

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 335**

51 Int. Cl.:

C08J 3/14 (2006.01)
B03C 1/01 (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)
C08K 3/22 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
H01F 1/44 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12Q 1/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2013 PCT/EP2013/002145**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014 WO14015966**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2013 E 13740211 (1)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2875066**

54 Título: **Micropartículas de alcohol de polivinilo, esféricas, magnetizables, procedimiento para su fabricación y uso de las mismas**

30 Prioridad:

21.07.2012 DE 102012014536

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.03.2017

73 Titular/es:

**PERKINELMER CHEMAGEN TECHNOLOGIE
GMBH (100.0%)
Arnold-Sommerfeld-Ring 2
52499 Baesweiler, DE**

72 Inventor/es:

**OSTER, JÜRGEN;
SOMMER, THOMAS y
À BRASSARD, LOTHAR**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 607 335 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

5 Micropartículas de alcohol de polivinilo, esféricas, magnetizables, procedimiento para su fabricación y uso de las mismas

La presente invención hace referencia a las micropartículas de alcohol de polivinilo magnetizables, esféricas, que son adecuadas en particular para el procedimiento de detección diagnóstico así como para el aislamiento y la limpieza de biomoléculas. La invención se refiere además al método de fabricación, con el cual se pueden fabricar estas micropartículas a gran escala.

10 Las partículas magnéticas del tipo arriba mencionado se emplean en una multitud de procedimientos diagnósticos o en una investigación biomédica o biológico molecular. En general se trata de partículas esféricas que contienen un material superparamagnético en forma coloidal, que se incrusta en una matriz polimérica o bien está rodeado de una envuelta polimérica. En general estas partículas magnéticas son micropartículas de un tamaño del orden de 1 hasta 20µm.

15 Debido a sus propiedades, sustancias como las biomoléculas o las células pueden enlazarse de forma selectiva o reversible, siendo las micropartículas magnetizables especialmente adecuadas para el uso en procedimientos automatizables. Puesto que las micropartículas magnetizables pueden inmovilizarse colocando un campo magnético, no se precisan etapas de centrifugación para la separación de medios líquidos. Esto facilita la ejecución automatizada incluso en métodos de varias etapas y trae consigo un ahorro considerable de tiempo.

20 Las micropartículas magnetizables de base polimérica, su fabricación y utilización ya se han descrito en el estado de la técnica, por ejemplo en la WO 97/04862 A1 y en los documentos allí citados.

25 La WO 97/04862 A1 informa sobre partículas en forma de perlas o bolitas a base de alcohol de polivinilo, que se han descrito como adecuadas para el fraccionamiento de células, ácidos nucleicos, proteínas, virus o bacterias así como para su uso en inmunoanálisis, para la secuenciación del ADN o la síntesis del ADN.

30 Las partículas descritas en WO 97/04862 A1 presentan una matriz polimérica a base de alcohol de polivinilo, en la cual se encapsulan los coloides magnéticos con tamaños de partícula de 10-200 nm. Las partículas poliméricas en forma de perlas o bolas tienen un tamaño de partícula del orden de 1-10 µm, preferiblemente de 1-4µm.

35 La fabricación de las partículas poliméricas magnetizables descritas en WO 97/04862 A1 se realiza de manera que una solución acuosa de alcohol de polivinilo, en la que se ha dispersado un coloide magnético, se suspende agitando en una fase orgánica no miscible con la fase polimérica (por ejemplo, aceite vegetal), que al menos contiene dos emulgentes. Durante este proceso de suspensión se lleva a cabo una reticulación del alcohol de polivinilo mediante la adición de un reticulante soluble en agua que reacciona con los grupos hidroxilo, por ejemplo el glutaraldehído. Las partículas de alcohol de polivinilo pueden ser modificadas seguidamente para el enlace específico de biomoléculas, por ejemplo mediante la inserción de moléculas espaciadoras, que pueden servir para la unión de las biomoléculas.

40 Sin embargo, se ha demostrado que el método de fabricación descrito en WO 97/04862 A1 y las partículas que se obtienen con el mismo no son del todo una ventaja.

45 Sobre todo resulta problemático el que las partículas poliméricas magnetizables fabricadas conforme a este método conocido presenten una distribución del tamaño de partículas demasiado amplia y la distribución del tamaño de partículas pueda oscilar de lote a lote, es decir, la reproducibilidad de los lotes sea insatisfactoria. Estos valores oscilantes conducen a rendimientos desiguales al utilizar las partículas en el método de separación, de manera que estas partículas no resultan útiles para muchas aplicaciones.

50 A ello se añade que las partículas poliméricas magnetizables fabricadas conforme al método descrito en WO 97/04862 A1 presentan elevados porcentajes de partículas con un tamaño inferior a 0,5µm y con un tamaño superior a 3µm.

55 Las partículas con un tamaño inferior a 0,5µm no presentan una velocidad de separación suficiente o bien movilidad en un campo magnético externo, de manera que para las potencias de campo magnético habitualmente empleadas solamente se pueden separar muy lentamente, lo que es una desventaja para el tiempo total de fabricación. Además existe el riesgo de que éstas estas partículas no se separen o lo hagan muy lentamente y sean arrastradas como impurezas y alteren y falseen las reacciones o mediciones siguientes, por ejemplo, las mediciones UV o las reacciones PCR.

60 Las partículas con un tamaño superior a 3µm tienen el inconveniente de que sedimentan relativamente rápido en el campo gravitatorio, por lo que la capacidad de enlace para las biomoléculas se limita claramente. Por lo

que puede ser necesario contrarrestar la sedimentación mediante las correspondientes medidas (re-dispersión). Además, las partículas poliméricas magnetizables con un tamaño de partículas creciente presentan una superficie global inferior respecto a la masa total o al volumen de suspensión. La consecuencia de ello es un rendimiento reducido en el número de sustancias que se separan (biomoléculas, células). En conjunto el proceso de separación magnético, por ejemplo en la filtración automatizada de ácidos nucleicos, empeora tanto por la presencia de partículas demasiado pequeñas ($<0,5\mu\text{m}$) como también por la presencia de partículas demasiado grandes ($>3\mu\text{m}$).

Además las partículas de alcohol de polivinilo magnetizables fabricadas con el método descrito en WO 97/04862 A1 presentan únicamente un contenido relativamente bajo de material magnetizable (magnetita/óxido de hierro), es decir del orden del 7 al 24% en peso. Esto conduce a unas propiedades de separación de las partículas en el campo magnético insuficientes o insatisfactorias.

Debido a los inconvenientes mencionados respecto al tamaño de las partículas, la distribución del tamaño de partículas y el contenido en magnetita, las partículas poliméricas magnetizables fabricadas conforme al método descrito en WO 97/04862 A1 se utilizarán de forma limitada y en particular serán poco adecuadas para su utilización en procedimientos automatizados de separación y análisis.

Se ha demostrado que es realmente un inconveniente que las partículas poliméricas magnetizables conocidas en la técnica actual actúen de forma inhibitoria al ser empleadas en el método de PCR, de manera que disminuya la sensibilidad de la detección y se vea alterada la exactitud o fiabilidad de las mediciones. Puesto que las técnicas PCR son ampliamente conocidas en la investigación biológico molecular y en el diagnóstico medicinal y es cada vez más importante el uso de micropartículas magnetizables en lo que se refiere a la automatización de estos métodos, es extremadamente insatisfactoria la acción inhibitoria mencionada de las partículas conocidas en la tecnología actual.

Además se ha demostrado que el método de fabricación descrito en la WO 97/04862 A1 no solamente es adecuado para la producción de partículas de alcohol de polivinilo magnetizables a gran escala. En este método conocido el volumen de los preparados reactivos se limita a un máximo de aproximadamente 5,1, y el rendimiento de las partículas poliméricas magnetizables es demasiado bajo. Por lo que no es posible fabricar de forma económica partículas de alcohol de polivinilo magnetizables en grandes cantidades y con las propiedades cualitativas requeridas (en particular con una distribución estrecha del tamaño de partícula).

Teniendo en cuenta los inconvenientes y los requisitos mencionados el cometido de la presente invención consistía en preparar partículas de alcohol de polivinilo magnetizables del tipo antes descrito, que sobre todo se caracterizaran por una distribución del tamaño de partícula del orden de $0,5-3\mu\text{m}$ y permitieran una velocidad de manipulación elevada (es decir un rendimiento elevado), una eficacia mejorada en la separación de las sustancias objetivo (en particular respecto a la pureza del producto) o/y rendimientos elevados, y no causaran ningún efecto inhibitorio en las aplicaciones de la PCR o bien únicamente un efecto inhibitorio ínfimo.

Además el cometido de la presente invención consistía en disponer de un método de fabricación mediante el cual se pudieran fabricar micropartículas magnetizables conforme a la invención, en particular consistentes con el lote. Además la presente invención tenía el cometido de conseguir un método de fabricación mediante el cual se pudieran fabricar micropartículas magnetizables a gran escala y con la distribución del tamaño de partículas indicada, es decir en cantidades de 200 g o más, preferiblemente de 500 g o más, en particular de 1 kg o más, por preparado reactivo.

