actividad de exonucleasa en de 5' a 3'. En algunos modos de realización, el kit contiene una enzima con actividad de transcriptasa inversa. En algún modo de realización, el kit contiene una enzima polimerasa que tiene actividad de exonucleasa en de 5' a 3' y actividad de transcriptasa inversa.

Aún en otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para fabricar una composición de perlas magnéticas descrita en el presente documento, que comprende las etapas de

a. puesta en contacto de un estabilizador y nanopartículas magnéticas que tienen un tamaño inferior a 30 nm de cualquier material seleccionado del grupo que consiste en metales, sales metálicas, carburos metálicos, nitruros metálicos, sulfuros metálicos, fosfuros metálicos, óxidos metálicos o quelatos metálicos que comprenden al menos un metal de transición en condiciones solvotérmicas para formar agregados definidos de tamaño controlado para formar un núcleo magnético que tiene un diámetro de entre 100 y 400 nm que es superparamagnético;

b. recubrimiento del núcleo magnético formado en la etapa (a) con un vidrio líquido, en el que el recubrimiento de vidrio líquido comprende un silicato y tiene un espesor de 20 nm o inferior.

En algunos modos de realización, el diámetro de la perla magnética recubierta es de entre aproximadamente 150 y 450 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 200 y 400 nm e, incluso más específicamente, de entre aproximadamente 250 y 400 nm. En determinados modos de realización, la perla magnética tiene un tamaño de partícula de entre 200 y 400 nm. En algunos modos de realización, el diámetro del núcleo magnético es de entre aproximadamente 150 y 350 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 200 y 350 nm. En modos de realización particulares, el núcleo magnético es de entre aproximadamente 250 y 320 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 260 y 300 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 270 y 290 nm. En algunos modos de realización, el estabilizador se selecciona del grupo que consiste en citrato, histidina, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC), oleato de sodio y ácido poliacrílico. En un modo de realización particular, el estabilizador es citrato de sodio. En algunos modos de realización, el núcleo magnético es de Fe_3O_4 , $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, MnFe_xO_y , CoFe_xO_y , NiFe_xO_y , CuFe_xO_y , ZnFe_xO_y , CdFe_xO_y , BaFe_xO y SrFe_xO , en el que x e y varían dependiendo del procedimiento de síntesis, y en el que x es preferentemente un número entero entre 1 y 3, más preferentemente, 2, y en el que y es preferentemente 3 o 4, lo más preferentemente, Fe_3O_4 . En modos de realización particulares, el núcleo magnético es un núcleo de magnetita. En algunos modos de realización, las condiciones solvotérmicas son condiciones que incluyen 190-250 °C y una presión incrementada de entre 1 y 20 bar. En algunos modos de realización, las perlas magnéticas son sustancialmente esféricas. En modos de realización particulares, el silicato se selecciona del grupo que consiste en silicato de sodio, silicato de potasio, silicato de calcio, silicato de litio y silicato de magnesio. En algunos modos de realización, el silicato es silicato de sodio. En determinados modos de realización, el recubrimiento de vidrio líquido tiene un espesor de 10 nm o inferior. En algunos modos de realización, la etapa a. incluye reducir una sal metálica en presencia de un estabilizador. En determinados modos de realización, la sal metálica es FeCl_3 y el estabilizador es citrato de sodio para formar un núcleo de magnetita. En determinados modos de realización, el vidrio líquido es silicato de sodio. En determinados modos de realización, el procedimiento comprende las etapas de:

a. formación de un núcleo de magnetita mediante la reducción de FeCl_3 en presencia de acetato de sodio, citrato de sodio y etilenglicol a una temperatura elevada durante un máximo de 18 horas;

b. recubrimiento del núcleo de magnetita formado en la etapa (a) con un vidrio líquido, preferentemente, silicato de sodio.

Breve descripción de las figuras

La fig. 1A ilustra una reacción solvotérmica que se puede usar para generar el núcleo de magnetita de las partículas descritas en el presente documento. La fig. 1B ilustra además la adición de un estabilizador al núcleo de magnetita. De forma ejemplar, el citrato se coordina alrededor de nanopartículas de magnetita para dar

suprapartículas.

La fig. 2 ilustra el posible mecanismo de una reacción química que se puede usar para producir el núcleo de magnetita de las partículas descritas en el presente documento.

La fig. 3A ilustra la reacción de recubrimiento con ortosilicato de tetraetilo (TEOS). La fig. 3B ilustra la reacción de recubrimiento con vidrio líquido.

Las figs. 4A-4C incluyen análisis de MEB comparativos que muestran la influencia de las concentraciones de reactivo en la morfología de las MGP descritas en el presente documento. Fig. 4A: factor de escala 1 (MC13); Fig. 4B: factor de escala 2 (MC15); Fig. 4C: Factor de escala 4 (MC06).

La fig. 5 ilustra un dispositivo de procesamiento de muestras que se puede usar con las perlas descritas en el presente documento.

La fig. 6 ilustra la dependencia del punto isoeléctrico de las partículas (muestras MC48) en el espesor del recubrimiento de sílice.

Las figs. 7A-7C ilustran la dependencia de los valores CT de FluA (fig. 7A), valores CT de FluB (fig. 7B) y valores CT de VRS (fig. 7C) medidos de las muestras MC48 en sus puntos isoeléctricos.

La fig. 8 ilustra la dependencia de los valores de CT medidos de FluA, FluB, VRS y del control positivo interno (IPC) de las muestras MC47 en sus puntos isoeléctricos.

La fig. 9 ilustra la dependencia de los valores de CT de FluA medidos de las muestras MC48 en el espesor del recubrimiento de sílice.

Las figs. 10A-10C ilustran las partículas de vidrio magnéticas MC14 sin recubrimiento (fig. 10A), con un espesor bajo de recubrimiento bajo del recubrimiento de vidrio líquido de acuerdo con la presente divulgación (fig. 10B), y el espesor alto de recubrimiento usando el procedimiento de recubrimiento de ortosilicato de tetraetilo (TEOS) (fig. 10C).

Descripción detallada

Definiciones

A menos que se defina de otro modo en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. Además, a menos que se requiera de otro modo por contexto, los términos en singular incluyen el plural y los términos en plural incluyen el singular. Los artículos "un/uno" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Los términos "detectar", "detección" y términos similares se usan en la presente solicitud para referirse ampliamente a un procedimiento o descubrimiento o determinación de la presencia o ausencia, así como un grado, cantidad o nivel, o probabilidad de aparición de algo. Por ejemplo, el término "detectar", cuando se usa en referencia a una secuencia de ácido nucleico diana, puede indicar el descubrimiento o determinación de la presencia, ausencia, nivel o cantidad, así como una probabilidad o posibilidad de la presencia o ausencia de la secuencia. Se ha de entender que las expresiones "que detecta la presencia o ausencia", "detección de la presencia o ausencia" y expresiones relacionadas incluyen detección cualitativa y cuantitativa.

Los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a polímeros de nucleótidos (por ejemplo, ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos) e incluyen ácidos nucleicos naturales (adenosina, guanidina, citosina, uracilo y timidina), no naturales y modificados. El término no está limitado por la longitud (por ejemplo, número de monómeros) del polímero. Un ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario y, en general, contendrá enlaces fosfodiéster 5'-3', aunque, en algunos casos, los análogos nucleotídicos pueden tener otras uniones. Los monómeros típicamente se denominan nucleótidos. El término "nucleótido no natural" o "nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido que contiene una base nitrogenada, glúcido o grupo fosfato modificado, o que incorpora un resto no natural en su estructura. Los ejemplos de nucleótidos no naturales incluyen didesoxinucleótidos, nucleótidos biotinilados, aminados, desaminados, alquilados, bencilados y marcados con fluoróforo.

El término "muestra" o "muestra biológica" se refiere a cualquier composición que contiene o se supone que contiene ácido nucleico procedente de un individuo. El término incluye componentes purificados o separados de células, tejidos o sangre, por ejemplo, ADN, ARN, proteínas, porciones libres de células o lisados celulares. En un modo de realización, la muestra es una muestra de sangre completa. Como se usa en el presente documento, una

"muestra de sangre completa" incluye sangre extraída del cuerpo de la que no se ha retirado ningún constituyente, tal como plasma o plaquetas. En general, la muestra no ha sido modificada excepto por la presencia de un anticoagulante. Una muestra también se puede referir a otros tipos de muestras biológicas, por ejemplo, plasma, suero, componentes sanguíneos (capa leucocitaria) y manchas de sangre seca. Las muestras también pueden incluir constituyentes y componentes de cultivos *in vitro* de células obtenidas de un individuo, incluyendo líneas celulares. Entre los ejemplos adicionales específicos de muestras biológicas se incluyen heces, hisopos de mucosas, aspirados de tejidos, homogeneizados de tejidos, cultivos celulares y sobrenadantes de cultivos celulares (incluidos cultivos de células eucariotas y procariotas), orina, saliva, esputo y muestra cerebroespinal.

Las condiciones "solvotérmicas" se aplican en un procedimiento de síntesis solvotérmica para producir compuestos químicos. En el presente documento, la síntesis solvotérmica permite el control preciso del tamaño, de la distribución de la conformación y de la cristalinidad de las nanopartículas o nanoestructuras de óxido metálico. Estas características se pueden alterar cambiando determinados parámetros experimentales, que incluyen la temperatura de reacción, el tiempo de reacción, el tipo de disolvente, el tipo de tensioactivo y el tipo de precursor (R. Xu *et al.*, *Modern Inorganic Synthetic Chemistry*, Elsevier, 2011, *Ámsterdam*, pág. 63).

El término "ferrimagnético", como se usa en el presente documento, se refiere a un material que consiste en poblaciones de átomos con momentos magnéticos opuestos pero desigualmente distribuidos, lo que, por tanto, da como resultado una saturación magnética y una remanencia una vez que se aplica un campo magnético externo.

El término "paramagnético" se refiere a una forma de magnetismo con la que determinados materiales son atraídos débilmente por un campo magnético aplicado externamente y forman campos magnéticos internos inducidos en la dirección del campo magnético aplicado. El paramagnetismo se produce debido a la presencia de electrones desapareados en el material, por lo que todos los átomos con orbitales atómicos incompletos son paramagnéticos. Debido a su espín, los electrones desapareados tienen un momento dipolar magnético y actúan como pequeños imanes. Un campo magnético externo hace que los espines de los electrones se alineen paralelos al campo, lo que provoca una atracción neta. Entre los materiales paramagnéticos se incluyen aluminio, oxígeno, titanio y óxido de hierro (FeO). En particular, los paramagnetos no retienen ninguna magnetización en ausencia de un campo magnético aplicado externamente porque el movimiento térmico aleatoriza las orientaciones de espín. En consecuencia, la magnetización total cae a cero cuando se elimina el campo aplicado.

El término "superparamagnético" se refiere a una forma de magnetismo que aparece en pequeñas nanopartículas ferromagnéticas o ferrimagnéticas. En ausencia de un campo magnético externo, la magnetización de las nanopartículas parece ser, de promedio, cero. Este estado se entiende que está en el estado superparamagnético. En este estado, un campo magnético externo puede magnetizar las nanopartículas de manera que la susceptibilidad magnética de las partículas superparamagnéticas sea mucho mayor que la de las partículas paramagnéticas.

Partículas magnéticas

El problema que debe resolver la presente invención se puede considerar que es proporcionar partículas magnéticas con propiedades mejoradas para la preparación de muestras y para ensayos biológicos, en particular, para procedimientos automatizados que se lleven a cabo en un tubo de procesamiento de muestras. Los sistemas que utilizan un tubo de procesamiento de muestras, tales como los descritos en el sistema cobas® Liat®, tienen requisitos muy exigentes para las partículas magnéticas. En dichos sistemas, las etapas de lavado, incubación y elución no ocurren en varios minutos, sino en unos pocos segundos, incrementando de este modo las demandas de partículas. En particular, las partículas deben proporcionar una fuerte respuesta magnética, deben tener un tamaño de partícula pequeño y deben mostrar una magnetización remanente baja. En algunos aspectos, se ha demostrado que resulta ventajoso que las partículas sean superparamagnéticas y que tengan un tamaño de >200 nm, ya que, de otro modo, las partículas se separan con demasiada lentitud. La solución a este problema la proporcionan las partículas de acuerdo con la presente invención, que presentan las propiedades deseadas de baja remanencia magnética y tiempos de separación magnética rápidos, capacidades de unión altas y rápidas para ácidos nucleicos con propiedades de elución rápida de los ácidos nucleicos. En particular, las partículas de acuerdo con la presente invención proporcionan un área de superficie disponible que es relativamente alta (para capacidades de unión altas y rápidas), un espesor de recubrimiento bajo (para saturación magnética), un tamaño de partícula que es aproximadamente mayor que 100 nm (para tiempos de separación magnética rápidos), y un núcleo magnético superparamagnético (para baja remanencia magnética).

En un aspecto, la invención proporciona una partícula magnética o una perla magnética que comprende un núcleo magnético producido en condiciones solvotérmicas y un recubrimiento basado en vidrio líquido, en el que la partícula magnética o la perla magnética es superparamagnética. Más específicamente, la presente invención proporciona una composición de partículas magnéticas. Como se usa en el presente documento, "partículas" (o "perlas") se refiere a materiales sólidos que tienen un diámetro relativamente pequeño. Las partículas contempladas en el presente documento son una dispersión sólida de pequeños núcleos magnéticos con un recubrimiento líquido a base de vidrio. Las partículas son comparativamente pequeñas y sustancialmente esféricas. Cabe destacar que los términos "partículas" y "perlas" así como "partículas magnéticas" y "perlas

magnéticas" se pueden usar de manera intercambiable. Las ventajas de dichas partículas o perlas incluyen, pero no se limitan a:

- 5 • tamaño de partícula incrementado, por ejemplo, mayor que 100 nm, tal como, por ejemplo, de 100 a 500 nm, más específicamente, de 200 a 400 nm, proporcionando un buen equilibrio entre tiempos de separación magnética rápidos, tiempos de sedimentación lentos y área superficial exterior incrementada;
- distribuciones de tamaño de partícula estrecho que producen resultados homogéneos y reproducibles;
- 10 • uso de una partícula superparamagnética que proporciona una baja remanencia magnética y no proporciona ninguna tendencia a la aglomeración después de aplicar una fuerza magnética;
- uso de un recubrimiento de vidrio líquido relativamente delgado que da lugar a una magnetización de alta saturación;
- 15 • facilidad de fabricación y escalabilidad de los procedimientos; y
- síntesis optimizada para el núcleo de magnetita y el recubrimiento, lo que reduce el tiempo de fabricación y el coste de los bienes, con menos residuos.

