

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 468 243**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

C08F 2/22 (2006.01)

C08F 2/44 (2006.01)

G01N 33/545 (2006.01)

G01N 33/549 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2007 E 07829923 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2088428**

54 Título: **Procedimiento de producción de partículas de polímero**

30 Prioridad:

16.10.2006 JP 2006281840

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

16.06.2014

73 Titular/es:

**MITSUBISHI CHEMICAL MEDIENCE
CORPORATION (50.0%)**

2-8, Shibaura 4-chome Minato-ku

Tokyo 108-8559, JP y

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA
UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

TANIGUCHI, TATSUO;

MIZUNO, AKIHIRO;

SAWAI, TOKIO y

TSUBOTA, HIROYUKI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 468 243 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

Procedimiento de producción de partículas de polímero

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de partículas de polímero que presentan un antígeno o un anticuerpo introducido en la superficie de las mismas, mediante la coexistencia del antígeno o anticuerpo en la polimerización en miniemulsión.

Técnica anterior

10 En el campo de ensayos de diagnóstico clínicos, diversas sustancias, que se pueden usar como un índice de diagnóstico de enfermedades, debería medirse rápidamente y de forma precisa en un gran número de muestras, y se debería darse una realimentación rápida y precisa de los resultados a una sala de tratamiento. En particular, la medida inmunológica basada en una reacción antígeno-anticuerpo se usa ampliamente para cuantificar de forma exacta una cantidad traza de una sustancia que se va a analizar. A este respecto, como un procedimiento para la mejora de la sensibilidad a detección o precisión, se lleva a cabo un procedimiento de aglutinación en látex que usa partículas hechas de un polímero sintético tal como poliestireno (el denominado látex), en el que se conoce un antígeno o anticuerpo específico para una sustancia que se va a analizar sobre la superficie de las partículas. El procedimiento de aglutinación del látex es un procedimiento para la medida rápida de una sustancia que se va a analizar, mediante detección visual u óptica de un grado de aglutinación de látex-partícula provocado por una reacción de la sustancia que se va a analizar con el antígeno o anticuerpo inmovilizado en las partículas de látex.

20 Adicionalmente, también es ampliamente usado un procedimiento sándwich, que usa partículas magnéticas en lugar de partículas de látex, atrapando una sustancia que se va a analizar con un primer anticuerpo inmovilizado sobre las partículas magnéticas, lavando las partículas magnéticas acumuladas con un imán para eliminar sustancias no reaccionadas y similares (la denominada separación B/F), y añadiendo un segundo anticuerpo etiquetado con una sustancia que genera señal tal como un enzima o un agente fluorescente para llevar a cabo de este modo el análisis.

25 Casi todas las sustancias a analizar, que son cuantificadas usando una reacción antígeno-anticuerpo, son por lo general componentes traza contenidas en muestras biológicas y, por tanto, es importante la precisión en un intervalo a baja concentración. Sin embargo, debido a que hay un caso donde se observa un nivel anormalmente alto de una sustancia que se va a medir de acuerdo con el progreso de una enfermedad, se desea un reactivo capaz de medir de forma precisa desde un intervalo a baja concentración hasta un intervalo a alta concentración en el campo de ensayos de diagnóstico clínicos.

30 En procedimientos que usan partículas de látex que incluyen el procedimiento de aglutinación en látex y el procedimiento sándwich, es esencial inmovilizar un antígeno o anticuerpo sobre la superficie de las partículas de látex, y se usa un procedimiento de inmovilización física o química del antígeno o anticuerpo sobre la superficie. Por ejemplo, se usa un procedimiento de inmovilización directamente del antígeno o anticuerpo sobre las partículas de látex mediante adsorción física, o un procedimiento de unión del antígeno o anticuerpo a las partículas de látex mediante una unión covalente con un grupo funcional localizado sobre la superficie de las partículas de látex, por ejemplo, un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo mercapto, un grupo hidroxilo, un grupo aldehído, un grupo epoxi, o similares.

40 Sin embargo una cantidad del antígeno o anticuerpo capaz de ser portado en la superficie del látex se ve limitada en estos procedimientos de unión física o química, y por tanto, hay un límite para un intervalo de medida o una sensibilidad de detección cuando el procedimiento de aglutinación del látex o el procedimiento del sándwich se lleva a cabo. Esto es, las propiedades (por ejemplo, una carga de superficie, una tasa de grupo funcional introducido, una distribución del tamaño de partícula, o similares) de las partículas de látex de por sí no son uniformes entre diferentes lotes o fabricantes, y por tanto, aunque si un procedimiento de unión de antígeno o anticuerpo a partículas de látex fuese uniforme, las propiedades de las partículas de látex unido a anticuerpo no son uniformes. Por ejemplo, en los procedimientos de unión física o química de un antígeno o anticuerpo a la superficie del látex, no toda la cantidad del antígeno o anticuerpo se une al látex, y el antígeno o anticuerpo no unido se elimina mediante lavado tras el procedimiento de unión, o el antígeno o anticuerpo unido se pelan frecuentemente del látex mediante centrifugación o dispersión. Es decir, un cambio en la cantidad de una unión de antígeno o anticuerpo afecta a un intervalo de medida o a una sensibilidad de detección.

50 Además, como un nuevo problema surgido recientemente, se han observado a veces muestras que provocan una reacción no específica, como se muestra en la referencia no de patente 1. Cuando un antígeno o anticuerpo se une a la superficie de partículas de látex, el antígeno o anticuerpo se desnaturaliza estructuralmente, y es provocada la reacción no específica por "una sustancia que se une a la parte desnaturalizada" contenida en las muestras. Debido a la reacción no específica, la fiabilidad de los valores medidos se pierde, y no se puede hacer un diagnóstico exacto. Este problema no se solventaría con exámenes individuales como para un antígeno o anticuerpo, o partículas de látex, y es muy difícil de resolver.

55 Referencia no de patente 1: Rinsho Byori (The Japanese Journal of Clinical Pathology), Agosto de 2000, vol. 48 nº 8, páginas 760-763.

El documento WO-A-02/02647 describe un procedimiento para la producción de partículas de tamaño nanométrico que presentan sitios de reconocimiento específicos de la molécula, el procedimiento comprende la formación de una emulsión que comprende dos fases no miscibles entre sí, en las que la emulsión contiene a) al menos un monómero, b) al menos un agente que da especificidad de molécula, c) de forma opcional al menos un iniciador, d) opcionalmente al menos un agente reticulante, y e) al menos un emulsionante; y subsiguientemente llevar a cabo una polimerización en emulsión. La polimerización en emulsión se inicia térmicamente o fotoquímicamente.