Los cometidos mencionados antes se resuelven mediante el método de fabricación indicado en las reivindicaciones independientes y las micropartículas de alcohol de polivinilo magnetizables, esféricas, así como mediante las formas de ejecución preferidas o especialmente definidas en las reivindicaciones dependientes y mediante las demás formas de ejecución que se deducen de la posterior descripción. Con las características del método conforme a la invención, en particular en lo que se refiere a su globalidad, se podrán obtener micropartículas magnetizables, esféricas de alcohol de polivinilo con las propiedades de las partículas mencionadas, tal como se aclara a continuación.

El método conforme a la invención, que permite la fabricación de micropartículas esféricas, magnetizables de alcohol de polivinilo con una distribución del tamaño de partícula del orden de $0,5$ a $3\mu\text{m}$ y/o con las propiedades ya mencionadas en la escala de producción (por ejemplo, 200 g por preparado o más), comprende al menos las etapas siguientes:

- (1) Dispersión de un material magnetizable a base de nanopartículas, preferiblemente magnetita, en una fase acuosa, alcohol de polivinilo (PVA) en forma disuelta (solución acuosa de alcohol de polivinilo);
- (2) Adición de esta fase acuosa a una fase orgánica, que no sea miscible con la fase acuosa y contenga al menos un emulgente, y la producción de una emulsión agitando a una temperatura de 40°C o más;
- (3) Adición de al menos una sustancia reticulante soluble en agua, adecuada para la reticulación del alcohol de polivinilo agitando de forma continuada.

Sin que se establezca una teoría determinada se asume que la formación de partículas esféricas, magnetizables de alcohol de polivinilo se realiza de manera que durante la dispersión (etapa (1)) se forman sobre cada una de las partículas de material magnetizable (por ejemplo, magnetita) unas capas delgadas de PVA, evitándose con ello la formación de aglomerados de partículas. En la emulsión fabricada conforme a la etapa (2) la fase acuosa que contiene PVA y las nanopartículas magnetizables, revestidas de PVA, forma junto con la fase orgánica y el emulgente una emulsión con micelas esféricas. Mediante la reticulación (etapa (3)) se estabilizan las nanopartículas por medio del acoplamiento covalente de muchas cadenas de PVA a la superficie de partículas.

En particular debido a la elevada temperatura de emulsión (etapa (2), 25°C o superior) disminuye la formación de partículas con un tamaño de partícula demasiado pequeño (en particular <0,5 µm) y se desplaza el máximo del tamaño a partículas más grandes; las partículas resultantes presentan con ello una relación óptima de magnetizabilidad (y separación) respecto a la capacidad superficial y al comportamiento de la sedimentación. Además mediante el procedimiento conforme a la invención se consigue un encapsulado más eficiente del material magnetizable en nanopartículas en la capa de alcohol de polivinilo; el resultado de ello es la reducción o ausencia mencionada de efectos inhibidores.

Las partículas que se obtienen con el método conforme a la invención son básicamente esféricas, es decir en forma de bolitas o de perlas, como se puede ver a la luz del microscopio, debido al método de fabricación anteriormente descrito.

La denominación "magnetizable" significa que las partículas son magnetizadas de manera que por el efecto de un campo magnético externo son atraídas y por ejemplo pueden ser separadas de un medio líquido. Al desconectar o desactivar el campo magnético las partículas quedan suspendidas de nuevo, es decir las partículas deberían presentar preferiblemente una remanencia casi o totalmente nula.

La denominación "micropartículas de alcohol de polivinilo" equivale a que las micropartículas magnetizables conforme a la invención tienen una matriz, en la cual se incrusta el material magnetizable de nanopartículas. Conforme a una configuración preferida la matriz polimérica de las micropartículas magnetizables consta exclusivamente de alcohol de polivinilo.

Las micropartículas de alcohol de polivinilo magnetizables que se obtienen con el método conforme a la invención presentan una distribución del tamaño de partícula del orden de 0,5 hasta 3µm, preferiblemente de 0,5 a 1µm. Conforme a otra configuración preferida las micropartículas de alcohol de polivinilo presentan una distribución del tamaño de partícula del orden de 1,25 hasta 2,25 µm.

El cometido "distribución estrecha del tamaño de partículas" significa que al menos un 75%, preferiblemente al menos un 90%, en particular al menos un 95% de las partículas tiene un tamaño de partícula que se encuentra dentro del intervalo de tamaño mencionado de 0,5 hasta 3 µm o bien 0,5 hasta 1µm.

La distribución de partículas es preferiblemente monomodal, es decir presenta un máximo único dentro del intervalo de 0,5 hasta 3µm o bien del intervalo de 0,5 hasta 1µm.

Como material magnetizable que se dispersa en la solución acuosa de alcohol de polivinilo se pueden emplear partículas coloidales ferromagnéticas o superparamagnéticas, donde la preferida es la magnetita nanocristalina.

Preferiblemente el material magnetizable a base de nanopartículas tiene un tamaño de partícula del orden de 5 hasta 250 nm, en particular de 5 hasta 100 nm, donde se prefiere el tamaño de 5 a 50 nm.

Conforme a una configuración preferida de la invención el material magnetizable empleado, preferiblemente nanopartículas de magnetita, se fabrica o se trata previamente mediante un método que se caracteriza por lo siguiente:

- La suspensión de nanopartículas magnetizables en agua totalmente desalada con una conductividad específica inferior a 500 µS/cm, preferiblemente inferior a 100 µS/cm, en particular inferior a 5µS/cm;
- El tratamiento de la suspensión acuosa de nanopartículas por medio de un homogeneizador de ultrasonidos

Las nanopartículas magnetizables empleadas al principio se pueden fabricar mediante métodos conocidos (ver por ejemplo Sipos P.: "Manufacturing of Size Controlled Magnetite Nanoparticles Potentially suitable for the preparation of Aqueous magnetic fluids"; Romanian reports in physics 2006;58(3):229-233; así como YE XR y cols.: "Room temperature solvent-free synthesis of monodisperse magnetite nanocrystals", J. Nanosci. Nanotechnol. 2006, vol. 6, nº3, pp. 852-856).

Preferiblemente la fabricación de nanopartículas así como su posterior tratamiento se realiza sin añadir sustancias tensoactivas.

5 Mediante el tratamiento de ultrasonidos mencionado de la suspensión de nanopartículas se puede realizar una disgregación continuada de los agregados de partículas existentes. El tratamiento mediante ultrasonidos se lleva a cabo preferiblemente en el método de circulación.

10 La potencia de ultrasonidos es preferiblemente de al menos 1000 W. La duración de la radiación es preferiblemente de al menos 10 minutos, en particular de al menos 0,5 horas y especialmente de 1 hora.

Los homogeneizadores de ultrasonidos adecuados para llevar a cabo el tratamiento mencionado son conocidos por el experto o bien en el mercado (por ejemplo, Dr. Hielscher Sonopuls 2000 W; Hielscher Ultrasonics GmbH, D-14513 Teltow).

15 Además se ha demostrado que es preferible que antes de su posterior uso la suspensión de nanopartículas se someta a una etapa de centrifugación en la cual las partículas con un tamaño > 250 nm, preferiblemente con un tamaño >100 nm, se distancien. La centrifugación se realiza preferiblemente a 1000-3000 x g.

20 Se ha averiguado que las nanopartículas magnetizables previamente tratadas por medio de los métodos descritos son adecuadas para la fabricación de micropartículas de alcohol de polivinilo magnetizables, conforme a la invención, que presenten las características anteriormente descritas (en particular una distribución del tamaño de partículas estrecha).

25 Mediante el empleo de material magnetizable a base de nanopartículas, en particular magnetita, con tamaños de grano de 250 nm como máximo, preferiblemente de 100 nm como máximo, se pueden fabricar micropartículas de alcohol de polivinilo magnetizables, que presenten un porcentaje relativamente elevado de material magnetizable, en particular magnetita.

30 Preferiblemente este porcentaje es como mínimo del 50%. Según una configuración especialmente preferida las partículas conforme a la invención tienen un contenido en magnetita de 50 hasta 50% en peso (valor medio: aprox. 55% en peso)

35 En el caso del alcohol de polivinilo empleado para la fabricación de la fase acuosa se trata preferiblemente de alcohol de polivinilo con una masa molar media del orden de 50.000 hasta 300.000 y un grado de hidrólisis del orden del 70 al 100,0% molar, preferiblemente del 80 al 95% molar. Por ejemplo, con esta finalidad se tienen en cuenta los alcoholes de polivinilo con la denominación "Wowiol" (Kuraray Europe GmbH, Frankfurt a.M.)

40 La concentración de alcohol de polivinilo en la fase acuosa es preferiblemente del 2% como máximo, en particular del 0,2 al 2% en peso, especialmente del 1,5% en peso, para evitar la formación de partículas con un diámetro demasiado grande (especialmente mayor de 3µm), que es poco favorable para el uso posterior de las partículas por sus propiedades de sedimentación, en particular para la filtración automatizada de ácidos nucleicos. Además la limitación de la concentración de alcohol de polivinilo a un máximo del 2,0%, especialmente del 1,5% permite que se puedan obtener partículas poliméricas magnetizables con un porcentaje alto en material magnetizable (por ejemplo, magnetita), en particular con un porcentaje del 50% en peso o preferiblemente del 50 al 60% en peso.

