



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 913 199**

⑮ Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)
B32B 5/08 (2006.01)
B32B 9/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2015 PCT/FR2015/053673**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2016 WO16108004**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2015 E 15823699 (2)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2022 EP 3240897**

⑮ Título: **Complejo multicapas, procedimiento de fabricación y uso del complejo**

⑩ Prioridad:

30.12.2014 FR 1463423

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.06.2022

⑮ Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
69280 Marcy-L'Etoile, FR**

⑮ Inventor/es:

**BURR, ARNAUD;
LAAYOUN, ALI;
LAURENT, ALAIN y
VEYRET, RAPHAËL**

⑮ Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 913 199 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

Complejo multicapas, procedimiento de fabricación y uso del complejo

- 5 La presente descripción se refiere al campo del diagnóstico molecular. Más precisamente, se refiere a complejos magnéticos sólidos que permiten la extracción y/o la purificación de ácidos nucleicos (ADN y/o ARN) a partir de muestras biológicas o de extracciones medioambientales, estando provistos estos complejos de al menos tres capas distintas.
- 10 El desarrollo de la biología molecular ha permitido llevar a cabo inmensos progresos en el diagnóstico. Así, a partir de una muestra a ensayar, es posible extraer y detectar ácidos nucleicos que pertenecen al hospedante o a los microorganismos infecciosos contenidos en la muestra. La detección, o incluso la cuantificación, de este material genético permite establecer un diagnóstico con respecto a una infección microbiana o a la presencia de oncogenes. Esto se lleva a cabo generalmente en tres etapas que se describen a continuación:
- 15 1) La extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas complejas (sangre, tumor, alimentos, etc.) que consiste en una lisis química o mecánica de las células a fin de liberar su contenido, y en particular los ácidos nucleicos. Estos últimos se purificarán de manera selectiva para después ser amplificados si su cantidad no es suficiente para una detección directa.
- 20 2) La amplificación de ácidos nucleicos purificados por técnicas de amplificación de material genético: NASBA, RT PCR, PCR, etc. Esta etapa es necesaria cuando la cantidad de ácidos nucleicos recogida a partir de una muestra biológica es muy baja, o cuando el ensayo no es lo suficientemente sensible para una detección directa.
- 25 3) La detección de ácidos nucleicos amplificados mediante técnicas denominadas de punto final, en tiempo real, por secuenciación, etc. Según la técnica de detección utilizada, esta etapa puede permitir la cuantificación selectiva de los ácidos nucleicos diana buscados.
- 30 Para una detección sensible y específica de los ácidos nucleicos, y por lo tanto para llevar a cabo un diagnóstico lo más preciso posible, parece esencial extraer y/o aislar de manera eficaz los ácidos nucleicos (ADN y ARN) de las células. Esta etapa de extracción y/o de purificación, también denominada "Sample Prep" (por sample preparation: preparación de la muestra) es generalmente crítica debido a que de esta primera etapa resultará toda la calidad de una serie de eventos que llevarán al resultado final del ensayo de diagnóstico. En efecto, es necesario tener una extracción de ácidos nucleicos tan específica y eficaz como sea posible (en cantidad, pureza y tiempo) para no perder la información, lo que puede conducir a un diagnóstico erróneo y ser fatal para un paciente.
- 35 Se han desarrollado muchas técnicas para intentar extraer los ácidos nucleicos a partir de diferentes muestras biológicas. Los métodos más antiguos llevan a cabo una multitud de etapas que consisten generalmente en enriquecer las células que contienen los ácidos nucleicos, lisis estas células, separar y eliminar las proteínas, las membranas y otros constituyentes celulares, purificar los ácidos nucleicos restantes por precipitación en disolventes orgánicos. Estas técnicas son costosas, necesitan mucho tiempo y son frecuentemente imposibles de automatizar. Por lo tanto, ya no son adaptadas para las prácticas actuales en las que la automatización es necesaria debido a que permite obtener resultados lo más rápido posible y evita problemas de contaminación y errores humanos, particularmente en casos de sepsis "infección de la sangre" en la que el diagnóstico vital de un paciente está comprometido. Las técnicas más recientes de extracción de ácidos nucleicos utilizan fases sólidas en las que las células se lisan en condiciones de reacciones específicas, y los ácidos nucleicos liberados se unen a la fase sólida. Es bien conocido en el estado de la técnica que las técnicas actuales de extracción de ácidos nucleicos utilizan muy a menudo fases sólidas que son partículas recubiertas de sílice. En efecto, la sílice tiene la propiedad de adsorber, de manera reversible, los ácidos nucleicos bajo ciertas condiciones de concentración de sales y de pH, lo que la convierte en un material muy adaptado para este uso. Estas técnicas se describen claramente en "Rapid and simple method for purification of nucleic acids.", Boom, Journal of Clinical Microbiology, 1990 p495 y en la patente US 5 234 809 del mismo autor.
- 40 También es conocido el uso de partículas magnéticas recubiertas de sílice. La parte magnética de las partículas sirve lo más frecuentemente para facilitar y automatizar las etapas de captura, lavado y elución de los ácidos nucleicos, ya que un simple imán permite el desplazamiento de las partículas en el tubo y la recogida de sobrenadantes para las etapas de lavado. Los rendimientos de extracción de ácidos nucleicos están notablemente mejorados. Estas técnicas están bien descritas en "Magnetic particles for the separation and purification of Nucleic acids", S. Berensmeier, Applied Microbial Biotechnology 2006 73 495-504; "The use of magnetic nanoparticles in the development of new molecular detection Systems", I. J. Bruce, Journal of Nanosciences and nanotechnology, y en "Optimization of influencing factors of nucleic acid adsorption onto silica-coated magnetic particles: Application to viral nucleic acid extraction from serum", Ning Sun et al., Journal of Chromatography A, 2014, 1325, 31-39.
- 45 50 55 60 65 A pesar de que estas partículas magnéticas de sílice pueden tener una gran eficacia en la extracción de ácidos nucleicos, su protocolo de fabricación es largo, delicado y costoso. En efecto, las partículas magnéticas recubiertas de sílice utilizadas para la extracción de ácidos nucleicos pueden ser, a veces, muy complejas de fabricar, en particular a nivel de la capa de sílice que necesita ser perfectamente estable y controlada en grosor y homogeneidad. La calidad

y naturaleza de esta capa de sílice tiene una importancia fundamental para la calidad de los ácidos nucleicos extraídos, así como para la reproducibilidad de los resultados de una extracción de ácidos nucleicos a otra.

- 5 De este modo, el documento US 2010/0009375 A1 describe la fabricación de partículas magnéticas recubiertas de una capa continua y ultrafina de sílice de menos de 1 nm para la extracción de ácidos nucleicos. Sin embargo, esta capa es muy difícil de medir y sigue siendo difícil de controlar a nivel del procedimiento. Esto hace que el control de la calidad de estas partículas sea muy complejo. Si la capa de sílice es demasiado fina, los ácidos nucleicos pueden adsorberse en la magnetita que compone el núcleo magnético sin poder ser desorvidos durante la etapa de elución.
- 10 Los documentos US 2005/0287583 A1 y US 6924033 B2 describen también la fabricación de partículas magnéticas recubiertas de una capa muy gruesa de sílice (relación óxido de silicio/óxido de hierro ($\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$) = 40/60) lo que conduce a agregados cuya calidad y reproducibilidad de un lote a otro puede impactar seriamente la calidad de la extracción. Aquí también el procedimiento de fabricación es muy complejo e implica un estricto control de las relaciones de los reactivos de SiO_2 /magnetita/ Na_2O .
- 15 15 Por otro lado, el documento US 2011/0186524 A1 describe la fabricación de partículas de sílice magnéticas para la extracción de ácidos nucleicos, que implica una etapa de calentamiento a 200°C durante 7 h, y el uso de disolventes orgánicos, tanto inconvenientes en términos de tiempo de preparación, coste y uso ulterior (amplificación, detección) de los ácidos nucleicos extraídos ya que, en función de los tratamientos recibidos durante la extracción, los rendimientos de amplificación y de detección pueden verse afectados. Además, el documento US2009/182120 describe un complejo multicapas constituido por partículas magnéticas y nanopartículas de sílice para la extracción de ácidos nucleicos.
- 20 25 Para hacer frente a esta complejidad de fabricación y evitar procedimientos complejos para controlar el grosor de la capa de recubrimiento de magnetita, algunos inventores han propuesto utilizar solo magnetita para llevar a cabo la extracción de ácidos nucleicos a partir de medios complejos. Así, los documentos EP 1674571, US 6936414 y US 2007/0148651 describen la extracción de ácidos nucleicos por partículas constituidas únicamente en magnetita en un medio ácido para favorecer la interacción entre el óxido metálico y los ácidos nucleicos. Sin embargo, la desorción de los ácidos nucleicos es muy difícil y necesita un calentamiento de las partículas en un amortiguador de fosfato para favorecer la competición con los ácidos nucleicos adsorbidos, y eluir los ácidos nucleicos adsorbidos, lo que afecta negativamente al rendimiento de extracción. Además, el uso de agentes en el amortiguador de elución que favorece la desorción, tal como el fosfato, puede conllevar una inhibición ulterior de la PCR u otras técnicas de amplificación del material genético extraído. Por lo tanto, la extracción de los ácidos nucleicos con partículas de óxido metálico "desnudas" no es satisfactoria.
- 30 35 Por otro lado, algunos inventores han modificado las propiedades de las partículas de óxidos metálicos injertándoles diversos compuestos orgánicos o inorgánicos. Generalmente, dichas partículas se estabilizan por complejación con derivados de fosfatos, fosfonatos, carboxilatos u otros compuestos orgánicos. Esto se describe en el libro "Stability constants of metal-ioncomplexes" de Lars Gunnar Sillén y Arthur Earl Martell editado en 1971 por la Chemical Society, en el documento US 5160725, por G. Pourroy en Chem. Comm. 2010 46 985-987 o en Chem. Mater., 2008, 20 (18), pp 5869-5875. Estos complejos se pueden utilizar como agentes de contraste en tratamiento de imágenes médicas, como sonda para detectar una hebra de ADN complementaria *in vivo*, o como ferrofluidos biocompatibles.
- 40 45 Sólo las obras de Rittich Bohuslav en "Isolation of genomic DNA using magnetic cobalt ferrite and silica particles", B. Rittich, J. of Chromatography A, 2004, 43-48, y de David Horack en "Ferrite supports for the isolation of DNA from complex samples and polymerase chain reaction amplification", D. Horak, J. of Chromatography A, 2005, 93-98 tratan de partículas magnéticas recubiertas de ligandos para la extracción de ácidos nucleicos. No obstante, las condiciones de uso no son adaptadas para la lisis celular y la desnaturización de nucleasas ya que no usan sales caotrópicas para la extracción. Por lo tanto, los rendimientos de extracción y/o de amplificación, y después de detección de los ácidos nucleicos no son óptimos. Además, se observan problemas de elución de los ácidos nucleicos.
- 50 A la vista del estado de la técnica anterior, parece claro que era necesario desarrollar soportes sólidos magnéticos innovadores que permiten la extracción y la purificación de ácidos nucleicos, y que:
- 55 - sean fáciles de sintetizar y económicos, particularmente a nivel de la capa que recubre el compuesto magnético,
- sean muy eficaces en términos de rendimiento de captura y elución, de extracción de los ácidos nucleicos contenidos en medios biológicos complejos, en particular la sangre,
- 60 - permitan obtener rápidamente ácidos nucleicos de gran pureza sin coelución de inhibidores, y que a su vez sean amplificables con eficacia,
- sean eficaces para poder capturar cantidades muy pequeñas de ácidos nucleicos o de biomoléculas,
- 65 - permitan ajustar la selectividad de captura de los ácidos nucleicos bicatenarios frente a los monocatenarios,

- no necesiten el uso de amortiguador de elución que puede inhibir posteriormente las reacciones de amplificación o de análisis aguas abajo de la extracción.

5 Así, el objeto de esta descripción se refiere al desarrollo y a la realización de nuevos complejos sólidos que permiten la extracción y la purificación de ácidos nucleicos de manera eficaz, y esto a partir de muestras, preferentemente de muestras biológicas complejas.

En primer lugar, la presente descripción se refiere a un complejo de tres capas que comprende:

- 10 - una primera capa que comprende al menos un compuesto magnético,
- una segunda capa que recubre, al menos parcialmente, la primera capa y que comprende al menos un compuesto inorgánico de silicato,
- 15 - una tercera capa que recubre, al menos parcialmente, la segunda capa y que comprende al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato, así como al procedimiento de fabricación de tal compuesto de tres capas.

20 En segundo lugar, la presente invención también se refiere al uso de este complejo de tres capas en la purificación de microorganismos y/o biomoléculas o en la extracción de biomoléculas, preferentemente de los ácidos nucleicos a partir de una muestra.

25 En tercer lugar, la presente invención se refiere al uso de este complejo de tres capas en la detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos diana, a partir de una muestra susceptible de contener dichos ácidos nucleicos diana, que comprende las siguientes etapas:

1. la extracción de ácidos nucleicos de una muestra con la ayuda de este complejo de tres capas,
2. la detección y/o la cuantificación de los ácidos nucleicos diana mediante técnicas convencionales de detección y/o de cuantificación.

30 En cuarto lugar, la presente invención se refiere al uso de este complejo de tres capas en un método de lisis de microorganismos y/o de células, a partir de una muestra, caracterizado por que consiste en poner en contacto al menos una muestra con al menos un complejo según la invención, y en el que dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato y/o dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato comprende al menos un agente de la familia de los detergentes que permite la lisis.

40 En quinto lugar, la presente invención se refiere a kits de diagnóstico molecular que comprenden al menos el complejo de tres capas según la invención.

La presente descripción propone por lo tanto proporcionar complejos de tres capas particularmente útiles en el campo del diagnóstico molecular. Los complejos según la descripción comprenden o consisten en:

- 45 - una primera capa que comprende al menos un compuesto magnético,
- una segunda capa que recubre, al menos parcialmente, la primera capa y que comprende al menos un compuesto inorgánico de silicato,
- 50 - una tercera capa que recubre, al menos parcialmente, la segunda capa y que comprende al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato.

55 Por capa, se entiende un grosor de material o de una sustancia extendida de manera a formar una película de grosor variable. La capa puede ser continua o discontinua. La capa también puede denominarse recubrimiento.

60 Por complejo de tres capas se entiende un conjunto sólido y compacto constituido de al menos tres capas distintas, física y químicamente. En el marco de un complejo multicapas, las capas se superponen, la primera capa está recubierta por la segunda que se moldea a la forma de la primera capa, y la segunda capa está recubierta ella misma por la tercera, y así sucesivamente. La sucesión de las tres capas se lleva a cabo en un orden preciso para guardar las propiedades del complejo. Cuando la segunda capa es discontinua, la tercera capa se superpone y está en contacto directo con la segunda capa y la primera capa. No obstante, la primera capa no puede recubrir la segunda o la tercera capa, al igual que la segunda capa no puede recubrir la tercera capa.

Compuesto Magnético

Por compuesto magnético se entiende un compuesto susceptible de reaccionar a un campo magnético mediante una reacción de orientación y/o desplazamiento dependiente de la fuerza y orientación de dicho campo magnético. Esta fuerza tiene lugar a través del campo magnético y se produce por cargas en movimiento o imanes. Los compuestos magnéticos comprendidos en el complejo de tres capas según la invención se escogen de los metales y/o de los óxidos metálicos.

5 El o los metales dotados de capacidades magnéticas que se pueden usar en el complejo de tres capas de la presente invención son hierro, cobalto, níquel, aceros, hierro fundido, así como metales que reaccionan más débilmente al magnetismo tal como manganeso, cromo, platino y aluminio.

10 El o los óxidos metálicos que se pueden usar en la presente invención se escogen de magnetita, maghemita y ferritas de fórmula MFe_2O_4 con $M = Mn, Ni, Co, Zn$, etc. o cualquier otro metal convencionalmente utilizado en las ferritas que 15 pueda ser dopado con átomos metálicos distintos al hierro.

15 Preferiblemente, el compuesto magnético del complejo de la invención es la magnetita o la maghemita, de manera aún más preferiblemente la magnetita.

20 Dicho al menos un compuesto magnético del complejo de la invención puede estar en forma plana y formar una membrana, una placa. También puede estar en forma variable, por ejemplo en forma cúbica, en forma de cristal, de aguja, de cono, de esfera, en forma de partícula que puede ser a su vez esférica, multiédrica, por ejemplo tetraédrica, octaédrica, etc. La forma preferida del compuesto magnético del complejo de tres capas de la invención es la partícula de dimensión comprendida entre 1 y 500 nm, preferiblemente entre 2 y 400 nm, más preferiblemente entre 10 y 300 25 nm, más preferiblemente aún entre 50 y 150 nm.

30 Por partícula se entiende una estructura física identificable, distinta, aislada y no soluble en un medio acuoso o en una mezcla de disolventes orgánicos y acuosos, o en un disolvente orgánico, y cuyo tamaño puede ser micrométrico o nanométrico. Preferiblemente, la partícula es nanométrica y entre 1 y 400 nm.

35 Cuando dicho al menos un compuesto magnético del complejo de tres capas está en forma de partícula, entonces todo el complejo de tres capas tiene la forma de una partícula debido a que la capa de compuesto inorgánico de silicato que recubre dicho al menos un compuesto magnético se moldea a la forma de este último, y sucede lo mismo para la tercera capa con respecto a la segunda capa. En el caso del complejo en forma de partícula, se puede decir que dicho al menos un compuesto magnético forma el núcleo de dicha partícula ya que se sitúa en el centro de la misma.

40 Sin embargo, dado que las capas pueden recubrirse solo parcialmente, la forma final del complejo de tres capas no es necesariamente idéntica a la forma inicial de dicho al menos un compuesto magnético. Así, con un compuesto magnético en forma de partícula, es posible obtener un complejo de tres capas en una forma final aleatoria. En una variante preferida de la invención, el complejo de tres capas tiene forma de mora, constituyendo el compuesto magnético el núcleo sólido y formando la segunda capa una capa discontinua formada por nanoesferas satélites alrededor del núcleo.

45 La capa de compuesto magnético tiene un grosor micrométrico o nanométrico.

Compuesto inorgánico de silicato

50 Por compuesto inorgánico de silicato se entiende cualquier compuesto que comprende sílice y que es de naturaleza inorgánica. El o los compuestos inorgánicos de silicato utilizables en el complejo de tres capas según la invención son silicatos, silicatos de magnesio, de sodio, de potasio, de litio o de calcio, talco, aluminosilicatos, caolín, bentonita, nanopartículas de sílice, preferentemente nanopartículas de sílice cuyo tamaño está comprendido entre 0,1 y 20 nm, preferentemente entre 1 y 20 nm, nanopartículas de sílice mesoporosas, nanopartículas magnéticas recubiertas de sílice, así como las nanopartículas citadas anteriormente, cuya sílice está modificada químicamente con grupos orgánicos o inorgánicos.

55 Los grupos orgánicos o inorgánicos que pueden modificar la sílice son compuestos que tienen grupos carbonados dotados de funciones aminas, carboxílico, tiol, alcohol, ácido fosfónico o sulfónico, fosfonatos y/o fosfatos, compuestos de la familia de los detergentes tales como las saponinas, homopolímeros o copolímeros, polímeros de anhídrido maleico, N-vinilpirrolidona, polietilenos, propileno y metilviniléteres (AMVE) injertados con anhídrido maleico, N-vinilpirrolidona (NVP)/N-acriloxisuccinimida (NAS), polisacáridos, látex aminados.

60 En una variante de realización preferida del complejo de tres capas según la invención, el compuesto inorgánico de silicato es bentonita o nanopartículas de sílice cuyo tamaño está comprendido entre 0,1 y 20 nm, más preferentemente aún entre 1 y 20 nm. Estos compuestos dan los mejores resultados en términos de extracción de ácidos nucleicos. En una realización del complejo de tres capas según la invención, el compuesto inorgánico de silicato está constituido por nanopartículas de sílice, cuya sílice está modificada por enlace con saponinas.

Estos compuestos dan buenos resultados en términos de lisis celular que permitirán, en combinación con los complejos de tres capas preferidos para la extracción de ácidos nucleicos, un diagnóstico molecular eficaz y preciso.