Divulgación de la invención

Problemas a resolver por la invención

Los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos de un procedimiento de unión de un antígeno o anticuerpo a la superficie del látex, en lugar de los procedimientos de unión física o química convencionales anteriores, y encontraron que cuando un antígeno o anticuerpo coexisten como una proteína, se pueden obtener partículas de látex en las que el antígeno o anticuerpo es introducido en la superficie de las partículas de látex una vez que la síntesis se complete. Los presentes inventores han encontrado, además de forma sorprendente, que las partículas de látex muestran una mayor reactividad a una sustancia que se analiza en comparación con reactivos convencionales en base a la adsorción física o similares, mientras que las propiedades del antígeno o anticuerpo introducido se mantienen, y que el antígeno o anticuerpo introducido en la superficie de las partículas de látex no se desnaturaliza estructuralmente con la unión, y por tanto, pueden evitarse reacciones no específicas con muestras que reaccionan no específicamente con reactivos convencionales. Los presentes inventores encontraron que un monómero puede polimerizarse en condiciones específicas, en un estado que el antígeno o anticuerpo coexiste en la reacción sintética de partículas de látex y se complementa en la presente invención.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento nuevo de producción de partículas de polímero que puedan proporcionar un reactivo para análisis inmunológico, que presente una sensibilidad a la detección excelente y sea capaz de evitar la reacción no específica que tiene lugar en procedimientos convencionales.

Medios para resolver los problemas

El problema se puede resolver con la presente invención, un procedimiento para la producción de partículas de polímero que presenta un antígeno o un anticuerpo introducido en la superficie del mismo, caracterizado porque comprende la etapa de llevar a cabo la polimerización en miniemulsión usando un monómero, un iniciador de polimerización por radicales, un emulsionante, y un hidrófobo en presencia del antígeno o anticuerpo con el que se producen las partículas de polímero, en el que el iniciador de la polimerización por radicales es un iniciador redox.

La presente invención proporciona una partícula de polímero que presenta una proteína introducida en la superficie de la misma, que se puede obtener con el procedimiento.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la reacción de polimerización se lleva a cabo a baja temperatura (más preferiblemente de 0 a 40° C) en la polimerización en miniemulsión.

De acuerdo con la presente invención, el iniciador de polimerización por radicales es un iniciador redox, preferiblemente una combinación de ácido ascórbico y H₂O₂.

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, el emulsionante es un tensioactivo, más preferiblemente un tensioactivo polimérico que presenta una cadena de polietilenglicol.

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, el hidrófobo es hexadecano o poliestireno.

Además se describe en la presente memoria:

[1] un reactivo para análisis inmunológico, que comprende una suspensión de partículas de látex que presenta un antígeno o un anticuerpo específico para una sustancia que se va a analizar introducida en la superficie de las partículas de látex, producido por polimerización de un monómero en presencia del antígeno o anticuerpo con el que se va a sintetizar las partículas de látex,

[2] un procedimiento para el análisis inmunológico, que comprende la etapa de poner en contacto, en un líquido, (1) una muestra que se sospecha contiene una sustancia que se va a analizar, con (2) partículas de látex que presentan un antígeno o un anticuerpo específico para la sustancia introducida en la superficie de las partículas de látex, producida por polimerización de un monómero en presencia de un antígeno o anticuerpo con el que se sintetiza las partículas de látex,

[3] el procedimiento de [2], que comprende además la etapa de analizar ópticamente un grado de aglutinación de látex-partícula provocado por una reacción de antígeno-anticuerpo, tras la etapa de poner en contacto, y

[4] el procedimiento de [2], que comprende además, tras la etapa de poner en contacto, la etapa de separar las partículas de látex del líquido, y analizar ópticamente la sustancia que se va a analizar unida a las partículas de látex, o la sustancia que se va a analizar que queda en el líquido.

Efectos de la invención

De acuerdo con la presente invención, se pueden proporcionar nuevas partículas de polímero, que pueden proporcionar un reactivo para análisis inmunológico, que presentan una excelente sensibilidad a detección y son capaces de evitar la reacción no específica que tiene lugar en procedimientos convencionales.

5 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos por medida de serie diluidas dos veces de una solución patrón de un anticuerpo anti-BSA, usando un reactivo preparado con la presente invención que contiene partículas de látex con BSA introducido, o un reactivo convencional que contiene partículas de látex unidas a BSA.

10 La figura 2 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos por medida de dos diluciones en serie de una solución patrón de un anticuerpo anti-IgG, usando un reactivo preparado con la presente invención que contiene partículas de látex con BSA introducido, o un reactivo convencional que contiene partículas de látex unidas a BSA.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

15 El procedimiento de la presente invención se caracteriza por la coexistencia de un antígeno o un anticuerpo en el procedimiento de polimerización en miniemulsión. De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, se pueden producir partículas de polímero (de forma particular, partículas de látex) que presentan el antígeno o el anticuerpo introducido en la superficie del mismo (en adelante denominadas como las partículas de polímero introducidas asociadas).

20 El procedimiento de la presente invención se puede llevar a cabo de una forma similar a la polimerización en miniemulsión convencional (por ejemplo, M. Antonietti, K. Landfester, Prog. Polym. Sci., 2002, 27, 689-757, and J. M. Asua, Prog. Polym. Sci., 2002, 27, 1283-1346), excepto en que coexisten un antígeno o anticuerpo en la reacción de polimerización.

25 La polimerización en miniemulsión convencional puede comprender, pero sin limitarse a estas, las etapas de, por ejemplo, mezclar un monómero, un iniciador de polimerización por radicales, un emulsionante, y un hidrófobo para preparar una mezcla, someter a cizallamiento la mezcla, y calentar la mezcla cizallada hasta una temperatura de inicio de la polimerización con la que se lleve a cabo la polimerización. En la polimerización en miniemulsión, después de que un monómero para polimerización se mezcle con un emulsionante, se lleva a cabo una etapa de cizallamiento mediante, por ejemplo, radiación supersónica, para alterar el monómero mediante una fuerza de cizallamiento y formar gotas de monómero recubiertas con el emulsionante. Las gotas de monómero se polimerizan calentando la mezcla hasta la temperatura de inicio de polimerización del iniciador de polimerización por radicales para obtener las partículas de polímero.