El material magnético, preferiblemente la magnetita, se añade a la fase acuosa preferiblemente en un porcentaje del 0,5 hasta el 7,5%, en particular del 1 al 5% en peso.

50 El proceso de dispersión en una primera etapa del método se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos. Habitualmente se usa un aparato dispersor (por ejemplo, ULTRA TURRAX®) o bien un agitador de propulsión. Siempre que sea necesario se puede realizar el proceso de dispersión mientras se calienta la suspensión con el fin de garantizar la solución lo más completa posible del alcohol de polivinilo.

55 En una configuración preferida del método el alcohol de polivinilo y la fase acuosa contenida en el material magnetizable se homogenizan en un homogeneizador de ultrasonidos antes de añadirse a la fase orgánica. De ese modo el material magnetizable, siempre que se requiera o prefiera, se trituran a un tamaño de partícula inferior a 250 nm, preferiblemente inferior a 100 nm (diámetro hidrodinámico). Esta etapa adicional de homogeneizado tiene además la ventaja de que se trituran los posibles agregados de partículas o grumos. Los homogeneizadores de ultrasonidos adecuados son conocidos por el experto y se encuentran en el mercado (por ejemplo, "Labsonic P", Fa Sartorius AG, Göttinge; "Dr. Hielscher Sonopuls 2000 W").

60 Se puede prescindir de la adición de emulgentes a la fase polimérica acuosa por las características especiales del método de fabricación conforme a la invención.

65

En una segunda etapa o en una etapa posterior del método de fabricación conforme a la invención se añade la fase acuosa a una fase orgánica que no es miscible con la fase acuosa y contiene al menos un emulgente. De manera que agitando a una temperatura de 40°C o superior se fabrica una emulsión. Preferiblemente la temperatura se encuentra a 50°C como mínimo, en particular a 55 hasta 65°C, y especialmente a 60°C. Sorprendentemente se ha demostrado que se puede reducir o evitar la formación de partículas muy pequeñas (inferiores a 0,5µm) cuando la fabricación se lleva a cabo a una temperatura elevada, tal como se ha indicado, donde actúan de forma más favorable temperaturas elevadas (≥30°C, ≥40°C, ≥50°C, ≥60°C).

El proceso de emulsión se termina después de 10 s hasta 15 min, dependiendo del tipo de aparato dispersor, agitador empleado, del tamaño del volumen de emulsión etc.

La emulsión puede realizarse del modo conocido por el experto mediante un dispersor o agitador, a una velocidad de agitación entre 500 y 5000 U/min.

Para fabricar la emulsión se ha comprobado que es preferible el uso de un dispersor conforme al principio del rotor-estator. La velocidad empleada oscila típicamente entre 500 y 4000 U/min. Normalmente el cabezal de mezcla se sumerge en el líquido emulsionante que se encuentra en un recipiente cerrado. El volumen del recipiente puede ser de hasta 100 litros, o de 100 a 500 litros.

El proceso de dispersión y emulsión se lleva a cabo utilizando los dispersores mencionados básicamente sin introducir aire. Preferiblemente el aparato dispersor está equipado con un cabezal de mezcla cuyo estator (que rodea el rotor) está previsto de una multitud de ranuras verticales. Durante la rotación se crea una corriente de líquido vertical dirigida hacia abajo así como una corriente de líquido horizontal; ésta actúa de manera que el líquido sale por las ranuras del cabezal de mezcla, lo que conduce a una homogeneización y mezcla muy eficiente debido a las elevadas fuerzas de corte que allí aparecen y a las turbulencias que se crean en el cabezal. En particular se favorece de ese modo la distribución rápida del reticulante por la suspensión.

Los agitadores dispersantes del tipo mencionado son conocidos por el técnico; por ejemplo, se emplea un agitador de Fa. Ystral GmbH ("ystral Dispermix", Fa. Ystral GmbH, D-79282 Ballrechten-Dottingen).

Al utilizar el agitador, anteriormente descrito, se produce una desaglomeración eficiente y una suspensión; además debido a la elevada potencia de circulación del agitador se evita un calentamiento puntual y se consigue una distribución rápida del reticulante. Se reduce o evita con ello la indeseada "convergencia" de micelas, es decir la formación de "beads" o concentración de dos o más micelas.

Se ha averiguado que el uso de un dispersador del tipo mencionado es especialmente favorable si se trabaja con volúmenes grandes de emulsión (10 litros o más), con una consistencia de lote mantenida.

El método de dispersión descrito no solamente es preferible en lo que se refiere al manejo de grandes volúmenes, sino también en lo que se refiere al aumento del rendimiento de micropartículas magnetizables de alcohol de polivinilo. Por ejemplo el rendimiento de micropartículas esféricas magnetizables de alcohol de polivinilo para un volumen de emulsión de 100 litros es de cómo mínimo 200 g.

Como fase orgánica no miscible en agua se emplean en general los líquidos siguientes: aceites vegetales (por ejemplo, aceite de girasol o de colza), aceites minerales, aceites sintéticos, aceites de silicona y de parafina; así como mezclas de los aceites mencionados.

La fase orgánica, no miscible en agua se añade generalmente en un exceso de volumen con respecto a la fase acuosa. El porcentaje de volumen de fase orgánica no miscible en agua equivale preferiblemente a 3 hasta 50 veces, en especial a un volumen de 3 hasta 25 veces, en particular a un volumen de 3 hasta 15 veces de fase acuosa.

En la fabricación de la emulsión el emulgente preferido procede del grupo siguiente de emulgentes: copolímeros de bloque de óxido de propileno-óxido de etileno (Poloxamere, por ejemplo, Syperonic®, Tetronic®, Pluronic®), polisorbatos (compuestos que se forman por la eterificación de ésteres de ácidos grasos de sorbitán con polietilenglicol : por ejemplo, Tween®, preferiblemente Tween 80®), éster de ácido graso de sorbitán (por ejemplo, laurato de sorbitán, estearato de sorbitán, oleato de sorbitán, sesquioleato de sorbitán: por ejemplo, Arlacel®, Span®, Dehymuls®), ácidos grasos polietoxilados (éster de ácido graso etoxilado, etanolamida de ácido graso, etoxilato de alquilamina (por ejemplo, éter de PEG-laurilamina, oleilamina o estearilamina, éter de trietanolamina-PEG), productos de adición del óxido de etileno y/o del óxido de propileno a alcoholes grasos con 8 hasta 18 átomos de C (por ejemplo, Brij®, Eumulgin®, Polidocanol), aceite de ricino hidrogenado polietoxilado (por ejemplo, Dehymus® HRE 7), polímeros en bloque de derivados de aceite de ricino, copolímeros de bloque de polioxietileno, polioxipropileno-etilendiamina, copolímeros de bloque de polioxietileno de un ácido graso polihidroxilado y de óxido de polietileno (por ejemplo, Hypermer® A70), etoxilatos alquilfenólicos (en particular octilfenol o nonilfenol con 2-100 unidades de óxido de etileno; por ejemplo, Triton®, Triton®X-100), propoxilatos alquilfenólicos, éster de ácido graso de pentaeritrita (por ejemplo,

monolaurato de pentaeritrilo), éster mixto a base de éster de pentaeritrita-ácido graso y éster de alcohol graso-ácido cítrico (por ejemplo Dehylmus® FCE), polietilenglicoles, ácidos y sulfonatos de alquilbenzol, éster parcial de poliglicerina, alcoholes azucarados o glucósidos de alquilo con ácidos grasos saturados y/o insaturados, lineales o ramificados con 8 hasta 22 átomos de carbono, copolímeros de bloque de ácido graso polihidroxílico-polietilenglicol y fosfoglicéridos como la fosfatidilcolina o la fosfatidiletanolamina. Además se pueden emplear también mezclas o combinaciones de dos o más emulgentes.

Una mezcla preferida de emulgentes contiene los siguientes componentes principales: 1) Tween® 80 (polioxietileno(20)-sorbitán-monooleato) y/o (2) Arlacel® 83 (sesquioleato de sorbitán); (3) DEHYLMUS® HRE 7 (PEG-7) etoxilado, aceite de ricino hidrogenado y (4) Hypermer® A70 (copolímeros de bloque de polioxietileno a base de un ácido graso polihidroxigenado y óxido de polietileno).

Se prefieren mezclas de emulgentes, que al menos tengan un emulgente lipófilo en combinación con al menos un emulgente anfílico o hidrófilo. Los emulgentes lipófilos son en general tensoactivos no iónicos con valores HLB del orden de 3 hasta 8; éstos se conocen como emulgentes Ag/Ac. Los emulgentes hidrófilos o anfílicos suelen tener valores de HLB del orden de 8 hasta 18 y se conocen como emulgentes Ac/Ag.

Al grupo de los emulgentes lipófilos pertenecen por ejemplo los siguientes compuestos: Ester de sorbitán-ácido graso (por ejemplo, Span® 40), lecitina, copolímeros de bloque de PEG, PPG, PEG (por ejemplo, Pluronic® L31, L61, L81), éter de PEG-oleilo (por ejemplo, Hrij® 93).