- 5 La unión entre la primera capa del complejo de la invención que comprende al menos un compuesto magnético y la segunda capa que comprende al menos un compuesto inorgánico de silicato se lleva a cabo mediante enlaces electrostáticos o covalentes, dando lugar a una estructura tridimensional.
- 10 En una realización particularmente ventajosa del complejo de tres capas según la invención, dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato se encuentra en forma de partícula, tal como un grano, una lámina, una aguja, una fibra, una nanopartícula, etc. o en forma insoluble en un disolvente acuoso, una mezcla de disolvente acuoso-disolvente orgánico o un disolvente orgánico.
- 15 Por ejemplo, la sílice se puede encontrar en forma de grano o de partícula, la bentonita se encuentra generalmente en forma de lámina.
- 20 Las partículas o formas que no son solubles en un disolvente acuoso o una mezcla de disolvente acuoso-disolvente orgánico, o un disolvente orgánico del compuesto inorgánico de silicato tienen generalmente un tamaño nanométrico para permitir una buena adhesión del al menos un compuesto inorgánico de silicato a la capa de al menos un compuesto magnético. Preferentemente, el tamaño de estas partículas o formas insolubles está comprendido entre 0,1 y 20 nm, preferentemente entre 1 y 20 nm, más preferentemente entre 2 y 10 nm, aún más preferentemente entre 6 y 8 nm.
- 25 La forma de partículas preferida del compuesto inorgánico de silicato es la forma de nanopartículas. Así, la primera capa del complejo de tres capas está recubierta, al menos parcialmente, con una segunda capa constituida de nanopartículas de sílice, preferentemente de 0,1 a 20 nm, más preferentemente entre 1 y 20 nm, más preferentemente aún entre 2 y 10 nm, y aún más preferiblemente entre 6 y 8 nm. En una realización preferida de la invención, se usan como compuesto inorgánico de silicato las nanopartículas de sílice comercializadas por la compañía Sigma-Aldrich, denominadas Ludox®, en particular, se preferirán las nanopartículas de Ludox®SM 7nm.
- 30 Por forma no soluble en un disolvente acuoso o mezcla de disolvente acuoso-disolvente orgánico, o en un disolvente orgánico, se entiende una estructura que no se disuelve o se disuelve sólo parcialmente en estos disolventes, sea cual sea la temperatura del medio. También se puede decir forma insoluble o parcialmente insoluble. Así, incluso en condiciones acuosas, esta forma permanece bien materializada, en forma de suspensión, estructurada e identificable.
- 35 Se puede observar bajo un microscopio electrónico. La Figura 3 ilustra partículas de magnetita (compuesto magnético) recubiertas de nanopartículas de sílice Ludox SM de 7 nm (compuesto inorgánico de silicato), recubiertas ellas mismas de pirofosfato (compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato). Esta figura ejemplifica así el complejo de la invención con el compuesto inorgánico de silicato en forma insoluble en un disolvente acuoso, en una mezcla disolvente acuoso-disolvente orgánico o en un disolvente orgánico.
- 40 La capa de compuesto inorgánico de silicato tiene un grosor nanométrico.
- 45 Compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato
- 50 Por compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato, se entiende un compuesto capaz de unirse al compuesto magnético o capaz de unirse al compuesto inorgánico de silicato, sea cual sea sus formas respectivas. Más precisamente, son moléculas que tienen afinidad por los óxidos metálicos tal como se describe en "Stability constants of metal-ion complexes" de Lars Gunnar Sillén y Arthur Earl Martell editado en 1971 por la Chemical Society. Pueden ser de naturaleza orgánica o inorgánica. A título de ejemplo y de manera no exhaustiva, se puede citar el ácido cítrico y sus sales, los iones fosfatos, pirofosfatos, trifosfatos, polifosfatos, fosfonatos y los ácidos fosfónicos, los fosfonatos o ácidos fosfónicos acoplados a moléculas orgánicas, los compuestos de la familia de los ácidos fosfóricos, sulfonatos, los compuestos de la familia de los detergentes y/o los compuestos de la familia de los ácidos carboxílicos.
- 55 Las moléculas orgánicas acopladas a los fosfonatos o ácidos fosfónicos pueden ser, por ejemplo, ribosas, desoxirribosas, aminoácidos, péptidos, etc. Entre los compuestos de la familia de los detergentes se pueden citar saponinas, Tweens, Tritón, etc.
- 60 Se puede considerar un complejo de tres capas según la invención cuya tercera capa está constituida por una combinación de compuestos que tienen afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato mencionado anteriormente, por ejemplo, iones fosfato, pirofosfato o trifosfato en combinación con una saponina. Estas moléculas ofrecen entonces varias propiedades complementarias. Pueden entonces lisar al mismo tiempo las células humanas de la muestra a ensayar y capturar/purificar ácidos nucleicos o biomoléculas de estas células humanas.

- 5 Se puede considerar utilizar diferentes funcionalizaciones de la segunda y/o tercera capa del complejo de la invención para llevar a cabo una lisis selectiva de células humanas y una captura selectiva de bacterias, incluso un enriquecimiento de microorganismos diana y/o ácidos nucleicos diana o biomoléculas diana. Cuando la primera capa
- 10 es magnetita o maghemita, dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato es un compuesto que tiene afinidad por el hierro. En las variantes de realización preferidas del complejo de tres capas según la invención, dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato consiste en monofosfatos, pirofosfatos, trifosfatos, ácido cítrico o sus sales y/u saponina.
- 15 10 La unión entre la segunda capa del complejo de la invención que comprende al menos un compuesto inorgánico de silicato y la tercera capa que comprende al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato se lleva a cabo mediante enlaces electrostáticos o covalentes, o de coordinación, dando lugar a una estructura tridimensional.
- 20 15 En la realización en la que la segunda capa del complejo según la invención está constituida de partículas o nanopartículas, preferentemente nanopartículas de sílice, se pueden producir intersticios entre dichas partículas o nanopartículas, y la tercera capa que comprende al menos un compuesto que tiene afinidad por al menos un compuesto magnético se adhiere más fácilmente y mejor a la primera capa debido a que ciertos átomos metálicos y/u de óxidos metálicos de la primera capa están disponibles y son más accesibles para formar una reacción o efectuar un enlace.
- 25 20 La capa de compuesto que tiene afinidad por al menos un compuesto magnético y/o el al menos un compuesto inorgánico de silicato tiene un grosor nanométrico o menor.
- 30 25 En una realización particular, el complejo de tres capas según la invención y tal como se ha definido anteriormente comprende además un soporte sólido bajo toda o parte de la primera capa constituida por el al menos un compuesto magnético.
- 35 30 Por soporte sólido se entiende cualquier soporte capaz de soportar la capa de al menos un material magnético. Puede tratarse de al menos un soporte plano, un soporte hueco, una oblea, una aguja, una membrana, una placa, una lámina, un cono, un tubo, una bola, una partícula, etc. El soporte es preferentemente una bola o una partícula.
- 40 35 La unión del soporte con la primera capa de al menos un compuesto magnético se lleva a cabo mediante enlaces electrostáticos, mediante enlaces covalentes o mediante cualquier otro medio físico o químico. Por ejemplo, es posible utilizar un adhesivo para fijar dicho al menos un compuesto magnético al soporte o una sustancia intermedia capaz de mantener la unión entre el soporte sólido y el compuesto magnético, como, por ejemplo, una proteína, un polímero, un polímero hidrófilo o hidrofóbico, una polidopamina, etc. En una realización particular, el complejo de tres capas tal como se ha definido anteriormente, con o sin soporte, está en forma de partícula, y dicha tercera capa que comprende al menos un compuesto magnético que tiene una afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato se sitúa fuera de la partícula. En cierto modo, el núcleo de la partícula está constituida:
- 45 40 1) por el soporte, que a su vez está recubierto por el complejo de tres capas con la primera capa en contacto con el soporte, la segunda capa en contacto con la primera capa y la tercera capa en contacto con la segunda capa o la primera capa, cuando la segunda capa es discontinua, y constituye la película exterior de la partícula final, o
- 50 45 2) por dicho al menos un compuesto magnético recubierto por las segunda y tercera capas, constituyendo la tercera capa la envoltura exterior de la partícula final.
- 55 50 En esta variante de realización, la forma preferida es un complejo de tres capas que tiene una forma de partícula, cuya primera capa constituye el núcleo de dicha partícula y tiene un tamaño comprendido entre 2 y 400 nm, preferentemente entre 50 y 100 nm.
- 60 55 Las formas más particularmente preferidas del complejo según la invención son complejos que comprenden magnetita entre 50 nm y 100 nm (primera capa), nanopartículas de sílice (más preferentemente Ludox SM 7 nm) o bentonita (segunda capa), e iones monofosfatos, pirofosfatos, trifosfatos (tercera capa).
- 65 60 En el complejo según la invención, cuando está en forma de partícula, la relación peso por peso (o p/p) entre dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato y dicho al menos un compuesto magnético representa entre 0,1% y 60%, preferentemente entre 1% y 50%, más preferentemente entre 3% y 35%, más preferentemente aún entre 4 y 10%. En las variantes preferidas de realización de la invención, la relación peso/peso de compuesto inorgánico de silicato sobre compuesto magnético es mayor cuando el compuesto inorgánico de silicato está en forma de lámina, como por ejemplo bentonita, que cuando está en forma de nanopartículas. Por ejemplo, cuando la partícula de magnetita está recubierta con bentonita, la relación bentonita/magnetita se sitúa entre 25% y 55%, mientras que, si está recubierta con nanopartículas Ludox, la relación Ludox/magnetita está entre 1% y el 10%.

En el mismo contexto, cuando el complejo según la invención está en forma de partícula, la relación molar de dicho al menos un compuesto magnético (preferiblemente hierro)/al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato y/o al menos un compuesto magnético está comprendida, entre 0,1% y 15%, preferentemente entre 0,1 y 10%, más preferentemente entre 5% y 10%, y aún más preferentemente entre 6% y 9%.

5 Método de producción

10 El complejo de tres capas según la invención se produce mediante métodos de fabricación que son fáciles de llevar a cabo y altamente reproducibles. Esto permite tener una fiabilidad en los rendimientos del complejo producido, así como uniformidad, o al menos muy pocas variaciones, de un lote de complejo producido a otro.

15 Además, los métodos de producción del complejo de la invención utilizados son económicos, y ciertas variantes de producción son muy rápidas.

15 Para lleva a cabo los métodos de producción del complejo según la invención, conviene en primer lugar describir los métodos para suministrar los diversos constituyentes del complejo de la invención.

20 - Suministro en compuesto magnético portador

20 Dicho al menos un compuesto magnético se encuentra en estado natural o bien se sintetiza según los protocolos clásicos descritos en la bibliografía o bien por coprecipitación, como se describe por R. Massart (IEEE Trans. Magn. 1981, 17, p1247-1248), o por oxidación parcial de sales metálicas como se describe por T. Sugimoto y E. Matjevic (Journal of Colloids and Interface Science, 1980, 74, P227-243), o bien por descomposición de precursores organometálicos como se describe por Maity (Journal of Magnetic Materials 321 1256 (2009)). La ventaja de estas técnicas es que se pueden incorporar fácilmente otros átomos metálicos tales como cobalto, manganeso, zinc, etc. a fin de obtener ferritas que se pueden utilizar también como compuesto magnético como se ha descrito anteriormente en el complejo de la invención.

30 De manera alternativa y preferible, dicho al menos un compuesto magnético se puede comprar en el comercio. Este es particularmente el caso de las nanopartículas de óxidos metálicos que pueden adquirirse de proveedores de pigmentos para tintas magnéticas como se describe en The Journal of Imaging Science and Technology November/December 2000, vol. 44, nº 6; p. 508-513 "The Influence of Particle Size, Shape and Particle Size Distribution on Properties of Magnetites for the Production of Toners".

35 - Suministro en compuesto inorgánico de silicato

40 Dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato tal como se ha descrito anteriormente, por ejemplo del tipo trisilicato de magnesio o de sodio, bentonita, caolín, talco, etc. puede adquirirse fácilmente a proveedores de productos químicos como Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). Por otro lado, numerosos protocolos clásicos y conocidos por el experto en la materia describen la manera de obtener estos compuestos inorgánicos de silicato. Por ejemplo, las nanopartículas inorgánico de silicato, utilizadas en la realización preferida de la invención, pueden ser sintetizadas según protocolos estándar para la condensación de tetraetoxisilano (TEOS) en medio acuoso y alcalino que se describen en la bibliografía por W. Stöber (Journal of Colloids and Interface Science 1968, 26, p62-69).

45 Alternativamente, las nanopartículas de silicato se pueden obtener de proveedores de productos químicos como la compañía Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA) que proporciona, por ejemplo, las partículas de la gama LUDOX o equivalentes de la misma, o como la compañía NanoH (Lyon, Francia). Es posible y fácil introducir grupos funcionales tales como amino, fosfonatos, azido, alquino, etc. en estos compuestos inorgánicos de silicato (preferiblemente nanopartículas) por co-condensación de los silanos correspondientes con TEOS de manera a aumentar la fuerza de interacción con el al menos un compuesto magnético (por ejemplo, nanopartículas de fosfonato).

50 - Suministro en compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato

55 Estos compuestos que tienen afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato son generalmente productos fácilmente disponibles de proveedores de productos químicos. De lo contrario, son fácilmente preparados químicamente mediante métodos clásicos y conocidos por el experto en la materia.

60 La presente descripción se refiere a un método para preparar al menos un complejo de tres capas tal como se define anteriormente, caracterizado por que comprende al menos las siguientes etapas:

65 a0) eventualmente, poner en contacto un soporte tal como se define anteriormente con al menos un compuesto magnético tal como se define anteriormente de manera que al menos un compuesto magnético se fije o se una al soporte,

5 a) poner en contacto el resultado de la etapa a0) o al menos un compuesto magnético tal como se define anteriormente, con al menos un compuesto inorgánico de silicato tal como se define anteriormente, de manera que tenga lugar una interacción electrostática y/o un enlace covalente y/o un enlace de coordinación entre dicho al menos un compuesto magnético y dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato, y de manera que la capa de dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato recubra, al menos parcialmente, la capa de dicho al menos un compuesto magnético,

10 b) poner en contacto el complejo obtenido en la etapa a) (dos capas constituidas por dicho al menos un compuesto magnético/ al menos un compuesto inorgánico de silicato, con o sin soporte) con al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato tal como se ha definido anteriormente, preferiblemente en un medio acuoso, de manera que dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato se adhiere y se coloque por encima de la capa de dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato del complejo de dos capas, con o sin soporte, o por encima del compuesto magnético cuando la capa del al menos un compuesto inorgánico de silicato es discontinua.

15 Generalmente, se realizan uno o varios lavados en agua o en medio acuoso después de cada una de las etapas de obtención del complejo según la invención, preferentemente después de las etapas a) y b).

20 20 La unión de la segunda capa con la primera capa se lleva a cabo por adsorción y por enlace electrostático y/o por enlace covalente y/o enlace de coordinación. Lo mismo ocurre con la unión de la tercera capa a la segunda capa.

25 En una variante de realización, el complejo comprende un soporte sobre el que se fija o se une el complejo. El soporte es tal como se describe anteriormente. En este caso, el método de fabricación del complejo sobre el soporte se puede llevar a cabo de varias maneras:

- 30 - o bien el soporte se pone en contacto con el al menos un material magnético de manera que se produce una interacción entre los dos materiales, ya sea por enlaces electrostáticos, o por enlace covalente, o por enlace de coordinación, después se añade la segunda capa a la primera capa fijada al soporte, fijándose la segunda capa sobre la primera capa y no sobre el soporte, después se añade la tercera capa al complejo de dos capas fijado al soporte,
- 35 - o bien el soporte se pone en contacto con un complejo de dos capas constituido de la primera capa unida a la segunda capa, fijándose entonces el soporte a la primera capa del complejo de dos capas de la misma manera que se describe anteriormente, después, se añade la tercera capa al complejo de dos capas fijado al soporte,
- 40 - o bien el soporte se pone en contacto con el complejo de tres capas ya formado y se fija a la primera capa del complejo de tres capas de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

40 40 El soporte tiene un grosor milimétrico a micrométrico.

45 También es posible utilizar un material que permite fijar física o químicamente la primera capa del complejo al soporte. Puede tratarse de un adhesivo o de cualquier otro compuesto susceptible de cumplir esta función, es decir, una sustancia intermedia capaz de mantener la unión entre el soporte sólido y el compuesto magnético como, por ejemplo, una proteína, un polímero, un polímero hidrófilo o hidrofóbico, una polidopamina, etc.

50 En una variante preferida de realización de la descripción, el complejo final se presenta en forma de partícula que comprende un núcleo de al menos un compuesto magnético, el cual está recubierto al menos parcialmente con dos capas: una capa de al menos un compuesto inorgánico de silicato y una capa de compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato, estando esta última capa situada al exterior del complejo.

55 Así, el método de preparación de la realización preferida comprende al menos las siguientes etapas:

- 60 a) poner en contacto al menos un compuesto magnético tal como se ha definido anteriormente con al menos un compuesto inorgánico de silicato tal como se ha definido anteriormente, encontrándose ya dicho compuesto inorgánico de silicato en forma de partículas, nanopartículas o en forma insoluble, de manera que se produce una interacción electrostática y/o un enlace covalente y/o un enlace de coordinación entre dichos al menos dos compuestos, y que las partículas o formas insolubles recubren al menos parcialmente la partícula de al menos un compuesto magnético que constituye el núcleo,
- 65 b) poner en contacto la partícula recubierta obtenida al final de la etapa a) con al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato tal como se ha definido anteriormente, preferentemente en un medio acuoso, de manera que se produce una interacción electrostática y/o un enlace covalente y/o un enlace de coordinación entre dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato y/o dicho al menos un compuesto

5 magnético y dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato del complejo de dos capas obtenido al final de la etapa a), o dicho al menos un compuesto magnético del complejo de dos capas obtenido al final de la etapa a) y que dicho al menos un compuesto tiene una afinidad por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato y/o dicho al menos un compuesto magnético se adhiere a la superficie de dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato o al núcleo de la partícula final.

10 Preferiblemente, la interacción entre dicho al menos un compuesto magnético y dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato es no covalente, así como para la interacción entre dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato y/o dicho al menos al menos un compuesto magnético y dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato o dicho al menos un compuesto magnético.

15 Generalmente, se llevan a cabo uno o varios lavados en agua o en medio acuoso después de cada una de las etapas de producción del complejo según la invención.

20 15 El contacto entre dicho al menos un compuesto magnético y dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato tiene lugar generalmente a un pH comprendido entre 2 y 7, preferiblemente entre 3 y 6, más preferiblemente entre 3 y 4. En general, el recubrimiento de la primera capa de dicho al menos un material magnético está favorecido por interacciones electrostáticas opuestas. Por lo tanto, el recubrimiento debe realizarse en una zona de pH en la que el al menos un compuesto inorgánico de silicato y dicho al menos un compuesto magnético tiene cargas de superficie opuestas, como se describe en el documento US 4280918.

25 En la forma de realización preferida del complejo de la invención, se usa magnetita como compuesto magnético y se usa sílice como compuesto inorgánico de silicato. Situándose el punto isoeléctrico de la magnetita a 6,8, y el de la sílice alrededor de 2, el recubrimiento de la magnetita con sílice debe llevarse a cabo a un pH comprendido entre 2 y 6,8, preferiblemente a un pH de 3,5.

30 Para el método de fabricación del complejo, las temperaturas utilizadas se sitúan entre 15°C y 65°C, preferiblemente entre 20°C y 60°C.

35 30 La realización preferida de la invención es muy fácil y rápida de sintetizar ya que usa compuestos comerciales o fácilmente sintetizables.

40 Así, en un primer tiempo, dicho al menos un compuesto magnético (preferiblemente partículas de magnetita) se incuba entre pH 3 y 6 con dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato (preferiblemente nanopartículas inorgánicas de silicato Ludox) para dar una carga positiva a dicho al menos compuesto magnético y una carga negativa a dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato. De esta forma, los dos tipos de compuestos (en forma de partículas en la forma preferida de la invención) se unen entre sí de manera muy sólida formando una estructura tridimensional (en forma de mora en el caso del uso de magnetita y de partículas Ludox).

45 40 Generalmente, la temperatura utilizada en esta primera etapa es la temperatura ambiente, pero la temperatura puede variar entre 20°C y 60°C.

50 Los complejos compuestos obtenidos, es decir los complejos de dos capas (o en la forma preferida las partículas recubiertas de Ludox) se lavan después por imantación o por cualquier técnica apropiada conocida que permite obtener la misma función.

55 50 En un segundo tiempo, se recubre al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato sobre el complejo de dos capas constituido de al menos un compuesto magnético recubierto con al menos un compuesto inorgánico de silicato. Esto se lleva a cabo por incubación de dicho complejo de dos capas con dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato en un medio acuoso durante 30 segundos a 24 h, preferiblemente 2 h, a pH y temperatura controlados.

60 55 Generalmente, la temperatura utilizada en esta etapa es la temperatura ambiente, pero la temperatura puede variar entre 20°C y -60°C.

65 El complejo de tres capas se lava de nuevo por imantación o cualquier otra técnica conocida que tenga la misma función, después se puede recoger en agua para determinar la concentración midiendo el extracto seco.

60 Los lavados se llevan a cabo generalmente en agua o al menos en medio acuoso.

Este método de recubrimiento de la capa de al menos un compuesto magnético con al menos un compuesto inorgánico de silicato y en particular con formas insolubles en un disolvente acuoso (partículas inorgánico de silicato) se describe en el documento US 4280918.