30 El antígeno o anticuerpo usado en la presente invención no está particularmente limitado, en tanto muestre una actividad de superficie, y es preferible un antígeno o anticuerpo que se pueda usar en un procedimiento de látex (por ejemplo, un procedimiento de aglutinamiento de látex o una separación B/F que use látex). Que un cierto antígeno o anticuerpo muestre o no una actividad de superficie se puede confirmar con un procedimiento conocido, tal como una medida de la tensión de superficie, o una medida de un espectro fluorescente que usa pireno como una sonda fluorescente. Un antígeno o anticuerpo preferido usado en la presente invención muestra una relación de intensidad (I1/I3) del primer pico de emisión (I1) al tercer pico de emisión (I3) de 0,5 a 1,6 (más preferiblemente de 0,6 a 1,5) en la medida con espectro fluorescente que usa pireno como una sonda fluorescente. Ejemplos del antígeno o anticuerpo incluyen diversos anticuerpos, receptores, enzimas, lípidos y cadenas de azúcar, más particularmente, IgG, proteína reactiva frente a C (CRP), ferritina, microglobulina β -2, α -fetoproteína (AFP), IgE, virus de la hepatitis B (anticuerpo HBs o anticuerpo HBc), dímero D, producto de degradación de la fibrina/fibrinógeno (FDP), fibrina soluble (SF), complejo inhibidor de plasmina- α 2-plasmina (PPI), antígeno específico de la próstata (PSA), elastasa 1, elastasa XDP, trombosmodulina y albúmina (preferiblemente albúmina de suero).

45 Como el anticuerpo se puede usar un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. El anticuerpo se puede usar como una molécula de inmunoglobulina tal cual, o un fragmento del mismo, tal como Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv.

50 Se puede usar en la presente invención un monómero que se puede usar en polimerización en miniemulsión convencional. Ejemplos del monómero incluyen estireno, derivados de estireno (por ejemplo, clorometilestireno o estirenosulfonato de sodio), ácido acrílico o ácido metacrílico, ésteres de ácido acrílico o ésteres de ácido metacrílico [por ejemplo, (met)acrilato de metilo, (met)acrilato de etilo, (met)acrilato de butilo, (met)acrilato de hexadecilo] y acetato de vinilo.

55 Un iniciador de polimerización por radicales que se pueda usar en una polimerización en miniemulsión convencional puede ser, por ejemplo, un iniciador de peróxido, un iniciador de persulfato, un iniciador azo, o un iniciador redox. En la presente invención el iniciador de polimerización por radicales es un iniciador redox. El iniciador redox es preferible en la presente invención debido a que la reacción de polimerización puede ser a baja temperatura. Cuando el antígeno o anticuerpo que coexiste en la reacción de polimerización presenta actividades fisiológicas, se puede suprimir una reducción en las actividades fisiológicas llevando a cabo la reacción de polimerización a baja temperatura.

Ejemplos del iniciador de peróxido incluyen peróxido de benzilo (BPO), peróxido de di-t-butilo (DBPO) y peróxido de amonio. Ejemplos del iniciador de persulfato incluyen persulfato de potasio (KPS), persulfato de amonio (APS) y persulfato de sodio (NPS). Ejemplos del iniciador azo incluyen azobisisobutironitrilo (AIBN), 2,2'-azobisisobutirato de dimetilo (MAIB), ácido 4,4'-azobis(4-cianoaléxico) y 2,2'-azobis(2,4-dimeilvaleronitrilo).

- 5 Ejemplos del iniciador redox incluyen N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TMEDA)/persulfato de potasio (KPS), FeSO₄/KPS, FeSO₄/H₂O₂ y ácido ascórbico (vitamina C)/H₂O₂. La combinación de ácido ascórbico/H₂O₂ es preferible, debido que se puede lograr una alta tasa de conversión (por ejemplo, de 75 a 98%).

- Diversos tensioactivos que se pueden usar en la polimerización en miniemulsión convencional se pueden usar como el emulsionante en la presente invención y pueden incluir compuestos aniónicos, compuestos catiónicos, y compuestos no iónicos. Ejemplos de los compuestos no iónicos incluyen un tensioactivo polimérico que presenta una cadena de polietilenglicol (PEG), un alcohol de cadena larga, poli(alcohol vinílico) y Brij 35 (PIERCE).

- El tensioactivo polimérico que presenta una cadena de polietilenglicol (PEG) puede ser, por ejemplo, CH₂=C(CH₃)COO(CH₂CH₂O)_nCH₃ (n es un número entero de 2 o más, preferiblemente de 2 a 100, más preferiblemente de 5 a 80, aún más preferiblemente de 8 a 50, lo más preferiblemente de 9 a 23), de forma más particular, por ejemplo, CH₂=C(CH₃)COO(CH₂CH₂O)₂₃CH₃ [n=23; (nombre del producto) éster NK M-230G; Shin-nakamura Chemical Co. Ltd.], o CH₂=C(CH₃)COO(CH₂CH₂O)₉CH₃ [n=9; (nombre del producto) éster NK M-90G; Shin-nakamura Chemical Co. Ltd.]. La estabilidad de la dispersión debida a la repulsión estérica puede obtenerse usando el tensioactivo polimérico anterior como el emulsionante.

Ejemplos del alcohol de cadena larga incluyen 1-pentanol y decanol.

- 20 Se puede usar un hidrófobo en la polimerización en miniemulsión convencional en la presente invención, y puede ser, por ejemplo, hexadecano, silsesquioxano, o un polímero hidrófobo (por ejemplo, metacrilato de poliestireno o polimetilo). Es preferible hexadecano o poliestireno. Cuando se usa el hidrófobo se puede suprimir un aumento en la heterogeneidad del tamaño de partícula debido a la maduración de Oswald, y por lo tanto se puede sintetizar partículas de látex monodispersadas.

- 25 Las condiciones de reacción en la polimerización, tales como disolvente, relación de mezcla, temperatura, o tiempo de reacción, se pueden seleccionar de forma apropiada, por ejemplo, llevando a cabo un experimento piloto, de acuerdo con el tipo de un monómero y un antígeno o anticuerpo usado, el tamaño de partícula medio de las partículas de polímero que se sintetizan, la cantidad del antígeno o anticuerpo portado en la superficie de las partículas, o similares.