Al grupo de los emulgentes hidrófilos o anfílicos pertenecen por ejemplo: los copolímeros de bloque de PEG-PPG-PEG (por ejemplo, Pluronic® L-64, Pluronic® 10R5), éter de PEG-hexadecilo (por ejemplo, Hrij® S10), éter de polioxietileno-nonilfenilo, éter de polioxietileno-tridecilo, monoestearato de polioxietileno-sorbitán (por ejemplo, Tween® 60), monolaurato de polioxietileno-sorbitán (por ejemplo, Tween® 60), monolaurato de polioxietileno-sorbitán (por ejemplo Tween® 20), éter de polioxietileno-estearilo (por ejemplo, Brij® 100), aceite de ricino hidratado polietoxilado.

El emulgente o la mezcla de dos o más emulgentes se puede añadir a la fase no miscible en agua o bien disolver en ella antes de que esta fase se purifique con la fase acuosa para su emulsión.

El porcentaje de emulgente o de emulgentes es preferiblemente de 0,1 hasta 10% en peso, preferiblemente del 1 al 7,5% en peso respecto a la fase orgánica.

Durante la etapa de emulsión se realiza la adición de al menos uno de los reticulantes solubles en agua adecuados para la reticulación del alcohol de polivinilo, de manera que las partículas esféricas de alcohol de polivinilo que encierran el material magnetizable se estabilicen mediante una reticulación covalente.

La adición de sustancias reticulantes se realiza preferiblemente durante el emulsión, es decir, ambas fases se dispersan o emulsionan agitando en ausencia del reticulante, de manera que el reticulante se añade luego y continúa el proceso de agitación hasta que termina la reacción de reticulación (en general unos 10s hasta 5 min después de añadir el reticulante). Preferiblemente, la reticulación se realiza a una temperatura elevada tal como se ha indicado para la etapa de emulsión. La temperatura empleada para el emulsión (>25°C) puede mantenerse durante la reacción de reticulación.

Como sustancias reticulantes se emplean preferiblemente los aldehídos bifuncionales, en particular el glutaraldehído, así como el cloruro de ácido o la divinilsulfona, de manera que el glutaraldehído es el preferido. Por el contrario, el uso de diaminas como reticulante (por ejemplo, hexametildiamina) se ha demostrado que es poco favorable porque los grupos amino libres pueden ir acompañados de reacciones secundarias no deseadas con biomoléculas.

Los reticulantes se añaden a la emulsión habitualmente en forma líquida, es decir como soluciones (por ejemplo, soluciones acuosas) de manera que estas soluciones contienen el o los reticulantes preferiblemente en una concentración total de 1 hasta el 40% en peso, en particular del 5 hasta el 25% en peso. Según una configuración preferida se emplea una solución de glutaraldehído acuosa del 12,5%.

El porcentaje de sustancias reticulantes añadidas a la emulsión se sitúa preferiblemente entre el 0,1 y el 10% en volumen, en particular entre el 1 y el 7,5% en volumen respecto a la fase acuosa.

Además la reticulación se lleva a cabo por medio de aldehídos bifuncionales, en particular el glutaraldehído, preferiblemente añadiendo ácido, porque de ese modo la reacción de reticulación puede acelerar notablemente. De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto sorprendentemente que una adición de ácido del 10% en volumen o menos, preferiblemente del 5% en volumen o menos, en particular del 3,2% en volumen o menos, respecto a la fase polimérica, es suficiente para acelerar la reticulación producida por el glutaraldehído e impedir posibles agregados o acumulaciones de material magnetizable en forma de nanopartículas. Los porcentajes en volumen indicados se refieren al HCl 1N hasta 3N.

La adición de ácido se lleva a cabo preferiblemente antes de la etapa de emulsionado, es decir, el ácido se añade a la fase acuosa. Alternativamente la adición de ácido se puede realizar durante la emulsión o después de la emulsión.

5 Además de HCl se tienen en cuenta los ácidos siguientes: a) ácido nítrico 1-3N (adición de ácido del 10% en Vol. como máximo a la fase polimérica); b) ácido sulfúrico 1-3N (adición de ácido del 5% en Vol. como máximo a la fase polimérica); c) HBr; d) ácido acético; e) ácido fosfórico.

10 Además se ha descubierto que concentraciones superiores de ácido (es decir, mayores del 10% en volumen), en particular a temperaturas altas (60°C) conducen a la destrucción del material magnetizable, en particular de la magnetita y por tanto a una liberación no deseada de iones de hierro. La disminución conforme a la invención de la adición de ácido durante la reticulación puede hacer que se obtengan partículas magnetizadas de alcohol de polivinilo que presenten un contenido elevado de material magnetizable, preferiblemente magnetita, es decir de al menos un 50% en peso o de hasta un 90% en peso.

15 La reacción de reticulación tiene lugar habitualmente entre unos 10 segundos hasta 5 minutos de la adición del reticulante. Seguidamente se pueden separar las micropartículas esféricas magnetizables de alcohol de polivinilo usando métodos conocidos (por ejemplo, por centrifugación o separación magnética) de la mezcla de reacción líquida. Para la separación de impurezas eventualmente adheridas (por ejemplo, aceite, emulgentes) se pueden lavar o bien se puede efectuar la resuspensión y centrifugación o bien la separación magnética de las micropartículas por medio del disolvente o mezclas adecuadas (por ejemplo, agua, etanol, metanol, 2-propanol, n-hexano, acetona, metiletilcetona).

20 En una configuración preferida el método conforme a la invención comprende al menos las etapas siguientes:

- 25
- Dispersión de nanopartículas de un material magnetizable, preferiblemente magnetita, en una fase acuosa, que contiene alcohol de polivinilo en forma disuelta, donde la concentración de alcohol de polivinilo en la fase acuosa es como máximo del 2,0% en peso, preferiblemente del 0,1 hasta el 2,0% en peso, en particular del 0,5 al 1,5% en peso y donde la concentración de material magnetizable o de magnetita en la fase acuosa es preferiblemente del 0,5 hasta el 7,5% en peso, en particular del 1 hasta el 5% en peso;
 - Adición de la fase acuosa a una fase orgánica que no es miscible con la fase acuosa y al menos contiene un emulgente, y fabricación de una emulsión agitando a una temperatura de al menos 50°C, preferiblemente de 55 a 65°C, en particular de 60°C.
 - 35 - Adición de al menos una sustancia reticulante soluble en agua, adecuada para la reticulación del alcohol de polivinilo, en una agitación continuada.

40 En una configuración preferida el método conforme a la invención comprende al menos las etapas siguientes:

- 40
- Dispersión de nanopartículas de un material magnetizable, preferiblemente magnetita, con un tamaño de partícula de 250 nm como máximo, preferiblemente de 100 nm como máximo, en una fase acuosa, que contiene alcohol de polivinilo en forma disuelta, donde la concentración de alcohol de polivinilo en la fase acuosa es como máximo del 2,0% en peso, preferiblemente del 0,1 hasta el 2,0% en peso, en particular del 0,5 al 1,5% en peso y donde la concentración de material magnetizable o de magnetita en la fase acuosa es preferiblemente del 0,5 hasta el 7,5% en peso, en particular del 1 hasta el 5% en peso;
 - 45 - Adición de la fase acuosa a una fase orgánica que no es miscible con la fase acuosa y al menos contiene un emulgente, y fabricación de una emulsión agitando a una temperatura de al menos 25°C, preferiblemente de 50 a 65°C, en particular de 60°C;
 - 50 - Adición de al menos un aldehído bifuncional como reticulante añadiendo ácido clorhídrico (1N hasta 3N) en un porcentaje de volumen de hasta el 5% respecto a la fase acuosa.

55 En una configuración preferida el método conforme a la invención comprende al menos las etapas siguientes:

- 55
- Dispersión de nanopartículas de un material magnetizable, preferiblemente magnetita, en una fase acuosa, que contiene alcohol de polivinilo en forma disuelta, donde la concentración de alcohol de polivinilo en la fase acuosa es como máximo del 2,0% en peso, preferiblemente del 0,1 hasta el 2,0% en peso, en particular del 0,5 al 1,5% en peso y donde la concentración de material magnetizable o de magnetita en la fase acuosa es preferiblemente del 0,5 hasta el 7,5% en peso, en particular del 1 hasta el 5% en peso;
 - 60 - Adición de la fase acuosa a una fase orgánica que no es miscible con la fase acuosa y al menos contiene un emulgente, y fabricación de una emulsión agitando a una temperatura de 25°C o superior, preferiblemente de 50 a 65°C, en particular de 60°C; de manera que la fabricación de la emulsión se lleve a cabo por medio de un agitador dispersor según el principio rotor-estator a una velocidad del rotor del orden de 500 hasta 4000 revoluciones/min y el volumen de la emulsión sea de 10 litros o superior.
 - 65

- Adición de al menos una sustancia reticulante soluble en agua, adecuada para la reticulación del alcohol de polivinilo, en una agitación continuada.