20 En el presente documento, cabe destacar que el tamaño no es el único factor decisivo para las propiedades magnéticas de las partículas. Por ejemplo, los óxidos de hierro, tales como Fe_3O_4 , pueden estar presentes en diferentes modificaciones que tienen diferentes propiedades. En particular, el tamaño de las cristalitas puede ser relevante para las propiedades magnéticas de las partículas. Por ejemplo, las cristalitas pequeñas pueden mostrar una remanencia magnética significativamente menor y, por tanto, proporcionar propiedades superparamagnéticas, mientras que las cristalitas con un tamaño de 200 nm o superior pueden no presentar propiedades superparamagnéticas. En modo de realización específico, el núcleo magnético de las partículas de acuerdo con la invención está compuesto de pequeñas cristalitas (por ejemplo, un agregado definido de nanopartículas magnéticas que comprende además un estabilizador). Por tanto, las partículas de acuerdo con la invención alcanzan tamaños de 100 a 500 nm, más específicamente, de 200 a 400 nm, pero todavía presentan propiedades superparamagnéticas. Además, las propiedades superparamagnéticas pueden ser decisivas para la aplicación técnica, ya que las partículas pueden no aglomerarse si entran en contacto varias veces con un imán.

35 Un aspecto de la invención es una composición de partículas magnéticas que son sustancialmente esféricas y que tienen un diámetro pequeño y que contienen al menos un objeto magnético de diámetro mayor que 100 nm. En determinados aspectos, el diámetro es de entre aproximadamente 80 y 500 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 150 y 450 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 200 y 400 nm e, incluso más específicamente, de entre aproximadamente 250 y 400 nm. En determinados aspectos, el diámetro del núcleo magnético es de entre aproximadamente 50 y 450 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 100 y 400 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 150 y 350 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 200 y 350 nm. En aspectos particulares, el núcleo magnético es de entre aproximadamente 250 y 320 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 260 y 300 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 270 y 290 nm. Las partículas magnéticas de acuerdo con la presente invención son nanogotas de vidrio en las que se dispersan objetos magnéticos muy pequeños que no se agregan. Por lo tanto, las partículas magnéticas descritas en el presente documento también se pueden denominar "partículas de vidrio magnéticas" ("MGP", por sus siglas en inglés). Aquellos objetos que se denominan magnéticos son atraídos por un imán, es decir, son materiales ferromagnéticos o superparamagnéticos. Los materiales ferromagnéticos pueden incluir materiales que aún no han sido premagnetizados. Por premagnetización, en este contexto, se entiende que significa la puesta en contacto con un imán, lo que incrementa la remanencia. Más específicamente, el núcleo magnético de las partículas magnéticas de acuerdo con la invención es superparamagnético. Los materiales adecuados para generar perlas superparamagnéticas son metales, sales metálicas, carburos metálicos, nitruros metálicos, sulfuros metálicos, fosfuros metálicos, óxidos metálicos o quelatos metálicos que comprenden al menos un metal de transición. Entre los metales de transición preferentes de acuerdo con la divulgación se incluyen, pero no se limitan a, cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, zinc, cadmio, níquel, gadolinio, cobre y molibdeno. Más preferentemente, el metal, carburo metálico, nitruro metálico, sulfuro metálico, fosfuro metálico, óxido metálico o quelato metálico comprende al menos hierro. Más preferentemente, el núcleo magnético comprende un óxido de hierro, en particular, un óxido de hierro seleccionado del grupo que consiste en Fe_3O_4 , $\alpha-Fe_2O_3$, $\gamma-Fe_2O_3$, $MnFe_xO_y$, $CoFe_xO_y$, $NiFe_xO_y$, $CuFe_xO_y$, $ZnFe_xO_y$, $CdFe_xO_y$, $BaFe_xO$ y $SrFe_xO$, en el que x e y varían dependiendo del procedimiento de síntesis, y en el que x es preferentemente un número entero entre 1 y 3, más preferentemente es 2, y en el que y es preferentemente 3 o 4.

60 Lo más preferentemente, el núcleo magnético comprende Fe_3O_4 . Más específicamente, los materiales magnéticos preferentes son hierro u óxido de hierro, por ejemplo, magnetita (Fe_3O_4) o Fe_2O_3 .

65 De acuerdo con la presente invención, el material del núcleo magnético especificado anteriormente comprende un agregado definido de nanopartículas magnéticas con un estabilizador. Los estabilizadores adecuados se seleccionan de al menos un miembro del grupo que consiste en ácidos dicarboxílicos, ácidos tricarboxílicos, ácido

5 poliacrílico, aminoácidos, tensioactivos y ácidos grasos, incluidas las sales y derivados, tales como ésteres y polímeros, de los compuestos mencionados. Por tanto, se debe entender que el grupo mencionado anteriormente incluye sales y derivados, tales como ésteres y polímeros, de los compuestos mencionados. Por tanto, el estabilizador se selecciona preferentemente de al menos un miembro del grupo que consiste en ácidos

10 dicarboxílicos, sales de ácido dicarboxílico, derivados de ácido dicarboxílico, ácidos tricarboxílicos, sales de ácidos tricarboxílicos, derivados tricarboxílicos, ácido poliacrílico, sales de ácido poliacrílico, derivados de ácido poliacrílico, aminoácidos, sales de aminoácidos, derivados de aminoácidos, tensioactivos, sal de tensioactivos, ácidos grasos, sales de ácidos grasos y derivados de ácidos grasos. En un aspecto, el estabilizador, tal como citrato, se añade *in situ* durante la formación de los agregados de partículas (las denominadas suprapartículas) que forman el núcleo magnético de las partículas de acuerdo con la invención que presentan propiedades superparamagnéticas. En el presente documento, la adición subsiguiente del estabilizador después de la formación del agregado de partículas no proporcionará el mismo resultado. Preferentemente, como ácidos grasos, sales de ácidos grasos o derivados de ácidos grasos, se eligen los compuestos que se puedan unir a la superficie de la suprapartícula, estabilizando de este modo la suprapartícula. Un ácido graso empleado como estabilizador es preferentemente una única cadena

15 de grupos alquilo que contiene de 8 a 22 átomos de carbono con un grupo carboxiterminal (-COOH) y adsorción de alta afinidad (por ejemplo, adsorción química o adsorción física) a la superficie de la partícula magnética. El ácido graso tiene múltiples funciones, incluyendo proteger el núcleo de la partícula magnética frente a la oxidación y/o la hidrólisis en presencia de agua, lo que puede reducir significativamente la magnetización de la nanopartícula (Hutten, *et al.* (2004) J. Bio-tech. 112:47-63); estabilizar el núcleo de la nanopartícula; y similares. El término "ácido graso" incluye ácidos grasos saturados o insaturados y, en particular, insaturados. Los ácidos grasos saturados ejemplares incluyen ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido enántico, ácido caprílico, ácido pelargónico, ácido cáprico, ácido undecílico, ácido tridecílico, ácido pentadecílico, ácido margárico, ácido nonadecílico, ácido heneicosílico, ácido behénico, ácido tricosílico, ácido lignocérico, ácido pentacosílico, ácido cerótico, ácido

20 heptacosílico, ácido montánico, ácido nonacosílico, ácido melísico, ácido henatriacontílico, ácido lacceroico, ácido psílico, ácido gédico, ácido ceroplástico, ácido hexatriacontílico, ácido heptatriacontanoico y ácido octatriacontanoico y similares. Los ácidos grasos insaturados ejemplares incluyen ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido araquidónico, ácido hexadecatrienoico, ácido estearidónico, ácido eicosatrienoico, ácido eicosatetraenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido heneicosapentaenoico, ácido docosapentaenoico, ácido clupanodónico, ácido docosahexaenoico, ácido tetracosapentaenoico, ácido tetracosahexaenoico, ácido caléndico, ácido eicosadienoico, ácido docosadienoico, ácido adrénico, ácido docosapentaenoico, ácido tetracosatetraenoico, ácido tetracosapentaenoico, ácido 5-dodecenoico, ácido 7-tetradecenoico, ácido palmitoleico, ácido vaccénico, ácido paulínico, ácido 15-docosenoico, ácido 17-tetracosenoico, ácido eláidico, ácido gondoico, ácido mead, ácido erúcico, ácido nervónico, ácido ruménico, ácido caléndico, ácido jacárico, ácido

25 eleosteárico, ácido catalpico, ácido punícico, ácido rumelénico, ácido parinárico, ácido bosseopentaenoico, ácido pinolénico, ácido podocárpico y similares. El ácido graso puede ser sintético o aislado de una fuente natural usando procedimientos establecidos. Además, un ácido graso puede ser un derivado tal como un éster enólico de ácido graso (es decir, un ácido graso que ha reaccionado con la forma enólica de acetona), un éster graso (es decir, un ácido graso con el hidrógeno activo reemplazado por el grupo alquilo de un alcohol monohídrico), una amina grasa o amida grasa, o en modos de realización particulares, un alcohol graso como se describe anteriormente. Un ácido graso en particular preferente es el ácido oleico.

45 Un tensioactivo, como se usa en el contexto de la presente invención, es un compuesto orgánico que es anfipático, es decir, que contiene tanto grupos hidrófobos como grupos hidrófilos. Preferentemente, se seleccionan tensioactivos que se puedan unir a la superficie de la suprapartícula, estabilizando de este modo preferentemente los tensioactivos de la suprapartícula con una variedad de longitudes de cadena, se pueden emplear valores de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) y cargas superficiales según la aplicación. Preferentemente, el tensioactivo de acuerdo con la divulgación es una sal de amonio cuaternario, alquilbencenosulfonatos, lignosulfonatos, polioxiletoxilato o éster sulfato. Los ejemplos no limitantes de tensioactivos son bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC), polietoxilatos de nonilfenol (es decir, NP-4, NP-40 y NP-7), dodecylbencenosulfonato de sodio, laurilsulfato de amonio, laurilsulfato de sodio, miridosulfato de sodio, docusato, perfluorooctanosulfonato, perfluorobutanosulfonato, alquil-aril éter fosfatos, alquil éter fosfatos, estearato de sodio, ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico, perfluorononanoato de amonio, laurilsulfato de magnesio, ácido perfluorononanoico, ácido perfluorooctanoico, fosfolípidos, laurilsulfato de potasio, alquilsulfato de sodio,

50 dodecilsulfato de sodio, laurato de sodio, lauroil sarcolosinato de sodio, nonanoiloxibencenosulfonato de sodio, parath sulfato de sodio, cloruro de behenitrmonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, bronidox, bromuro de dimetildioctadecilamonio, cloruro de dimetildioctadecilamonio, cloruro de laurilmetil gluceth-10 hidroxipropil dimonio, diclorhidrato de octenidina, olafur, N-oleil-1,3-propanodiamina, cloruro de estearalconio, hidróxido de tetrametilamonio, bromuro de tonzonio, cetomacrogol 1000, alcohol cetosteárico, alcohol cetílico, cocamida DEA, cocamida MEA, decilpoliglucosa, cocoanfodiacetato de disodio, monoestearato de glicerol, polietilenglicol isocetil-éter, octilfenoxipolietoxi etanol, laurilglucósido, maltósidos, monolaurina, micosubtilina, nonoxinoles, octaetilenglicol monododecil-éter, N-octil beta-D-tioglucopiranosido, octilglucósido, alcohol oleílico, pentaetilenglicol monododecil-éter, polidocanol, poloxámero, amina de sebo polietoxilada, poliglicerol poliricnoleato, polisorbato, sorbitán, monolaurato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, triestearato de sorbitán,

55 alcohol estearílico, surfactina, Triton X-100, Tween 80, cocamidopropil betaína, cocamidopropil hidroxisulfatína, dipalmitoilfosfatidilcolina, hidroxisulfatína, óxido de laurildimetilamina, lecitina, óxido de miristamina, peptitergentes,

lauroanofoacetato de sodio y éster bis(2-etilhexil)sulfosuccínico.

El término "aminoácidos", tal como se usa en el sentido de la presente invención, se refiere a aminoácidos o derivados de aminoácidos naturales o no naturales, así como a sales de aminoácidos. Preferentemente, se eligen aminoácidos que se pueden unir a la superficie de la suprapartícula, estabilizando de este modo preferentemente la suprapartícula. Entre los aminoácidos ejemplares se incluyen cisteína, metionina, histidina, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, glicina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina, selenocisteína, pirrolisina, cisteína, deshidroalanina, endurecidina, lantionina, norvalina y derivados de los mismos.

El término "ácido dicarboxílico", en el sentido de la presente invención, se refiere a un hidrocarburo o hidrocarburo sustituido que contiene dos grupos funcionales de ácido carboxílico (es decir, $R_1-(C(O)OH)_2$), en el que R_1 es (a) un hidrocarburo lineal que contiene de 0 a 18 unidades de carbono o (b) un hidrocarburo cíclico que contiene de 3 a 8 unidades de carbono, ya sea como anillos aromáticos o no aromáticos. El término incluye sales y derivados de ácidos grasos, tales como ésteres de ácidos grasos. Los ácidos dicarboxílicos representativos son, por ejemplo, ácido propanodioico, ácido butanodioico, ácido pentanodioico, ácido hexanodioico, ácido heptanodioico, ácido octanodioico, ácido nonanodioico, ácido decanodioico, ácido undecanodioico, ácido dodecanodioico, ácido hexadecanodioico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glutacónico, ácido traumático, ácido mucónico, ácido glutínico, ácido citracónico, ácido mesacónico, ácido málico, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido tartrónico, ácido tartárico, ácido diaminopimélico, ácido sacárico, ácido mesoxálico, ácido oxaloacético, ácido acetonadicarboxílico, ácido arabinárico, ácido ftálico, ácido isoftálico, ácido tereftálico, ácido difénico, ácido 2,6-naftalenodicarboxílico.