- Por ejemplo, respecto a 40 mmol de un monómero para polimerización (por ejemplo, un monómero de estireno), se puede usar respectivamente un antígeno o anticuerpo [por ejemplo, albúmina de suero bovino, IgG, o F(ab')₂] en una cantidad por lo general de 0,01 a 5 g, preferiblemente de 0,02 a 2 g, más preferiblemente de 0,08 a 0,8 g; un iniciador de polimerización por radicales (por ejemplo, ácido ascórbico o H₂O₂) en una cantidad por lo general de 0,01 a 4 mmol, preferiblemente de 0,02 a 2 mmol; y un emulsionante (por ejemplo, éster NK M-230G o éster NK M-90G) en una cantidad por lo general de 0,1 a 10 mmol, preferiblemente de 0,2 a 5 mmol, más preferiblemente de 0,4 a 4 mmol. El tiempo de reacción es por lo general de 1 hora o más, preferiblemente de 3 a 48 horas, más preferiblemente de 4 a 24 horas. La temperatura de reacción es por lo general de 0 a 80° C, preferiblemente de 0 a 60° C, más preferiblemente de 0 a 40° C.

De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, se pueden producir partículas de látex que presentan un antígeno o anticuerpo introducido en la superficie de las partículas de látex.

- 40 En partículas de látex convencionales, por ejemplo, un antígeno o anticuerpo se inmoviliza directamente sobre las partículas de látex mediante adsorción química, o un antígeno o anticuerpo se une a las partículas de látex mediante una unión covalente por un grupo funcional localizado sobre la superficie de las partículas de látex, por ejemplo, un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo mercapto, un grupo hidroxilo, un grupo aldehído, un grupo epoxi, o similares. En las partículas de látex con antígeno o anticuerpo introducido que se pueden obtener mediante el procedimiento de la presente invención, se porta el antígeno o anticuerpo sobre la superficie del látex embebiendo parte del antígeno o anticuerpo en las partículas de látex.

- 45 Cuando se producen partículas de látex por polimerización en miniemulsión llevada a cabo a temperatura baja, como un procedimiento de introducción de un antígeno o anticuerpo coexistente en partículas de látex en la síntesis de las partículas de látex, el antígeno o anticuerpo se introduce en la superficie de las partículas de látex cuando la síntesis se completa, y como consecuencia, se puede evitar la eliminación del antígeno o anticuerpo no unido de las partículas de látex por lavado o el pelado del antígeno o anticuerpo unido desde las partículas de látex por centrifugación o dispersión, lo que tiene lugar en partículas de látex producidas por procedimientos convencionales. Adicionalmente se puede obtener una alta reactividad usando tales partículas de látex. Además, debido a que el antígeno o anticuerpo es introducido en la superficie de las partículas de látex cuando se completa la síntesis no tiene lugar la desnaturalización debida a obstáculos estéricos por la unión, y por tanto, se puede evitar una reacción con una muestra en la que se observa una reacción no específica cuando se usan partículas de látex convencionales.

En el procedimiento de la presente invención, no se clarifica un mecanismo de la introducción del antígeno o anticuerpo coexistente en la superficie de las partículas de polímero (por ejemplo, látex) en la polimerización en miniemulsión, pero

los presentes inventores suponen el siguiente mecanismo. Esto es, el antígeno o anticuerpo usado en la presente invención muestra una actividad de superficie, y por tanto, se considera que el antígeno o anticuerpo existe en la superficie de las partículas de polímero (por ejemplo, látex), como una interfaz con agua, debido a la parte hidrófila. A este respecto la presente invención no se ve limitada por la suposición.

5 La presente invención proporciona partículas de polímero útiles como un agente nuevo para análisis inmunológico y en un procedimiento nuevo para análisis inmunológico. En el agente y procedimiento para análisis inmunológico se usan partículas de látex que presentan un antígeno o anticuerpo (es decir, un asociado inmunológico) introducido en la superficie de las partículas de látex (partículas de látex a las que se introduce un asociado), en lugar de partículas de látex convencionales que portan un antígeno o anticuerpo sobre la superficie de las mismas con una unión física o
10 química. Las partículas de látex en las que se introduce un asociado no se encuentran particularmente limitadas, en tanto el antígeno o anticuerpo sea portado en la superficie de las partículas de látex mediante embebido de parte del antígeno o anticuerpo en las partículas de látex. Las partículas de látex en las que se introduce un asociado se pueden producir con el procedimiento de la presente invención.

15 Se pueden usar partículas de polímero preparadas con la presente invención en un procedimiento de látex (un procedimiento de aglutinación de látex o una separación B/F que usa látex) para llevar a cabo el análisis. En un sistema en el que las partículas de látex en las que se introduce un antígeno o anticuerpo específico de una sustancia que se va a analizar se pusieron en contacto con la sustancia que se va a analizar (es decir, un sistema en el que se lleva a cabo una reacción antígeno-anticuerpo en el látex), no tiene lugar la desnaturalización debida al obstáculo estérico en el antígeno o anticuerpo introducido, y por tanto, las partículas de látex no reaccionan con una muestra no específica para
20 la parte desnaturalizada, y como consecuencia, la sustancia que se va a analizar se puede analizar (detectar o medir, preferiblemente medir) a una mayor sensibilidad, en comparación con procedimientos convencionales.

No se ve particularmente limitada una sustancia que se pueda analizar (una sustancia que se va a analizar), en tanto se pueda analizar como un antígeno o un anticuerpo usando por lo general una reacción antígeno-anticuerpo, y son preferibles sustancias fisiológicamente activas. Ejemplos de la sustancia que se va a analizar incluyen proteínas, lípidos y cadenas de azúcar, más particularmente, IgG, proteína reactiva C (CRP), ferritina, microglobulina β -2, α -fetoproteína (AFP), IgE, virus de la hepatitis B (anticuerpo HVs o anticuerpo HBc), dímero D, producto de degradación de fibrina/fibrinógeno (FDP), fibrina soluble (SF), complejo inhibidor de plásmido- α 2-plásmido (PPI), antígeno específico de la próstata (PSA), elastasa 1, elastasa XDP, trombomodulina y albúmina (preferiblemente albúmina de suero).
25

30 Una muestra que se puede analizar no se ve particularmente limitada en tanto sea sospechosa de poner en contacto la anterior sustancia que se va a analizar. La muestra puede ser, en particular, muestras biológicas, tales como sangre, suero, plasma, orina, fluido cerebroespinal, extractos de célula o líquidos de tejido alterados.

Se pueden usar partículas de polímero preparadas con la presente invención en un procedimiento de látex para llevar a cabo un análisis. En el procedimiento de látex se usan partículas de látex en las que se introduce un antígeno o anticuerpo específico para una sustancia que se va a analizar.

35 Se puede seleccionar de forma apropiada un tamaño de partícula medio de las partículas de látex introducidas asociadas de acuerdo con una concentración de detección de la sustancia que se va a analizar, o un equipo de medida. El tamaño de partícula medio se puede seleccionar de forma apropiada dentro de un intervalo por lo general de 0,05 a 0,5 μ m.