En una configuración preferida el método conforme a la invención comprende al menos las etapas siguientes:

- Dispersión de nanopartículas de un material magnetizable, preferiblemente magnetita, en una fase acuosa, que contiene alcohol de polivinilo en forma disuelta, donde la concentración de alcohol de polivinilo en la fase acuosa es como máximo del 2,0% en peso, preferiblemente del 0,1 hasta el 2,0% en peso, en particular del 0,5 al 1,5% en peso y donde la concentración de material magnetizable o de magnetita en la fase acuosa es preferiblemente del 0,5 hasta el 7,5% en peso, en particular del 1 hasta el 5% en peso;
- Adición de la fase acuosa a una fase orgánica que no es miscible con la fase acuosa y al menos contiene un emulgente, y fabricación de una emulsión agitando a una temperatura de al menos 50°C, preferiblemente de 55 a 65°C, en particular de 60°C, donde la fabricación de la emulsión se realiza por medio de un agitador de dispersión que funciona según el principio del rotor-estator a una velocidad del rotor de 500 hasta 4000 revoluciones/min y el volumen de la emulsión es de 10 litros o más;
- Adición de al menos un aldehído bifuncional, preferiblemente el glutaraldehído, como reticulante añadiendo ácido clorhídrico (1N hasta 3N) en un porcentaje de volumen de hasta el 10%, preferiblemente hasta el 5%, en particular del 3,2% como máximo, respecto a la fase acuosa.

Cada una de las configuraciones descritas se puede combinar con una o varias de las propiedades anteriormente descritas.

Según una configuración especialmente preferida el material magnetizable empleado en una primera etapa del método de fabricación conforme a la invención, preferiblemente magnetita, se somete a un método de tratamiento que comprende los pasos siguientes:

- Suspensión de las nanopartículas magnetizables en agua totalmente desalada con una conductividad específica inferior a 100 μ S, preferiblemente inferior a 5 μ S/cm;
- Tratamiento de la suspensión de nanopartículas acuosa por medio de un homogeneizador de ultrasonidos, preferiblemente a una potencia de ultrasonidos de al menos 1000 W y una duración del tratamiento de al menos 10 minutos, preferiblemente al menos 0,5; el tratamiento con ultrasonidos puede llevarse a cabo en un método continuado (método de flujo).

Con el método conforme a la invención se pueden obtener partículas esféricas, magnetizables de alcohol de polivinilo con una distribución del tamaño de partículas estrecha del orden de 0,5-3 μ m, por ejemplo en cantidades de al menos 200 g por preparado. El tamaño del preparado, es decir el volumen de la emulsión fabricada puede ser de 5 litros o más, en particular de 10 litros o más, por ejemplo, de 50 hasta 150 litros o bien de 100 litros (por ejemplo, 200-500 litros).

El tamaño de las partículas puede verse influido por los posibles cambios de los parámetros siguientes (teniendo en cuenta los valores límite, considerados esenciales para la invención, tal como se indica en la descripción anterior):

- Concentración polimérica (concentración mínima que actúa reduciendo el tamaño de partícula);
- Velocidad de agitación durante la emulsión (velocidad máxima que actúa reduciendo el tamaño de partícula);
- Selección del emulgente, así como de la concentración de emulgente.

Las micropartículas de alcohol de polivinilo fabricadas con el método conforme a la invención pueden ser empleadas sin posterior modificación para el enlace de, por ejemplo, biomoléculas, en particular mediante el enlace a los grupos OH libres del alcohol de polivinilo, o bien pueden ser activadas o modificadas mediante diferentes reacciones conocidas por el experto, para facilitar el enlace de las biomoléculas, células, etc. Con las reacciones de modificación mencionadas se pueden acoplar por ejemplo grupos funcionales, o bien moléculas espaciadoras a la matriz o a la superficie de las partículas.

Los ejemplos preferidos de dichas reacciones de modificación o activación conocidas se han descrito en la WO 97/04862 A1 y en los documentos en ella citados. A este respecto mencionaremos la activación por medio de los reactivos de activación como el bromuro de cianógeno (para el acoplamiento de ligandos a grupos amino primarios, por ejemplo, anticuerpos), la epiclorhidrina, el 1,1'-carbonildiimidazol o el diisocianato de hexametileno.

La introducción de moléculas espaciadoras se puede realizar de un modo conocido mediante la polimerización por injerto de monómeros de vinilo (en particular monómeros acrílicos) bajo la acción catalítica de las sales de cerio (IV), tal como se ha descrito en WO 97/04862 A1 y en los documentos allí citados.

Los espaciadores acoplados a las micropartículas de alcohol de polivinilo magnetizables se pueden emplear, por ejemplo, para la unión de las biomoléculas.

La invención hace referencia además a micropartículas esféricas, magnetizables, de alcohol de polivinilo con una distribución del tamaño de partículas del orden de 0,5 hasta 3 μm , que se obtiene conforme a uno de los métodos de fabricación conforme a la invención anteriormente descritos. Preferiblemente las micropartículas presentan una distribución del tamaño del orden de 0,8 hasta 3 μm o bien en particular del orden de 0,5 hasta 1 μm , Conforme a otra configuración preferida, las micropartículas tienen una distribución del tamaño del orden de 1,25 hasta 2,25 μm .

“La distribución del tamaño es del orden de ...” significa que al menos presenta un 75%, preferiblemente al menos un 90%, en particular al menos un 95% de un tamaño de partícula, que se encuentra dentro del límite de tamaño indicado.

La distribución del tamaño de partículas de las micropartículas conforme a la invención puede definirse como monomodal, es decir, presenta básicamente solo un máximo único.

El tamaño de partícula puede ser determinado por la forma conocida por el experto, es decir, mediante DLS/PCS (dispersión dinámica de la luz/espectroscopia de correlación de fotones). Los aparatos de medición adecuados para ello se obtienen en el comercio (por ejemplo, Beckman Coulter DelsaNano C, D-47807 Krefeld).

El método PCS empleado da como resultado el tamaño medio de partícula de la muestra medida y un índice de polidispersidad correspondiente (PDI), que representa una medida del ancho de la distribución del tamaño de partículas. Entre las micropartículas magnetizables fabricadas con el método conforme a la invención que presentan una distribución del tamaño estrecha, el índice de polidispersidad (PDI) se sitúa por debajo de 0,25, en particular entre 0,1 y 0,25.

Conforme a una configuración preferida, las micropartículas magnetizables conforme a la invención se caracterizan por que el contenido en material a base de nanopartículas, en particular de magnetita, es al menos de un 50% en peso preferiblemente de al menos un 60% en peso, en particular de al menos un 75% en peso y especialmente de hasta un 90% en peso. Esto se puede lograr si la concentración de alcohol de polivinilo en la fase acuosa es como máximo del 1,5% en peso, tal como se ha descrito antes. Debido al elevado contenido en magnetita y debido a la estrecha distribución del tamaño de partícula (tal como se ha mencionado) estas micropartículas magnetizables se caracterizan por unas buenas propiedades de separación en el campo magnético.

La determinación del porcentaje de material inorgánico magnetizable puede realizarse conforme a un método conocido por el experto como el análisis de la combustión.

Debido al elevado contenido en magnetita de las micropartículas magnetizables conforme a la invención se pueden garantizar también en el caso de un tamaño de partícula reducido (por ejemplo, del orden de 0,5 hasta 1 μm) unas buenas propiedades magnéticas de separación. Las partículas especialmente preferidas conforme a la invención son por lo tanto aquellas que presentan una distribución del tamaño de partículas del orden de 0,5 hasta 1 μm y un contenido en magnetita del 50 hasta el 90% en peso, preferiblemente del 50 al 75% en peso, en particular del 50 al 60% en peso.

Las micropartículas magnetizables fabricadas o que se obtienen con el método conforme a la invención se caracterizan, a pesar de su elevado contenido en magnetita (al menos un 50% en peso, preferiblemente entre un 50 y un 60% en peso, en particular al menos un 60% en peso) por la manifiesta reducción del enlace no específico (en particular de las proteínas) en el uso en el método de detección mencionado, especialmente en la PCR. Esta reducción del enlace no específico se atribuye a que con el método de fabricación conforme a la invención se consigue un encapsulado muy eficiente del material magnetizable (por ejemplo, magnetita). A consecuencia de ello el porcentaje de magnetita libre (o bien de material magnetizable en nanopartículas) que es responsable de los enlaces no específicos, es extraordinariamente escaso.

El encapsulado más eficiente de la magnetita o bien la disminución del porcentaje de magnetita libre es detectable mediante un cambio medible del potencial zeta de las partículas, comparado con el de las partículas convencionales (por ejemplo, WO 97/04862 A1) (ver ejemplo 3 y tabla 1). Las partículas fabricadas o que se obtienen con el método conforme a la invención presentan preferiblemente un potencial zeta elevado al menos un 15%, preferiblemente un 25% y en particular un 30% (respecto al valor absoluto del potencial zeta). Se asume que el cambio observado del potencial zeta se atribuye a la disminución de magnetita libre en la superficie de las partículas (para un tamaño y superficie de partículas invariable, y que el potencial zeta por tanto se puede considerar como una medida de la eficiencia del encapsulado de magnetita. Preferiblemente, el potencial zeta de las micropartículas magnéticas $\leq -35\text{mV}$, en particular $\leq -40\text{mV}$

La presente invención comprende micropartículas magnetizables, esféricas de alcohol de polivinilo con un contenido en material magnetizable donde las micropartículas tienen un potencial zeta ≤ -35 mV, en particular ≤ -40 mV.

5 La distribución del tamaño de partícula es preferiblemente de 0,5 a 3 μm , y en particular del orden de 0,5 hasta 1 μm o bien del intervalo de 1,25 hasta 2,25 μm .