El término "ácido tricarboxílico", en el sentido de la presente invención, se refiere a un hidrocarburo o hidrocarburo sustituido que contiene tres grupos funcionales de ácido carboxílico (es decir, $R_1-(C(O)OH)_3$), en el que R_1 es (a) un hidrocarburo lineal que contiene de 3 a 18 unidades de carbono o (b) un hidrocarburo cíclico que contiene de 3 a 8 unidades de carbono, ya sea como anillos aromáticos o no aromáticos. El término incluye sales y derivados de ácidos grasos, tales como ésteres de ácidos grasos. Los ácidos tricarboxílicos representativos son, por ejemplo, ácido cítrico (ácido 2-hidroxipropano-1,2,3-tricarboxílico), ácido isocítrico (ácido 1-hidroxipropano-1,2,3-tricarboxílico), ácido aconítico (ácido prop-1-eno-1,2,3-tricarboxílico), ácido propano-1,2,3-tricarboxílico, ácido trimelítico (ácido benceno-1,2,4-tricarboxílico), ácido trimésico (ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico), ácido oxalosuccínico (ácido 1-oxopropano-1,2,3-tricarboxílico) o ácido hemimelítico (ácido benceno-1,2,3-tricarboxílico). Preferentemente, el ácido tricarboxílico es ácido cítrico que incluye citratos, es decir, sales y derivados del ácido cítrico.

Preferentemente, el estabilizador se selecciona del grupo que consiste en ácido cítrico, histidina, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC), oleato de sodio, ácido poliacrílico o mezclas de dos o más de los mismos, incluyendo las respectivas sales o derivados de los mismos. Por tanto, la presente invención se refiere también a una partícula magnética como se describe anteriormente, en la que el núcleo magnético consiste preferentemente en una suprapartícula que consiste en nanopartículas magnéticas agregadas con al menos un estabilizador, en el que el al menos un estabilizador se selecciona del grupo que consiste en citrato, histidina, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC), oleato de sodio, ácido poliacrílico o mezclas de dos o más de los mismos. En un modo de realización particular, el estabilizador es citrato de sodio. Preferentemente, la cantidad de estabilizador está en el intervalo de entre el 1 y el 80 % en peso, más preferentemente, en el intervalo de entre el 5 y el 70 % en peso, más preferentemente, en el intervalo de entre el 10 y el 50 % en peso, lo más preferentemente, de entre el 20 y el 40 % en base del peso total de la suma de estabilizador y la suprapartícula.

En determinados aspectos, el núcleo magnético de las MGP se produce en condiciones solvotérmicas. Debe entenderse que las condiciones solvotérmicas incluyen aproximadamente 190-250 °C y una presión incrementada de aproximadamente 1 a 20 bares.

También se proporciona una suspensión de perlas magnéticas, por ejemplo, que se puede producir mediante la adición de un líquido a una composición de MGP y la mezcla de la suspensión hasta la homogeneidad. Un líquido que se puede usar en la suspensión puede incluir cualquier líquido que no afecte a la estabilidad de las partículas magnéticas y que se pueda usar para producir una suspensión homogénea. Se usan líquidos adecuados que resultan adecuados para procedimientos de biología molecular, en particular, procedimientos de purificación de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) que hacen uso de la unión de estas sustancias a partículas de vidrio en determinadas condiciones. Los líquidos alternativos comprenden alcoholes o cualquier mezcla de los mismos con agua o cetonas. En un modo de realización, una suspensión puede contener entre 5 y 200 mg/ml de MGP. En otros modos de realización, la suspensión puede contener entre 5 y 100 mg/ml de MGP. En otros modos de realización, la suspensión puede contener entre 5 y 60 mg/ml de MGP. En determinados modos de realización, la suspensión puede contener entre 25 y 50 mg/ml de MGP.

De forma alternativa o adicional, las MGP se suspenden en soluciones tamponadas acuosas que pueden contener opcionalmente un agente caotrópico. En el presente documento, la concentración puede ser de entre 2 y 8 mol/l,

por ejemplo, de entre 4 y 6 mol/l. Las sales caotrópicas pueden ser yoduro de sodio, perclorato de sodio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio o clorhidrato de guanidinio. Un "agente caotrópico", como se usa en el presente documento, incluye cualquier sustancia química que altere la estructura ordenada del agua líquida y que tenga el efecto de que el ADN o el ARN se una a las MGP si este agente está presente en la solución que contiene ADN o ARN. Los sistemas de tampón que se pueden usar con propósitos de biología molecular se pueden encontrar, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989), *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York, NY, EE.UU. Las sustancias tampón preferentes son tris-hidroximetilamina (TRIS), fosfato, ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-(2-etanosulfónico)(HEPES), sales de los mismos u otras sustancias adecuadas. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias que modifican la fuerza iónica de la solución, por ejemplo, NaCl, KCl o CaCl₂ o que son ligandos de cationes metálicos tales como, por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o sales del mismo. En otro modo de realización, la suspensión de las MGP puede contener adicionalmente ADN o ARN, opcionalmente, en una mezcla con proteínas, ácidos grasos, carbohidratos y otro material de origen biológico. En otro modo de realización, el líquido puede contener una mezcla de uno o más constituyentes seleccionados del grupo de alcoholes, cetonas, soluciones tamponadas acuosas, agentes caotrópicos, sustancias que modifican la fuerza iónica de la solución, ligandos, material biológico, ADN o ARN, todos con las características como se describe anteriormente.

Los materiales magnéticos que se pueden usar en las MGP se pueden caracterizar mediante cualquier procedimiento adecuado conocido de la técnica. Por ejemplo, la saturación magnética es el estado alcanzado cuando un incremento en un campo magnético externo aplicado no puede incrementar más la magnetización del material, por lo que la densidad de flujo magnético total se estabiliza en cierta medida. Asimismo, la remanencia o magnetización remanente o magnetismo residual es la magnetización que queda en un material ferromagnético (tal como hierro) después de que se elimine un campo magnético externo. En un modo de realización, las MGP contempladas en el presente documento presentan una magnetización de saturación de entre 30 y 80 Am²/kg, más específicamente, de entre 50 y 70 Am²/kg y una remanencia magnética inferior a 5 Am²/kg, más específicamente, inferior a 3, incluso más específicamente, inferior a 2.

El material del núcleo magnético usado en las MGP descritas en el presente documento incluye un recubrimiento compuesto por un material amorfo que contiene un recubrimiento de vidrio líquido, por ejemplo, un recubrimiento de vidrio líquido de sodio. Las partículas de núcleo magnético sin recubrir tienen un diámetro de entre aproximadamente 250 y 320 nm, más específicamente, de entre 260 y 300 nm, más específicamente, de entre 270 y 290 nm. Después de aplicar el recubrimiento de vidrio líquido, la perla recubierta tiene un diámetro de entre aproximadamente 270 y 340 nm, más específicamente, de entre 280 y 320 nm, magnetizada con de 50 a 70 Am²/kg, respectivamente.

Procedimientos para la fabricación de partículas magnéticas

En el presente documento, se divulgan además procedimientos de fabricación de una composición de las perlas magnéticas divulgadas anteriormente. En el presente documento, en una primera etapa, se pone en contacto un estabilizador con nanopartículas de cualquier material seleccionado del grupo que consiste en metales, sales metálicas, carburos metálicos, nitruros metálicos, sulfuros metálicos, fosfuros metálicos, óxidos metálicos o quelatos metálicos que comprenden al menos un metal de transición en condiciones solvotérmicas. De este modo, se producen agregados de tamaño controlado superior a 100 nm que forman un núcleo magnético que es superparamagnético. En una segunda etapa, el núcleo magnético se recubre con un vidrio líquido para formar las perlas magnéticas de acuerdo con la invención.

La reacción se realiza a temperatura elevada, preferentemente, de entre 190 y 250 °C, y a presión elevada, preferentemente, de 1 a 20 bar. En dichas condiciones solvotérmicas, el estabilizador se coordina en la superficie que circunda las nanopartículas magnéticas para dar suprapartículas. Por lo tanto, el núcleo magnético comprende una suprapartícula que consiste en nanopartículas agregadas recubiertas con estabilizador que se agregan entre sí. En el presente documento, el recubrimiento es un estabilizador que reviste al menos una parte, preferentemente, toda la superficie, de cada nanopartícula. Preferentemente, también en este caso, cada nanopartícula comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en metal, sales metálicas, carburo metálico, nitruro metálico, sulfuro metálico, fosfuro metálico, óxido metálico, quelato metálico y una mezcla de dos o más de los mismos. Se debe entender que cada nanopartícula presente en la suprapartícula puede comprender una mezcla de dos o más de los grupos mencionados anteriormente, es decir, dos o más de un metal, sales metálicas, carburo metálico, nitruro metálico, sulfuro metálico, fosfuro metálico, óxido metálico, quelato metálico y una mezcla de dos o más de los mismos. Además, se pueden concebir mezclas de dos o más metales diferentes, dos o más sales metálicas diferentes, dos o más óxidos metálicos diferentes, dos o más carburos metálicos diferentes, dos o más nitruros metálicos diferentes, dos o más sulfuros metálicos diferentes, dos o más quelatos metálicos diferentes o dos o más fosfuros metálicos diferentes. Más preferentemente, cada nanopartícula en la suprapartícula comprende un óxido metálico o un carburo metálico. En un modo de realización preferente, el metal es un metal de transición. Entre los metales de transición preferentes de acuerdo con la divulgación se incluyen, pero no se limitan a, cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, zinc, cadmio, níquel, gadolinio, cobre y molibdeno. Lo más preferentemente, el metal es hierro. De acuerdo con un modo de realización particular, cada nanopartícula comprendida en la suprapartícula es una nanopartícula de óxido metálico, lo más preferentemente, una

nanopartícula de óxido de hierro, en particular, una nanopartícula de Fe_3O_4 .

Por tanto, la presente divulgación también se refiere además a una partícula magnética como se describe anteriormente, así como a una partícula magnética obtenida u obtenible mediante el procedimiento descrito anteriormente, en el que el núcleo magnético comprende o preferentemente consiste en una suprapartícula que consiste en nanopartículas agregadas en las que las nanopartículas se recubren preferentemente con al menos un estabilizador. Preferentemente, el núcleo magnético tiene un diámetro en el intervalo de entre 80 y 500 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 150 y 450 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 200 y 400 nm e, incluso más específicamente, de entre aproximadamente 250 y 400 nm. En determinados modos de realización, la perla magnética tiene un tamaño de partícula de entre 200 y 400 nm. En algunos modos de realización, el diámetro del núcleo magnético es de entre aproximadamente 50 y 450 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 100 y 400 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 150 y 350 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 200 y 350 nm. En modos de realización particulares, el núcleo magnético es de entre aproximadamente 250 y 320 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 260 y 300 nm, más específicamente, de entre aproximadamente 270 y 290 nm.

Preferentemente, el estabilizador se selecciona de al menos un miembro del grupo que consiste en ácidos dicarboxílicos, ácidos tricarboxílicos, ácido poliacrílico, aminoácidos, tensioactivos y ácidos grasos. Por tanto, se debe entender que el grupo mencionado anteriormente incluye sales y derivados, tales como ésteres y polímeros, de los compuestos mencionados. Por tanto, el estabilizador se selecciona preferentemente de al menos un miembro del grupo que consiste en ácidos dicarboxílicos, sales de ácido dicarboxílico, derivados de ácido dicarboxílico, ácidos tricarboxílicos, sales de ácidos tricarboxílico, derivados tricarboxílicos, ácido poliacrílico, sales de ácido poliacrílico, derivados de ácido poliacrílico, aminoácidos, sales de aminoácidos, derivados de aminoácidos, tensioactivos, sal de tensioactivos, ácidos grasos, sales de ácidos grasos y derivados de ácidos grasos.

Como se usa en el presente documento, los términos "recubierto" o "recubrimiento" se usan para referirse al procedimiento de adsorción, interacciones de van der Waals y/o de grupos no polares (por ejemplo, adsorción química o adsorción física) o unión covalente de la nanopartícula magnética y el estabilizador.

En un modo de realización particular que se muestra en la fig. 1A, una sal de hierro (III) se reduce a Fe_3O_4 en condiciones solvotérmicas para formar nanopartículas magnéticas. El agente reductor se puede seleccionar del grupo de alcoholes, preferentemente, polialcoholes, tales como etilenglicol, dietilenglicol y trietilenglicol. Además, un estabilizador está presente en la mezcla de reacción. Como se muestra en la fig. 1B, el estabilizador, tal como citrato de sodio, se coordina en la superficie alrededor de las nanopartículas magnéticas para la formación *in situ* de agregados de nanopartículas con tamaños controlados para formar las denominadas suprapartículas.

En una segunda etapa, las suprapartículas se recubren con un recubrimiento seleccionado del grupo que consiste en sílice, silicatos, silanos y mezclas de dos o más de los mismos. Un procedimiento conocido en la técnica es el uso de ortosilicato de tetraetilo (TEOS) de acuerdo con el procedimiento de Stöber (Stöber *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.*, 1968, 26, 62). Como se muestra en la fig. 3A, las suprapartículas se mezclan con etanol y H_2O antes de añadir TEOS. La agitación de la mezcla a una temperatura de entre 15 y 35 °C durante de 8 a 24 horas proporciona perlas magnéticas revestidas con TEOS.

Además, el recubrimiento se puede seleccionar del grupo de sílice (por ejemplo, ortosilicato de tetraetilo, metacrilato de 3-(trimetoxisililo) propilo, viniltrimetoxisilano, viniltrietoxisilano, aliltrimetoxisilano, aliltrietoxisilano, trietoxivinilsilano, acrilato de 3-(trimetoxisililo) propilo, trimetoxi(7-octen-1-il)silano, trimetoximetilsilano, trietoximetilsilano, etiltrimetoxisilano, trietoxi(etil)silano, trimetoxifenilsilano, trimetoxi (2-feniletil)silano, trimetoxi(propil)silano, n-propiltrietoxisilano, isobutil(trimetoxi)silano, isobutilrietoxisilano) o el grupo de los silicatos (por ejemplo, silicato de sodio, silicato de potasio, silicato de calcio, silicato de litio y silicato de magnesio). Como se muestra en la fig. 3B, las superpartículas se pueden someter a un recubrimiento con vidrio líquido ("LG") mezclando las superpartículas con H_2O y vidrio líquido de sodio (por ejemplo, silicato de sodio) antes de añadir HCl. La agitación de la mezcla a una temperatura de entre 15 y 35 °C durante de 2 a 12 horas proporciona perlas magnéticas que tienen un recubrimiento de vidrio líquido. Dependiendo de la eficacia del recubrimiento, la etapa de recubrimiento con vidrio líquido se puede repetir al menos una vez más. Mediante el goteo lento y la aplicación de HCl a la solución, es posible ajustar exactamente el espesor del recubrimiento. Por tanto, se pueden obtener recubrimientos extremadamente delgados usando condiciones claramente controladas durante la adición de HCl a la solución. Como se muestra en la sección de Ejemplos a continuación, los recubrimientos que son demasiado gruesos dan lugar a resultados deficientes, por ejemplo, en los ensayos cobas® Liat®.