40 Como el anticuerpo introducido en las partículas de látex se puede usar un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. El anticuerpo se pueden usar como una molécula de inmunoglobulina tal cual, o un fragmento de la misma, tal como Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv.

45 El agente para análisis inmunológico se puede preparar de varias formas, por ejemplo, un sistema de componente de un reactivo que contiene un tampón y las partículas de látex en las que se introduce un antígeno o anticuerpo; un sistema de componentes de dos reactivos en el que el primer reactivo contiene un tampón y el segundo reactivo contiene un anticuerpo monoclonal y las partículas de látex en las cuales se introduce un antígeno o anticuerpo; o un sistema de componentes de dos reactivos en el que el primer reactivo contiene un tampón y las partículas de látex introducidas y el segundo reactivo contiene partículas de látex sensibilizadas con un antígeno o anticuerpo.

50 En el procedimiento se usan el(los) anterior(es) reactivo(s) para llevar a cabo una reacción de aglutinación y un grado de la aglutinación se analiza de forma óptica (en particular se mide) para analizar (en particular medir) una cantidad de la sustancia que se va a analizar contenida en una muestra. El análisis óptico de un grado de la aglutinación de partículas de látex se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante un instrumento óptico para la medida de la intensidad de una luz difractada, una absorbancia, o una intensidad de una luz transmitida. Una longitud de onda de medida preferida es de 300 a 800 nm. El grado de aglutinación se puede llevar a cabo de acuerdo con un procedimiento conocido, por selección de un tamaño (tamaño de partícula medio) de la partícula de látex, una concentración de partícula de látex, o un tiempo de reacción, y medida de un aumento o reducción en una intensidad de luz difractada, una absorbancia o una intensidad de luz transmitida, o una combinación de los mismos.
55

De forma alternativa se puede analizar una cantidad de la sustancia que se va a analizar contenida en una muestra (en particular medir), poniendo en contacto el(los) anterior(es) reactivo(s) con una muestra en un líquido, llevando a cabo una separación B/F para separar las partículas de látex del líquido, y analizar (en particular medir) la sustancia que se va a

analizar unida a las partículas de látex, o la sustancia que se va a analizar que queda en el líquido.

5 La reacción de aglutinación de látex-partículas se puede medir de forma más precisa, se puede extender un intervalo medible en una concentración baja, y se puede evitar una reacción no específica, pero no solo seleccionando el tipo de un antígeno o anticuerpo que se va a introducir, sino también ajustando otros factores que pueden afectar la reacción de aglutinación del látex. Como los factores que se pueden citar se encuentran, por ejemplo, una concentración de partículas de látex, una cantidad de un anticuerpo introducido en las partículas de látex, o un tamaño de partícula de la partícula de látex.

10 La reacción antígeno-anticuerpo usada se puede llevar a cabo en las mismas condiciones que las de la reacción antígeno-anticuerpo convencional. Como un medio de reacción se pueden seleccionar de forma apropiada diversos tampones de acuerdo con el tipo de la sustancia que se va a analizar. No se ven particularmente limitados una resistencia iónica y un pH del tampón, en tanto el tampón no inactive la sustancia que se va a analizar y no inhiba la reacción antígeno-anticuerpo. Como el tampón, por ejemplo, se puede usar un tampón de Good, un tampón de glicina, o un tampón tris. El pH en la reacción es preferiblemente 5 a 10, más preferiblemente 6 a 8. La temperatura de reacción es preferiblemente de 0 a 50° C, más particularmente 20 a 40° C. El tiempo de reacción se puede seleccionar de forma apropiada.

Ejemplos

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente con los siguientes ejemplos, pero sin limitarse a estos. Ejemplo 1(1), ejemplo 4(1), y ejemplo 6(1) se encuentran dentro de las reivindicaciones.

Ejemplo 1: Preparación de reactivo para medida de anticuerpo de albúmina de suero anti-bovino (BSA)

20 (1) Preparación de partículas de látex con BSA introducido

Después de haberse mezclado 40 mmol de estireno, 4 mmol de hexadecano, 200 mg de BSA, 0,8 mmol de $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{23}\text{CH}_3$ (éster NK M-230G; Shin-nakamura Chemical Co. Ltd.), 0,4 mmol de ácido ascórbico, y 20 g de agua, se sometió la mezcla a ultrasonidos [salida: 80%, pulso: 50%, UH-300 (SMT Co., Ltd.)] en un baño de hielo durante 15 minutos. Se transfirió la totalidad a un matraz de tres bocas, y se burbujeó gas nitrógeno a través de todo durante 15 minutos mientras se agitaba a 100 rpm. Después se añadió 0,4 mmol de H_2O_2 y se polimerizó a 30° C ó 60° C durante 6 horas mientras se agitaba a 200 rpm para preparar partículas de látex con BSA introducido. Los tamaños de partícula medios de las partículas de látex con BSA introducido fueron de 0,109 μm (polimerización a 30° C) y 0,121 μm (polimerización a 60° C).

(2) Preparación de suspensión de partículas de látex con BSA introducido

30 Respecto a 1 ml de partículas de látex con BSA introducido (concentración: 1%), se añadió 1 ml de un reactivo de bloqueo para la medida inmunológica N101 (NOF Corporation), y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esta mezcla se centrifugó a 35000 rpm. Se suspendió el precipitado resultante (es decir, el látex) en 10 ml de un tampón Tris (pH 8,0) para preparar una suspensión de partículas de látex con BSA introducido.

(3) Preparación de tampón

35 Se añadió cloruro de sodio a 0,1 mol/l de tampón Tris (pH 8,0) que contiene 0,5% en peso de BSA de modo que se llegue a una concentración de 0,9% en peso para preparar un tampón. Después de esto un tampón Tris que contiene NaCl sin BSA se designa como "tampón A" y un tampón Tris que contiene NaCl con BSA se designa como "tampón B".

(4) Reactivo para la medida de anticuerpo anti-BSA

40 Se evaluó un sistema de componentes de dos reactivos constituido por la suspensión de partículas de látex con BSA introducido (segundo reactivo) preparado en el ejemplo 1(2) y tampón A ó B (primer reactivo) preparado en el ejemplo 1(3) en los siguientes ejemplos, como un reactivo para la medida de un anticuerpo anti-BSA, un reactivo para análisis inmunológico de la presente invención.