- De manera original, rápida y fiable, uno de los métodos de fabricación del complejo particularmente ventajoso es usar al menos un compuesto magnético, preferentemente al menos una partícula de magnetita o maghemita, y depositar sobre esta última o recubrir al menos parcialmente esta última con al menos un compuesto inorgánico de silicato, preferentemente un compuesto inorgánico de silicato de naturaleza insoluble y ya estructurado en forma de partículas (por ejemplo nanopartículas de sílice) o láminas (por ejemplo bentonita). Por ejemplo, como compuesto inorgánico de silicato se utilizará preferentemente nanopartículas de sílice de entre 0,1 y 20 nm, más preferentemente de entre 1 nm y 20 nm y aún más preferentemente partículas Ludox® SM de 7nm. Cuando se utilizan estos tipos de compuestos, la fabricación del complejo se simplifica debido a que estos compuestos inorgánicos de silicato están disponibles en el comercio. Además, su tamaño está perfectamente controlado y por tanto la fabricación del complejo es muy reproducible y estandarizable. En esta variante de realización del complejo, una simple adsorción de dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato sobre dicho al menos un compuesto magnético en las condiciones de pH adecuadas es por lo tanto suficiente para generar una capa de sílice del grosor deseado, controlada y regulada por el tamaño de las nanopartículas inorgánicas de silicato escogidas. Después, durante el recubrimiento con la tercera capa, los espacios entre las nanopartículas de material inorgánico de silicato se llenan con dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato. Este es generalmente el caso cuando dicho al menos un compuesto que forma la tercera capa tiene una afinidad por dicho al menos un compuesto magnético preferentemente. Cuando el compuesto que forma la tercera capa del complejo tiene una afinidad por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato más alta que para el compuesto magnético, no es imprescindible que existan espacios en la segunda capa del complejo.
- Cabe señalar que esta realización del complejo implica un aumento de la superficie desarrollada del complejo (o superficie específica) y por tanto un aumento de la capacidad de extracción/purificación de los ácidos nucleicos.
- Además, escogiendo juiciosamente partículas inorgánicas de silicatos dotadas de funciones destacables (aminas, ácidos carboxílicos, etc.), se puede funcionalizar el compuesto magnético fácilmente con estas funciones sin necesidad de usar procesos complejos de control de condensación de silanos sobre magnetita en presencia de disolvente(s) orgánico(s).
- Para ofrecer muy buenas capacidades de captura y extracción y/o purificación de ácidos nucleicos, es preferible que dicho al menos un compuesto magnético esté completamente recubierto con dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato.
- Se comprende así que una de las ventajas del complejo de tres capas según la invención se basa en la simplicidad de realización y de fabricación de este. Sin embargo, las ventajas de este complejo no se limitan a su fabricación, las ventajas en su uso son múltiples. En efecto, de manera sorprendente, se ha observado que el complejo según la invención ofrece propiedades remarcables y particularmente interesantes en la captura y elución de ácidos nucleicos, y en particular en medios o muestras biológicas complejos.
- Los complejos de tres capas de la invención se han evaluado por su capacidad para extraer los ácidos nucleicos a partir de células o de bacterias contenidas en un medio o muestra complejo tal como la sangre.
- Por muestra, se entiende una muestra que tiene diversos orígenes tales como muestras de origen alimentario, medioambiental, humano, veterinario o cosmético.
- Entre las muestras de origen alimentario se pueden citar, de manera no exhaustiva, una muestra de productos lácteos (yogures, quesos, etc.), carne, pescado, huevo, fruta, verdura, bebida (leche, zumos de frutas, refrescos, etc.). Por supuesto, estas muestras de origen alimentario también pueden provenir de salsas o platos más elaborados, o materias primas sin procesar o parcialmente procesadas. Una muestra alimentaria también puede provenir de un alimento destinado a animales, tales como tortas, harinas animales. Todas estas muestras, si no son líquidas, son previamente tratadas para estar en forma líquida.
- Como se ha indicado anteriormente, la muestra puede ser de origen medioambiental y puede consistir, por ejemplo, en una extracción de superficie, de agua, etc.
- La muestra también puede consistir en una muestra biológica, de origen humano o animal, que puede corresponder a muestras de fluido biológico (orina, sangre total o derivados tales como suero o plasma, esputo o saliva, pus, líquido cefalorraquídeo, etc.), heces (por ejemplo, diarreas coléricas), frotis de nariz, garganta, piel, heridas, órganos, tejidos o células aisladas, muestras de hisopo, extracciones o lavados broncoalveolares, biopsias. Evidentemente, esta lista no es exhaustiva.
- De manera general, el término "muestra" se refiere a una parte o a una cantidad, más particularmente una pequeña parte o una pequeña cantidad, extraída de una o más entidades con fines de análisis. Esta muestra puede eventualmente haber sufrido un tratamiento previo, lo que implica por ejemplo etapas de mezcla, dilución o incluso trituración, en particular si la entidad de partida está en estado sólido.

La muestra analizada es, en general, susceptible de, o sospechosa de, contener al menos una biomolécula representativa de la presencia de microorganismos o de una enfermedad a detectar, caracterizar o controlar.

- 5 Por biomolécula, se entiende un compuesto o una entidad química que puede ser un ácido nucleico (ADN o ARN de cualquier tipo ADN genómico, ADN complementario, ARN mensajero, ARN complementario, ARN de transferencia, ARN mitocondrial, ADN de cloroplasto, ARN ribosómico, ADN plásmido, ADN o ARN viral, microARN, snoARN, siARN, ARNi, en forma monocatenaria o bicatenaria) o una proteína.
- 10 Por microorganismo, se entiende todo o parte de una bacteria, de un hongo, de una levadura o de un virus.
- 15 Así, la presente invención se refiere también a un método para purificar microorganismos y/o biomoléculas, o para extraer biomoléculas, preferiblemente ácidos nucleicos, a partir de una muestra, preferiblemente biológica, en la que se usa al menos un complejo tal como el definido anteriormente.
- 20 20 Por extracción, se entiende una técnica que permite aislar biomoléculas a partir de cualquier muestra, por ejemplo, el aislamiento de ADN o ARN a partir de células eucariotas, procariotas, animales, humanas, microorganismos o tejidos. Así, la extracción en el sentido de la invención incluye la lisis y la purificación de las biomoléculas. La purificación en sí comprende la adsorción o captura, el lavado y la elución de las biomoléculas y/o de los microorganismos. La captura consiste en adsorber las biomoléculas y/o microorganismos sobre el complejo y eluir por desorción o liberación de estos últimos el complejo según la invención. Cuando se habla de purificación de microorganismos, no hay lisis de estos últimos, puede tratarse entonces de un enriquecimiento en microorganismos.
- 25 Preferentemente, los ensayos del complejo se llevan a cabo en condiciones caotrópicas, que son condiciones en las que se desnaturalizan las estructuras tridimensionales de las macromoléculas biológicas, tales como las proteínas, el ADN o el ARN. Los agentes caotrópicos interfieren con las interacciones intramoleculares débiles (no covalentes), tales como los enlaces de hidrógeno, las fuerzas de van der Waals y las fuerzas hidrófobas. Entre los agentes caotrópicos se pueden citar la urea, las sales de guanidina tales como el cloruro o el tiocianato de guanidinio y el perclorato de litio. Se utilizan generalmente en concentraciones que oscilan de 1 a 6 M, en particular para GuSCN y GuHCl.
- 30 30 Generalmente, se añade también un detergente que ayuda a la lisis celular, este último puede escogerse de Tween, triton, SDS y otros detergentes de utilizados comúnmente en concentraciones comprendidas entre 0,05 y 5% en peso o en volumen con respecto al amortiguador de lisis.
- 35 Así, las proteínas capaces de desnaturalizar o dañar los ácidos nucleicos, como las nucleasas, se inhiben o destruyen en condiciones caotrópicas, y esto ofrece las condiciones más favorables para extraer de manera eficaz ácidos nucleicos. Preferentemente, para la captura de los ácidos nucleicos en la presente invención, se utiliza cloruro de guanidinio o tiocianato de guanidinio y/o ácido clorhídrico (HCl) en medio amortiguado a pH 7 y un detergente, preferentemente triton X100.
- 40 40 El complejo según la invención ofrece propiedades de alto rendimiento en la purificación y/o extracción de biomoléculas y/o microorganismos, y en particular en la extracción de ácidos nucleicos.
- 45 Las buenas propiedades de captura de los ácidos nucleicos vía partículas magnéticas recubiertas de sílice son ampliamente conocidas. Se muestra en la presente solicitud que el hecho de añadir un compuesto que tiene una fuerte afinidad por dicho al menos un compuesto magnético a una partícula de compuesto magnético afecta a la captura de los ADN. Sin embargo, y de manera muy sorprendente, en el complejo según la invención en el que se tiene un compuesto magnético recubierto de al menos un compuesto inorgánico de silicato, el mismo recubierto de al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato y/o por el al menos el compuesto magnético, es decir, una combinación de los dos tipos de partículas ya conocidas y descritas anteriormente, la captura de ácidos nucleicos, y en particular de ADN, no se ve afectada en absoluto, incluso está potenciada. Este efecto sinérgico era absolutamente impredecible. Era más bien predecible que dicho al menos un compuesto que tiene una afinidad por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato y/o por el al menos compuesto magnético desplace completamente el recubrimiento del compuesto inorgánico de silicato y haga caer el rendimiento de extracción del ADN. Asimismo, no se podía prever de los tipos de partículas descritas anteriormente que el complejo de tres capas mejoraría las capacidades de elución del ARN y, por lo tanto, ofrecería propiedades de purificación y de extracción de los ácidos nucleicos de ADN y ARN claramente mejoradas con respecto a la técnica anterior. Los ejemplos ilustran muy claramente este fenómeno y aunque los ejemplos se limitan a unos pocos compuestos magnéticos, compuestos inorgánicos de silicato y compuestos que tienen afinidad por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato y/o por dicho al menos compuesto magnético, es muy posible para el experto en la materia generalizar los efectos obtenidos a las diversas combinaciones posibles y considerables de estos tres compuestos listados anteriormente para formar un complejo de tres capas según la invención.
- 55 60 Como se especifica anteriormente, la forma particularmente preferida de compuesto inorgánico de silicato está constituida por las nanopartículas de sílice entre 0,1 y 20 nm, más preferiblemente entre 1 y 20 nm. Cabe señalar que cuanto menor sea el tamaño de las nanopartículas de compuesto inorgánico de silicato unidas a la primera capa -capa

5 magnética- del complejo de la invención, mayor y más eficaz será la extracción de ácidos nucleicos con los complejos de la invención. De alguna manera, el tamaño de las partículas influye en el rendimiento de extracción de ácidos nucleicos, y cuanto mayor sea la superficie específica de las nanopartículas de compuesto inorgánico de silicato, mejor será la extracción de ácidos nucleicos: un complejo que tiene magnetita recubierta por nanopartículas de compuesto inorgánico de silicato Ludox® HS 40 capturará menos ácidos nucleicos que un complejo que tiene magnetita recubierta por nanopartículas del compuesto inorgánico de silicato Ludox® SM 7nm.

10 Para obtener buenos resultados en la purificación de microorganismos y/o biomoléculas o la extracción de biomoléculas, en particular de ácidos nucleicos, las relaciones en peso por peso de compuesto inorgánico de silicato/compuesto magnético están comprendidas entre 0,1% y 60%, preferentemente entre 0,5% y 30%, más preferentemente entre 1% y 20%, más preferentemente aún entre 2% y 15%, de manera muy particular preferentemente entre 3% y 10%.

15 Para obtener buenos resultados en la purificación de microorganismos y/o biomoléculas o la extracción de biomoléculas, en particular ácidos nucleicos, las relaciones en peso por peso de compuesto magnético/compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato, están comprendidas entre 0,1% y 20%, preferiblemente entre 0,1% y 10%, más preferiblemente entre 4% y 8%.

20 En otro de sus aspectos, la presente invención se refiere a un método para detectar y/o cuantificar biomoléculas, en particular ácidos nucleicos diana, a partir de una muestra susceptible de contener dichos ácidos nucleicos diana, que comprende las siguientes etapas:

- 25 1) extraer ácidos nucleicos de una muestra mediante la realización del método descrito anteriormente,
- 2) detectar y/o cuantificar los ácidos nucleicos diana mediante técnicas convencionales de detección y/o cuantificación.

30 En efecto, una vez extraídas las biomoléculas con el complejo según la invención, es interesante detectar los ácidos nucleicos diana, incluso cuantificarlos a fin de realizar un diagnóstico preciso. Estos ácidos nucleicos diana son los que se sospecha, o son susceptibles, que estén presentes en la muestra ensayada.

35 Los métodos de detección clásicos que se pueden usar son todos aquellos ampliamente conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede citar, de manera no exhaustiva, marcas radiactivos; marcas en frío: colorimetría, fluorescencia, quimioluminiscencia; hibridaciones moleculares; transferencia Southern; transferencias Northern; Dot Blot o hibridación *in situ*. Preferiblemente, se usa la detección con una sonda de detección.

40 Por sonda de detección o sonda, se entiende una secuencia nucleica de una secuencia nucleotídica de cuatro bases de diferentes tipos escogidos del grupo de adenina, timina, guanina, uracilo, citosina, que es capaz de hibridarse específicamente sobre un amplicón y que comprende al menos un marcador. La sonda puede ser una sonda de forma redondeada (denominada O-probe, véase la solicitud de patente del Solicitante FR08/54549 depositada el 4 de julio de 2008), una baliza molecular (también denominada Molecular Beacon), una sonda Taqman® o una sonda FRET. Estos tres últimos tipos de sondas son bien conocidos por el experto en la materia. Estas sondas pueden eventualmente estar constituidas, total o parcialmente, de nucleótidos modificados. Cada sonda comprende un marcador y opcionalmente un inactivador. Entre estas sondas, preferiblemente, se usan sondas que emiten una fluorescencia cuando se hibridan con la secuencia complementaria, sondas descritas por Tyagi & Kramer (Nature Biotech, 1996, 14:303-308), comúnmente conocidas con el nombre de "molecular beacons" o kits comerciales tales como los kits de la gama R-gene® de Argene (bioMérieux, Verniolle, Francia). Es posible hacer la detección en tiempo real o al final de la reacción.

50 Los métodos de cuantificación utilizados son los métodos de cuantificación estándar utilizados convencionalmente por el experto en la materia. Por ejemplo, es posible utilizar kits de cuantificación de la gama R-gene® de Argene (bioMérieux, Verniolle, Francia). Estos métodos usan clásicamente intervalos de cuantificación estándar (QS) que permiten evaluar la cantidad real de un ácido nucleico dado o de ácidos nucleicos en la muestra ensayada.

55 En una variante de realización, la presente invención se refiere a un método de detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos diana como el descrito anteriormente, en el que, entre la etapa de extracción y la etapa de detección de ácidos nucleicos, existe una etapa de elución de los ácidos nucleicos del complejo usado en la etapa de extracción y/en la o etapa de amplificación de los ácidos nucleicos por técnicas convencionales.

60 La etapa de elución se lleva a cabo generalmente con una disolución de pH ligeramente alcalino y baja fuerza iónica a una temperatura de entre 50°C y 70°C. De manera general, se prefiere usar productos comerciales tales como los productos de la gama de extracción NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Francia). Estas condiciones son condiciones estándar para mantener la integridad de los ácidos nucleicos y son condiciones estándar.

65

Por amplificación o reacción de amplificación, se entiende cualquier técnica de amplificación de ácidos nucleicos bien conocida por el experto en la materia.

5 La etapa de amplificación se lleva a cabo generalmente debido a que la cantidad de ácidos nucleicos a detectar y/o cuantificar es muy baja y es necesario pasar por una fase de amplificación de estos últimos para detectarlos y/o cuantificarlos con el fin de dar un diagnóstico preciso. Sin fase de amplificación, es totalmente posible obtener resultados erróneos concluyendo que un ácido nucleico diana está ausente de una muestra cuando en realidad está presente en esta, pero en una cantidad tan pequeña que las técnicas utilizadas no permiten detectarlo. Así, se pueden usar numerosos métodos de amplificación, tales como PCR, RT-PCR, LCR, RCR, 3SR, RCA, NASBA, TMA, SDA o cualquier técnica de amplificación de los ácidos nucleicos conocida por el experto en la materia.

10 Los ensayos realizados para la detección y/o amplificación de ácidos nucleicos diana con los complejos según la invención dan excelentes resultados.

15 15 En otro de sus aspectos, la presente invención se refiere a un método de lisis de microorganismos y/o células y/o tejidos, a partir de una muestra, caracterizado por que consiste en poner en contacto al menos una muestra con al menos un complejo de tres capas tal como se describe anteriormente, y en el que dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato y/o dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato comprende al menos un agente de la familia de los detergentes que permiten la lisis.

20 20 En ciertas situaciones de análisis, puede ser interesante lisar, de determinada manera células, células de un tejido y/o microorganismos. Así, el uso de este complejo puede resultar interesante cuando se trata dianar un cierto tipo celular o de microorganismo. Por ejemplo, en el contexto de la sepsis, puede ser necesario lisar, de manera determinada y selectiva, las membranas y los ácidos nucleicos de las células sanguíneas humanas presentes en grandes cantidades en una muestra. Esto se puede llevar a cabo con saponina que penetra y debilita las membranas y envolturas que contienen colesterol. Puede ser necesario realizar esta lisis selectiva en vista a poder seleccionar y extraer los microorganismos patógenos presentes en muy bajas cantidades en la muestra ensayada. Después de una lisis de estos microorganismos muy débilmente representados, será posible purificar sus ácidos nucleicos y amplificarlos de manera selectividad con una muy alta sensibilidad a pesar de que están presentes en una cantidad muy pequeña en la muestra inicial. El complejo de tres capas según la invención podría ayudar en este sentido. Como se ha descrito anteriormente, los compuestos que constituyen la segunda y/o la tercera capa del complejo de la invención pueden ser funcionalizados con compuestos de la familia de los detergentes, como por ejemplo las saponinas. Así, estos complejos así funcionalizados pueden tener un papel en la lisis selectiva de células humanas. Así, el complejo de tres capas podría utilizarse para llevar a cabo una primera etapa de lisis y captura selectiva de ácidos nucleicos no diana, y facilitar en cierto modo una etapa de enriquecimiento diana de microorganismos presentes en la muestra, pero no capturados por los complejos. de la invención También se puede considerar tener un complejo de tres capas según la invención en el que dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato y/o dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato se funcionalizan de manera diferentes y complementarias, y permiten capturar y/o lizar diferentes tipos de biomoléculas y/o microorganismos.

25 35 40 En la realización preferida según este método, dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato comprende nanopartículas de sílice de entre 0,1 nm y 20 nm, más preferiblemente de entre 1 nm y 20 nm, cuya sílice está unida con saponinas y/o el compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato se acopla a al menos una saponina. La funcionalización puede no ser completa, es decir, que los compuestos así funcionalizados pueden recubrir solo parcialmente dicho al menos un compuesto magnético.

45 50 55 60 Todos los compuestos inorgánicos de silicato y todos los compuestos que tienen afinidad por el al menos compuesto magnético y/o por el compuesto inorgánico de silicato listados anteriormente son "funcionalizables" por un detergente del tipo saponina. En una realización preferida para el uso de lisis selectiva de células o microorganismos, el compuesto inorgánico de silicato es una nanopartícula de sílice Ludox® 7nm, y el compuesto que tiene afinidad por el al menos un compuesto magnético y/o el al menos un compuesto inorgánico de silicato se escoge de dopamina y sus derivados, catecolas y sus derivados, ácidos fosfónicos, fosfonatos, fosfatos y los compuestos de la familia de los ácidos carboxílicos (preferiblemente ácido cítrico y sus sales), preferiblemente acoplados con al menos una saponina.

65 Finalmente, en un último aspecto, la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico molecular que comprende al menos un complejo de tres capas según la invención definida anteriormente.

60 Este último también puede incluir reactivos que permiten la amplificación específica de los ácidos nucleicos susceptibles o sospechosos de estar contenidos en la muestra a analizar, y/o reactivos que permiten la detección y/o la cuantificación de los ácidos nucleicos susceptibles o sospechosos de estar contenidos en la muestra a ensayar.

65 65 Estos kits permitirán llevar a cabo los diferentes métodos de extracción y/o detección y/o cuantificación descritos anteriormente.

Los ejemplos y figuras adjuntos representan realizaciones particulares de la invención y no pueden considerarse limitativos del alcance de la presente invención.

5 Figuras:

Las diferentes figuras ayudan a comprender la invención e ilustran los resultados y rendimientos obtenidos con el complejo según la invención.