Sistemas de ensayo y dispositivos de procesamiento de muestras

Las MGP descritas en el presente documento se pueden usar en cualquier procedimiento de ensayo de amplificación manual o en un sistema de amplificación de ácidos nucleicos automatizado o en un sistema de preparación de muestras. En un modo de realización, las MGP se pueden usar en cualquier instrumento de PCR y/o sistema de preparación de muestras comercialmente disponible, que incluye, pero sin limitarse a, el sistema

5 cobas® 6800/8800, el sistema cobas® 4800, el instrumento cobas® AmpliPrep, el sistema cobas® Liat®, el instrumento cobas® p630, el sistema cobas® s201, el analizador cobas® TaqMan® 48, el analizador cobas® TaqMan®, el sistema LightCycler® 1536, el sistema LightCycler® 2.0, el sistema LightCycler® 480, el sistema LightCycler® 96, el sistema MagNA Pure 96, el sistema MagNA Pure Compact, el sistema MagNA Pure LC2.0 o la solución FLOW (véase, por ejemplo, www.molecular.roche.com/systems).

10 En un modo de realización específico, las MGP descritas en el presente documento se usan en un dispositivo de procesamiento de muestras configurado para realizar una técnica de amplificación de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos extraídos de una muestra biológica se pueden procesar además mediante la amplificación de los ácidos nucleicos usando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente en el presente documento. En un modo de realización específico, los ácidos nucleicos extraídos del organismo son ARN y su procesamiento incluye una transcripción inversa acoplada con una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) usando combinaciones de enzimas, tales como polimerasa Tth y polimerasa Taq o transcriptasa inversa y polimerasa Taq. En algunos modos de realización, las sondas de ácido nucleico circular con muescas se pueden circularizar usando ADN ligasa de T4 o Ampligase™ y ácidos nucleicos guía, seguido de detección de la formación de las sondas circularizadas cerradas después de un procedimiento de selección *in vitro*. Dicha detección puede ser a través de PCR, TMA, RCA, LCR, NASBA o SDAR usando enzimas conocidas por los familiarizados con la técnica. En modos de realización ejemplares, la amplificación de los ácidos nucleicos se puede detectar en tiempo real usando sondas de ácido nucleico marcadas con fluorescente o tintes intercalantes de ADN, así como un fotómetro o dispositivo de carga acoplada en el analizador molecular para detectar el incremento de fluorescencia durante la amplificación de ácido nucleico. Estas sondas marcadas de forma fluorescente usan sistemas de detección bien conocidos por los familiarizados con la técnica (es decir, TaqMan™, Molecular Beacons™, sondas de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), sondas Scorpion™) y, en general, usan extinción de fluorescencia, así como la liberación de extinción o transferencia de energía de fluorescencia de un indicador a otro para detectar la síntesis o presencia de ácidos nucleicos específicos. En un modo de realización, las MGP divulgadas en el presente documento se usan en un dispositivo que comprende canales, cámaras, depósitos, regiones de detección y procesamiento autónomos de microescala a macroescala. El dispositivo puede ser un cartucho, dispositivo, recipiente o bolsa, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE. UU. n.º 6.440.725; 6.783.934; 6.818.185; 6.979.424; 8.580.559 y 8.940.526, así como dispositivos tales como los disponibles de Cepheid Corp., Idaho Technology, Inc. y/o Biofire Diagnostics, Inc.

35 Por ejemplo, el dispositivo puede ser una bolsa de análisis de ácido nucleico autónoma que incluye una zona de lisis celular, una zona de preparación de ácido nucleico, una zona de amplificación de primera fase, una zona de amplificación de segunda fase, como se muestra en la fig. 1 de la publicación de solicitud de EE. UU. n.º 201000056383. La bolsa comprende una variedad de canales y blísteres de diversos tamaños y se dispone de modo que la muestra fluya a través del sistema y diversas zonas y se procese en consecuencia. El procesamiento de la muestra se produce en diversas ampollas localizadas dentro de la bolsa. Se proporcionan numerosos canales para mover la muestra dentro y entre las zonas de procesamiento, mientras que se proporcionan otros canales para suministrar fluidos y reactivos a la muestra o para retirar dichos fluidos y reactivos de la muestra. El líquido dentro de la bolsa se mueve entre ampollas por presión, por ejemplo, presión neumática. En este modo de realización particular, las MGP descritas en el presente documento se proporcionan en un compartimento configurado para albergar las MGP y en comunicación fluida con uno u otros canales y blísteres de modo que las MGP se puedan incorporar al flujo de trabajo de procesamiento de muestras y procesarlas en consecuencia.

45 En un ejemplo alternativo, el dispositivo puede ser un cartucho de análisis de ácido nucleico autónomo como se muestra en las figs. 3 a 5 y 9 de la patente de EE. UU. n.º 9.322.052. El cartucho incluye, entre otros, múltiples cámaras que comprenden una cámara de muestra para contener una muestra de fluido introducida a través del orificio de entrada, una cámara de lavado para contener una solución de lavado, una cámara de reactivo para contener un reactivo de lisis, una cámara de lisis, una cámara de residuos para recibir la muestra y solución de lavado usadas, una cámara de neutralizador para contener un neutralizador y una cámara de mezcla maestra para contener una mezcla maestra (por ejemplo, reactivos de amplificación y sondas fluorescentes) y para mezclar los reactivos y sondas con el analito separado de la muestra de fluido, un recipiente de reacción y una cámara de detección. En este modo de realización, las MGP descritas en el presente documento se proporcionan en un compartimento configurado para albergar las MGP y en comunicación fluida con uno u otros canales y blísteres de modo que las MGP se puedan incorporar al flujo de trabajo de procesamiento de muestras y procesarlas en consecuencia.

60 En un modo de realización específica, los procedimientos descritos en el presente documento se llevan a cabo en un dispositivo de procesamiento de muestras tal como el descrito en la patente de EE. UU. n.º 7.718.421. Los dispositivos segmentados, tales como los descritos en la patente de EE. UU. n.º 7.718.421, proporcionan un recipiente práctico para recibir, almacenar, procesar y/o analizar una muestra biológica. En determinados modos de realización, el dispositivo segmentado facilita protocolos de procesamiento de muestras que implican múltiples etapas de procesamiento. En determinados modos de realización, se puede recoger una muestra en un dispositivo de muestra, y a continuación el dispositivo se sitúa en un analizador que manipula el dispositivo y su contenido para procesar la muestra.

Un modo de realización particular incluye un dispositivo flexible que se ha segmentado en compartimentos por precintos rompibles. Los segmentos individuales pueden contener diversos reactivos y tampones para procesar una muestra. Se pueden aplicar pinzas y accionadores al dispositivo en diversas combinaciones y con diversos tiempos para dirigir el movimiento del fluido y para provocar que los sellos rompibles estallen. Este estallido de los precintos rompibles puede dejar una superficie de dispositivo interior que está sustancialmente libre de obstrucciones para el flujo de fluido. En un modo de realización, el flujo de la muestra biológica se puede dirigir hacia el extremo distal del dispositivo a medida que avanza el procesamiento, mientras que el flujo de residuo se puede ver obligado a moverse en el sentido opuesto, hacia la abertura del dispositivo donde se colocó inicialmente la muestra. Esta entrada de muestra se puede sellar, posiblemente de forma permanente, por una tapa con un mecanismo de cierre, y se puede localizar una cámara de residuos en la tapa para recibir el residuo para su almacenamiento. Un beneficio significativo de este enfoque es que la muestra procesada no entra en contacto con superficies que se han tocado por la muestra sin procesar. En consecuencia, es menos probable que cantidades mínimas de inhibidores de reacción presentes en la muestra sin procesar que podrían recubrir las paredes del dispositivo contaminen la muestra procesada.

El dispositivo de procesamiento de muestras se muestra en la fig. 5 y puede incluir un dispositivo flexible transparente que se puede configurar en una pluralidad de segmentos, tales como 16, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 y/o 190, y que están sustancialmente aplanados por compresión. En un modo de realización, un dispositivo puede tener al menos dos segmentos. En un modo de realización, un dispositivo puede tener al menos tres segmentos. El dispositivo flexible puede proporcionar funcionalidad operativa entre aproximadamente 2 y 105 °, compatibilidad con las muestras, dianas y reactivos, baja permeabilidad a los gases, propiedades mínimas de fluorescencia y/o elasticidad durante ciclos repetidos de compresión y flexión. El dispositivo se puede fabricar de una variedad de materiales, de los que sus ejemplos incluyen, pero no se limitan a: poliolefinas tales como polipropileno o polietileno, poliuretano, copolímeros de poliolefina y/u otros materiales que proporcionan características adecuadas.

En modos de realización ejemplares, uno o más reactivos se pueden almacenar como sustancia seca y/o bien como soluciones líquidas en segmentos del dispositivo. En modos de realización donde los reactivos se pueden almacenar en formato seco, las soluciones líquidas se pueden almacenar en segmentos contiguos para facilitar la reconstitución de la solución de reactivo. Los ejemplos de reactivos típicos incluyen: reactivo de lisis, tampón de elución, tampón de lavado, inhibidor de DNasa, inhibidor de RNasa, inhibidor de proteinasa, agente quelante, reactivo neutralizante, solución salina caotrópica, detergente, tensioactivo, anticoagulante, solución germinante, isopropanol, solución etanólica, anticuerpo, sondas de ácido nucleico, sondas de ácido peptidonucleico y sondas de ácido nucleico con fosfotioato. En modos de realización donde uno de los reactivos es una solución de sal caotrópica, un componente preferente es isocianato de guanidinio o clorhidrato de guanidinio o una combinación de los mismos. En algunos modos de realización, el orden en el que se pueden almacenar los reactivos en el dispositivo en relación con la abertura a través de la que se introduce una muestra refleja el orden en el que se pueden usar los reactivos en los procedimientos que utilizan el tubo. En modos de realización preferentes, un reactivo incluye una sustancia que se puede unir específicamente a un componente preseleccionado de una muestra. Por ejemplo, una sustancia se puede unir específicamente a un ácido nucleico, o una sonda de ácido nucleico se puede unir específicamente a ácidos nucleicos que tienen secuencias de bases particulares.

Se puede lograr una detección ultrarrápida de una señal desde un segmento de dispositivo usando un sensor, tal como un fotómetro, un espectrómetro, un CCD, conectado a un bloque. En modos de realización ejemplares, se puede aplicar presión por un accionador sobre el segmento de dispositivo para definir adecuadamente la conformación del segmento de dispositivo. El formato de señal puede ser la intensidad de una luz a determinada longitud de onda, tal como una luz fluorescente, un espectro y/o una imagen, tal como una imagen de células o elementos artificiales tales como los puntos cuánticos. Para la detección de fluorescencia, se puede usar una excitación de luz del sistema óptico para iluminar una reacción, y se puede detectar la luz de emisión por el fotómetro. Para detectar una pluralidad de señales que tienen longitudes de onda específicas, se pueden detectar señales de diferentes longitudes de onda en serie o en paralelo por canales de detección especializados o un espectrómetro.

Kits

En algunos modos de realización, las MGP y las composiciones y suspensiones de las mismas descritas en el presente documento se incluyen en un kit o un componente del mismo. Los kits contemplados en el presente documento pueden incluir cualquier artículo fabricado (por ejemplo, un envase o un recipiente) que incluye al menos un dispositivo para amplificar, capturar, etiquetar/convertir o detectar específicamente una secuencia de ácido nucleico diana, como se describe en el presente documento, en el que se incluyen las composiciones descritas en el presente documento en el dispositivo o se proporcionan como un componente, vial o recipiente separado del kit. El kit puede incluir además instrucciones de uso, reactivos complementarios, materiales de control y/o componentes o módulos usados en los procedimientos de amplificación descritos en el presente documento o en una etapa de los mismos. El kit también puede incluir al menos uno de los siguientes componentes: nucleósidos trifosfato, polimerasa de ácido nucleico y tampones necesarios para la función de la polimerasa de ácido nucleico. Uno o más de los componentes del kit se pueden incluir en el kit, a modo de componentes separados, por ejemplo,

en viales o recipientes separados empaquetados juntos, o uno o más de los componentes del kit se pueden incluir en el kit en el mismo vial o recipiente.

Dichos kits pueden comprender componentes que se pueden usar durante un procedimiento de preparación de muestras, por ejemplo, placas de microtitulación en formato de 96 o 384 pocillos o tubos de reacción ordinarios fabricados, por ejemplo, por Eppendorf, Hamburgo, Alemania y todos los demás reactivos para llevar a cabo una amplificación de ácidos nucleicos usando los materiales de control descritos en el presente documento. El kit puede incluir MGP, tal como se describe en el presente documento. El kit puede comprender además o adicionalmente un reactivo de proteasa y un tampón de lisis que contiene, por ejemplo, agentes caotrópicos, detergentes o alcoholes o mezclas de los mismos que permiten la lisis de las células. Estos componentes del kit se pueden proporcionar por separado en tubos o recipientes de almacenamiento. Dependiendo de la naturaleza de los componentes, estos se pueden proporcionar en un solo tubo o recipiente de almacenamiento. El kit puede comprender además o adicionalmente una solución de lavado que resulte adecuada para la etapa de lavado de las partículas de vidrio magnéticas en el caso de que haya un ácido nucleico unido a las mismas. Esta solución de lavado puede contener etanol y/o agentes caotrópicos en una solución tamponada o soluciones con un pH ácido sin etanol y/o agentes caotrópicos tal como describe anteriormente. A menudo, la solución de lavado u otras soluciones se proporcionan como soluciones madre que se tienen que diluir antes de su uso.