Ejemplo 2: medida de solución patrón de anticuerpo anti-BSA

(1) Preparación de solución patrón de anticuerpo anti-BSA

45 Se diluyó en serie un anticuerpo anti-BSA (albúmina de vaca anti-ratón; DAKO, 900 unidades) dos veces con solución salina fisiológica para preparar una serie de diluciones en serie de un anticuerpo anti-BSA patrón que presenta concentraciones de 900, 450, 225, 113, 56, 28, 14 y 7 unidades.

(2) Medida de solución patrón de anticuerpo anti-BSA

50 Después de haberse mezclado 90 μl de tampón A ó B preparado en el ejemplo 1(3) con 15 μl de cada una de las series de dilución, e incubarse a 37° C durante un periodo de tiempo predeterminado, se añadió luego 90 μl de la suspensión de partículas de látex con BSA introducido preparada en el ejemplo 1(2) y se agitó. De la última adición se midieron las

absorbancias a longitudes de onda de 800 nm y 570 nm durante 5 minutos. La diferencia entre una variación de la absorbancia (es decir, un grado de cambio en absorbancia) a 570 nm y una variación de la absorbancia a 800 nm fue considerada como una variación de la absorbancia (Δ Abs). La medida se llevó a cabo usando un analizador automatizado (Hitachi 7170, Hitachi Ltd.).

5 A título comparativo las partículas de látex de poliestireno que presentan un tamaño de partícula medio de 0,11 μ m (JSR Corporation, contenido en sólidos: 10%) se usaron para preparar una suspensión de partículas de látex unidas a BSA mediante sensibilización de 1 ml de las partículas (concentración: 1%) con 0,3% (3 mg/ml) de BSA.

10 Los resultados se muestran en la tabla 1 y figura 1, y tabla 2. La tabla 1 y la figura 1 muestran los resultados del reactivo (temperatura de polimerización = 30° C) de la presente invención descritos en el ejemplo 1(4) usando tampón A ó B, así como también los resultados de un reactivo convencional. La tabla 2 muestra los resultados de los reactivos (temperatura de polimerización = 30° C ó 60° C) de la presente invención descritos en el ejemplo 1(4) usando tampón A (es decir, sin BSA) así como también los resultados de un reactivo convencional.

15 Como es evidente en la tabla 1 y figura 1, cuando se usó el tampón A (es decir, sin BSA), la suspensión de partículas de látex con BSA introducido (reactivo de la presente invención) mostró una variación de la absorbancia (Δ Abs) de 24513 a una concentración de anticuerpo anti-BSA de 900 unidades, mientras que la suspensión de partículas de látex unidas a BSA (reactivo convencional) mostró una variación de la absorbancia (Δ Abs) de 385 a una concentración de anticuerpo anti-BSA de 900 unidades, y por tanto, la suspensión de partículas de látex con BSA introducido muestra de forma aparente una mayor sensibilidad. Cuando se usó tampón B (es decir, sin 0,5% de BSA), no se observaba reacción con las series de dilución del anticuerpo anti-BSA usando cualquier suspensión.

20

Tabla 1

Variación de la absorbancia (Δ Abs)

Anticuerpo anti-BSA (título)	Reactivo convencional partículas unidas a BSA		Reactivo de la invención partículas unidas a BSA	
	Tampón A	Tampón B	Tampón A	Tampón B
0	-20	-10	-102	-50
7	-38	-7	84	-50
14	-19	-7	407	-48
28	-19	-9	1439	-46
56	-18	-6	4546	-45
113	-15	-6	7024	-48
225	-5	-2	11471	-49
450	63	2	16397	-43
900	385	11	24513	-46

25 Como es evidente en la tabla 2, cuando se usaron las suspensiones de partículas de látex con BSA introducido (reactivo de la presente invención), la suspensión de partículas de látex con BSA introducido obtenida llevando a cabo la reacción de polimerización a una temperatura baja (30° C) mostró una variación de la absorbancia (Δ Abs) de 24513 a una concentración de anticuerpo anti-BSA de 900 unidades, mientras que la suspensión de partículas de látex con BSA introducido obtenida llevando a cabo la reacción de polimerización a una temperatura alta (60° C) mostró una variación de la absorbancia (Δ Abs) de 8480 a una concentración de anticuerpo anti-BSA de 900 unidades, y por tanto, la suspensión de partículas de látex con BSA introducido preparadas a baja temperatura mostraban una mayor sensibilidad. Además, la suspensión de partículas de látex unidas a BSA (reactivo convencional) mostró una variación de la absorbancia (Δ Abs) de 385 a una concentración de anticuerpo anti-BSA de 900 unidades, y por tanto, las suspensiones de partículas de látex con BSA introducido mostraron aparentemente una mayor sensibilidad.

30

Tabla 2

Variación de la absorbancia (Δ Abs)

Anticuerpo anti-BSA (título)	Partículas unidas a BSA		Partículas con BSA introducido	
	Temperatura de polimerización			
			30° C	60° C
0	-20	-102	-73	
14	-19	407	-55	
28	-19	1439	-1	
56	-18	4546	114	
113	-15	7024	406	
225	-5	11471	1169	
450	63	16397	3507	
900	385	24513	8480	

Ejemplo 3: medida de suero humano usando reactivo para medida de anticuerpo anti-BSA

5 En este ejemplo se repitieron los procedimientos descritos en el ejemplo 2(2), excepto que se usaron cinco muestras de suero humano (números 1 a 5) como muestras normales y tres muestras de suero humano (números 6 a 8) como muestras no específicas en lugar de las series de dilución de un anticuerpo anti-BSA patrón. Las muestras no específicas reaccionaron de forma no específica con una suspensión de partículas de látex a las que se unió BSA (es decir, partículas de látex unidas a BSA), pero no reaccionaron con una suspensión de partículas de látex a las que no estaba unida BSA.

10

Los resultados se muestran en la tabla 3.

15 Como se muestra en la tabla 3, las muestras de suero normal (números 1 a 5) y las muestras de suero no específicas (números 6 a 8) no reaccionaron con la suspensión de partículas de látex con BSA introducido. Sin embargo la suspensión de partículas de látex con BSA unido reaccionaron fuertemente con las muestras no específicas cuando se usaba el tampón sin BSA (tampón A) o el tampón en el que se suspendió BSA al 0,5% (tampón B).