10 El contenido en material magnetizable en nanopartículas, en particular de magnetita, es como mínimo del 50% en peso, preferiblemente del 60% en peso, en particular del 75% en peso y puede ser de hasta un 90% en peso.

15 Las micropartículas magnetizables fabricadas o que se obtienen con el método conforme a la invención se caracterizan además porque en las aplicaciones PCR tienen una influencia inhibidora claramente reducida en la reacción PCR o bien porque dicha influencia falta totalmente, en comparación con las micropartículas ya conocidas (ver ejemplo 4 y tablas 3 y 4). La presencia de componentes inhibidores en el preparado de la reacción PCR conduce a un retraso de la reacción de amplificación y por tanto a un incremento del valor Ct. Con este valor se define el número de ciclos en la "Real Time Quantitative PCR", que serán necesarios hasta que la señal de fluorescencia exceda el valor umbral y se inicie la fase exponencial de la PCR. Puesto que el valor Ct es más o menos proporcional a la cantidad de ácido nucleico contenida en la muestra, la presencia de componentes inhibidores (como, por ejemplo, micropartículas con efecto inhibidor) conduce a una adulteración de los resultados.

20 Sorprendentemente se ha averiguado que al utilizar micropartículas magnetizables fabricadas u obtenidas con el método conforme a la invención en las aplicaciones de la PCR el valor Ct se mantiene inalterado o bien se incrementa un máximo del 2%, preferiblemente un máximo del 1%, en particular un máximo del 0,5%.

25 Por tanto la presente invención comprende micropartículas esféricas, magnetizables de alcohol de polivinilo con un contenido en material magnetizable, donde las micropartículas al emplearse en un método de PCR no provocan ninguna alteración del valor Ct o bien solamente un incremento mínimo del valor Ct, preferiblemente del 2% como máximo, en particular del 1% como máximo, o del 0,5% como máximo.

30 La distribución del tamaño de partículas tiene lugar preferiblemente en el intervalo de 0,5 hasta 3 μm , en particular en el intervalo de 0,5 hasta 1 μm o en el intervalo de 1,25 hasta 2,25 μm . El contenido en material magnetizable, especialmente de magnetita, es preferiblemente de cómo mínimo un 50% en peso, al menos de un 60% en peso, en particular de un 75% en peso y puede ser de hasta un 90% en peso.

35 Las micropartículas magnetizables conforme a la invención tienen grupos funcionales que facilitan un acoplamiento de biomoléculas o ligandos a través de enlaces covalentes o no covalentes. Como grupos funcionales se tienen en cuenta los grupos hidroxilo de la matriz del alcohol polivinilo, pero también los grupos introducidos mediante reacciones de modificación tal como se ha mencionado antes. De acuerdo con una configuración preferida estos grupos funcionales se enlazan al alcohol de polivinilo a través de moléculas espaciadoras.

40 Como biomoléculas o ligandos que pueden estar unidos por enlaces covalentes o no covalentes a las micropartículas magnetizables se tienen en cuenta especialmente anticuerpos, avidina, biotina, proteína A, proteína G, lectina, oligosacáridos, oligonucleótidos, enzimas, inhibidores enzimáticos, sustratos de enzimas, proteínas de receptores, albúmina, gelatina, glutatión, aminoácidos, péptidos, hormonas y neurotransmisores. Además también se tienen en cuenta otras biomoléculas o ligandos que se utilizan para fines diagnósticos o bien en la cromatografía de afinidad.

45 Las micropartículas de alcohol de polivinilo esféricas y magnetizables son debido a su elevado contenido (mínimo un 50% en peso) en material magnetizable en nanopartículas, preferiblemente magnetita, y debido a su estrecha distribución del tamaño de partículas del orden de 0,5 hasta 3 μm especialmente adecuadas para la utilización en un método de separación automatizado, en particular para la filtración automatizada del ácido nucleico. Debido a la estrecha distribución del tamaño se simplifica la separación completa de las micropartículas magnetizables en particular en la filtración automatizada del ácido nucleico.

50 Además se pueden conseguir muy buenas propiedades de separación magnética con las micropartículas de alcohol de polivinilo esféricas y magnetizables conforme a la invención, cuyo contenido en material magnetizable pueda ser superior al 50% en peso y hasta el 90% en peso, a pesar de un tamaño de partícula reducido o bien pequeño (es decir, una separación rápida, completa y reproducible con elevado rendimiento). Por lo tanto estas micropartículas conforme a la invención sirven también para el tratamiento de volúmenes grandes de muestras (por ejemplo, aislamiento de ADN genómico de 10 ml de sangre entera).

55 Además las micropartículas de alcohol de polivinilo conforme a la invención son adecuadas para el tratamiento de volúmenes de muestras muy pequeños (por ejemplo, 10 μl), puesto que debido al pequeño diámetro de la

partícula y por tanto a la gran superficie total activa es suficiente con una masa pequeña de partículas para la filtración de la muestra correspondiente.

Las micropartículas de alcohol de polivinilo conforme a la invención pueden, por ejemplo, ser empleadas para el aislamiento, limpieza o enriquecimiento de células, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, toxinas, virus, bacterias, anticuerpos, enzimas, antígenos o receptores. Los campos de aplicación preferidos conciernen a métodos de detección diagnósticos o forenses, en inmunoanálisis, a la secuenciación del ADN, a la limpieza del producto PCR, al fraccionamiento celular, al aislamiento de proteínas, a la limpieza por afinidad, a la inmunoprecipitación, la tipificación tisular, la síntesis de oligonucleótidos o la síntesis peptídica.

Mediante la presente invención se preparan micropartículas magnetizables con unas propiedades de separación mejoradas, que son adecuadas especialmente para el método de separación automatizado. Además por medio del método de fabricación conforme a la invención se consigue la producción de estas partículas a gran escala y con una consistencia elevada del lote.

Ejemplos

Ejemplo 1: Fabricación de una suspensión coloidal de magnetita

Coloide de magnetita: La magnetita nanocristalina se fabrica tal como se ha descrito antes mediante un método conocido. Después se lava mediante un centrifugado reiterado a 3000xg durante cinco minutos y una resuspensión reiterada en agua desmineralizada hasta un valor de conductividad específico de la suspensión $500\mu\text{S}/\text{cm}$. La magnetita fabricada conforme a la presente invención tiene un potencial zeta débilmente negativo, casi neutro (en el intervalo de aprox. -4,5 hasta -0,5 mV).

180 g de la magnetita así obtenida se suspenden en 4400 ml de agua desmineralizada y se tratan durante 2 horas en un método de ultrasonidos in-line (método volumétrico) con una potencia mínima de 1000 W (Dr. Hielscher SONopuls 2000 W; Hielscher Ultrasonics GmbH, D-14513 Teltow).

Después se añaden 600 ml de una solución al 12,5% de PVA (% en peso) y se irradia durante otras dos horas. A continuación la suspensión se centrifuga durante 10 minutos a 2000 x g. Se obtiene una suspensión de magnetita que contiene PVA con un tamaño máximo de 100 nm y un contenido en magnetita del 2,8%, así como del 1,4% de PVA. La determinación del tamaño de partícula se lleva a cabo mediante PCS (Beckman Coulter DelsaNano C).

Ejemplo 2: Fabricación de micropartículas de alcohol de polivinilo magnetizables

5000 ml de coloide de magnetita conforme al ejemplo 1 se mezclan con 660 ml de HCl (2,5M). A esta suspensión se añade hasta 60 litros de un aceite vegetal habitual en el comercio, que contiene 1,5% en volumen de Tween®, un 0,5% en volumen de sesquioleato de sorbitán, un 2,5% en volumen de Dehylum® HRE y un 0,75% en volumen de Hypermer, y después la fase orgánica que se ha calentado a 60°C.

Seguidamente se agita durante 10 minutos con un agitador dispersor (Ystral Dispermix) a 60°C y a una velocidad de agitación de 3500 U/min. Tras añadir 550 ml de una solución de glutaraldehído al 12,5% (en agua) se agita de nuevo durante otros 35 minutos (Ystral Dispermix, 3500 U/min).

Las partículas se separan magnéticamente de la suspensión y se lavan de nuevo con agua (ningún disolvente orgánico). Se obtienen 250 g de partículas con un tamaño de 1-3 μm y un contenido en magnetita del 55% en peso. El índice de polidispersidad (PDI) se sitúa entre 0,1 y 0,25. La determinación del tamaño de partícula y del PDI se realizaba por medio del PCS (Beckman Coulter DelsaNano C).

Ejemplo 3: Determinación del potencial zeta

Las micropartículas magnetizables conforme a la invención se caracterizan entre otras cosas porque en el método de detección bioquímico (en particular en la PCR) provocan enlaces poco específicos, arrastre de componentes perturbadores etc. Se supone que esta propiedad ventajosa conforme a la presente invención es provocada por un mejor encapsulado del material magnetizable (magnetita), de manera que quede menos magnetita no encapsulada expuesta a la superficie de la partícula.