- 10 - La Figura 1 es un esquema del complejo según la invención en una posible realización, representando el sombreado el soporte sólido, representando las estrellas al menos un compuesto magnético, representando los círculos dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato, y representando la letra L dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato.
- 15 - La Figura 2 es un esquema de la formación del complejo según la invención en una realización preferida.
- 20 - La Figura 3 corresponde a una imagen de microscopio electrónico de complejos según la invención: partículas de magnetita recubiertas casi en su totalidad por nanopartículas inorgánicas de silicato Ludox® SM 7 nm y pirofosfato (invisible en la figura).
- 25 - La Figura 4 muestra el rendimiento de captura (negro) y de elución (cuadriculada) del ADN para partículas de magnetita recubiertas con compuestos inorgánicos de silicato.
- FSC 419 corresponde a los resultados obtenidos con partículas de magnetita de 100 nm;
 - AL1001 corresponde a los resultados obtenidos con partículas de magnetita de 100 nm recubiertas con Ludox® 6% (peso/peso) a pH 3,5;
- 30 - AL1018 corresponde a los resultados obtenidos con partículas de magnetita de 100 nm recubiertas con MgSiO₄ 50% (peso/peso) a pH 3,5;
- AL 1024 corresponde a los resultados obtenidos con partículas de magnetita recubiertas con NaSiO₄ 50% (peso/peso) a pH 3,5;
- 35 - AL 1014 corresponde a los resultados obtenidos con partículas de magnetita recubiertas de bentonita 30% (peso/peso) a pH 3,5.
- 40 - La Figura 5 muestra el rendimiento de captura (gris) y de elución (cuadriculado) de ARN para partículas de magnetita recubiertas con compuestos inorgánicos de silicato. Se ensayaron las mismas partículas que las de la Figura 4.
- 45 - La Figura 6 muestra el rendimiento general de extracción de ADN (negro) y de ARN (gris) para partículas de magnetita recubiertas con compuestos inorgánicos de silicato descritos en la Figura 4.
- AB 930 corresponde a partículas de magnetita solas;
 - KE54a corresponde a los resultados obtenidos con partículas de magnetita recubiertas de iones fosfato al 6% molar. Por % molar en las figuras y en los ejemplos significa relación molar hierro/compuesto que tiene afinidad por el compuesto inorgánico de silicato y/o el compuesto magnético (que también puede denominarse ligando)
- 55 - KE220 corresponde a los resultados obtenidos con partículas de magnetita recubiertas de iones pirofosfato al 6% molar;
- KE351 corresponde a los resultados obtenidos con partículas de magnetita recubiertas de iones trifosfato al 6% molar;
 - KE225 corresponde a los resultados obtenidos con partículas de magnetita recubiertas con HEEPA ácido (2-(2-hidroxietoxi(etoxi)ethyl-fosfónico) (Sikemia, Montpellier, Francia) al 10% molar;

- KE231 corresponde a los resultados obtenidos con partículas de magnetita recubiertas con NTPA ácido Nitrilotris(metilen)trifosfónico (Acros, Geel, Bélgica) al 0,1% molar.
- 5 - La Figura 7B muestra el rendimiento de captura (gris) y de elución (cuadriculado) del ARN para las mismas partículas que las de la Figura 7A.
- La Figura 8 muestra el rendimiento total de extracción de ADN (negro) y de ARN (gris) para las partículas de las Figuras 7A y 7B.
- 10 - La figura 9 representa el rendimiento de captura (negro) y de elución (cuadriculado) del ADN para partículas de magnetita recubiertas con compuestos inorgánicos de silicato y con compuestos que tienen afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato:
- FSC 419 corresponde a los resultados obtenidos con partículas de magnetita de 100 nm;
- 15 • AL1001 corresponde a los resultados obtenidos con partículas de magnetita de 100 nm recubiertas con Ludox® 6% (peso/peso) a pH 3,5;
- 20 • AL1013 corresponde a los resultados obtenidos con partículas de magnetita de 100 nm recubiertas con Ludox® 6% (peso/peso) e ión pirofosfato al 6,8% molar;
- 25 • AL 1014 corresponde a los resultados obtenidos con partículas de magnetita recubiertas de bentonita 30% (peso/peso) a pH 3,5;
- AL1015 corresponde a los resultados obtenidos con partículas de magnetita de 100 nm recubiertas con bentonita 30% (peso/peso) e ión pirofosfato 6,8% molar.
- 30 - La Figura 10 representa el rendimiento de captura (gris) y de elución (cuadriculado) del ARN para partículas de magnetita recubiertas con compuestos inorgánicos de silicato y con compuestos que tienen afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato (en comparación con las referencias). Ciertas partículas de la Figura 9 se analizaron con respecto a los ARN, y los resultados aparecen en la Figura 10. Las otras partículas ensayadas se dan en la tabla 3 del ejemplo 3 a continuación.
- 35 - La figura 11 representa el rendimiento total de extracción del ADN (negro) y del ARN (gris) para partículas de magnetita recubiertas con compuestos inorgánicos de silicato y compuestos que tienen afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato (en comparación con las referencias) de las Figuras 9 y 10.
- 40 - La figura 12 representa la eficacia de extracción de ácidos nucleicos en la sangre con complejos de tres capas según la invención que comprenden un tipo de magnetita (AB 930 de 100 nm) tal como se describe en la invención (evaluación UV con Nanodrop (ThermoScientific, Waltham, USA)).
- La Figura 12A representa la absorbancia de 3 tipos de partículas en función de la longitud de onda
- AB930: magnetita pura - curva con triángulos
- 45 • AB1760: magnetita recubierta con Ludox® SM 6% peso/peso - curva con cruces, y
- AB1773: magnetita recubierta con Ludox® SM 6% y después de iones pirofosfato al 6,8% molar - curva con rumbos.
- 50 - La Figura 12B muestra la cantidad de ácidos nucleicos capturados en la sangre en función de tres tipos diferentes de partículas; las mismas que las de la figura 12A.
- 55 - La Figura 13 ilustra la eficacia de extracción de ácidos nucleicos en la sangre con complejos de tres capas según la invención que comprenden otro tipo de magnetita AB 1757 50 nm como se describe en la invención (evaluación UV con Nanodrop (ThermoScientific, Waltham, USA)). Los 4 tipos de partículas ensayados son los siguientes:
- KE220: magnetita recubierta con iones pirofosfato al 6,8% molar;
- 60 • AB1761: magnetita recubierta con 6% peso/peso de Ludox®;
- AB 1774: magnetita recubierta con Ludox al 6% peso/peso e iones pirofosfato al 6,8% molar, y
- AB1777: magnetita recubierta con Ludox® al 6% peso/peso e iones trifosfato al 6,8% molar.

- La Figura 14 ilustra la eficacia de extracción de ácidos nucleicos en la sangre con complejos de tres capas según la invención que comprenden otro tipo de magnetita FSC 419 100 nm como se describe en la invención (evaluación UV con Nanodrop (ThermoScientific, Waltham, USA)).
- 5
- La Figura 14A representa la absorbancia de 2 tipos de partículas en función de la longitud de onda:
 - AL1001: magnetita recubierta con Ludox® 6% peso/peso -curva con guiones, y
- 10
- AL1013: magnetita recubierta con Ludox® 6% y después con iones pirofosfato al 6,8% molar - curva de línea continua
- La Figura 14B representa la cantidad de ácidos nucleicos capturados en la sangre en función de tres tipos de partículas diferentes: KE220: magnetita recubierta con iones pirofosfato al 6,8% mol; los mismos 2 tipos de partículas que los de la Figura 14A.
- 15
- La Figura 15 ilustra la eficacia de extracción de ácidos nucleicos en la sangre con complejos de tres capas según la invención que comprenden otro tipo de compuesto inorgánico de silicato: la bentonita como se describe en la invención (evaluación UV con Nanodrop (ThermoScientific, Waltham, USA)).
- 20
- La figura 15A representa la absorbancia de 2 tipos de partículas en función de la longitud de onda:
 - AL1014: magnetita recubierta con bentonita 30% peso/peso - curva con guiones,
- 25
- ALIOIS: magnetita recubierta con bentonita 30% y después con iones pirofosfato al 6,8% molar-curva de línea continua.
- La Figura 15B representa la cantidad de ácidos nucleicos capturados en la sangre en función de tres tipos de partículas diferentes: KE220: magnetita recubierta con iones pirofosfato al 6,8% molar; los mismos 2 tipos de partículas que los de la Figura 15A.
- 30
- La Figura 16 ilustra los resultados de una amplificación por PCR del ADN del virus CMV extraído por diferentes tipos de partículas magnéticas, simplemente (complejos de dos capas) o doblemente recubiertas (complejo de tres capas según la invención)
- 35
- AL1001: magnetita recubierta con Ludox 6%;
 - AL1013: magnetita recubierta con Ludox 6% peso/peso e iones pirofosfato al 6,8% molar;
- 40
- AL1014: magnetita recubierta con bentonita en una relación peso/peso de 30%;
 - AL1015: magnetita recubierta con bentonita en una relación peso/peso de 30% y después con iones pirofosfato al 6,8% molar.

45 Ejemplos

Ejemplo 1: Recubrimiento de partículas de magnetita con compuestos inorgánicos de silicato (magnetita/compuestos inorgánicos de silicato)

50 Se realizaron unos recubrimientos de partículas de magnetita de aproximadamente 100 nm, mediante compuestos inorgánicos de silicato comerciales, con diferentes relaciones magnetita/sílice. En los ejemplos a continuación, se usan Ludox SM® de 7 nm, bentonita, silicato de magnesio o de sodio, sílice "ahumada" o dióxido de silicio.

55 El recubrimiento está favorecido por interacciones electrostáticas opuestas. Así, este último debe llevarse a cabo en una zona de pH en las que las nanopartículas inorgánicas de silicato y la magnetita tengan cargas de superficie opuestas.

El punto isoelectrónico de la magnetita se sitúa a 6,8, y el de la sílice alrededor de 2. El recubrimiento debe llevarse a cabo a un pH comprendido entre 2 y 6,8, es decir, un pH escogido de 3,5, como se describe a continuación.

60 A- Protocolo de recubrimiento de la magnetita:

65 1- Se lavan de 1 a 400 mg de magnetita (11-814 μ) a 92,1 mg/ml) y se recogen en el mismo volumen con una disolución de HCl al 1 mM pH 3 a fin de ajustar el pH de la suspensión. El volumen de la disolución de lavado depende de la cantidad de magnetita (entre 2 ml (1-75 mg de magnetita) y 10 ml (400 mg de magnetita)).

2- Las disoluciones de compuestos inorgánicos de silicatos indicadas anteriormente se preparan en agua y se ajusta su pH en alrededor de 3, añadiendo algunas gotas de HCl al 1M antes de ajustar sus concentraciones entre 30 y 300 mg/ml.

5 3- Se mezclan las suspensiones de magnetita y de compuestos inorgánicos de silicato en las relaciones indicadas en la Tabla 1 a continuación, y se mezclan por vórtice inmediatamente antes de ajustar el volumen, con una disolución de HCl al 1 mM pH 3, entre 2 ml y 10 ml según la cantidad de magnetita usada. En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de recubrimiento de magnetita con nanopartículas inorgánicas de silicato llevadas a cabo con relaciones magnetita/sílice (peso/peso) comprendidas entre 1% y 50% a fin de obtener nanocompuestos con porcentajes de recubrimiento diferentes.

10 4- El pH de la suspensión final se verifica y debe estar entre 3-3,5, y, dependiendo del tipo de compuesto inorgánico de silicato, puede ser necesario ajustar el pH con algunas μ l de NaOH o de HCl al 1M.

15 5- La suspensión se agita en un agitador de rodillos durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente.

20 6- Se puede realizar un control negativo de la misma manera, pero con una disolución de sosa a pH = 9-11 (100 μ M - 1,5 mM de NaOH) y sin ajustar el pH de los compuestos inorgánicos de silicato. A este pH, las nanopartículas de sílice y de magnetita están ambas cargadas negativamente, y la sílice no recubre la magnetita.

B- Protocolo de lavado de la suspensión de partículas de magnetita/compuestos inorgánicos de silicato

25 1. El sobrenadante se elimina por imantación de las partículas compuestas magnetita/nanopartículas de silicato recientemente formadas. La suspensión se lava en primer lugar con agua por imantación, después con la ayuda de una disolución de sosa al 100 pM, pH 9, después se recoge en la misma disolución y, de manera facultativa, se somete a ultrasonidos durante 10 min al 100% de potencia (Vibra-cell 75042, Bioblock Scientific, Illkirch, Francia). La disolución de sosa se elimina de la disolución por imantación. Estas etapas se llevan a cabo tres o incluso más veces hasta alcanzar un pH de 9.

30 2. La disolución de partículas se lava con agua por imantación sucesiva 3 veces a pH 7 y después se concentra a 50 mg/ml. Se lleva a cabo un extracto seco para verificar esta concentración.

Tabla 1: Detalles experimentales del recubrimiento simple de magnetita por silicatos

	Partícula de magnetita portadora		Compuestos inorgánicos de silicato		Relación sílice/magnetita (peso/peso)	Ph Injerto	IEP, (Punto isoeléctrico)
	Tipo de magnetita	masa utilizada	Tipo de nanopartículas	masa utilizada			
AL 1001-CTRL)	Magnetita FSC 419 100 nm 92,1 mg/ml. 814 μ l	75 mg	Iudox SM 7 nm (Sigma Aldrich, ref. 420794) en disolución en agua al 30% a pH 9,5	15 μ l (4,5 mg)	6%	11	7,5
KE 59	Magnetita AB 930/100 nm	75 mg	Iudox SM 7 nm (Sigma Aldrich, referencia 420794) en disolución en agua al 30% a pH 9,5	0,75 mg	1%	3-4	5,2
KE 58	Magnetita AB 930 100 nm	75 mg	Igual	2,25 mg	3%	3-4	3,8
AB 1760	Magnetita AB 930 100 nm	400 mg	Igual	29 mg	6%	3-4	2
AL 1001	Magnetita FSC 419 100 nm	75 mg	Igual	15 μ l (4,5 mg)	6%	3-4	4
AB 1761	Magnetita AB 1757 50 nm	400 mg	Igual	29 mg	6%	3-4	nd
AL 1009	Magnetita FSC 419 100 nm	5 mg	bentonita (Aldrich 285234) 50 mg/ml en agua a pH 10,4	6 μ l (0,3 mg)	6%	3-4	<1
AL 1014	Magnetita FSC 419 100 nm	75 mg	bentonita (Aldrich 285234) 100 mg/ml en	318 μ l (32 mg)	30%	3	<1

			agua ajustada a pH 7 con HCL 1M				
AL 1018	Magnetita FSC 419 100 nm	75 mg	Trisilicato de magnesio (Aldrich 63148) 150 mg/ml en agua ajustada a pH 7 con HCL 1M	500 μ l (75 mg)	50%	3	5,5
AB 1992	Magnetita AB 930 100 nm	150 mg	Trisilicato de magnesio (Aldrich 63148)	72 mg	50%	3-4	nd
AB 1024	Magnetita AB 930 100 nm	75 mg	Trisilicato de sodio (Aldrich 63148)	500 μ l (75 mg)	50%	3	5,1
año fiscal 1959	Magnetita AB 930 100 nm	150 mg	Sílice pirógena (Aldrich S5130)	18 mg	10%	3-4	nd
AB 1960	Magnetita AB 930 100 nm	150 mg	Dióxido de silicio (Aldrich 637238)	18 mg	10%	3-4	nd

C- Caracterización físico-química por zetametría

Las nanopartículas sintetizadas se analizan por zetametría en el aparato Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments (Malvern, Reino Unido) a fin de medir su punto isoeléctrico. Las medidas se llevan a cabo a 0,3 mg/ml en 3 disoluciones diferentes, respectivamente:

- HCl 5 mM, 10 mM NaCl pH 2,5;

10 - Tris, HCl 5 mM, 10 mM NaCl pH 7;

- y NaOH 5 mM, 10 mM NaCl pH 11,5.

15 Para ello se extraen 6 μ l de la suspensión de partículas a 50 mg/ml (0,3 mg) en agua que se añaden a 2 ml de una de las disoluciones anteriores contenidas en un frasco de polipropileno para obtener una suspensión de 0,15 mg/ml. Se asegura, midiendo el pH, que el pH de la disolución no se modifica por la adición de las partículas. La suspensión de partículas se introduce entonces en el depósito de medida (Folder capillary cells, DTS 1061) con la ayuda de una jeringa de 2 ml. El programa de medida escogido para el conjunto de las medidas de potencial Zeta es el programa "BMX Zéta" (las medidas se llevan a cabo a 21°C).

20 La medida del potencial zeta de estas partículas en función del pH permite deducir el punto isoeléctrico cuando el potencial zeta se vuelve nulo. Es indicativa del estado de funcionalización de superficie de la magnetita.

25 Conclusión: De manera general (véase la Tabla 1), se demuestra un claro cambio del punto isoeléctrico de la magnetita hacia valores más bajos que corresponden bien a un recubrimiento por compuestos inorgánicos de silicato, cuyo nivel de recubrimiento puede ser ajustado mediante la concentración en compuesto inorgánico de silicato (véase para esto los experimentos KE 59, KE 58 o AB 1760 en los que el punto isoeléctrico evoluciona en función de la concentración en partículas de compuesto inorgánico de silicato Ludox[®]), o AL 1018 y AL 1024 en función de la concentración de trisilicato de magnesio o trisilicato de sodio.

30 **Ejemplo 2: Recubrimiento de partículas de magnetita mediante compuestos que tienen afinidad por el al menos un compuesto magnético y/o por el al menos un compuesto inorgánico de silicato. Para simplificar, estos últimos compuestos también se denominan ligandos (magnetita/ligando)**

35 Se recubrieron partículas de magnetita con ligandos como se describe a continuación según dos protocolos en función de los pKa de los compuestos que tienen afinidad por el al menos un compuesto magnético y/o por el al menos un compuesto inorgánico de silicato (ligandos) escogidos.

40 Como para la adsorción de nanopartículas inorgánico de silicato, un ligando de hierro se adsorberá eficazmente sobre magnetita en un intervalo de pH en el que el ligando está cargado negativamente, y en el que la magnetita está cargada positivamente, es decir, a un pH comprendido entre el primer pKa del ligando y el punto isoeléctrico de la magnetita (6,8).

45 Según este principio, los revestimientos o recubrimientos de compuestos que tienen afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato del tipo fosfatos (pKa entre 1 y 12) y fosfonatos (pKa entre 3 y 6) se llevaron a cabo con, respectivamente, un pH de la disolución igual a pH 3 o pH 5.

Cabe señalar que cualquier otro compuesto que tenga afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato ser adsorbido (ácidos carboxílicos, etc.) según este principio.

Los dos protocolos se describen a continuación.

5 Protocolo de recubrimiento de la magnetita a pH=3 con compuestos que tienen afinidad por el al menos un compuesto magnético y/o por el al menos un compuesto inorgánico de silicato de tipo fosfato

10 1- Un volumen mínimo de magnetita del orden de 550 μ l, que corresponde a una masa del orden de 1 a 80 mg, se lava con una disolución de HCl a 1 mM pH 3, después se recoge en la misma disolución antes de ser introducido en un microtubo de polipropileno de 1,5 ml.

2- El ligando de tipo fosfato en disolución en agua a 40 mM, cuyo pH se ha ajustado a pH 3, se añade bajo vórtice para que corresponda a una fracción molar comprendida entre 0,1% y 10% molar con respecto al hierro.

15 Ej:

$$\text{Fracción molar en ligando con respecto al hierro} = \frac{\text{num de mol de ligando}}{(\text{num de mol de ligando}) + (\text{num de mol de Fe3O}_4 \times 3)}$$

$$= \frac{\text{Vligando X [ligando]}}{(\text{Vligando X [ligando]}) + \left(\frac{\text{masa Fe3O}_4}{\text{M(Fe3O}_4)} \times 3 \right)}$$

20 3- El pH se controla con la ayuda de un medido de pH, debe estar del orden de 3. Generalmente, no es necesario recubrir el pH, pero se puede hacer si es necesario, con cloruro sódico NaCl o HCl al 0.1M.

4. Complementar hasta 1.5 ml con una disolución de HCl al 1 mM pH 3.

4- Complementar hasta 1,5 ml con una disolución de HCl al 1 NIM pH 3.

3- El tubo eppendorf se agita sobre rodillos durante 2 horas a temperatura ambiente.

3. El medio de reacción se lava entonces con agua por inmersión hasta obtener un pH de 7.

7.- Las partículas se recogen en la cantidad adecuada de agua para obtener una concentración de 50 mg/ml (verificada midiendo el extracto seco).

Protocolo de recubrimiento de la magnetita a pH=5 con compuestos que tienen afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato de tipo fosfonatos

1- Un volumen mínimo de magnetita del orden de 550 μ l, que corresponde a una masa del orden de 30-80 mg, se lava con una disolución de HCl al 10 μ M pH 5, y después se recoge en la misma disolución antes de introducirlo en un tubo eppendorf de 1,5 ml.

40 2- El ligando en disolución en agua al 40 mM, cuyo pH se ha ajustado a pH 5, se añade bajo vórtice para que corresponda a una fracción molar comprendida entre 0,1% y 10% molar con respecto al hierro.