Tabla 3

Variación de la absorbancia (Δ Abs)

Muestras de suero humano	Reactivo convencional partículas unidas a BSA		Reactivo de la invención partículas unidas a BSA	
	Tampón A	Tampón B	Tampón A	Tampón B
[Normal]				
Nº 1	-76	-54	-4	2
Nº 2	-88	25	-31	-16
Nº 3	53	63	-47	-39
Nº 4	89	92	-5	116
Nº 5	100	129	2	14
[No específico]				
Nº 6	6382	6463	20	60
Nº 7	2536	3570	23	71
Nº 8	1571	2317	13	74

Ejemplo 4: preparación de reactivo para medida de anti-IgG

(1) Preparación de partículas de látex con IgG introducido

5 Después de haberse mezclado 40 mmol de estireno, 4 mmol de hexadecano, 200 mg de IgG, 0,6 mmol de $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{23}\text{CH}_3$ (éster NK M-230G; Shin-nakamura Chemical Co. Ltd.), 0,4 mmol de ácido ascórbico, y 20 g de agua, se sometió la mezcla a ultrasonidos [salida: 80%, pulso: 50%, UH-300 (SMT Co., Ltd.)] en un baño de hielo durante 15 minutos. Se transfirió la totalidad a un matraz de tres bocas, y se burbujeó gas nitrógeno a través de todo durante 15 minutos mientras se agitaba a 100 rpm.

10 Después se añadió 0,4 mmol de H_2O_2 y se polimerizó a 30° C durante 6 horas mientras se agitaba a 200 rpm para preparar partículas de látex con IgG introducido. Los tamaños de partícula medios de las partículas de látex con IgG introducido fueron de 0,318 μm .

(2) Preparación de suspensión de partículas de látex con IgG introducido

15 Respecto a 1 ml de partículas de látex con IgG introducido (concentración: 1%), se añadió 1 ml de un reactivo de bloqueo para la medida inmunológica N101 (NOF Corporation), y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esta mezcla se centrifugó a 35000 rpm. Se suspendió el precipitado resultante (es decir, el látex) en 10 ml de un tampón Tris (pH 8,0) para preparar una suspensión de partículas de látex con IgG introducido.

(3) Reactivo para la medida de anticuerpo anti-IgG

20 Se evaluó un sistema de componentes de dos reactivos constituido por la suspensión de partículas de látex con IgG introducido (segundo reactivo) preparado en el ejemplo 4(2) y tampón B (primer reactivo) preparado en el ejemplo 1(3) en los siguientes ejemplos, como un reactivo para la medida de un anticuerpo anti-IgG, un reactivo para análisis inmunológico de la presente invención.

Ejemplo 5: medida de solución patrón de anticuerpo anti-IgG

(1) Preparación de solución patrón de anticuerpo anti-IgG

25 Se diluyó en serie un anticuerpo anti-IgG (cadenas anti-IgG H&L; MILES-YEDA, 2,8 mg/ml) dos veces con solución salina fisiológica para preparar una serie de siete diluciones en serie de un anticuerpo anti-IgG patrón que presenta concentraciones de 2,8, 1,4, 0,7, 0,35, 0,175, 0,088 y 0,044 mg/ml.

(2) Medida de solución patrón de anticuerpo anti-IgG

30 Después de haberse mezclado 90 μl del tampón preparado en el ejemplo 1(3) con 2 μl de cada una de las series de dilución, e incubarse a 37° C durante un periodo de tiempo predeterminado, se añadió luego 90 μl de la suspensión de partículas de látex con IgG introducido preparada en el ejemplo 4(2) y se agitó. De la última adición se midieron las absorbancias a longitudes de onda de 800 nm y 570 nm durante 5 minutos. La diferencia entre una variación de la absorbancia a 570 nm y una variación de la absorbancia a 800 nm fue considerada como una variación de la absorbancia (ΔAbs). La medida se llevó a cabo usando un analizador automatizado (Hitachi 7170, Hitachi Ltd.).

35 A título comparativo las partículas de látex de poliestireno que presentan un tamaño de partícula medio de 0,283 μm (Sekisui, contenido en sólidos: 10%) se usaron para preparar una suspensión de partículas de látex unidas a IgG mediante sensibilización de 1 ml de las partículas (concentración: 1%) con 1% (10 mg/ml) de IgG, y se usaron la suspensión resultante de partículas de látex unidas a IgG y una suspensión de partículas de látex no sensibilizadas con IgG.

40 Los resultados del reactivo de la presente invención descrito en el ejemplo 4(3) se muestran en la tabla 4 y figura 2, junto con los resultados del reactivo convencional.

45 Como es evidente a partir de la tabla 4 y figura 2 la suspensión de partículas de látex con IgG introducido (reactivo de la presente invención) mostraron una variación de la absorbancia (ΔAbs) de 812 a una concentración de anticuerpo anti-IgG de 1,4 mg/ml, mientras que la suspensión de partículas de látex unidas a IgG (reactivo convencional) mostró una variación de la absorbancia (ΔAbs) de 219, y por tanto, la suspensión de partículas de látex con IgG introducido muestran de forma aparente una mayor sensibilidad.

Tabla 4

Variación de la absorbancia (Δ Abs)

Anticuerpo anti-IgG (mg/ml)	Reactivo de la invención		Reactivo convencional
	Partículas introducidas en BSA	Partículas unidas a BSA	Partículas no unidas
0	-1	-4	-12
0,044	104	-3	-8
0,088	174	7	-5
0,175	311	35	-4
0,35	504	71	-6
0,7	703	132	-2
1,4	812	219	-5
2,8	757	262	-5

Ejemplo 6: preparación de reactivo de medida con anticuerpo anti-CRP-F(ab')₂ introducido5 (1) Preparación de partículas de látex con anticuerpo anti-CRP-F(ab')₂ introducido

Después de mezclar 10 mmol de estireno, 1 mmol de hexadecano, 50 mg de anticuerpo anti-CRP F(ab')₂, 0,2 mmol de CH₂=C(CH₃)COO (CH₂CH₂O)₂₃CH₃ (éster NK M-230G; Shin-nakamura Chemical Co. Ltd.), 0,1 mmol de ácido ascórbico, y 5 g de agua, se sometió la mezcla a ultrasonidos [salida: 50%, pulso: 50%, UH-300 (SMT Co., td)] en un baño de hielo durante 15 minutos. Se transfirió la totalidad a un matraz de tres bocas, y se burbujeó nitrógeno a través de todo durante 15 minutos mientras se agitaba a 100 rpm. Después se añadió 0,1 mmol de H₂O₂ y se polimerizó a temperatura ambiente durante 6 horas mientras se agitaba a 200 rpm para preparar las partículas de látex con anticuerpo anti-CRP-F(ab')₂ introducido. Los tamaños de partícula medios de las partículas de látex con anticuerpo anti-CRP-F(ab')₂ introducido resultantes eran de 0,249 μ m.