El kit puede comprender, además, un eluyente o tampón de elución, es decir, una solución o un tampón (por ejemplo, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) o agua pura para eluir el ácido nucleico unido a las partículas de vidrio magnéticas. Además, pueden estar presentes reactivos adicionales o soluciones tamponadas que se pueden usar para la purificación de un ácido nucleico.

En un modo de realización específico, el kit contiene una enzima polimerasa que tiene actividad de exonucleasa en de 5' a 3'. El kit también puede contener una enzima con actividad de transcriptasa inversa. En otro modo de realización, el kit contiene una enzima polimerasa que tiene actividad exonucleasa en de 5' a 3' y actividad de transcriptasa inversa.

Procedimientos y usos de las partículas magnéticas

Las MGP (y composiciones y suspensiones de las mismas) descritas en el presente documento se pueden usar para analizar cualquier ácido nucleico diana, que incluyen, pero sin limitarse a, los ácidos nucleicos asociados con patógenos bacterianos (por ejemplo, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *C. difficile*, tuberculosis, estreptococos del grupo B, sepsis, clamidia y gonorrea), patógenos víricos (por ejemplo, gripe, VIH, VHC y VHB), células tumorales (por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon y leucemia), alteraciones cromosómicas, tales como duplicación génica, deleciones de genes o translocaciones de genes, células que expresan marcadores de superficie celular específicos, tales como linfocitos CD4⁺, detección de mutaciones/alteraciones de genes, tales como polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y estado de metilación de genes.

En un modo de realización, las MGP se pueden usar para ensayos que incluyen captura, enriquecimiento, análisis y/o purificación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, las MGP descritas en el presente documento se pueden usar para capturar un ácido nucleico diana. La captura puede ayudar a enriquecer el ácido nucleico diana y a eliminar los inhibidores de reacción de una muestra. Las MGP se pueden usar para la captura, el enriquecimiento y/o la purificación en condiciones químicas y de temperatura definidas, y pueden liberar los componentes en diferentes condiciones químicas y de temperatura.

En un modo de realización específico, las MGP se usan para analizar ácidos nucleicos en una muestra mediante procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos. Los procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos pueden incluir, pero no se limitan a, la reacción en cadena de la ligasa (LCR; Wu D. Y. y Wallace R. B., *Genomics* 4 (1989) 560-69; y Barany F., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 88 (1991) 189-193); la reacción en cadena de la polimerasa-ligasa (Barany F., *PCR Methods and Applic.* 1 (1991) 5-16); Gap-LCR (documento WO 90/01069); reacción en cadena de reparación (documento EP 0439182 A2), 3SR (Kwoh D.Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 86 (1989) 1173-1177; Guatelli J.C., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 87 (1990) 1874-1878; documento WO 92/08808) y NASBA (documento US 5.130.238). Además, las MGP descritas en el presente documento también se pueden usar en los siguientes procedimientos: amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación por Qb (para una revisión, véanse, por ejemplo, Whelen A. C. y Persing D. H., *Annu. Rev. Microbiol.* 50(1996) 349-373; Abramson R. D. y Myers T. W., *Curr Opin Biotechnol* 4 (1993) 41-47).

Un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se divulga en las patentes de EE. UU. n.º 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159 y 4.965.188, entre otras referencias. La PCR emplea típicamente dos o más cebadores oligonucleotídicos que se unen a un molde de ácido nucleico seleccionado (por ejemplo, ADN o ARN). Los cebadores útiles para el análisis de ácidos nucleicos incluyen oligonucleotídicos que pueden actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ácido nucleico dentro de las secuencias de ácido nucleico de los ácidos nucleicos diana. Un cebador se puede purificar a partir de un

hidrolizado de restricción por procedimientos convencionales, o se puede producir sintéticamente. El cebador es preferentemente monocatenario para una máxima eficacia en la amplificación, pero el cebador puede ser bicatenario. En primer lugar, se desnaturalizan los cebadores bicatenarios, es decir, se tratan para separar las hebras. Un procedimiento de desnaturalización de ácidos nucleicos bicatenarios es por calentamiento. Una "polimerasa termoestable" es una enzima polimerasa que es estable frente al calor, es decir, es una enzima que cataliza la formación de productos de extensión de cebador complementarios a un molde y no se desnaturaliza irreversiblemente cuando se somete a las temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de ácidos nucleicos molde bicatenarios. En general, la síntesis se inicia en el extremo 3' de cada cebador y continúa en dirección de 5' a 3' a lo largo de la hebra molde. Se han aislado polimerasas termoestables de, por ejemplo, *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus* y *Methanothermus fervidus*. No obstante, también se pueden emplear polimerasas que no sean termoestables en ensayos de PCR siempre que se reponga la enzima.

Si el ácido nucleico molde es bicatenario, es necesario separar las dos hebras antes de que se pueda usar como molde en la PCR. La separación de las hebras se puede lograr por cualquier procedimiento de desnaturalización adecuado que incluya medios físicos, químicos o enzimáticos. Un procedimiento de separación de las hebras de ácido nucleico implica calentar el ácido nucleico hasta que esté predominantemente desnaturalizado (por ejemplo, más de un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % desnaturalizado). Las condiciones de calentamiento necesarias para desnaturalizar el ácido nucleico molde dependerán, por ejemplo, de la concentración salina de tampón y la longitud y composición de nucleótidos de los ácidos nucleicos que se desnaturalizan, pero típicamente varían de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 105 °C durante un tiempo dependiendo de rasgos característicos de la reacción, tales como la temperatura y la longitud del ácido nucleico. La desnaturalización se realiza típicamente durante aproximadamente 5 s a 9 min. Para no exponer la respectiva polimerasa a dichas altas temperaturas durante demasiado tiempo y, por tanto, poner en riesgo una pérdida de enzima funcional, resulta preferente usar etapas de desnaturalización cortas. En un modo de realización específico, la etapa de desnaturalización es de hasta 30 segundos, por ejemplo de hasta 20 segundos, de hasta 10 segundos, de hasta 5 segundos y, específicamente, de aproximadamente 5 segundos.

Si el ácido nucleico molde bicatenario se desnaturaliza por calor, la mezcla de reacción se deja enfriar hasta una temperatura que promueva la hibridación de cada cebador a su secuencia diana en los ácidos nucleicos diana. La temperatura para la hibridación es preferentemente de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 70 °C, más preferentemente de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 65 °C; más preferentemente de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C, más preferentemente de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 58 °C. Los tiempos de hibridación pueden ser de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 1 minuto (por ejemplo, de aproximadamente 20 segundos a aproximadamente 50 segundos, de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 40 segundos). En este contexto, puede ser ventajoso usar temperaturas de hibridación diferentes para incrementar la inclusividad del respectivo ensayo. En resumen, esto quiere decir que a temperaturas de hibridación relativamente bajas, los cebadores también se pueden unir a dianas que tengan emparejamientos erróneos únicos, por lo que también se pueden amplificar variantes de determinadas secuencias. Esto puede ser deseable si, por ejemplo, un determinado organismo tiene variantes genéticas conocidas o desconocidas que también se deben detectar. Por otra parte, las temperaturas de hibridación relativamente altas tienen la ventaja de proporcionar una mayor especificidad, puesto que a mayores temperaturas la probabilidad de que el cebador se una a secuencias diana no exactamente correspondientes disminuye continuamente. Para aprovechar ambos fenómenos, en algunos modos de realización de la divulgación, es preferente que el procedimiento descrito anteriormente comprenda hibridación a diferentes temperaturas, preferentemente, primero a una temperatura más baja, a continuación, a una temperatura mayor. Si, por ejemplo, una primera incubación tiene lugar a 55 °C durante aproximadamente 5 ciclos, se pueden (pre)amplificar secuencias diana que no exactamente correspondientes. Esto puede ir seguido, por ejemplo, de aproximadamente 45 ciclos a 58 °C, proporcionando mayor especificidad en la mayor parte del experimento. De esta manera, no se obvian variantes genéticas potencialmente importantes, mientras que la especificidad permanece relativamente alta.

A continuación, la mezcla de reacción se ajusta a una temperatura a la que se promueve u optimiza la actividad de la polimerasa, es decir, una temperatura suficiente para que se produzca la extensión del cebador hibridado para generar productos complementarios al ácido nucleico que se va a analizar. La temperatura debe ser suficiente para sintetizar un producto de extensión a partir de cada cebador que se hibrida a un molde de ácido nucleico, pero no debe ser tan alta como para desnaturalizar un producto de extensión de su molde complementario (por ejemplo, la temperatura para extensión varía en general de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C (por ejemplo, de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C, aproximadamente 60 °C). Los tiempos de extensión pueden ser de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 5 minutos, preferentemente de aproximadamente 15 segundos a 2 minutos, más preferentemente de aproximadamente 20 segundos a aproximadamente 1 minuto, más preferentemente de aproximadamente 25 segundos a aproximadamente 35 segundos. Las cadenas recién sintetizadas forman una molécula bicatenaria que se puede usar en las etapas sucesivas de la reacción. Las etapas de separación de las hebras, hibridación y alargamiento se pueden repetir tan a menudo como se necesite para producir la cantidad deseada de productos de amplificación correspondientes a los ácidos nucleicos diana. Los factores limitantes en la reacción son las cantidades de cebadores, enzima

termoestable y nucleósidos trifosfato presentes en la reacción. Las etapas de ciclado (es decir, desnaturalización, hibridación y extensión) se repiten preferentemente al menos una vez. Para su uso en la detección, el número de etapas de ciclado dependerá, por ejemplo, de la naturaleza de la muestra. Si la muestra es una mezcla compleja de ácidos nucleicos, se requerirán más etapas de ciclado para amplificar la secuencia diana lo suficiente para su detección. En general, las etapas de ciclado se repiten al menos aproximadamente 20 veces, pero se pueden repetir tantas como 40, 60 o incluso 100 veces.

Ejemplo

10 Síntesis de núcleos magnéticos

El núcleo magnético se sintetizó mediante la reducción de cloruro de hierro (III) a óxido de hierro (II, III) (Fe_3O_4) en condiciones solvotérmicas, como se describe en el documento [3], es decir, Liu *et al.* (Angew. Chem. Int. Ed., 2009, 48, 5875-5879). En resumen, el núcleo magnético ("perlas MC") se produjo mediante desgasificación de 800 ml de etilenglicol con argón durante 1 hora. Se añadió y disolvió FeCl_3 (44 g) y la solución se transfirió a un reactor a presión. Se añadieron citrato de sodio (9,7 g) y acetato de sodio (51,9 g) y la mezcla se calentó a 160 °C durante 1 hora y, a continuación, la temperatura se elevó a 200 °C y se mantuvo durante 18 horas. La mezcla se sometió a lavado magnético usando etanol y agua (3 x etanol, 3 x agua). Las perlas MC obtenidas eran superparamagnéticas. Los esquemas de reacción se muestran en las figs. 1A y 1B. En el presente documento, se usó acetato de sodio como aceptador de protones, mientras que se añadió citrato de sodio para estimular la formación de agregados definidos de nanopartículas, como se muestra en la fig. 1B. El posible mecanismo de reducción se muestra en la fig. 2.

25 Recubrimiento de núcleos magnéticos

Una porción de las perlas MC se recubrió con ortosilicato de tetraetilo (TEOS) de acuerdo con el procedimiento de Stöber (Stöber *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.*, 1968, 26, 62) como sigue: se mezclaron 0,4 g de perlas MC producidas por el procedimiento anterior con 1280 ml de etanol, 312 ml de H_2O y 16 ml de NH_4OH . La mezcla se añadió a una celda US de flujo continuo activada durante 30 minutos. Se añadió TEOS (2 ml) y la reacción se agitó a 25 °C durante 16 horas. La mezcla se sometió a lavado magnético usando etanol y agua (3 x etanol, 3 x agua).

Otra porción de las perlas MC se sometió a un recubrimiento con vidrio líquido ("LG") mediante la mezcla de 0,5 g de perlas con 160 ml de H_2O y 40 ml de vidrio líquido de sodio en un reactor de vidrio de 250 ml con una celda US de flujo continuo (y premezclada durante 10 minutos). Se añadió HCl (1 M, 66 ml) y la mezcla se agitó de forma continua y se sometió a una celda US de flujo continuo durante 2 horas. A continuación, la mezcla se sometió a un lavado magnético (3 x agua) y las etapas de recubrimiento de vidrio líquido anteriores se repitieron al menos una vez más. Las perlas ejemplares son MC13-LG a MC17-LG. Otra porción de las perlas MC se sometió a un recubrimiento con vidrio líquido ("LG") mediante la mezcla de perlas MC (2-15 g/l) con diversas cantidades de vidrio líquido de sodio (38-100 ml) en un volumen total de hasta 250 ml en un reactor de vidrio con una celda US de flujo continuo (y premezclada durante 10 minutos). Se añadió gota a gota HCl (1-3 M, 45 a 110 ml) y la mezcla se agitó de forma continua y se sometió a una celda US de flujo continuo durante de 4 a 6 horas. A continuación, la mezcla se sometió a un lavado magnético (3 x agua). Las perlas ejemplares son MC47-LG y MC48-LG.

45 Resultados

Las perlas MC sin recubrimiento tenían un diámetro de aproximadamente 270 nm, las partículas recubiertas con TEOS tenían un diámetro de aproximadamente 400 nm y las partículas recubiertas de vidrio líquido tenían un diámetro de aproximadamente 280 nm, magnetizadas con 46,7 (TEOS) y 54 (LG) $\text{A}^*\text{m}^2/\text{kg}$, respectivamente.