3- El pH se controla con un medidor de pH y después se ajusta a alrededor de 5 si es necesario con una disolución de sosa o de HCl al 0,1 M.

4- Complementar hasta 1,5 ml con una disolución de HCl al 10 µM pH 5.

5- La mezcla de reacción se agita en un termomezclador durante 12 horas a 60°C.

50 6- Las partículas se lavan entonces con agua por imantación hasta obtener un pH de 7.

7- Las nanopartículas se recogen en la cantidad adecuada de agua a fin de obtener una concentración de 50 mg/ml (verificada midiendo el extracto seco).

55 La siguiente tabla contiene un recapitulativo de algunos ejemplos de recubrimiento de la magnetita con compuestos que tienen afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato (a una concentración óptima de compuesto ligando para satisfacer las mejores condiciones de extracción de los ácidos nucleicos).

Tabla 2: Detalle experimental del recubrimiento simple de magnetita con compuestos que tienen afinidad por el al menos un compuesto magnético y/o para el al menos un compuesto inorgánico de silicato

	Partícula de magnetita portadora		Compuestos que tienen afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato (ligando)		Relación molar Fe/ligando	pH Injerto	IEP
	Tipo de magnetita	masa utilizada	Tipo de ligando	Volumen utilizado a 40 mM			
KE 54a	Magnetita AB 930 100 nm	80 mg	Ácido ortofosfórico (Aldrich ref.: 345245)	1900 µl	6,8%	3,5	5,2
KE 220	Igual	80 mg	Pirofosfato de sodio (Aldrich ref.: 221368)	1900 µl	6,8%	3,5	<2
KE 351	Igual	80 mg	Trifosfato de sodio (Aldrich ref.: 72061)	1900 µl	6,8%	3,5	3,2
KE 225	Igual	80 mg	HEEEPA=ácido 2-(2-(2-hidroxietoxi{etoxi}etil-fosfónico (Sikemia, Montpellier, Francia)	1900 µl	10%	5	4,3
KE 231	Igual	80 mg	NTPA Ácido nitrilotris(metileno)trifosfónico (Acros, Geel, Bélgica)	1900 µl	0,1%	5	nd

5 Conclusión: Se constata un claro desplazamiento del valor del punto isoelectrónico hacia valores inferiores al de la magnetita (punto isoelectrónico IEP: 6-7) lo que demuestra el recubrimiento de la magnetita y la modificación de su carga superficial, y por lo tanto de sus propiedades de superficie.

10 **Ejemplo 3: Recubrimiento con compuestos que tienen afinidad por el al menos un compuesto magnético y/o por el al menos un compuesto inorgánico de silicato de partículas de magnetita previamente recubiertas con compuestos inorgánicos de silicato (magnetita/compuestos inorgánicos de silicato/ligandos)**

15 Las partículas compuestas de magnetita/compuestos inorgánicos de silicato obtenidas en el Ejemplo 1 se recubren a su vez con compuestos que tienen afinidad por el al menos un compuesto magnético y/o por el al menos un compuesto inorgánico de silicato exactamente como se describe en el Ejemplo 2, salvo que son partículas de magnetita/compuestos inorgánicos de silicato que son usadas en lugar de magnetita sola (véase la Tabla 3). Como en el Ejemplo 2, se utilizan dos protocolos de recubrimiento según el pKa del compuesto que tiene afinidad por el al menos un compuesto magnético y/o por el al menos un compuesto inorgánico de silicato (ligando). Se llevan a cabo medidas del punto isoelectrónico en estas partículas.

20 Tabla 3: Detalle experimental del recubrimiento de magnetita/compuestos inorgánicos de silicato con compuestos que tienen afinidad por el al menos un compuesto magnético y/o por el al menos un compuesto inorgánico de silicato

	Partícula de magnetita portadora		Compuestos que tienen afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato (ligando)		Relación molar Fe/ligando	pH Injerto	Bote zeta a pH 7
	Tipo de magnetita	Masa utilizada	Tipo de ligando	Volumen utilizado a 40 mM			
AB1961	Magnetita 100 nm/Ludox® 6% (AB 1760)	30 mg	Pi = ion fosfato	710 µl	6,8%	3,5	nd
AB 1773	Igual	30 mg	PPi = ion pirofosfato	710 µl	6,8%	3,5	nd
AB 1776	Igual	30 mg	PPPi = ion trifosfato	710 µl	6,8%	3,5	nd
KE 492	Igual	30 mg	HEEEPA = ácido 2-(2-(2-hidroxietoxi{etoxi}etilfosfónico)) (Sikemia, Montpellier, Francia)	1420 µl	10%	5,6	nd

	Partícula de magnetita portadora		Compuestos que tienen afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato (ligando)				
	Tipo de magnetita	Masa utilizada	Tipo de ligando	Volumen utilizado a 40 mM	Relación molar Fe/ligando	pH Injerto	Bote zeta a pH 7
AB1837	Igual	30 mg	NTPA Ácido nitrilotris(metileno)trifosfónico (Acros, Geel, Bélgica)	14.2 μ l	0,1%	5,3	
AL 1013	Magnetita 100 nm/Ludox [®] 6% (AL 1001)	30 mg	PPi	875 μ l	8,3%	3	1,5
AB 1774	Magnetita 50 nm/Ludox [®] 6% (AB 1761)	30 mg	PPi	710 μ l	6,8%	3,6	nd
AB 1836	Igual	30 mg	HEEPA	1420 μ l	10%	5,6	nd
AB1777	Igual	30 mg	PPPi	710 μ l	6,8%	3,2	nd
AL 1015	Magnetita 100 nm/bentonita 30% (AL 1014)	37 mg	PPi	1080 μ l	8,3%	3	<1

Conclusión: la medida del punto isoelectrónico muestra que el recubrimiento por dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato apenas modifica la carga de superficie de las partículas. Lo que demuestra que las partículas siguen cargadas negativamente a pH 7.

Ejemplo 4: Medidas de los rendimientos de extracción del ADN y del ARN con partículas magnéticas recubiertas con compuestos inorgánicos de silicatos descritos en el Ejemplo 1

10 A fin de medir las capacidades y los rendimientos de las partículas magnéticas recubiertas con compuestos inorgánicos de silicato, descritas en el Ejemplo 1, para extraer ácidos nucleicos, se ha utilizado el protocolo descrito a continuación con los ácidos nucleicos descritos en la Tabla 4.

15 Tabla 4: Ácidos nucleicos utilizados en el ensayo de extracción de ácidos nucleicos

Ácido nucleico	Nombre del proveedor	Referencia	Tamaño medio
ADN de testículos de salmón	Sigma, San Luis, EE. UU.	D1626-1G	20 Kb
ADN de placenta humana	Fluka, Buchs, Suiza	31167	20 Kb
ARN humano de células MRC2	R&D Biotech, Besançon, Francia		2-4 Kb

Medida del rendimiento de captura

20 1- Se prepara en un microtubo de polipropileno de 1,5 ml la siguiente disolución:

25 a- 100 μ l de cloruro de guanidinio (GuHCl) 8M amortiguado con Tris HCl al 50 mM pH 7 (pH medido rigurosamente antes de la manipulación)

b- 30 μ l de Tris HCl al 100 mM pH 7

30 c- 20 μ l (20 μ g) de la disolución de ácidos nucleicos a 1 mg/ml en 50 mM de Tris HCl pH 7 (en el caso del ADN) o a 1 mg/ml en agua en el caso del ARN.

d- Mezclar por vórtice.

2- Se añaden extemporáneamente 50 μ l de las partículas preparadas en el Ejemplo 1 descrito anteriormente a 50 mg/ml en agua (2,5 mg). Las condiciones finales son: 100 μ g/ml de ácidos nucleicos para 2,5 mg de partículas en 200 μ l de GuHCl 4M, Tris HCL 45 mM pH 7).

5 3- La mezcla deja agitar en un agitador (Thermomixer, Eppendorf, Le Pecq, Francia) a 1000 rpm a 25°C durante 15 min.

4- Se realiza una medida de la densidad óptica DO a 260nm.

10 5- Después de la imantación, se extraen 1,7 μ l del sobrenadante de la suspensión que se analizan por espectrofotometría UV a 260 nm con la ayuda de un Nanodrop (ThermoScientific, Waltham, USA) a fin de determinar la concentración en ácido nucleico.

15 6- Se compara la concentración de ácidos nucleicos de la disolución con la de una disolución de referencia, disolución de partida, llevada a cabo sin partículas a fin de medir el rendimiento de captura:

$$\text{Rendimiento de captura a 15 min} = \frac{\text{DO260 nm inicial} - \text{DO260nm residual (15 min)}}{\text{DO260 nm inicial}}$$

Medida del rendimiento de elución

20 20 Las partículas, en las que se inmovilizan los ácidos nucleicos, se lavan entonces por imantación.

1- Se imanta la suspensión preparada previamente y se desecha el sobrenadante.

25 2- Se añaden 185 μ l de una disolución de GuHCl 4M, Tris HCL 50 mM pH 7. Se imanta y se elimina el sobrenadante, asegurándose por evaluación UV con Nanodrop (ThermoScientific, Waltham, USA) que no contiene ácidos nucleicos.

30 3- Se añaden 185 μ l del amortiguador NucliSENS easyMAG Extraction Buffer 2 (Ref BMX 280131, bioMérieux, Marcy l'étoile, Francia). Se mezcla por vórtice, se imanta y se elimina el sobrenadante, asegurando, mediante evaluación UV con Nanodrop (ThermoScientific, Waltham, USA), que no contiene ácidos nucleicos.

35 4- Se añaden 185 μ l del amortiguador NucliSENS easyMAG Extraction Buffer 3 (ref BMX 280132, bioMérieux, Marcy l'étoile, Francia), se mezcla en vórtice, se imanta y se elimina el sobrenadante, asegurando, mediante evaluación UV con Nanodrop (ThermoScientific, Waltham, USA), que no contiene ácidos nucleicos.

40 5- Se añaden 185 μ l del amortiguador NucliSENS easyMAG Extraction Buffer 3 (ref BMX 280132, bioMérieux, Marcy l'étoile, Francia), se mezcla por vórtice y se incuba a 70°C a 1000 rpm durante 10 min.

45 6- Se imanta y se mide la concentración de ácido nucleico con Nanodrop (ThermoScientific, Waltham, USA) a 260 nm a fin de calcular el rendimiento de elución.

$$\text{Rendimiento de elución a 15 min} = \frac{\text{DO260 nm después de 15 min de elución}}{\text{DO260 nm inicial} - \text{DO260 nm residual (15 min)}}$$

50 45 El protocolo descrito anteriormente permite medir un rendimiento de captura y un rendimiento de elución, basado en lo que se ha capturado, como se representa en las Figuras 4 y 5. Se demuestra así que, con respecto a la magnetita, la captura del ADN está solo ligeramente modificada por el recubrimiento de compuestos inorgánicos de silicato pero que su elución está mejorada de manera remarcable. Por otro lado, no hay modificación de la captura del ARN, y el recubrimiento de compuesto inorgánico de silicato también ayuda en su elución (en menor medida). Este fenómeno se puede generalizar a diversos tipos de compuestos inorgánicos de silicato como se muestra en las figuras.

55 50 Para simplificar, se representa en la Figura 6 el rendimiento total de extracción en ADN o en ARN (multiplicación del rendimiento de captura por el rendimiento de elución como se indica en las Figuras 4 y 5). Así, el simple recubrimiento de la magnetita con compuestos inorgánicos de silicato y siguiendo el protocolo descrito anteriormente constituye por lo tanto en sí mismo una mejora significativa en las propiedades de extracción de ácidos nucleicos de la magnetita.

60 55 **Ejemplo 5: Rendimiento de extracción del ADN y del ARN con partículas magnéticas recubiertas con compuestos que tienen afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato descrito en el Ejemplo 2**

60 60 Experimentos de extracción del ADN y del ARN se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito en el Ejemplo 4 utilizando partículas de magnetita recubiertas únicamente con un compuesto que tiene afinidad por el al menos un compuesto magnético y/o por el al menos un compuesto inorgánico de silicato sintetizado en el Ejemplo 2. La figura 7 (Figuras 7A y 7B) describe las medidas de rendimiento de captura y de rendimiento de elución, se demuestra que, con

respecto a la magnetita, la captura del ADN está totalmente inhibida (Figura 7A) mientras que la captura del ARN no está modificada pero sí que su elución está mejorada de manera remarcable (Figura 7B).

5 Para simplificar, se ha representado también en la Figura 8 el rendimiento general de la extracción de ADN o ARN (multiplicación del rendimiento de captura por el rendimiento de elución) que demuestra de nuevo y todavía en comparación con la magnetita, que la adsorción o captura de compuestos que tienen afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato sobre magnetita mejora drásticamente el rendimiento de extracción del ARN mientras que anula el del ADN.

10 **Ejemplo 6: Rendimiento de extracción del ADN y del ARN con partículas magnéticas de doble recubrimiento descritas en el Ejemplo 3**

15 Experimentos de extracción del ADN y del ARN se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito en el Ejemplo 4 utilizando partículas magnéticas doblemente recubiertas: 1) con al menos un compuesto inorgánico de silicato, y 2) con al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato tal como se sintetizan en el Ejemplo 3. Se utilizaron dos lotes de magnetita, uno compuesto por partículas de 50 nm y el otro de 100 nm. Sorprendentemente, se constató que las partículas doblemente recubiertas dan excelentes resultados (representados en las Figuras 9 y 10) y que permiten extraer mucho mejor el ADN y el ARN que las que están recubiertas una vez (partículas del Ejemplo 1 o 2), los resultados de extracción son mucho mejores que la simple suma de los dos resultados de extracción con los complejos de dos capas de los ejemplos 1 y 2, es decir, las partículas magnéticas recubiertas con el compuesto inorgánico de silicato (Ejemplo 1) y las partículas recubiertas con compuestos que tienen afinidad por el compuesto inorgánico de silicato y/o por el compuesto magnético (Ejemplo 2). La capacidad de captura del ADN se mantiene sustancialmente con respecto a la magnetita, pero la elución está facilitada. En cuanto al ARN, la capacidad de captura está también mantenida, de manera sorprendente, y la elución está muy claramente favorecida.

20 Al final, y como se resume en la Figura 11, estos resultados son remarcables y muestran que los complejos de la invención ofrecen un doble nivel de rendimientos: el recubrimiento con compuestos inorgánicos de silicato permite conservar el beneficio de un buen rendimiento de extracción del ADN mientras aumenta drásticamente el rendimiento de extracción del ARN después de la adsorción de los compuestos que tienen afinidad por el compuesto inorgánico de silicato y/o por el compuesto magnético.

25 Cabe destacar que el recubrimiento de la magnetita con un compuesto que tiene afinidad por el compuesto inorgánico de silicato y/o por el compuesto magnético, cuando los compuestos inorgánicos de silicato se han adsorbido previamente, no disminuye el rendimiento de extracción del ADN mientras que se podría haber esperado esta disminución ya que este es el caso cuando sólo se adsorben los compuestos que tienen afinidad por el compuesto inorgánico de silicato y/o por el compuesto magnético. Además, se observa, de manera clara, que este doble recubrimiento ofrece un efecto sinérgico y cooperativo en la extracción de los ácidos nucleicos ya que da mejores resultados que la suma de los resultados obtenidos con un simple recubrimiento, ya sea con compuestos inorgánicos de silicato o con compuestos que tienen afinidad por el compuesto inorgánico de silicato y/o por el compuesto magnético.

30 **Ejemplo 7: Demostración de la eficacia de partículas de doble recubrimiento (complejo de tres capas) para la extracción de ácidos nucleicos contenidos en una muestra de sangre usando partículas magnéticas de doble recubrimiento como se describe en el Ejemplo 3**

35 El aparato de extracción de ácido nucleico easyMAG® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) se ha utilizado para ensayar las partículas magnéticas de doble recubrimiento (complejo de tres capas) preparadas en el Ejemplo 3 en cuanto a sus capacidades para extraer ácidos nucleicos contenidos en las células blancas de una muestra de sangre. Para ello se utilizó el siguiente protocolo:

- 40 1- Se añaden 200 µl de sangre a 2 ml de amortiguador de lisis (NucliSENS lysis buffer BMX 200292, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia)
- 45 2- La muestra se somete a una mezcla por vórtice durante unos segundos y después se deja reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 50 3- Se añaden 50 µl de partículas magnéticas a 50 mg/ml en agua a la disolución preparada en el Ejemplo 3, es decir 2,5 mg, y se mezcla inmediatamente por vórtice durante 5 segundos.
- 55 4- La suspensión se incuba en reposo durante 10 min sin agitación antes de ser transferida a un vehículo easyMAG® en el que se lavarán las partículas magnéticas antes de eluir los ácidos nucleicos,
- 60 a. Brevemente, las partículas se lavan en el autómata con unos pocos ml de amortiguador NucliSENS easyMAG Extraction Buffer 1 (Ref BMX 280130, bioMérieux, Marcy l'étoile, Francia))

- b. Después se recogen con unos pocos ml de una disolución de etanol al 70%
- c. Finalmente, la elución se lleva a cabo con 50 μ l de amortiguador NucliSENS easyMAG Extraction Buffer 3 (ref BMX 280132, bioMérieux, Marcy l'étoile, Francia) a 70°C durante 5 minutos.
- 5 5- La calidad de los ácidos nucleicos extraídos se evalúa entonces midiendo la absorción del eluato entre 220 y 750 nm (Nanodrop, Thermo Fischer Scientific, USA)

10 **Ejemplo 7A:**

15 Se demuestra en los espectrofotogramas a continuación dados en la Figura 12 que la calidad y la cantidad de los ácidos nucleicos extraídos aumentan con el complejo de tres capas (también denominado partículas que tienen un recubrimiento doble) de manera remarcable. La magnetita (AB 930, 100 nm) casi no extrae ácido nucleico, la magnetita/Ludox® 6% (AB1760) extrae 3 veces más ácidos nucleicos (relación 260/280 = 1,9) no obstante con una relación 260/230 de 1,1 que indica una contaminación en sales. La magnetita/Ludox® 6%/PPi 6,8% (AB 1773) vuelve a extraer 4 veces más ácidos nucleicos pero esta vez de excelente calidad ya que la relación 260/280 es igual a 2,1 y la relación 260/230 es igual a 1,7.

20 Conclusión: Esto demuestra el efecto beneficioso y cooperativo del complejo de tres capas en la extracción de ácidos nucleicos a partir de una muestra compleja tal como la sangre.

25 **Ejemplo 7B:**

30 Otro lote de magnetita (AB 1757, 50 nm) también se recubrió con pirofosfato (= KE220) o nanopartículas de silicato Ludox® hasta 6% (= AB 1761). El producto AB1761 se recubrió entonces con 6,8% de PPi (AB 1774) o 6,8% de PPi (AB 1777). Estas partículas se usaron entonces para extraer ácidos nucleicos de una muestra de sangre tal como se describió anteriormente. Los resultados en la Figura 13 muestran de nuevo claramente el aumento de la eficacia de captura de ácido nucleico y de elución con purezas remarcables de 260/280. También cabe señalar que la capacidad de extracción de ácidos nucleicos es más importante debido a que las partículas son más pequeñas. También cabe señalar que la magnetita recubierta solo con ligandos de hierro (KE220) da muy malos resultados de extracción mostrando aún más claramente el efecto cooperativo de los dos tipos de recubrimiento (compuesto inorgánico de silicato + compuesto que tiene afinidad por el al menos un compuesto magnético y/o el al menos un compuesto inorgánico de silicato).

35 Conclusión: Se muestra bien con este ejemplo que existe un efecto sinérgico de los dos recubrimientos sobre la partícula magnética (complejo de tres capas según la invención) y esto para la extracción de ácidos nucleicos a partir de la sangre. Además, se muestra que varios tipos de complejos según la invención pueden dar resultados muy eficaces.

40 **Ejemplo 7C:**

45 Otro lote de magnetita (FSC 419, 50 nm) también se recubrió con nanopartículas de silicato Ludox® hasta 6% (= AL 1001). El producto AL 1001 se recubrió entonces con 6,8% de PPi 6,8% (AL 1013). Estas partículas se usaron después para extraer ácidos nucleicos de una muestra sanguínea tal como se describe anteriormente. Los resultados de la Figura 14 muestran de nuevo claramente el aumento de la eficacia de estas partículas según la invención en la extracción de ácidos nucleicos con purezas remarcables de 260/280. De nuevo, está claro que la extracción de ácidos nucleicos está potenciada cuando el complejo es de tres capas. En efecto, con complejos de dos capas (magnetita/PPi o magnetita/Ludox), la extracción es mucho menos buena. No era en absoluto previsible que el complejo de tres capas según la invención diera incluso mejores resultados de extracción que la suma de los resultados obtenidos para cada uno de los complejos de dos capas.