(2) Preparación de suspensión de partículas de látex con anticuerpo anti-CRP-F(ab')₂ introducido

15 Respecto a 1 ml de partículas de látex con anticuerpo anti-CRP-F(ab')₂ introducido (concentración: 1%), se añadió 1 ml de un reactivo de bloqueo para la medida inmunológica N101 (NOF Corporation), y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esta mezcla se centrifugó a 35000 rpm. Se suspendió el precipitado resultante (es decir, el látex) en 10 ml de un tampón Tris (pH 8,0) para preparar una suspensión de partículas de látex con anticuerpo anti-CRP-F(ab')₂ introducido.

20 (3) Reactivo para medida de CRP

Se evaluó un sistema de componentes de dos reactivos constituido por la suspensión de partículas de látex con anticuerpo anti-CRP-F(ab')₂ introducidos (segundo reactivo) preparado en el ejemplo 6(2) y tampón B (primer reactivo) en el ejemplo 1(3) en los siguientes ejemplos como un reactivo para la medida de CRP, un reactivo para análisis inmunológico de la presente invención.

25 **Ejemplo 7: medida de solución patrón de CRP**

(1) Preparación de solución patrón de CRP

Se diluyó en serie CRP (Oriental Yeast Co., Ltd., una solución de CRP recombinante, 100 mg/dl) con solución salina fisiológica para preparar una serie de seis diluciones en serie de un CRP patrón que presenta concentraciones de 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2 y 0,1 mg/dl.

30 (2) Medida de solución patrón de CRP

Después de haberse mezclado 90 μ l del tampón preparado en el ejemplo 1(3) con 2 μ l de cada una de las series de dilución, e incubarse a 37° C durante un periodo de tiempo predeterminado, se añadió luego 90 μ l de la suspensión de partículas de látex con anticuerpo anti-CRP-F(ab')₂ introducido preparada en el ejemplo 6(2) y se agitó. De la última adición se midieron las absorbancias a longitudes de onda de 800 nm y 570 nm durante 5 minutos. La diferencia entre

una variación de la absorbancia a 570 nm y una variación de la absorbancia a 800 nm fue considerada como una variación de la absorbancia (Δ Abs). La medida se llevó a cabo usando un analizador automatizado (Hitachi 7170, Hitachi Ltd.).

Los resultados del reactivo de la presente invención descrito en el ejemplo 6(3) se muestran en la tabla 5.

- 5 Como es evidente a partir de la tabla 5, la suspensión de partículas de látex con anticuerpo anti-CRP-F(ab')₂ introducido (reactivo de la presente invención) mostró una reactividad dependiente de la concentración con las soluciones patrón de CRP en el intervalo de 0,1 a 3,2 mg/dl.

Tabla 5

Variación de la absorbancia (Δ Abs)

CRP (mg/dl)	Reactivo de la invención partículas con anti-CRP-anticuerpo-F(ab') ₂ introducido
0	-36
0,1	6
0,2	57
0,4	154
0,8	315
1,6	482
3,2	533

10

Aplicabilidad industrial

La presente invención se puede aplicar a análisis inmunológicos, de forma particular a un procedimiento de aglutinación en látex.

REIVINDICACIONES

- 5 1.Un procedimiento de producción de partículas de polímero que tienen un antígeno o un anticuerpo introducido en la superficie de las mismas, **caracterizado porque** comprende la etapa de llevar a cabo la polimerización en miniemulsión usando un monómero, un iniciador de polimerización por radicales, un emulsionante y un hidrófobo en presencia del antígeno o anticuerpo, por medio de lo cual producir las partículas de polímero, en las que el iniciador de polimerización por radicales es un iniciador redox.
- 2.El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la reacción de polimerización se lleva a cabo a baja temperatura en la polimerización en miniemulsión.
- 10 3.El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la reacción de polimerización se lleva a cabo de 0 a 40° C.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 a 3, en el que el iniciador redox es una combinación de ácido ascórbico y H₂O₂.
- 5.El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el emulsionante es un tensioactivo.
- 15 6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el emulsionante es un tensioactivo polimérico que tiene una cadena de polietilenglicol.
- 7.El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el hidrófobo es hexadecano o poliestireno.

20

Figura 1

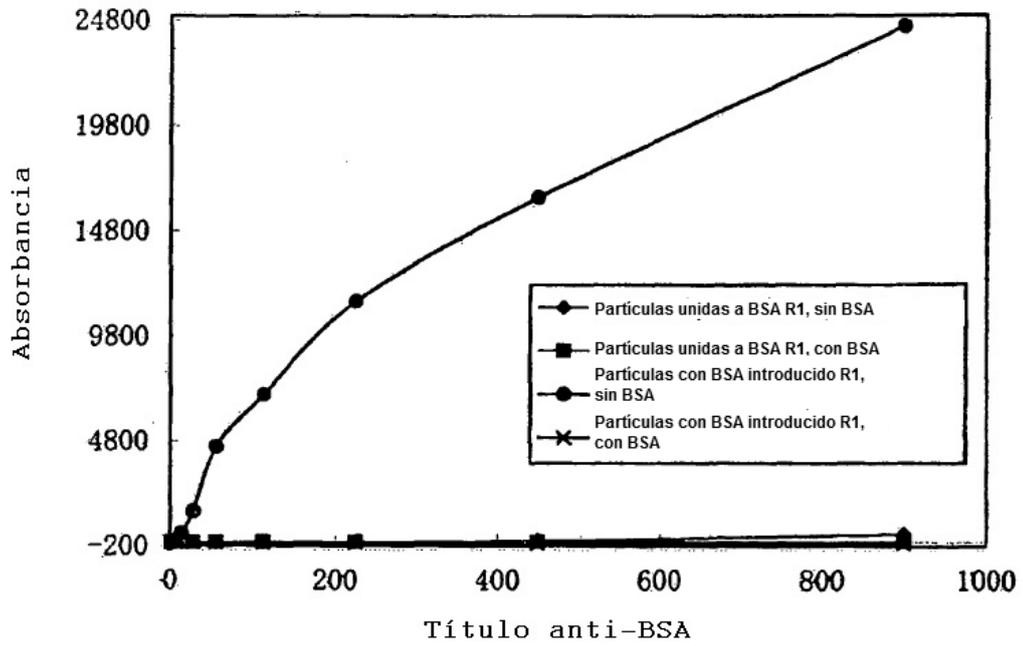


Figura 2