Puesto que debido a la presencia de magnetita no encapsulada las propiedades superficiales de las partículas pueden variar se acepta que esta modificación puede detectarse midiendo el potencial zeta, que básicamente es proporcional al número de cargas superficiales. Esta hipótesis se ha verificado del modo siguiente:

Se fabricaban micropartículas de alcohol de polivinilo conforme a la invención, tal como se ha descrito en el ejemplo 2. Para fines comparativos se fabricaban partículas magnéticas de alcohol de polivinilo conforme a WO

97/04862 A1, ejemplo 2. En ambos casos el tamaño de las partículas era de 1-3 μm . Seguidamente se realizaba una medición del potencial zeta con muestras de varios lotes de partículas. Los resultados se representan en la tabla siguiente:

5

Tabla 1:

<i>Partículas magnéticas conforme a WO 97/04862</i>			<i>Partículas magnéticas conforme a la invención</i>		
	Nr. Lote	Potencial zeta(mV)		Nr. lote	Potencial zeta (mV)
1	MP121	-29,41	1	C348	-39,59
2	MP121	-30,91	2	C349	-39,36
3	C238	-30,38	3	C350	-39,38
4	C257	-27,33	4	C351	-40,12
5	C271	-26,83	5	C352	-39,75
6	C283	-28,74			
Σ		-28,93	Σ		-39,64

10

Las partículas fabricadas conforme a la invención tienen un potencial zeta medio de aprox.-40 mV, que en comparación con las partículas fabricadas conforme a WO 97/04862 es un 30% más elevado (respecto al valor absoluto).

15

Este hallazgo confirma la suposición de que en las partículas conforme a la invención el porcentaje de magnetita libre puede haberse reducido. Cuanto menor es el porcentaje de magnetita libre en la superficie total y cuanto mayor es la parte recubierta por alcohol de polivinilo de la superficie total, más grupos funcionales potencialmente oxidables (y por tanto soporte de carga potencial) existirán en la superficie. Esto se exterioriza en una modificación correspondiente del potencial zeta, tal como se representa en la tabla 1. Puesto que el diámetro de las partículas y por tanto la superficie total de las partículas siempre se mantenía constante (1-3 μm) se deduce que la modificación observada del potencial zeta se puede atribuir a la disminución del porcentaje de magnetita libre en las partículas conforme a la invención.

20

25

Esta suposición se refuerza mediante experimentos adicionales en los cuales se ha podido demostrar que el potencial zeta de las partículas poliméricas magnéticas puede descender de nuevo (respecto al valor absoluto) al incubarse las partículas con la magnetita nanocristalina. La magnetita se enlaza a la superficie de las partículas por medio de las interacciones Van-der-Waals y cubre por tanto una parte de la superficie de la partícula, de manera que se aíslan o son inaccesibles las cargas situadas debajo. Esto tiene como consecuencia una disminución del potencial zeta (respecto al valor absoluto), tal como se representa en la siguiente tabla 2:

Tabla 2:

	Nr. Lote	Potencial zeta(mV)
1	C348	-38,59
2	C348+M	-32,28
3	C349	-39,36
4	C349+M	-34,1
5	C350	-39,38
6	C350+M	-33,13
7	C351	-40,12
8	C351+M	-33,14
9	C352	-39,75
10	C352+M	-32,98

30

Para las mediciones del potencial zeta representadas en la figura 2 se han empleado las partículas fabricadas conforme al método según la invención (como en la tabla 1 o ejemplo 2). El dato "+" significa que las muestras correspondientes han sido incubadas con la magnetita libre.

35

Debido al potencial zeta fuertemente negativo las partículas de alcohol de polivinilo magnetizables conforme a la invención tienden en menor medida a la formación de aglomerados o a la aglutinación que lo que sucede con las partículas de alcohol de polivinilo anteriormente conocidas (WO 97/04862 A1).

40

Ejemplo 4: Comportamiento de las micropartículas de alcohol de polivinilo magnetizables conforme a la invención que se emplean en la reacción en cadena

45

Se ha investigado si la presencia de micropartículas de alcohol de polivinilo magnetizables en las muestras de la reacción en cadena PCR ejerce un efecto inhibitor en la reacción en cadena. Para ello se comparaban las micropartículas conforme a la invención (ver ejemplos 2 y 3) con las partículas convencionales (WO 97/04862 A1; ver ejemplo 3).

La matriz de ADN empleada en la reacción en cadena se obtenía de manera que el plasma humano se mezclaba con una titulación de fagos definida, de bacteriófagos Phi X 174 y de esta mezcla se extraían los ácidos nucleicos. A continuación los ácidos nucleicos se amplificaban por medio de la reacción en cadena en tiempo real. Para verificar la posible influencia inhibitoria de las partículas poliméricas magnetizables se llevaban a cabo reacciones de amplificación con las micropartículas de alcohol de polivinilo magnetizables a investigar, de manera que se añadían 25 µg, 50µg o 100 µg de partículas por lote de reacción (ver tablas 3 y 4).

En las siguientes tablas 3 y 4 se mencionan los valores Ct averiguados por medio de la reacción en cadena en tiempo real. El valor Ct indica el número de ciclos que son necesarios hasta que se excede la señal de fluorescencia del valor umbral. En el control positivo (reacción en cadena sin adición de partículas poliméricas magnetizables) el valor Ct era de 25,00.

Tabla 3: Partícula magnetizable conforme a la invención: valores Ct (PCR en tiempo real)

	1	2	3	4	5	σ
25 µg	25,00	25,00	24,72	25,00	24,69	24,88
50 µg	25,00	25,02	25,07	25,14	25,10	25,07
100 µg	25,09	25,16	25,29	25,06	25,09	25,14

Los datos en las columnas 1 hasta 5 se refieren a distintos lotes de partículas conforme a la invención.

Como se deduce de la tabla 3, el valor Ct se mantiene inalterado en 25. Eso significa que la amplificación de los ácidos nucleicos no se ve perjudicada por las partículas existentes en la reacción.

Tabla 4: Partícula magnetizable conforme al estado de la técnica (WO 97/04862 A1): valores Ct (PCR en tiempo real)

	1	2	3	4	5	σ
25 µg	26,29	26,24	26,14	26,24	26,2	26,22
50 µg	25,74	26,68	25,7	26,69	26,57	26,68
100 µg	28	28,2	28,16	28,24	28	28,12

Los datos de las columnas 1 hasta 5 se refieren a los distintos lotes de las partículas fabricadas conforme a WO 97/04862 A1.

A diferencia de la tabla 3 (partículas conforme a la invención) la adición de partículas anteriormente conocidas a la reacción en cadena conducía a un incremento de los valores Ct, dependiente de la cantidad de partículas añadida (25/50/100µg). Mediante la adición de 100 µg el valor Ct ascendía a 28. El incremento del valor Ct significa un retraso en la formación de señales de fluorescencia, es decir una amplificación retardada. Este retraso indica la influencia inhibitoria de las partículas de magnetita convencionales (WO 97(04862 A1)), a diferencia de las partículas conforme a la invención, que no mostraban ningún efecto inhibitorio de este tipo (tabla 3).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la producción de micropartículas de alcohol de polivinilo esféricas y magnetizables, con una distribución del tamaño de partícula del orden de 0,5 a 3 µm, que comprende las etapas siguientes:
 - Dispersión de nanopartículas de un material magnetizable, preferiblemente magnetita, en una fase acuosa que contiene alcohol de polivinilo en forma disuelta;
 - Adición de la fase acuosa a una fase orgánica que es inmisible con dicha fase acuosa y contiene al menos un emulgente, y fabricación de una emulsión agitando a una temperatura de 40°C o superior;
 - 10 - Adición de al menos una sustancia reticulante soluble en agua, adecuada para la reticulación del alcohol de polivinilo durante una agitación continuada.
- 15 2. Método conforme a la reivindicación 1, que se caracteriza por que el material magnetizable consta de nanopartículas magnetizables de un tamaño de partícula del orden de 5 a 250 nm, preferiblemente de 5 a 100 nm, más preferiblemente de 5 a 50 nm.
- 20 3. Método conforme a la reivindicación 1 ó 2, que se caracteriza por que la magnetita nanocristalina se utiliza como material magnetizable a base de nanopartículas.
- 25 4. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que antes de añadir la fase acuosa a la fase orgánica, dicha fase acuosa sufre un tratamiento por el cual las partículas de un tamaño >250 nm, preferiblemente de un tamaño >100 nm, son retiradas preferiblemente por centrifugado.
- 30 5. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que la concentración de alcohol de polivinilo en la fase acuosa no excede el 2,0% en peso, y equivale preferiblemente a un 0,1 a 0,2% en peso, más preferiblemente a un 0,5 a 1,5% en peso.
- 35 6. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que la concentración de nanopartículas magnetizables en la fase acuosa es del 0,5 al 7,5% en peso, preferiblemente, del 1 al 5% en peso.
- 40 7. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que la fase orgánica, inmisible en agua consta de una o más sustancia(s) seleccionadas del grupo compuesto por aceites vegetales, aceites sintéticos, aceites minerales, aceites de silicona y aceites de parafina.
- 45 8. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que la proporción de emulgente contenida en la fase orgánica es del 0,1 al 10% en peso, preferiblemente del 1 al 7,5% en peso.
- 50 9. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que el agente reticulante se selecciona del grupo compuesto por aldehídos bifuncionales, en particular glutaraldehído, así como cloruros de ácido y divinil sulfona.
- 55 10. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que el agente reticulante se añade en forma líquida, con la proporción de dicho agente reticulante del 0,1 al 10% en volumen, preferiblemente del 1 al 7,5% en volumen, en cada caso respecto a la fase acuosa.
- 60 11. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que los aldehídos bifuncionales se utilizan como sustancias reticulantes y la reacción de reticulación se lleva a cabo añadiendo un ácido, donde preferiblemente se emplea ácido clorhídrico 1N hasta 3N en un porcentaje volumétrico de hasta un 10%, preferiblemente de hasta un 5%, en particular del 3,2% como máximo, respecto a la fase acuosa.
- 65 12. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que la emulsión se fabrica agitando a una temperatura de al menos 50°C, en particular de 55 a 65°C.
13. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que la fabricación de la emulsión se realiza por medio de un agitador-dispersador que funciona según el principio del rotor-estator.
14. Método conforme a una o varias de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que las etapas siguientes:
 - Dispersión de nanopartículas de un material magnetizable, preferiblemente magnetita, en una fase acuosa, que contiene alcohol de polivinilo en forma disuelta, donde la concentración de alcohol de polivinilo en la fase acuosa es como máximo del 2,0% en peso, preferiblemente del 0,1 hasta el 2,0% en peso, en particular del 0,5 al 1,5% en peso;