50 **Ejemplo 7D:**

55 El mismo lote de magnetita (FSC 419, 50 nm) también se recubrió con nanopartículas de silicato de bentonita hasta un 30% (= AL 1014). El producto AL 1014 se recubrió entonces con PPi al 6,8% (AL 1015). Estas partículas se usaron después para extraer ácidos nucleicos de una muestra sanguínea tal como se describe anteriormente. Los resultados de la Figura 15 muestran de nuevo claramente el aumento de la eficacia de las partículas de la invención (complejo de tres capas) en la extracción de ácidos nucleicos con purezas remarcables de 260/280. Cabe señalar que las partículas de AL 1014 simplemente recubiertas con bentonita no son eficaces para extraer los ácidos nucleicos con una buena pureza (relación 260/280 = 1,1 solamente, lo que indica una muy alta contaminación proteica, tal como se visualiza en el espectro UV de la Figura 15). Por otra parte, el recubrimiento de estas partículas (complejo de dos capas) con pirofosfato PPi mejora considerablemente la extracción (relación 260/280 = 1,7), lo que muestra de nuevo el fenómeno de cooperación y sinergia que aporta el doble recubrimiento para formar el complejo de tres capas de la invención.

Ejemplo 8: Amplificación y detección por PCR en tiempo real de ácidos nucleicos del citomegalovirus (CMV) extraídos de una muestra de sangre por complejos de tres capas según la invención (partículas tales como se describen en el ejemplo 3).

- 5 El autómata de extracción de ácidos nucleicos easyMAG® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) así como el kit de cuantificación de PCR en tiempo real CMV R-gen (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) se usaron para ensayar los complejos de tres capas según la invención (partículas magnéticas recubiertas dos veces preparadas en el Ejemplo 3) en cuanto a sus capacidades para extraer ácidos nucleicos a partir de una muestra de sangre, y la capacidad de estos ácidos nucleicos extraídos para ser amplificados después. Para ello se utilizó el siguiente protocolo:
- 10 1. Se añaden 200 μ l de sangre contaminada por la adición de un cultivo viral de citomegalovirus (CMV producido a partir de CMV Towne, ATCC VR-977) a 2 ml de amortiguador de lisis (NucliSENS lysis buffer BMX 200292, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia)
- 15 2. Se añaden 10 μ l de disolución de control de extracción e inhibición (IC2, contenida en el kit de cuantificación CMV R-gene® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia)) en el tubo de amortiguador de lisis que contiene la muestra de sangre.
- 20 2' En paralelo, en otros tubos, se llevan a cabo intervalos de control de 10^{e3} a 10^{e6} copias del CMV.
- 25 3. La muestra se somete a una mezcla por vórtice durante unos segundos y después se deja reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
4. A la disolución preparada en el Ejemplo 3, se le añaden 50 μ l de partículas magnéticas a 50 mg/ml en agua, es decir 2,5 mg, y se agita por vórtice inmediatamente durante 5 segundos.
- 25 5. La suspensión se incuba en reposo durante 10 min sin agitación antes de transferirla a un vehículo easyMAG® en el que se lavarán las partículas magnéticas antes de eluir los ácidos nucleicos.
- 30 a. Brevemente, las partículas se lavan en el autómata con unos pocos ml de amortiguador NucliSENS easyMAG Extraction Buffer 1 (Ref. BMX 280130, bioMérieux, Marcy l'étoile, Francia))
- 35 b. Despues, se recoge con unos pocos ml de una disolución de etanol al 50%,
- c. La elución se lleva a cabo finalmente con 50 μ l de amortiguador NucliSENS easyMAG Extraction Buffer 3 (ref BMX 280132, bioMérieux, Marcy l'étoile, Francia) a 70°C durante 5 minutos.
- 40 6- El ADN del CMV extraído se amplifica y cuantifica entonces utilizando el protocolo y los reactivos del kit de cuantificación CMV R-gene® en un termociclador BIO-RAD CFX-96 (BioRAD, Hercules, California).
- 45 Conclusión: Se demuestra, en la Figura 16, que el ADN del virus CMV (curvas con círculo) se amplifica con mejor sensibilidad en el caso de la utilización del complejo de tres capas según la invención (la partícula recubierta dos veces AL1013 (magnetita/Ludox 6% peso/peso/PPi 6,8%)) con respecto al uso de la partícula simplemente recubierta AL 1001 magnetita/Ludox 6% peso/peso) con, respectivamente, un Cq avanzado a 33,7 frente a un Cq de 35,5 en el caso de la amplificación de ácidos nucleicos extraídos con las partículas de magnetita recubiertas únicamente con Ludox® 6%. Es exactamente lo mismo para la amplificación de los ácidos nucleicos retenidos por otro complejo según la invención (las partículas recubiertas dos veces: AL1015 (magnetita/bentonita 30%/PPi 6,8%)). También se observa una amplificación detectada con mucha más sensibilidad (Cq = 34,8), mientras que usando solo un complejo de dos capas, es decir, las partículas AL 1014 (AL 1014 magnetita/bentonita 30%), no se observa amplificación.
- 50 50 En cada gráfico se observan 4 curvas sin círculo que corresponden a las curvas observadas con la ampliación de los intervalos de control que contienen 10^{e3} a 10^{e6} copias del CVMS.
- 55 Se muestra de nuevo el efecto muy ventajoso, incluso sinérgico, del recubrimiento doble sobre el compuesto magnético para formar los complejos de tres capas según la invención.
- Cabe señalar que la magnetita por sí sola en estas condiciones de uso no es el origen de ninguna amplificación/detección del virus CMV.
- 60 Referencias bibliográficas
- Rapid and simple method for purification of nucleic acids, Boom, Journal of Clinical Microbiology, 1990 p495
- Magnetic particles for the separation and purification of Nucleic acids, S. Berensmeier, Applied Microbial Biotechnology 2006 73 495-504

- The use of magnetic nanoparticles in the development of new molecular detection systems, I. J. Bruce, Journal of Nanosciences and nanotechnology
- 5 - Optimization of influencing factors of nucleic acid adsorption onto silica-coated magnetic particles: Application to viral nucleic acid extraction from serum, Ning Sun and al., Journal of Chromatography A, 1325 (2014) 31-39
- Stability constants of metal-ion complexes, Lars Gunnar Sillén y Arthur Earl Martell, Edition 1971, Chemical Society,
- 10 - G Pourroy, Chem. Comm. 2010 46 985-987
- G Pourroy, Chem. Mater., 2008, 20 (18), pp 5869-5875
- Isolation of genomic DNA using magnetic cobalt ferrite and silica particles, B.Rittch, J. of Chromatography A, 2004, 43-48
- 15 - Ferrite supports for the isolation of DNA from complex samples and polymerase chain reaction amplification, D. Horak, J. of Chromatography A, 2005, 93-98
- T. Sugimoto and E. Matjevic, Journal of Colloids and Interface Science, 1980, 74, P227-243
- 20 - R. Massart, IEEE Trans. Magn. 1981, 17, p1247-1248
- Maity, Journal of Magnetic Materials 321 1256 (2009)
- 25 - The Influence of Particle Size, Shape and Particle Size Distribution on Properties of Magnetites for the Production of Toners, Journal of Imaging Science and Technology, November/December 2000, vol. 44, no. 6; p. 508-513
- W. Stöber, Journal of Colloids and Interface Science 1968, 26, p62-69

REIVINDICACIONES

1. Complejo de tres capas que comprende:

- 5 - una primera capa que comprende al menos un compuesto magnético,
- una segunda capa que recubre parcialmente la primera capa y que comprende al menos un compuesto inorgánico de silicato,
- 10 - una tercera capa que recubre al menos parcialmente la segunda capa y que comprende al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato, escogido de ácido cítrico y sus sales, iones fosfatos, pirofosfatos, trifosfatos, o polifosfatos, ácidos fosfónicos, fosfonatos, fosfonatos o ácidos fosfónicos acoplados a moléculas orgánicas, compuestos de la familia de los ácidos fosfóricos, sulfonatos, compuestos de la familia de los detergentes y/o compuestos de la familia de los ácidos carboxílicos.
- 15 2. Complejo de tres capas según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho al menos un compuesto magnético se escoge metales y óxidos metálicos.
- 20 3. Complejo de tres capas según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que dicho compuesto magnético se escoge de magnetita, maghemita y ferritas.
- 25 4. Complejo de tres capas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato se escoge de silicatos, silicatos de magnesio o de sodio o de potasio o de litio o de calcio, talco, aluminosilicatos, caolín, bentonita, nanopartículas de sílice de entre 0,1 y 20 nm, preferentemente de entre 1 nm y 20 nm, nanopartículas de sílice mesoporosas, nanopartículas magnéticas recubiertas de sílice, nanopartículas de sílice citadas anteriormente, cuya sílice está unida a grupos orgánicos o inorgánicos.
- 30 5. Complejo de tres capas según la reivindicación 4, caracterizado por que dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato está constituido de bentonita o de nanopartículas de sílice de entre 0,1 nm y 20 nm, preferiblemente de entre 1 y 20 nm.
- 35 6. Complejo de tres capas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato está en forma particular tales como un grano, una lámina, una fibra, una aguja, una nanopartícula, etc., preferiblemente en forma nanoparticular, o en forma insoluble en un disolvente acuoso, una mezcla disolvente acuoso-disolvente orgánico o un disolvente orgánico.
- 40 7. Complejo de tres capas según la reivindicación 6, caracterizado por que las partículas o formas insolubles del compuesto inorgánico de silicato tienen un tamaño comprendido entre 0,1 y 20 nm, preferentemente entre 1 nm y 20 nm, preferiblemente entre 2 y 10 nm, aún más preferentemente entre 6 y 8 nm.
- 45 8. Complejo de tres capas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato es de naturaleza orgánica.
- 50 9. Complejo de tres capas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato es de naturaleza inorgánica.
- 55 10. Complejo de tres capas según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato está constituido de monofosfatos, pirofosfatos y/o trifosfatos.
11. Complejo de tres capas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que también comprende un soporte sólido bajo todo o parte de la primera capa.
12. Complejo según la reivindicación 11, caracterizado por que el soporte es un soporte plano, un soporte hueco, una oblea, una aguja, una membrana, una placa, un cono, un tubo, una bola, una partícula, preferentemente una partícula.
- 60 13. Complejo de tres capas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el complejo está en forma de partícula, y por que dicha tercera capa se sitúa en el exterior de la partícula.
14. Complejo según la reivindicación 13, caracterizado por que la primera capa constituye el núcleo de la partícula y tiene un tamaño comprendido entre 2 y 400 nm, preferentemente entre 50 y 100 nm.

15. Método para preparar al menos un complejo de tres capas como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende al menos las siguientes etapas:

5 a0) eventualmente, poner en contacto un soporte tal como se define en la reivindicación 12 con al menos un compuesto magnético tal como se define en la reivindicación 2 o 3 de manera que al menos un compuesto magnético se fija o se une al soporte,

10 a) poner en contacto el resultado de la etapa a0) o al menos un compuesto magnético tal como se define en la reivindicación 2 o 3 con al menos un compuesto inorgánico de silicato tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, de tal manera que una interacción electrostática y/o un enlace covalente y/o un enlace de coordinación se produce entre dicho al menos un compuesto magnético y dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato, y de tal manera que la capa de dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato recubre parcialmente la capa de dicho al menos un compuesto magnético,

15 b) poner en contacto el resultado de la etapa a) con al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, preferiblemente en un medio acuoso, de manera que dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato adhiere y se posiciona por encima de la capa de dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato del complejo de dos capas, con o sin soporte.

20 16. Método de preparación de un complejo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende al menos las siguientes etapas:

25 a) poner en contacto al menos un compuesto magnético tal como se define en la reivindicación 2 o 3 con al menos un compuesto inorgánico de silicato tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, encontrándose dicho compuesto inorgánico de silicato ya en forma particular, nanoparticular o en forma insoluble, de manera que se produce una interacción electrostática y/o un enlace covalente y/o un enlace de coordinación entre dichos al menos dos compuestos y que las partículas o formas insolubles recubren parcialmente la partícula de al menos un compuesto magnético que constituye el núcleo,

30 b) poner en contacto la partícula recubierta obtenida al final de la etapa a) con al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, preferentemente en un medio acuoso, de manera que se produce una interacción electrostática y/o un enlace covalente y/o un enlace de coordinación entre dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato y/o dicho al menos un compuesto magnético y dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato del complejo de dos capas obtenido al final de la etapa a) o dicho al menos un compuesto magnético del complejo de dos capas obtenido al final de la etapa a), y dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato y/o dicho al menos un compuesto magnético se adhiere a la superficie de dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato o al núcleo de la partícula final.

35 17. Método de purificación de microorganismos y/o biomoléculas, o de extracción de biomoléculas, preferentemente de ácidos nucleicos, a partir de una muestra, en el que se usa al menos un complejo tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o tal como se obtiene según una cualquiera de las reivindicaciones 15 y 16.

40 18. Método de detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos diana a partir de una muestra susceptible de contener dichos ácidos nucleicos diana, que comprende las siguientes etapas:

45 50 1. extraer los ácidos nucleicos de una muestra llevando a cabo el método tal como se define en la reivindicación 17,
2. detectar y/o cuantificar los ácidos nucleicos diana mediante técnicas convencionales de detección y/o cuantificación.

55 55 19. Método para detectar y/o cuantificar ácidos nucleicos diana según la reivindicación 18, caracterizado por que, entre la etapa de extracción y la etapa de detección de ácidos nucleicos, existe una etapa de elución de los ácidos nucleicos del complejo utilizado en la etapa 1) y/o una etapa de amplificación de los ácidos nucleicos por técnicas convencionales.

60 60 20. Método de lisis de microorganismos y/o células y/o tejidos, a partir de una muestra, caracterizado por que consiste en poner en contacto al menos una muestra con al menos un complejo tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, y en el que dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato y/o dicho al menos un compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato comprende al menos un agente de la familia de los detergentes que permite la lisis.

21. Método según la reivindicación 20, en el que dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato comprende nanopartículas de sílice de entre 0,1 nm y 20 nm, preferentemente de entre 1 nm y 20 nm, de las cuales la sílice está unida a al menos una saponina y/o el compuesto que tiene afinidad por dicho al menos un compuesto magnético y/o por dicho al menos un compuesto inorgánico de silicato se escoge de dopamina y sus derivados, catecoles y sus derivados, ácidos fosfónicos, fosfonatos, fosfatos y compuestos de la familia de los ácidos carboxílicos (preferentemente el ácido cítrico y sus sales) acoplados a al menos una saponina.

5 22. Kit de diagnóstico molecular que comprende al menos un complejo tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

10 23. Kit de diagnóstico molecular según la reivindicación 22, que comprende además:

- reactivos que permiten la amplificación específica de los ácidos nucleicos susceptibles, o que se sospeche, de estar contenidos en la muestra a ensayar, y/o

15 - reactivos que permiten la detección y/o la cuantificación de los ácidos nucleicos susceptibles, o que se sospeche, de estar contenidos en la muestra a ensayar.