En la tabla 1, se muestra una visión general de los experimentos usando perlas MC sin recubrimiento en comparación con perlas sintetizadas de acuerdo con el procedimiento establecido en el documento [3], es decir, Liu *et al.*

55 **Tabla 1: caracterización de perlas sin recubrimiento**

Nombre	FeCl_3 [mmol]	Na_3Cit [Eq]	NaOAc [Eq]	EG [ml]	Rendimi ento [g]	Magn. [Am^2/kg]	Rem. [Am^2/kg]	Tamaño [nm]
Lit[3]	4	0,10	3,66	20	np	np	np	170
Lit[3]	4	0,17	3,66	20	np	73,6	np	250
Lit[3]	4	0,26	3,66	20	np	np	np	300
MC01	163	0,23	3,89	800	13,8	59,7	0,03	
MC05	563	0,27	4,49	650	37,5	np	np	
MC06	650	0,23	3,89	600	54,5	72,3	11,2	

MC13	163	0,23	3,89	800	13,3	56,7	0,80	295
MC14	163	0,33	3,89	800	13,4	57,6	0,74	298
MC15	326	0,23	3,89	700	23,9	68,2	1,93	302
MC16	163	0,23	3,89	800	13,2	57,5	0,85	296
MC17	163	0,23	3,89	800	12,2	56,1	0,65	353

Los rendimientos de las reacciones de mayor concentración incrementaron linealmente. Adicionalmente, se observó un incremento de la magnetización de saturación ("Magn."). La remanencia magnética ("Rem.") también incrementó. El análisis de MEB mostró la influencia de las concentraciones de reactivo en la morfología de las nano MGP, como se ilustra en las figs. 4A-C.

Como se explica de manera general anteriormente, el procedimiento de recubrimiento se adaptó a partir del documento EP2916327B1. El tiempo de reacción se redujo de más de dos días a 4 horas y el procedimiento de ultrasonificación se optimizó usando una sonda de derivación, lo que permitió escalar fácilmente el procedimiento de recubrimiento y se demostró mediante el recubrimiento satisfactorio de un lote de 10 gramos, mientras que, en el documento EP2916327B1, se había usado un lote de 500 mg. A modo de comparación, los núcleos magnéticos también se recubrieron mediante el procedimiento Stöber, donde se usó TEOS como reactivo. La tabla 2 muestra las diferentes condiciones de síntesis.

Tabla 2: caracterización de perlas recubiertas

Nombre	Cantidad de partículas magnéticas [g]	Vidrio líquido [ml]	TEOS [ml]	Tiempo [h]	Magn. [Am ² /kg]	Rem. [Am ² /kg]	Tamaño [nm]
MC13LG1	0,5	120	-	22	54,0	0,96	308
MC13LG3	1,5	240	-	4	53,7	0,74	298
MC13TEOS3	0,4	-	7,5	16	41,7	0,44	306
MC13TEOS5	0,4	-	2	16	46,7	0,49	300
MC13TEOS6	0,4	-	1	16	43,8	0,47	312
MC14LG1	0,5	80	-	4	50,5	0,61	318
MC14TEOS1	0,4	-	2	16	43,4	0,47	353
MC15LG1	1,5	240	-	4	64,6	2,00	300
MC15LG1LG1	0,5	160	-	8	64,3	2,27	297
MC16LG1	0,5	80	-	4	51,0	0,67	297
MC16LG2	1,5	240	-	4	53,2	0,75	264
MC16LG3	10	1600	-	4	53,1	0,79	303
MC17LG1	0,5	80	-	4	52,7	0,74	320

En una tercera etapa, se demostró la funcionalidad de las MGP en el cobas® Liat®. El sistema cobas® Liat® es un sistema de punto de atención que automatiza completamente la preparación de muestras, la amplificación por PCR y la detección en tiempo real de secuencias de ADN/ARN diana en el analizador cobas® Liat®. El tiempo de respuesta (TAT) es muy rápido, oscilando entre 10 y 20 minutos. El tiempo total de unión, enriquecimiento y purificación del ácido nucleico en nano MGP puede ser de tan solo 5 minutos o menos. En estas pruebas, se introdujeron 10 µl de cada nano MGP en concentraciones de 25 mg/ml en tubos cobas® Liat®. Como ácidos nucleicos diana se usó *Clostridium difficile* (C. diff), virus de la gripe A (FluA), virus de la gripe B (FluB) y virus respiratorio sincitial (VRS) humano. Resultan preferentes los valores de umbral de ciclo (Ct) bajos y los valores de amplificación (Amp) altos. Las perlas MC-LG mostraron un rendimiento consecuente para la detección de ADN o ARN diana de organismos bacterianos o víricos, mientras que MC-TEOS mostró valores de Ct retrasados y valores de Amp bajos. Los resultados del rendimiento funcional de las MGP se resumen en la tabla 3.

Tabla 3: rendimiento funcional de las MGP

Nombre	Ct de C. diff	Amp de C. diff	Ct de FluA	Amp de FluA	Ct de FluB	Amp de FluB	Ct de VRS	Amp de VRS
MC13LG1	26,3	27,4	28,4	4,5	28,4	3,96	27,2	3,74
MC13LG3	26,5	21,6	-	-	-	-	-	-
MC13TEOS3	33,1	1,32	-	-	-	-	-	-
MC13TEOS5	29,3	11,5	34,3	1,66	34,7	1,41	-	-
MC13TEOS6	31,4	3,56	36,4	0,38	34,5	0,9	33,6	2,4
MC14LG1	25,8	26,3	28,9	4,6	29,8	2,81	27	3,1

MC14TEOS1	31,8	3,14	35,5	0,69	34,8	1,61	34,2	1,9
MC15LG1	27,4	16,64	30	4,32	30	31,6	4,53	4,53
MC15LG1LG1	26,9	17,8	30,1	4,51	30,1	31,8	4,93	4,93
MC16LG1	26,5	30,1	28,9	4,71	28,4	3,71	31,1	1,4
MC16LG2	27,2	17,5	29,8	4,4	29,4	4,3	31,2	2,7
MC16LG3	26,2	21,4	29	3,97	28,9	2,54	31,1	0,95
MC17LG1	26,5	29,1	28,9	4,99	28,8	3,82	31,4	1,54

Propiedades físicas de las partículas recubiertas

5 Las perlas MC47 y MC48 se sometieron a un recubrimiento con vidrio líquido ("LG") mediante la mezcla de perlas MC (2-15 g/l) con diversas cantidades de vidrio líquido de sodio (38-100 ml) en un volumen total de hasta 250 ml en un reactor de vidrio con una celda US de flujo continuo (y premezclada durante 10 minutos). Se añadió gota a gota HCl (1-3 M, 45-110 ml) dependiendo del espesor de recubrimiento deseado y la mezcla se agitó de forma continua y se sometió a una celda US de flujo continuo durante de 4 a 6 horas. A continuación, la mezcla se sometió a un lavado magnético (3 x agua).

10

Tabla 4: punto isoeléctrico y recubrimiento de sílice de las MGP

Muestra	Recubrimiento de sílice [% en peso]	Punto isoeléctrico
MC48	0	4,5
MC48LG2	15	1,5
MC48LG3	13	1,8
MC48LG5	7	2,5
MC48LG6	8	2,4
MC48LG7	20	1,2
MC48LG9	8	2,4

15 La figura 6 y la tabla 4 muestran la dependencia del punto isoeléctrico de las partículas del espesor del recubrimiento (es decir, el contenido de sílice) de las partículas. En el presente documento, se muestra claramente que, a medida que incrementa el recubrimiento de sílice, disminuye el valor del punto isoeléctrico.

20 Posteriormente, se analizó la influencia del punto isoeléctrico de las partículas sobre el rendimiento de las partículas en el ensayo cobas® Liat®. En el presente documento, las perlas MC47 y MC48 recubiertas de sílice, como se describe anteriormente, se sometieron a una reacción de amplificación/detección por PCR usando los reactivos de la prueba cobas® Liat® FluA/B RSV en condiciones estándar. Los resultados de los valores de umbral de ciclo (CT) medidos para las perlas MC48 para FluA (fig. 7A), para FluB (fig. 7B) y VRS (fig. 7C) en dependencia del punto isoeléctrico se proporcionan en la figura 7. En la figura 8, se ilustra la dependencia de los valores de CT medidos de FluA, FluB, VRS y del control positivo interno (IPC) de las muestras MC47 de sus puntos isoeléctricos.

25 En la tabla 5, se proporciona un resumen de los valores de CT generados usando las perlas recubiertas MC47 y MC48 y su correlación con los valores de punto isoeléctrico.

Tabla 5: valores de CT de FluA, FluB, VRS y del punto isoeléctrico de las perlas MC47 y MC48

Muestra	Punto isoeléctrico	CT de FluA	CT de FluB	CT de VRS
MC47LG1	2,7	31,1	31,7	31,0
MC47LG2	2,6	30,5	30,5	31,2
MC47LG3	2,9	31,0	30,9	31,4
MC47LG6	2,5	30,7	30,8	31,4
MC47LG7	2,4	31,4	32,0	31,0
MC47LG8	2,3	31,0	31,8	31,5
MC47LG12	2,2	31,0	31,5	31,7
MC47LG14	1,5	35,8	39,1	33,1
MC47LG17	2,8	31,8	32,6	31,6
MC47LG19	3,2	31,4	31,9	31,0
MC47LG20	3,5	33,8	34,0	33,5
MC47LG21	3,2	31,4	32,0	31,1
MC47LG22	2,8	31,4	32,2	31,0
MC48LG2	1,5	33,0	33,7	31,8

MC48LG3	1,8	32,0	32,4	31,6
MC48LG5	2,5	31,3	32,2	31,2
MC48LG6	2,4	31,4	31,9	30,9
MC48LG7	1,2	34,3	35,7	33,9
MC48LG9	2,4	31,6	32,2	31,0

5 A partir de estos datos, se puede deducir que el rendimiento de las partículas en el ensayo cobas® Liat® depende del punto isoeléctrico de las partículas. Además, resulta aparente que tanto los valores de punto isoeléctrico demasiado altos como los demasiado bajos dan lugar a un rendimiento deficiente de las partículas. Por tanto, dado que el punto isoeléctrico de las partículas se correlaciona directamente con el espesor del recubrimiento de las partículas, es muy importante controlar el espesor del recubrimiento de las partículas que, de acuerdo con la presente divulgación, se realiza mediante la adición de HCl a la suspensión de partículas/silicato. En la figura 9, se proporciona otra indicación de que los recubrimientos demasiado gruesos dan lugar a rendimientos deficientes de las partículas en los ensayos de PCR, lo que muestra una correlación directa entre el espesor del recubrimiento y el incremento de los valores de CT. La estructura del recubrimiento ventajosa es directamente visible en las micrografías de MEB que se muestran en la figura 10. Al comparar las perlas MC14 sin recubrir (figura 10A), las perlas MC14 recubiertas con el procedimiento de acuerdo con la presente divulgación (figura 10B) y las perlas MC14 recubiertas con el procedimiento de TEOS descrito anteriormente (figura 10C), resulta evidente que el espesor del recubrimiento con vidrio líquido con silicato de sodio es muy delgado, mientras que el recubrimiento con TEOS proporciona un recubrimiento sustancialmente más grueso. En el presente documento, los valores de CT retardados de las perlas recubiertas con TEOS descritas anteriormente también se ajustan a los datos que muestran que un recubrimiento grueso da lugar a un rendimiento deficiente en los ensayos de PCR.

20 En resumen, los datos anteriores muestran claramente que las perlas recubiertas de acuerdo con la presente divulgación presentan propiedades ventajosas en comparación con las perlas magnéticas fabricadas y recubiertas usando procedimientos de la técnica anterior. En el presente documento, las partículas de núcleo magnético se construyen mediante agregados controlados de nanopartículas de magnetita. De esta manera, las partículas muestran una remanencia magnética muy baja en combinación con tamaños de partículas en el intervalo de entre 80 y 500 nm. Los agregados controlados solo se forman mediante la adición de un estabilizador *in situ* a la reacción solvotérmica. Además, el espesor del recubrimiento de vidrio de las partículas se debe controlar específicamente de forma que se eviten recubrimientos demasiado gruesos, así como valores de punto isoeléctrico demasiado altos y demasiado bajos de las partículas recubiertas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de perlas magnéticas que comprende (a) un estabilizador y un núcleo magnético producido en condiciones solvotérmicas, (b) un recubrimiento de vidrio líquido, en la que las perlas magnéticas son superparamagnéticas,
- 10 en la que el recubrimiento de vidrio líquido comprende un silicato y tiene un espesor de 20 nm o menos, **caracterizada porque** el núcleo magnético es un agregado definido de nanopartículas magnéticas, dichas nanopartículas magnéticas tienen un tamaño inferior a 30 nm y el diámetro del núcleo magnético es de entre 100 y 400 nm.
- 15 2. La composición de la reivindicación 1, en la que las perlas magnéticas tienen un tamaño de partícula de entre 200 y 400 nm.
- 20 3. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que las perlas magnéticas tienen una magnetización de saturación de entre 50 y 70 Am²/kg.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que las perlas magnéticas tienen una remanencia magnética inferior a 3 Am²/kg.
- 25 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el silicato se selecciona del grupo que consiste en silicato de sodio, silicato de potasio, silicato de calcio, silicato de litio y silicato de magnesio.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el estabilizador se selecciona del grupo que consiste en citrato, histidina, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC), oleato de sodio y ácido poliacrílico.
- 30 7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el núcleo magnético es Fe₃O₄, α-Fe₂O₃, γ-Fe₂O₃, MnFe_xO_y, CoFe_xO_y, NiFe_xO_y, CuFe_xO_y, ZnFe_xO_y, CdFe_xO_y, BaFe_xO y SrFe_xO, en la que x e y varían dependiendo del procedimiento de síntesis, y en la que x es preferentemente un número entero entre 1 y 3 y en la que y es preferentemente 3 o 4.
- 35 8. Una suspensión de perlas magnéticas que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un líquido, en la que la suspensión se mezcla hasta la homogeneidad.
9. La suspensión de la reivindicación 8 que comprende entre 5 y 200 mg/ml de perlas magnéticas.
- 40 10. La suspensión de una cualquiera de las reivindicaciones 8- 9, en la que el líquido comprende una solución tamponada acuosa.
11. La suspensión de la reivindicación 10 que comprende además un agente caotrópico.
- 45 12. Un dispositivo configurado para realizar un análisis de ácidos nucleicos de una muestra, en el que dicho dispositivo comprende
- (a) un puerto de introducción de muestra adaptado para recibir una parte alícuota de muestra;
- (b) un compartimiento que comprende una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y
- 50 (c) una región de análisis de PCR que comprende uno o más compartimentos adicionales, cada uno configurado para llevar a cabo una o más etapas de dicho análisis de PCR, que comprende la preparación de reactivos, el enriquecimiento en dianas, la eliminación de inhibidores, la extracción de ácidos nucleicos, la amplificación y la detección en tiempo real.
- 55 13. Un kit que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
14. Un procedimiento de fabricación de una composición de perlas magnéticas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende las etapas de
- 60 a. puesta en contacto con un estabilizador y nanopartículas magnéticas que tienen un tamaño inferior a 30 nm de cualquier material seleccionado del grupo que consiste en metales, sales metálicas, carburos metálicos, nitruros metálicos, sulfuros metálicos, fosfuros metálicos, óxidos metálicos o quelatos metálicos que comprenden al menos un metal de transición en condiciones solvotérmicas para formar agregados definidos de tamaño controlado para formar un núcleo magnético que tiene un diámetro de entre 100 y 400 nm que es superparamagnético;
- 65 b. recubrimiento del núcleo magnético formado en la etapa (a) con un vidrio líquido, en el que el recubrimiento

ES 2 960 530 T3

de vidrio líquido comprende un silicato y tiene un espesor de 20 nm o inferior.