- Adición de la fase acuosa a una fase orgánica que no es miscible con la fase acuosa y al menos contiene un emulgente, y fabricación de una emulsión agitando a una temperatura de al menos 40°C, preferiblemente de 55 a 65°C, en particular de 60°C.
- Adición de al menos una sustancia reticulante soluble en agua, adecuada para la reticulación del alcohol de polivinilo, en una agitación continuada.

15. Método conforme a una o varias de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por las siguientes etapas:

- Dispersión de nanopartículas de un material magnetizable, preferiblemente magnetita, con un tamaño de partícula de 250 nm como máximo, preferiblemente de 100 nm como máximo, en una fase acuosa que contiene alcohol de polivinilo en forma disuelta, donde la concentración de alcohol de polivinilo en la fase acuosa es como máximo del 2,0% en peso, preferiblemente del 0,1 hasta el 2,0% en peso, en particular del 0,5 al 1,5% en peso;
- Adición de la fase acuosa a una fase orgánica que no es miscible con la fase acuosa y al menos contiene un emulgente, y fabricación de una emulsión agitando a una temperatura de al menos 40°C, preferiblemente de 55 a 65°C, en particular de 60°C.
- Adición de al menos un aldehído bifuncional como reticulante añadiendo ácido clorhídrico 1N hasta 3N en un porcentaje de volumen de hasta el 10%, preferiblemente de hasta el 5%, en particular de un 3,2% como máximo, respecto a la fase acuosa.

16. Método conforme a una o varias de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por las siguientes etapas:

- Dispersión de nanopartículas de un material magnetizable, preferiblemente magnetita, en una fase acuosa que contiene alcohol de polivinilo en forma disuelta, donde la concentración de alcohol de polivinilo en la fase acuosa es como máximo del 2,0% en peso, preferiblemente del 0,1 hasta el 2,0% en peso, en particular del 0,5 al 1,5% en peso;
- Adición de la fase acuosa a una fase orgánica que no es miscible con la fase acuosa y al menos contiene un emulgente, y fabricación de una emulsión agitando a una temperatura de 40°C o superior, donde la fabricación de la emulsión se realiza por medio de un principio rotor-estator a una velocidad del rotor del orden de 500 hasta 4000 revoluciones/min y el volumen de la emulsión es de 10 litros o superior;
- Adición de al menos una sustancia reticulante soluble en agua, adecuada para la reticulación del alcohol de polivinilo en una proceso de agitación continuo.

17. Método conforme a una o varias de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por las siguientes etapas:

- Dispersión de nanopartículas de un material magnetizable, preferiblemente magnetita, en una fase acuosa que contiene alcohol de polivinilo en forma disuelta, donde la concentración de alcohol de polivinilo en la fase acuosa es como máximo del 2,0% en peso, preferiblemente del 0,1 hasta el 2,0% en peso, en particular del 0,5 al 1,5% en peso;
- Adición de la fase acuosa a una fase orgánica que no es miscible con la fase acuosa y al menos contiene un emulgente, y fabricación de una emulsión agitando a una temperatura de al menos 40°C, preferiblemente de 55 a 65°C, en particular a 60°C, donde la fabricación de la emulsión se realiza por medio de un principio rotor-estator a una velocidad del rotor del orden de 500 hasta 4000 revoluciones/min y el volumen de la emulsión es de 10 litros o superior;
- Adición de al menos un aldehído bifuncional, preferiblemente el glutaraldehído, como reticulante añadiendo ácido clorhídrico 1N hasta 3N en un porcentaje de volumen de hasta el 10%, preferiblemente de hasta el 5%, en particular de un 3,2% como máximo, respecto a la fase acuosa.

18. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que el material magnetizable empleado, preferiblemente la magnetita, es sometido a un método de tratamiento que presenta las etapas siguientes:

- Suspensión de nanopartículas magnetizables en agua totalmente desalada con una conductancia o conductividad inferior a 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$, preferiblemente inferior a 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$;
- Tratamiento de la suspensión acuosa de nanopartículas mediante un homogeneizador de ultrasonidos.

19. Método conforme a la reivindicación 18, que se caracteriza por que el método de tratamiento presenta una fase de centrifugación en la cual las partículas con un tamaño superior a 250 nm, preferiblemente con un tamaño superior a 100 nm, se separan de la suspensión de nanopartículas.

20. Método para la fabricación de una suspensión acuosa de nanopartículas de magnetita, que se caracteriza por que presenta las etapas siguientes:
- 5 - Suspensión de nanopartículas magnetizables en agua totalmente desalada con una conductancia o conductividad inferior a 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$, preferiblemente inferior a 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$;
 - Tratamiento de la suspensión acuosa de nanopartículas mediante ultrasonidos;
 - Centrifugado de la suspensión acuosa de nanopartículas a 1000 hasta 3000 x g.
- 10 21. Micropartículas esféricas, magnetizables de alcohol de polivinilo, que se fabrican o se obtienen mediante un procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 19, y presentan una distribución del tamaño de partícula del orden de 0,5 hasta 3 μm , preferiblemente de 0,5 hasta 1 μm , y contienen material magnetizable en nanopartículas, en particular magnetita, en un porcentaje del 50% en peso como mínimo.
- 15 22. Micropartículas esféricas, magnetizables de alcohol de polivinilo conforme a la reivindicación 21, con una distribución del tamaño de partícula del orden de 1,25 hasta 2,25 μm .
- 20 23. Micropartículas esféricas, magnetizables de alcohol de polivinilo, en particular micropartículas de alcohol de polivinilo conforme a la reivindicación 21 o 22, que se caracterizan por que el potencial zeta de las micropartículas ≤ -35 mV, en particular ≤ -40 mV.
- 25 24. Micropartículas esféricas, magnetizables de alcohol de polivinilo, en particular micropartículas de alcohol de polivinilo conforme a una de las reivindicaciones 21 a 23, que se caracterizan por que en su empleo en el Real Time Quantitative PCR no se les atribuye ningún cambio del valor Ct o bien no producen un incremento del valor Ct de cómo máximo un 3%, preferiblemente de cómo máximo un 1%, en particular de un 0,5% como máximo.
- 30 25. Micropartículas esféricas, magnetizables, de alcohol de polivinilo, conforme a una de las reivindicaciones 21 hasta 24, que se caracterizan por que contienen material magnetizable en forma de nanopartículas, en especial magnetita, en un porcentaje de al menos un 60% en peso, preferiblemente de al menos un 75% en peso y en particular de hasta un 90% en peso.
- 35 26. Micropartículas esféricas, magnetizables de alcohol de polivinilo, conforme a una de las reivindicaciones 21 hasta 25, que se caracterizan por que presentan grupos funcionales que facilitan un acoplamiento de las biomoléculas o ligandos por medio de enlaces covalentes o no covalentes.
- 40 27. Micropartículas esféricas, magnetizables de alcohol de polivinilo, conforme a una de las reivindicaciones 21 hasta 26, que se caracterizan por que una o varias biomoléculas o ligandos están ligadas a las partículas por enlaces covalentes o no covalentes, de manera que las biomoléculas o los ligandos se eligen preferiblemente de grupos que comprenden anticuerpos, avidina, biotina, proteína A, proteína G, lectina, oligosacáridos, oligonucleótidos, enzimas, inhibidores enzimáticos, sustratos de enzimas, proteínas de receptores, albúmina, gelatina, glutatión, aminoácidos, péptidos, hormonas y neurotransmisores.
- 45 28. Utilización de micropartículas magnetizables de alcohol de polivinilo que se han fabricado mediante un procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 19, o bien de micropartículas magnetizables de alcohol de polivinilo conforme a una de las reivindicaciones 21 hasta 26, para el aislamiento, filtración o enriquecimiento de células, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, toxinas, virus, bacterias, anticuerpos, enzimas, antígenos o receptores, así como en un método de detección diagnóstico o forense, en el fraccionamiento celular, en la secuenciación del ADN, en la filtración del producto de la reacción en cadena, en la inmunoprecipitación, en el aislamiento de proteínas, en la limpieza por afinidad, en la inmunoprecipitación, en la tipificación tisular, en la síntesis de oligonucleótidos o en la síntesis peptídica.
- 50