Figura 1

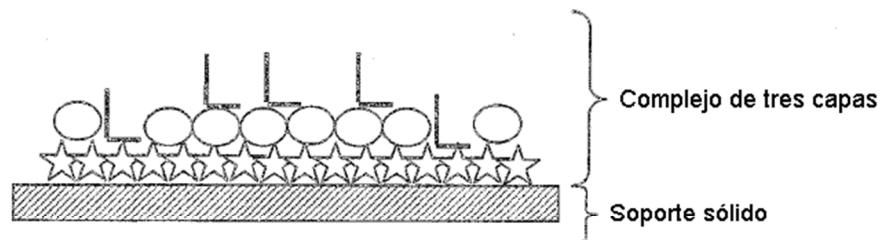


Figura 2

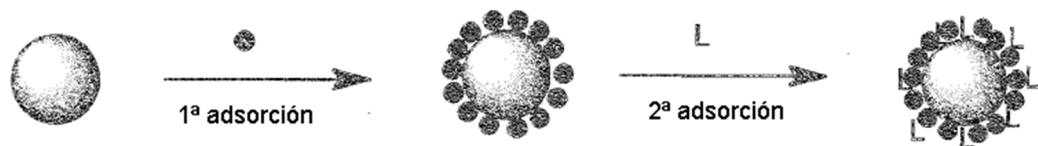


Figura 3

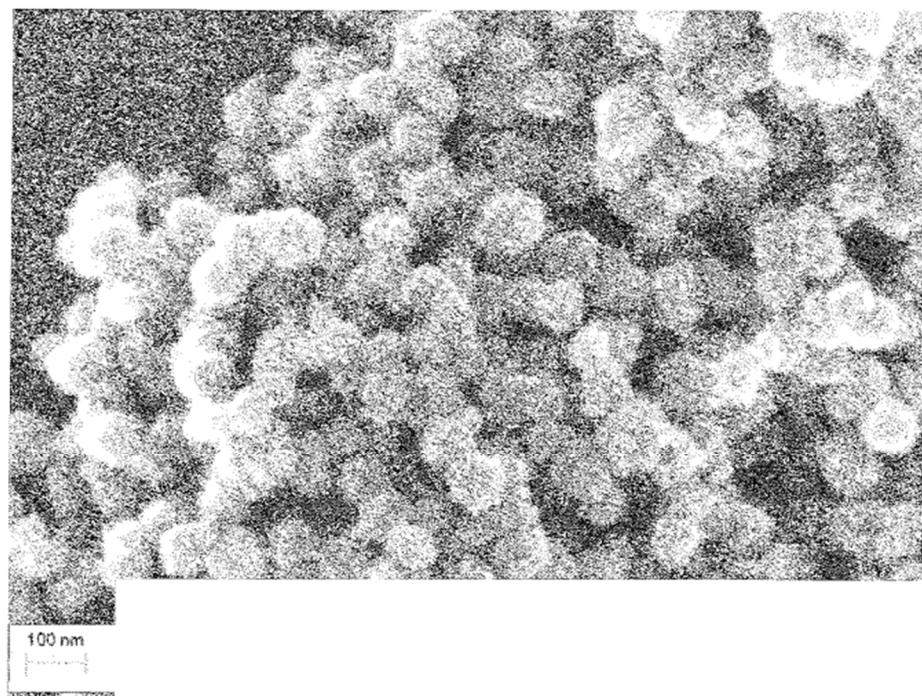


Figura 4

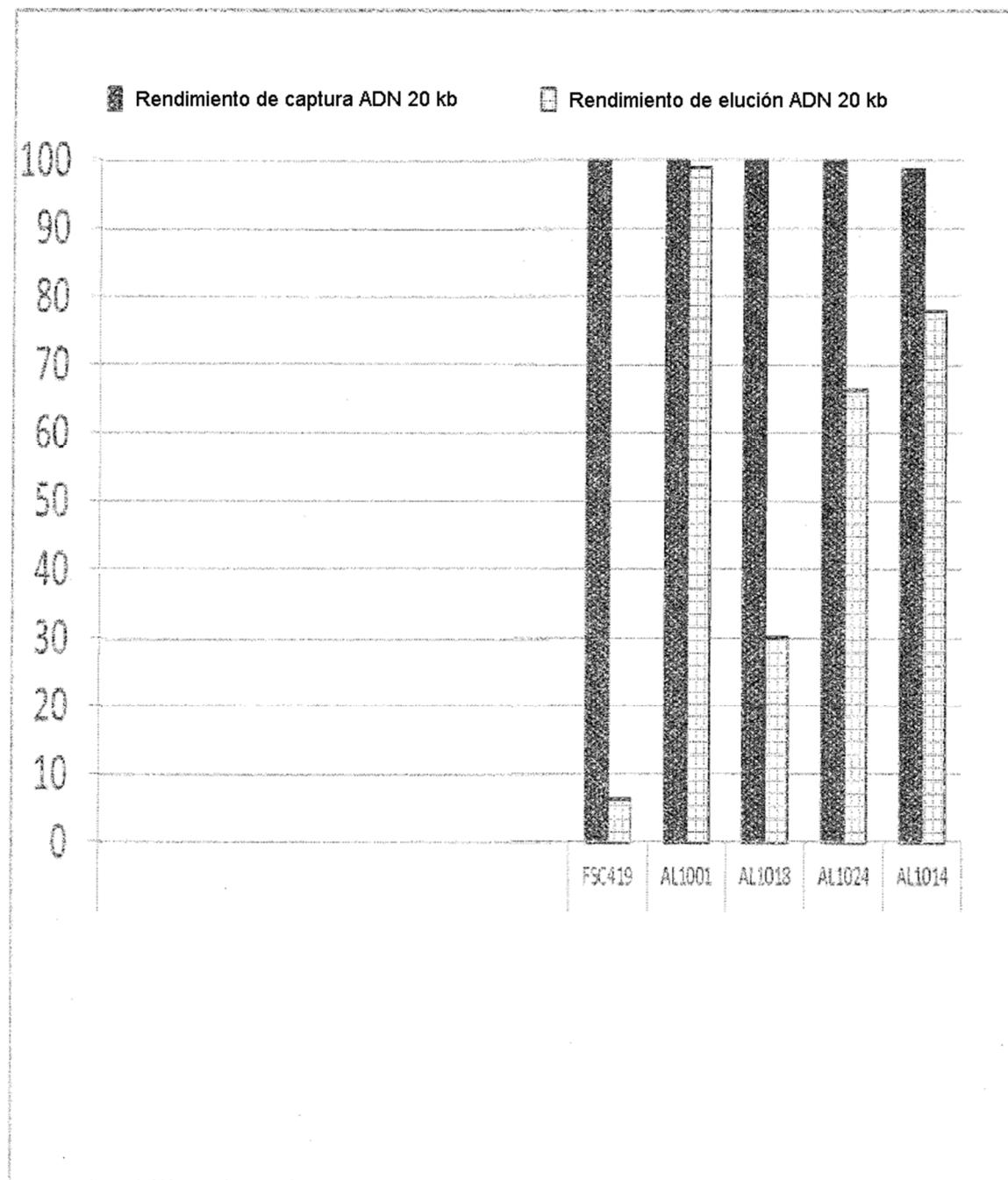


Figura 5

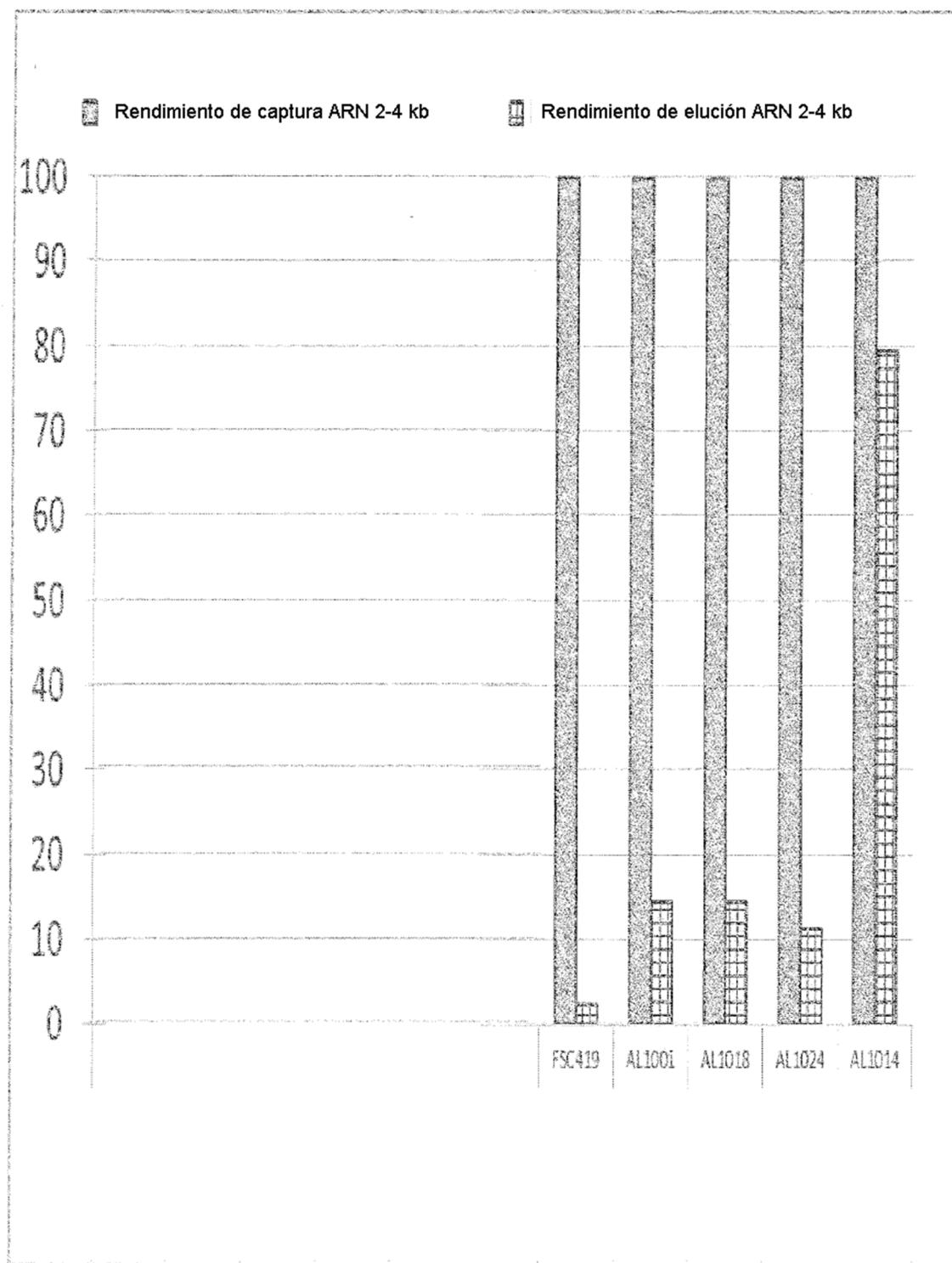
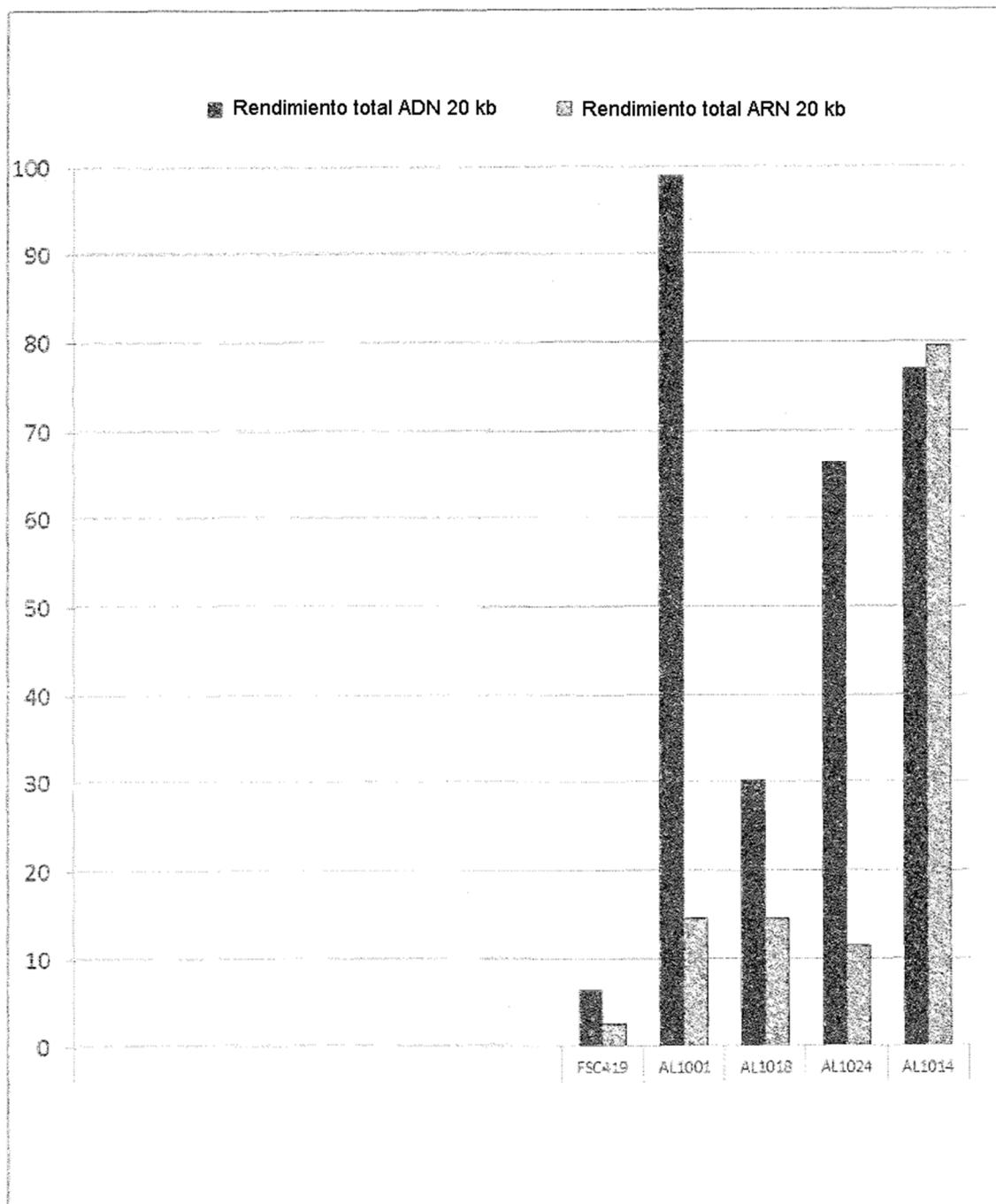


Figura 6



ES 2 913 199 T3

Figura 7A

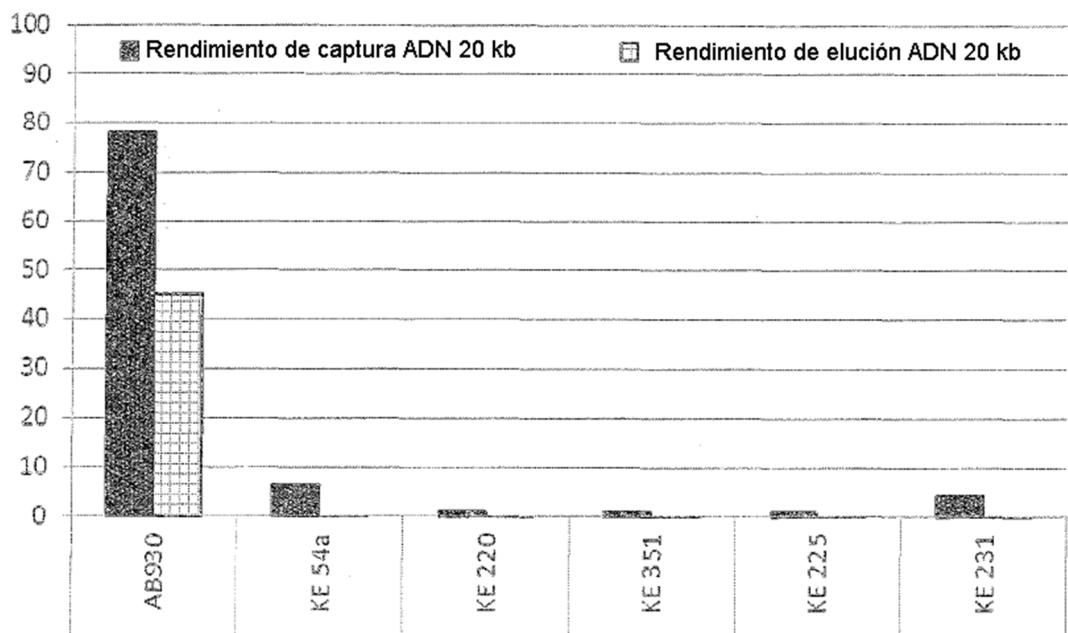


Figura 7B

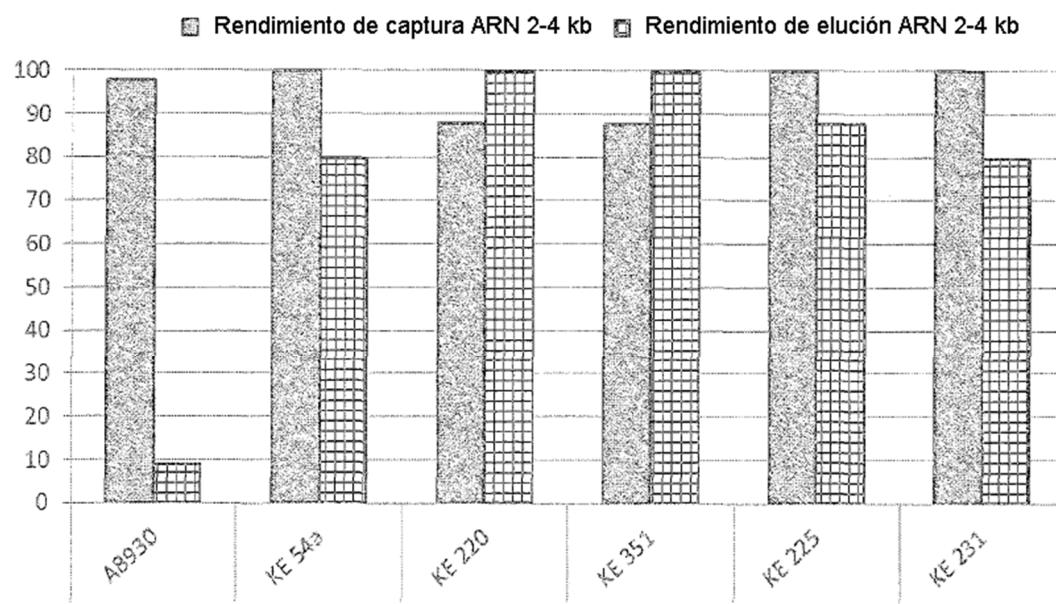
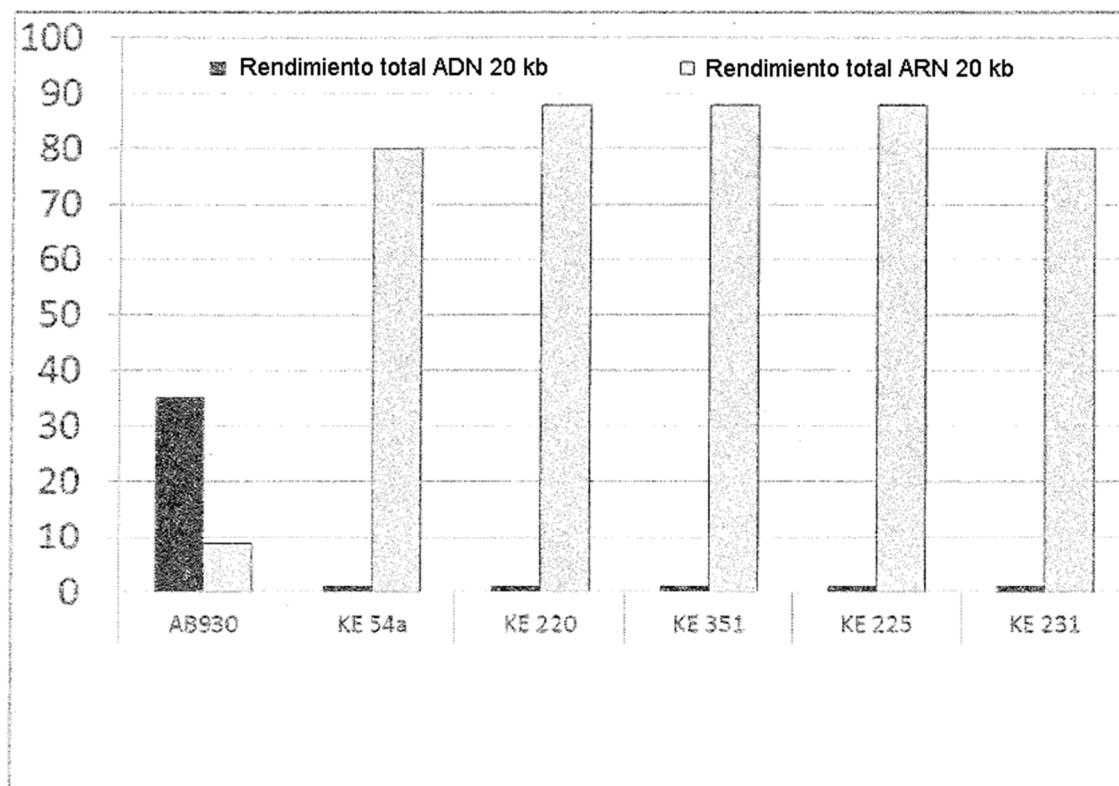
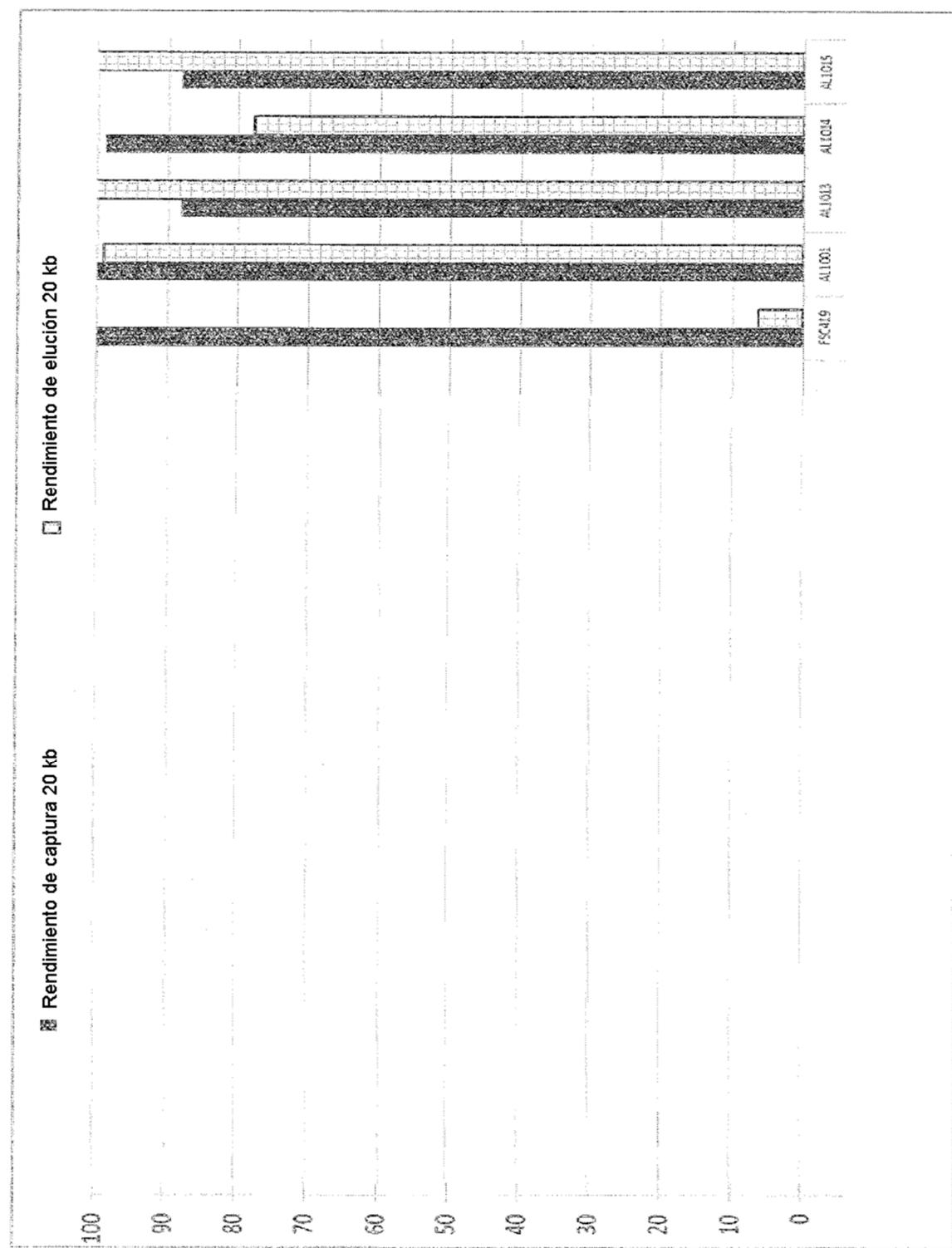