Fig. 1A

Reacción solvotérmica:

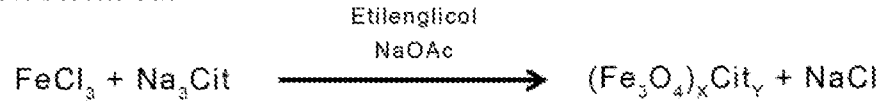


Fig. 1B

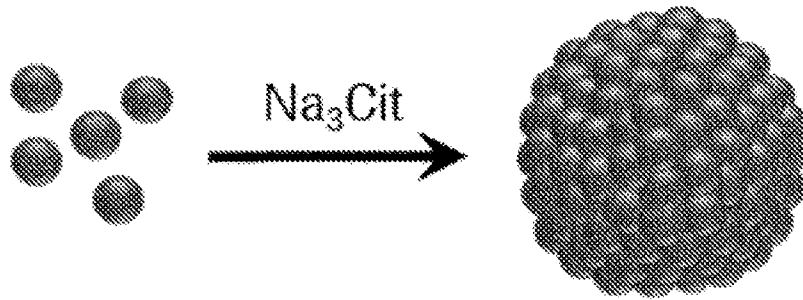


Fig. 2

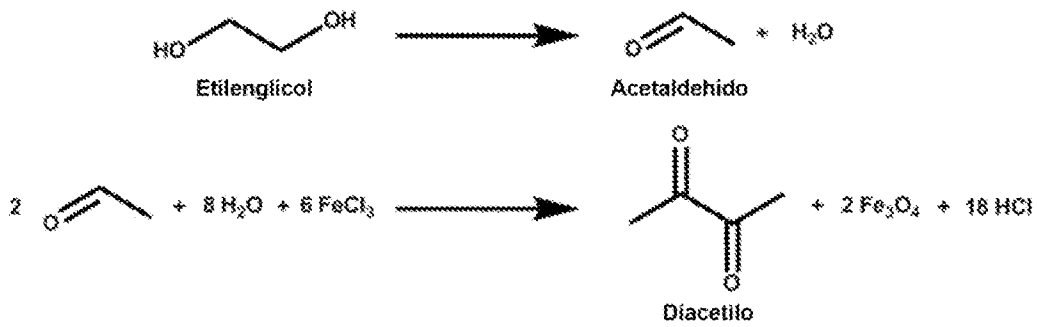


Fig. 3A

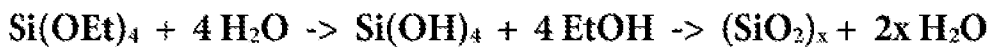


Fig. 3B

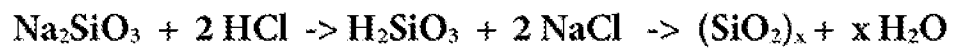


Fig. 4A

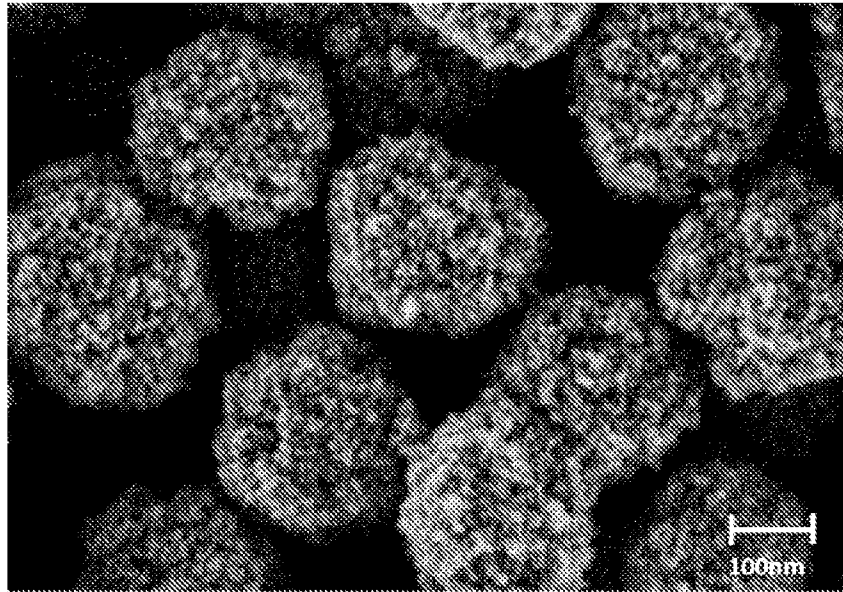


Fig. 4B

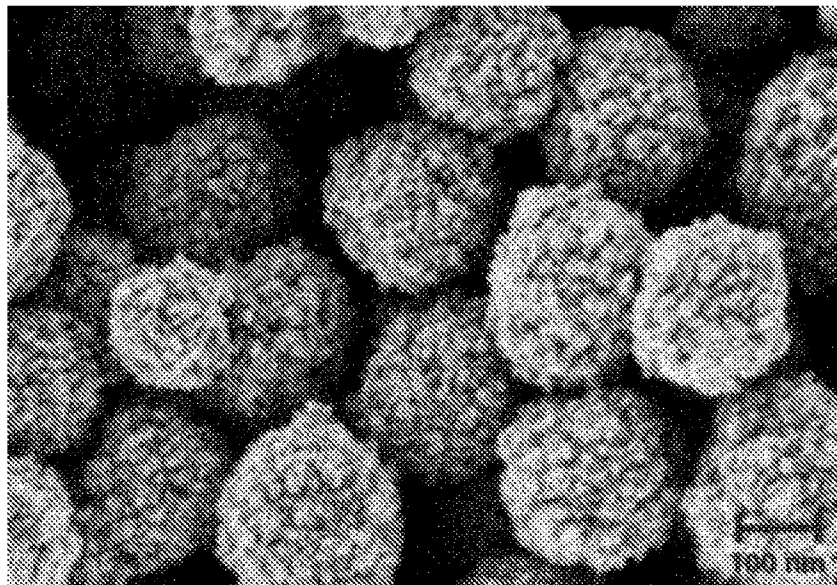


Fig. 4C

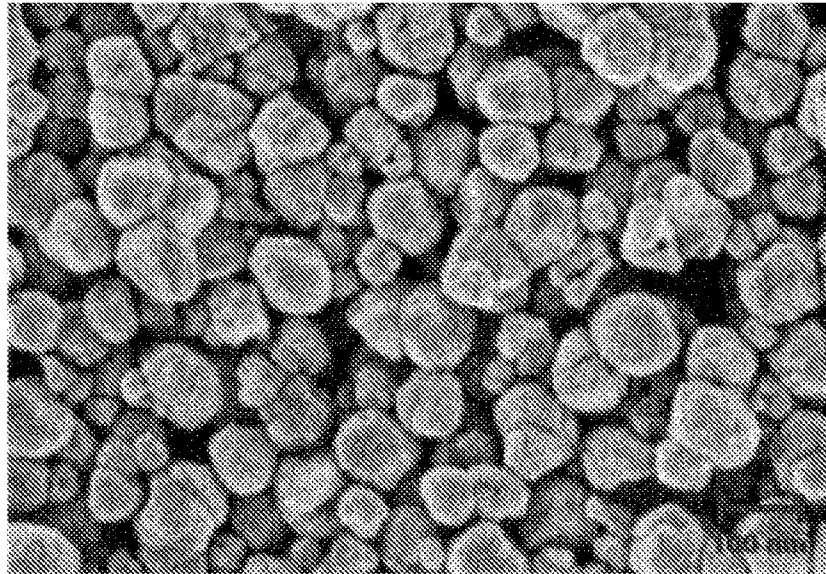


Fig. 5