Figura 8



ES 2 913 199 T3

Figura 9



ES 2 913 199 T3

Figura 10

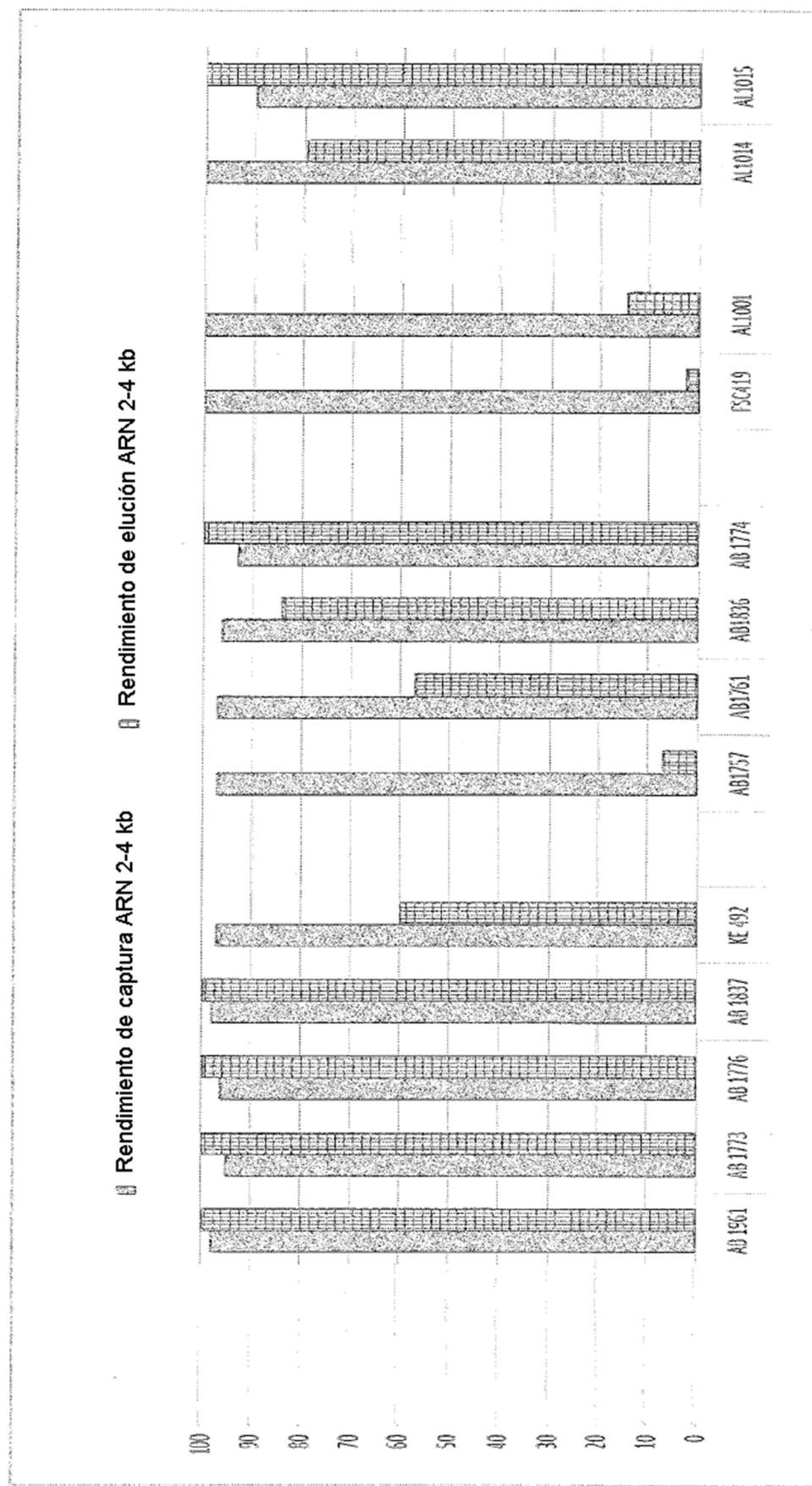


Figura 11

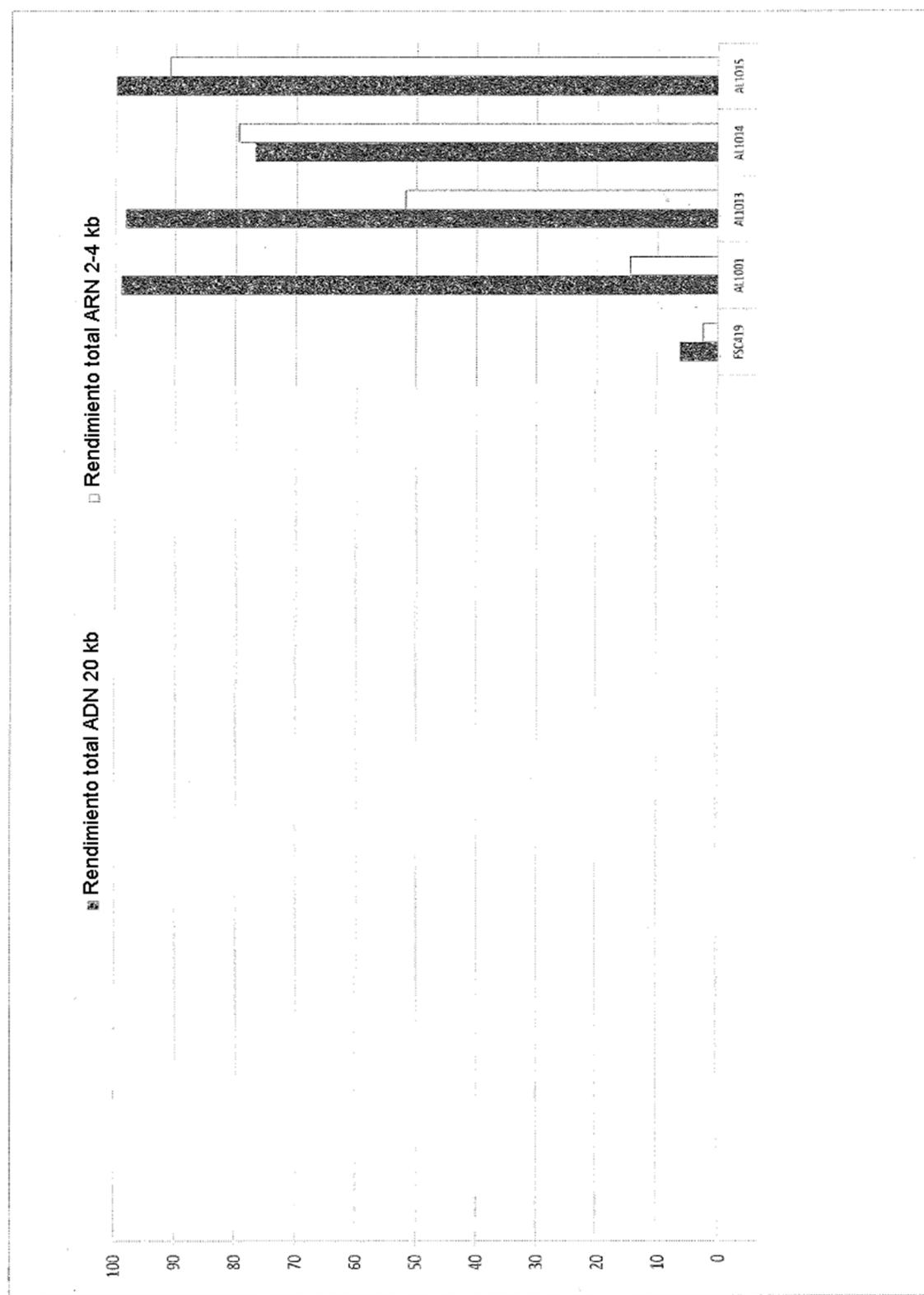


Figura 12

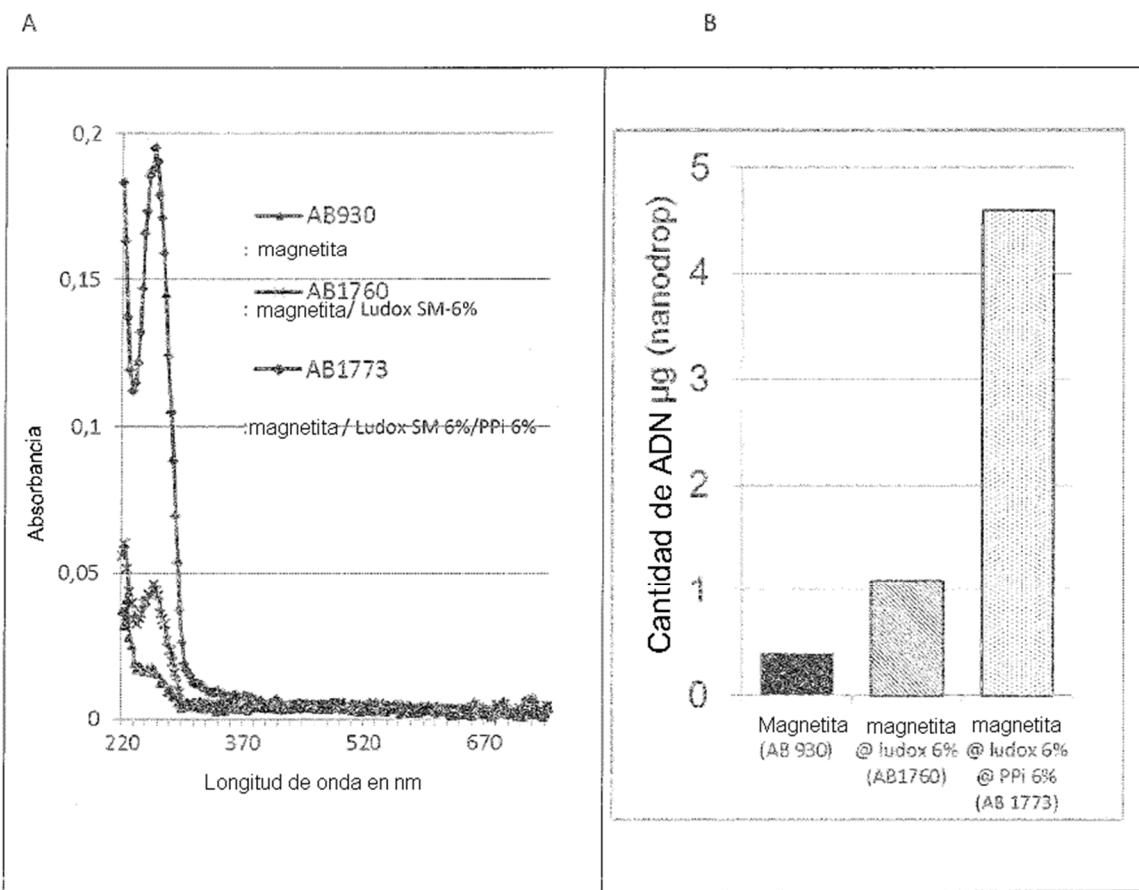


Figura 13

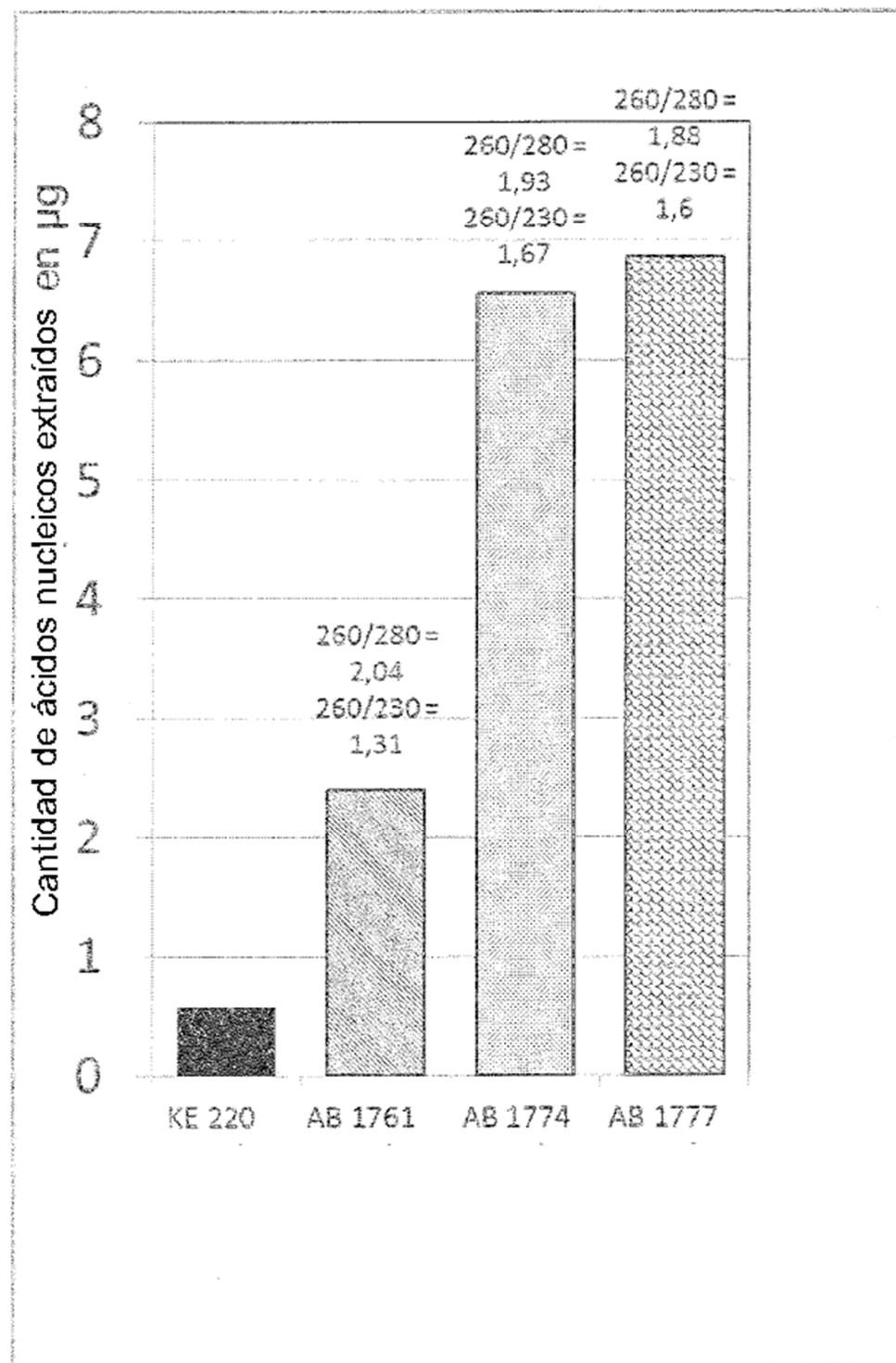
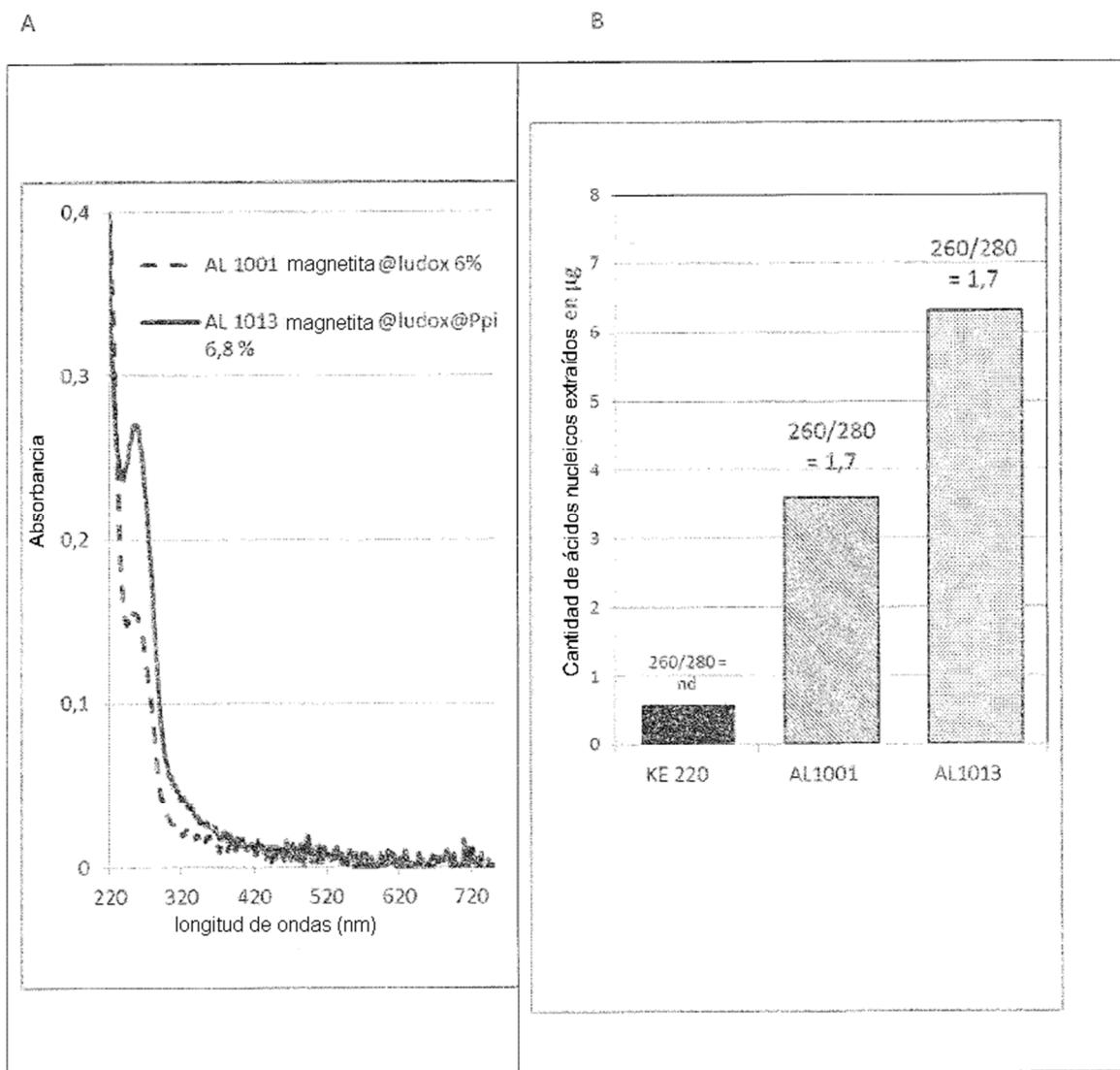


Figura 14



ES 2 913 199 T3

Figura 15

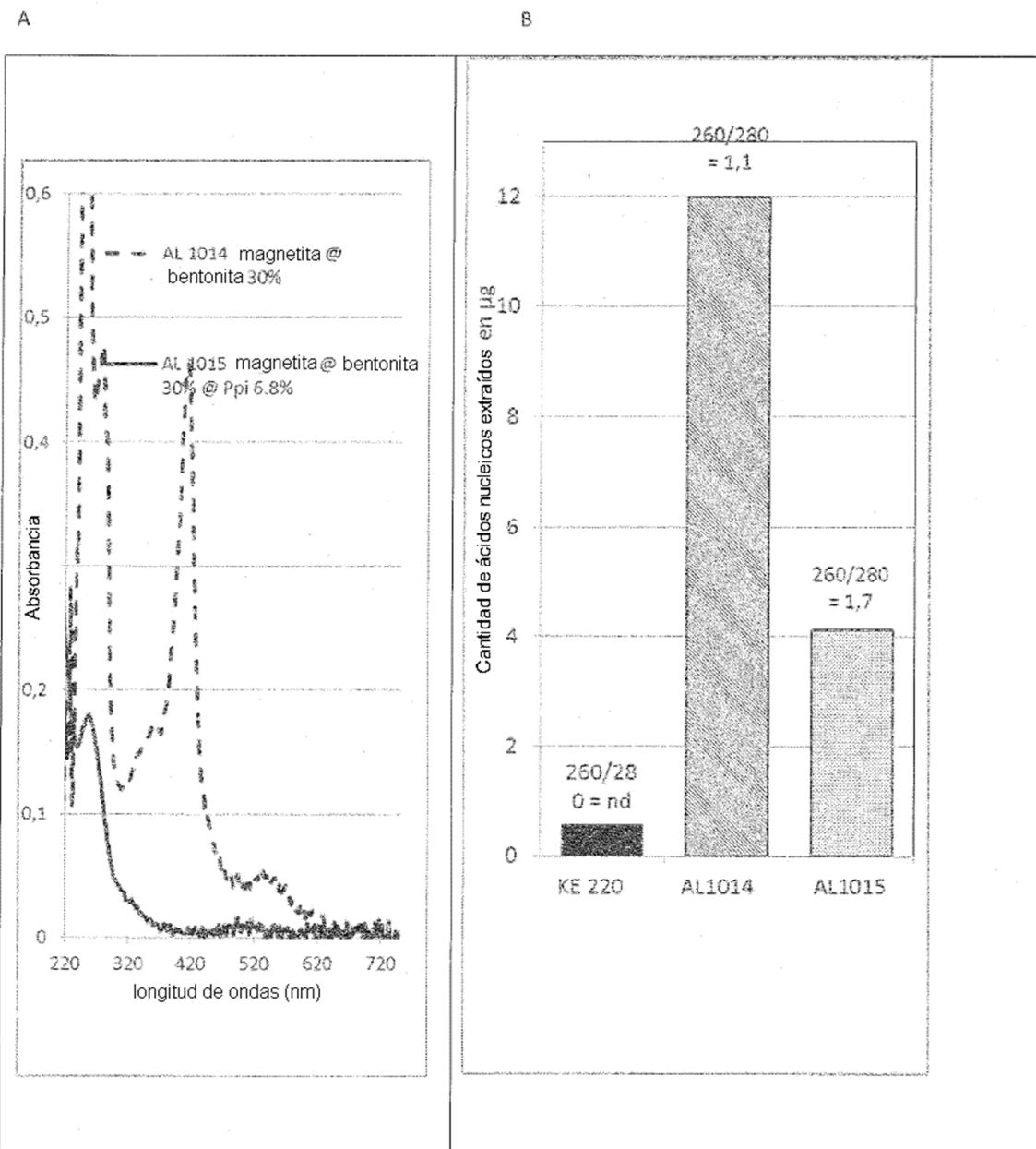


Figura 16