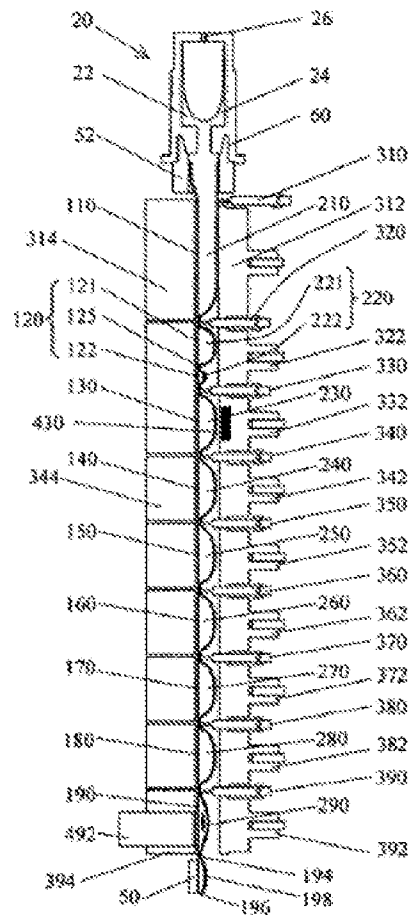


Fig. 6



Fig. 7A

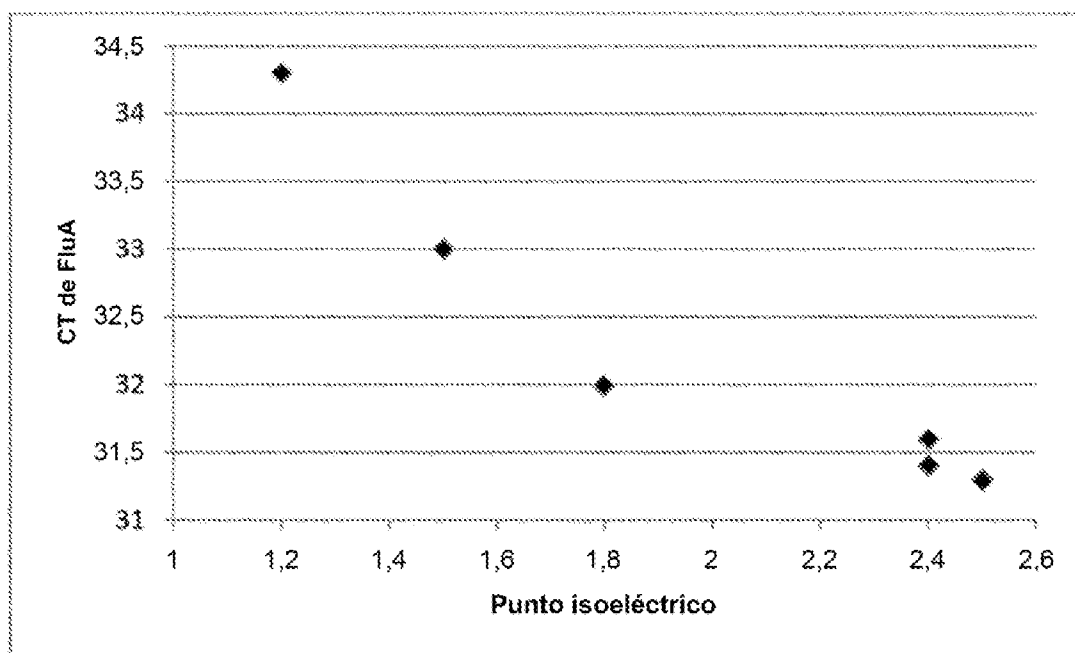


Fig. 7B

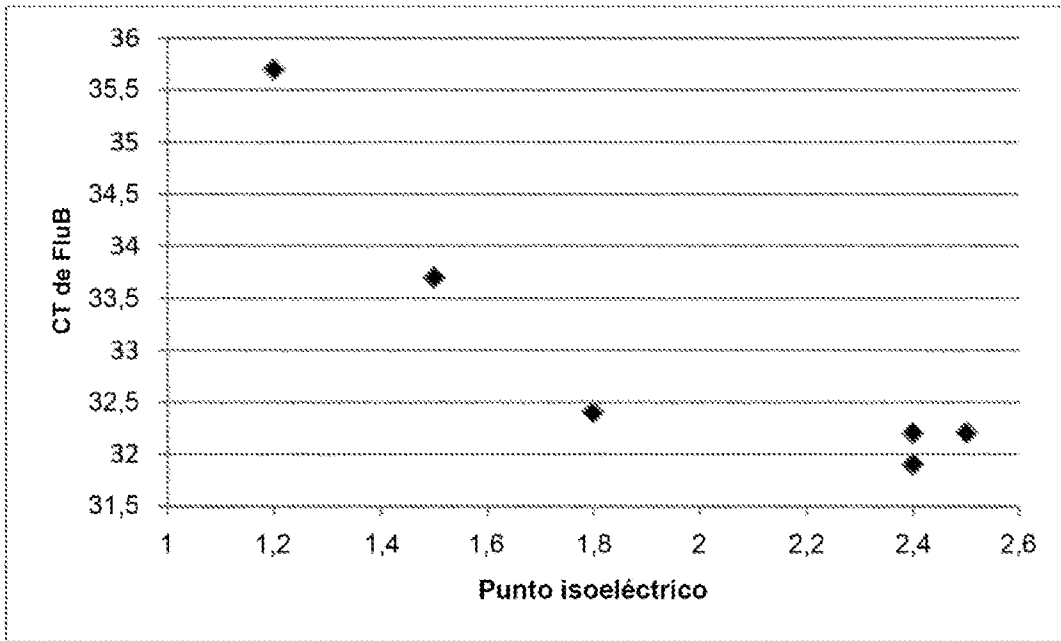


Fig. 7C

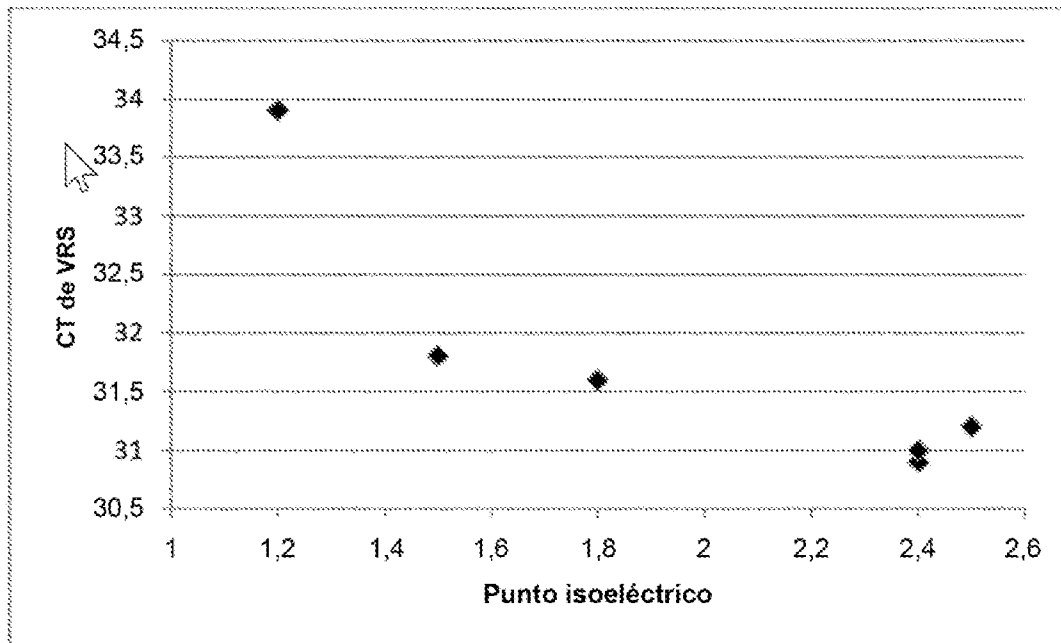


Fig. 8

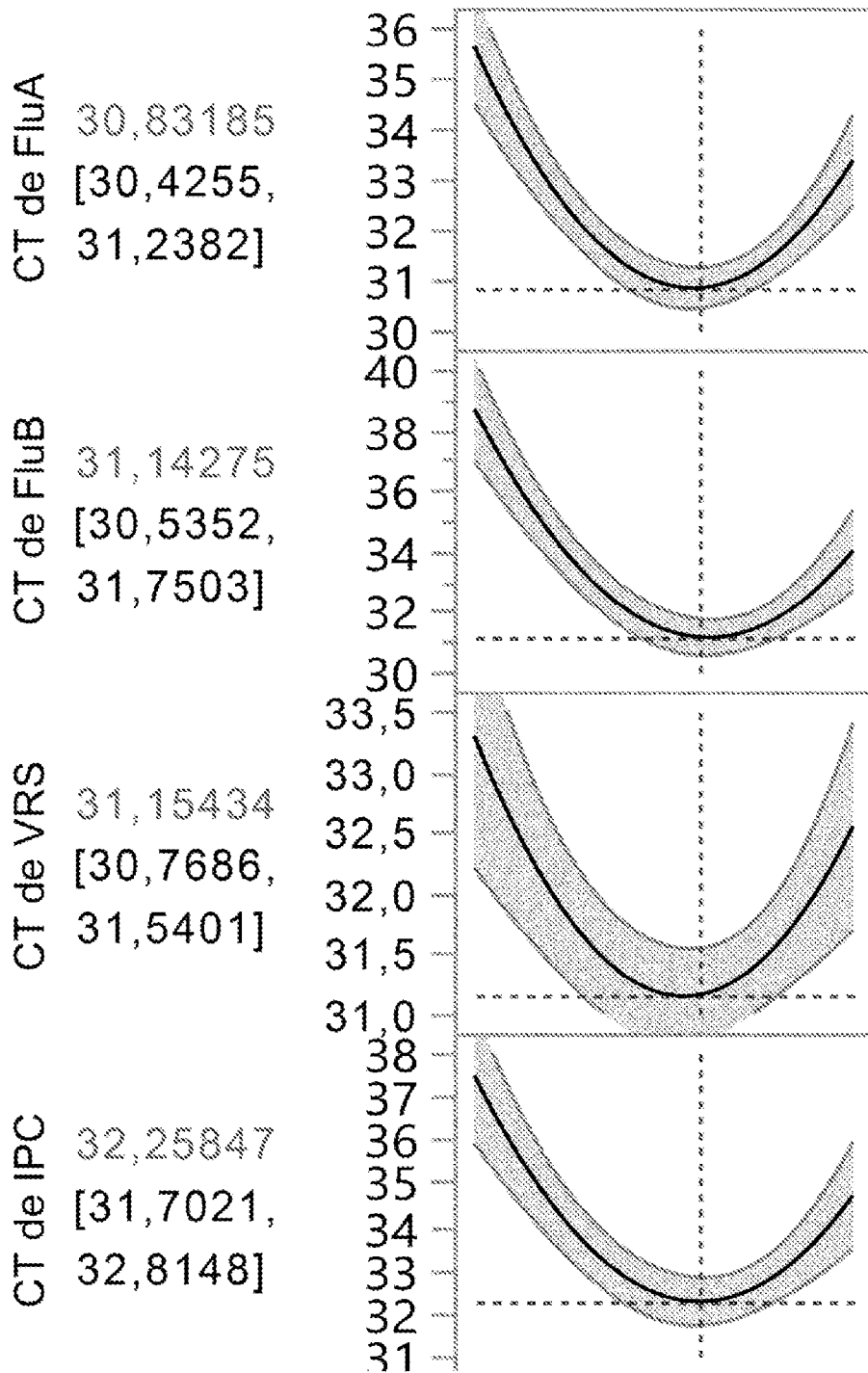


Fig. 9

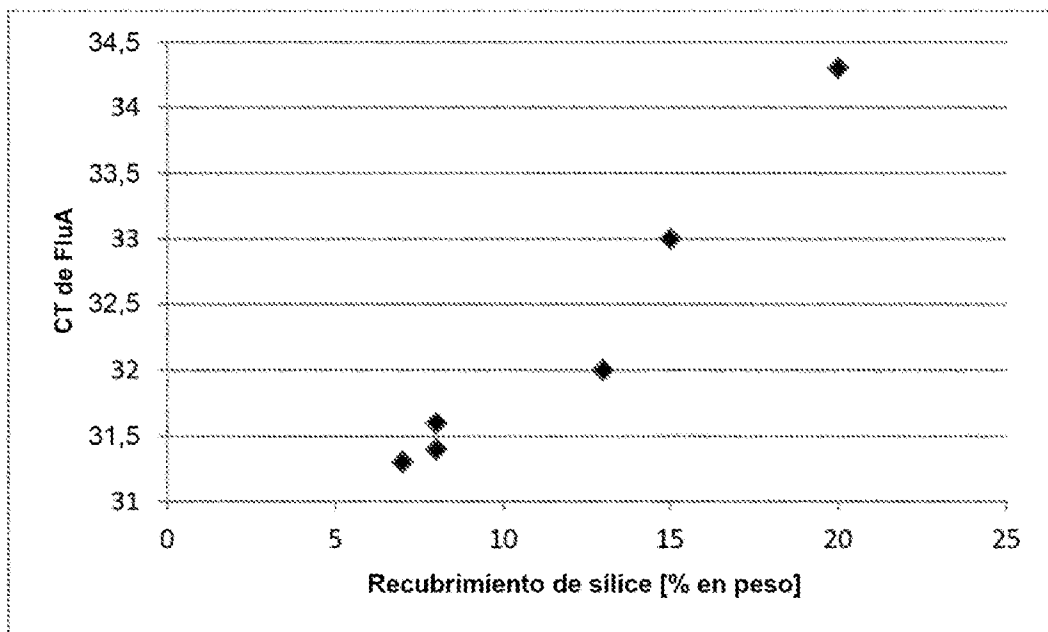


Fig. 10A

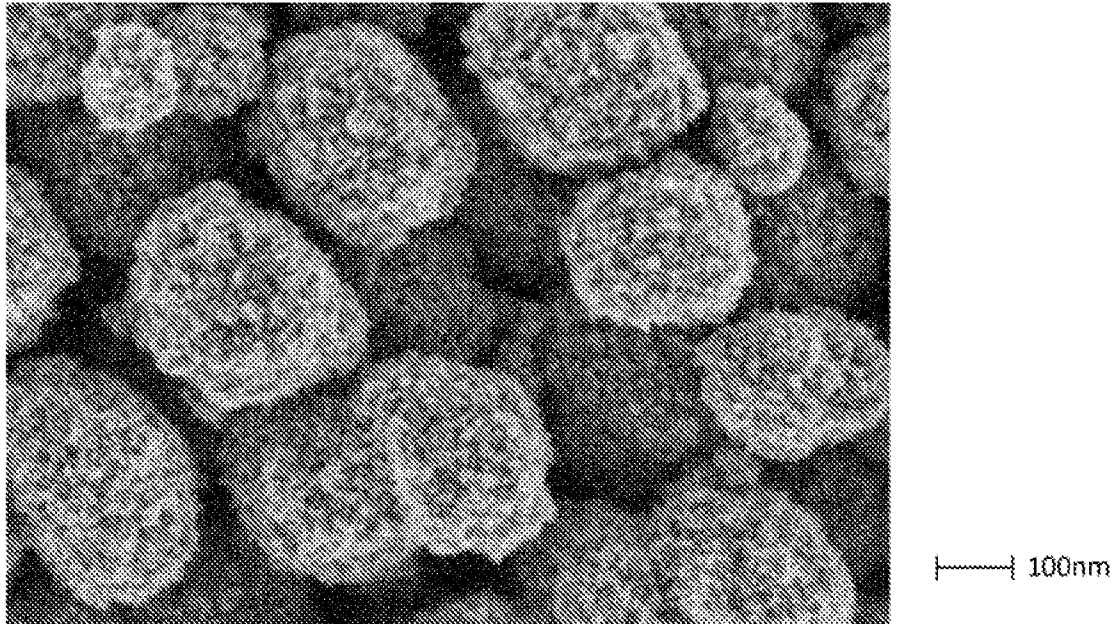
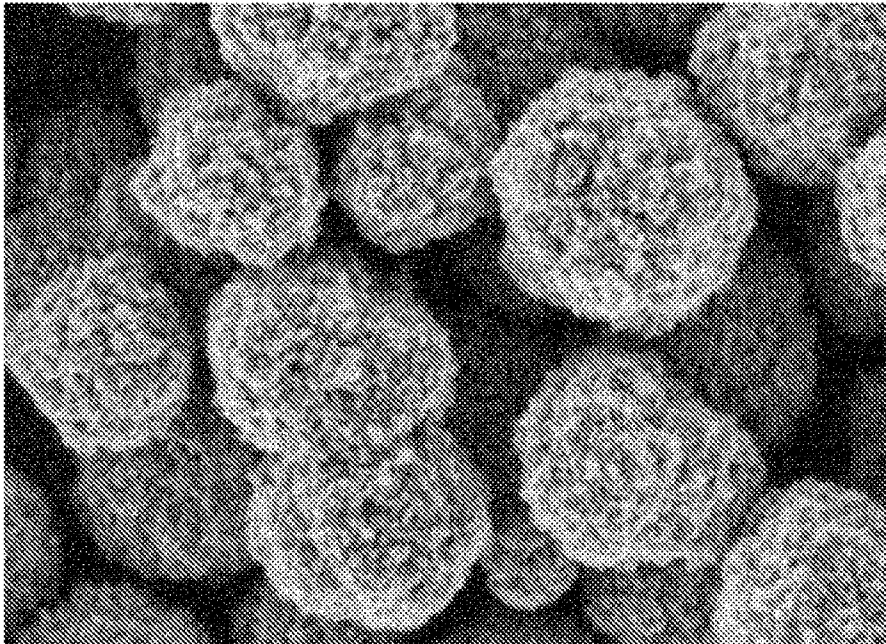
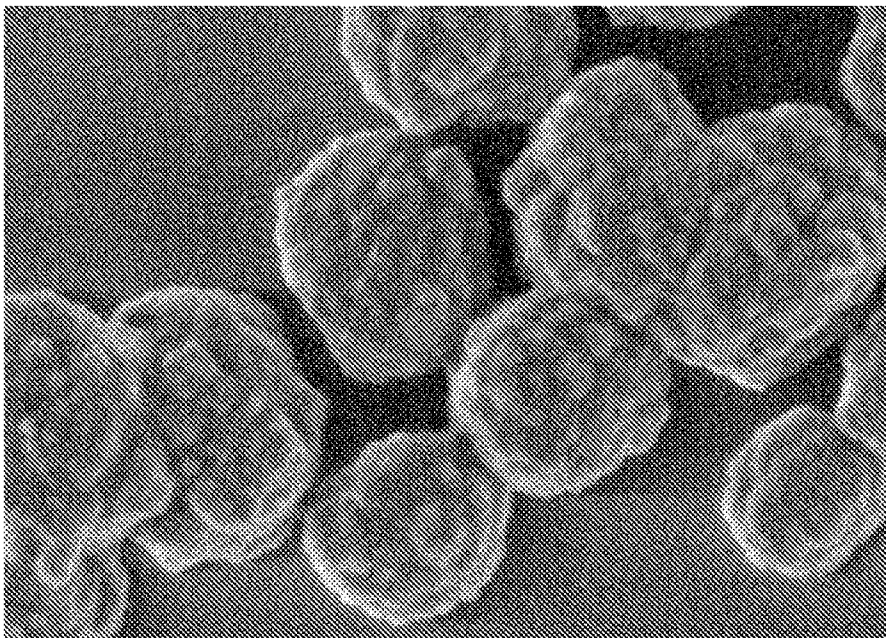


Fig. 10B



100nm

Fig. 10C



100nm