

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 163**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/545** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**C08F 2/00** (2006.01)

**C08F 212/08** (2006.01)

**C08F 279/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2012 PCT/JP2012/058590**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12133771**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012 E 12765483 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2693214**

54 Título: **Partícula de látex para reactivo de medición, partícula de látex sensibilizada y reactivo de medición para inmunonefelometría**

30 Prioridad:

**31.03.2011 JP 2011080374**

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

**28.11.2016**

73 Titular/es:

**SEKISUI MEDICAL CO., LTD. (100.0%)  
13-5, Nihonbashi 3-chome , Chuo-ku  
Tokyo 103-0027, JP**

72 Inventor/es:

**KITAHARA SHINICHIRO y  
TAKAHASHI YUKI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 592 163 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**

Partícula de látex para reactivo de medición, partícula de látex sensibilizada y reactivo de medición para inmunonefelometría

5

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a una partícula de látex para un reactivo de medición con el que se puede realizar una medición de alta sensibilidad incluso en la medición de una muestra de medición que contiene una sustancia de ensayo en una concentración diluida.

10

**Técnica anterior**

En una variedad de campos, incluyendo el campo de las pruebas de laboratorio clínico, los métodos de medición inmunológica que utilizan reacciones de antígeno-anticuerpo se usan ampliamente como método para determinar cuantitativamente una sustancia de ensayo residual contenida en una muestra de medición. Especialmente, el método inmunturbidimétrico de látex que usa partículas de látex como vehículo para un antígeno o un anticuerpo se realiza de forma simple y requiere un período corto de tiempo para la medición. Por lo tanto, el número de clases de sustancias de ensayo residuales que se han de medir empleando el método inmunturbidimétrico de látex como método de medición está aumentando aún más.

15

20

Para determinar cuantitativamente una sustancia de ensayo de un antígeno, un anticuerpo o similar contenida en una muestra de medición mediante el método inmunturbidimétrico de látex, el cambio en la absorbancia causada por la agregación de partículas de látex portadoras del antígeno o el anticuerpo (en lo sucesivo a veces denominadas en el presente documento "partículas de látex recubiertas") se detecta ópticamente. Este cambio de absorbancia es sobre la base de los cambios en tamaños de partículas aparentes de los agregados formados por la agregación de las partículas de látex recubiertas.

25

Como las partículas de látex utilizadas como vehículo en el método inmunturbidimétrico de látex, las partículas de látex de poliestireno que contienen poliestireno como componente principal se han utilizado convencionalmente porque el recubrimiento de antígeno o anticuerpo (inmovilización) es fácil, son relativamente baratos y pueden controlarse fácilmente en la reacción de polimerización (literatura de patente 1 y similares). En el caso en que se utilizan partículas de látex de poliestireno como vehículo en el método inmunturbidimétrico de látex, sin embargo, si la concentración de una sustancia de ensayo en una muestra de medición se diluye, el número de agregados que se va a formar es pequeño y los tamaños de partícula aparentes de los agregados también son pequeñas en comparación con el caso donde la concentración de la sustancia de ensayo en relación con el número de partículas de látex disminuye dentro de un intervalo apropiado, lo que da lugar a una sensibilidad desventajosamente insuficiente.

30

35

En consecuencia, con el fin de mejorar la sensibilidad de la medición que se reduce cuando la concentración de una sustancia de ensayo se ha diluido, se ha hecho un intento de aumentar el tamaño de partícula de las partículas de látex de poliestireno a fin de aumentar el tamaño de partícula aparente de los agregados que se formen.

40

Sin embargo, cuando el tamaño de partícula de las partículas de látex es demasiado grande, es necesario hacer el ajuste mediante la disminución de la concentración de partículas de látex recubiertas en una solución de reacción para su aplicación en un dispositivo de medición óptica que se va a usar, debido al límite superior de la absorbancia medible por el dispositivo de medición óptica. La disminución de la concentración de partículas de látex recubiertas en una solución de reacción redujo la probabilidad de que las partículas de látex recubiertas se encuentren con la sustancia de ensayo dentro de un cierto período de tiempo y a menudo se experimentaron mediciones sin la mejora prevista de la sensibilidad. Por otra parte, cuando se aumenta el tamaño de partícula de las partículas de látex que funcionan como vehículo, las partículas de látex son susceptibles de precipitar, y por lo tanto, si un reactivo de medición que contiene las partículas de látex recubiertas se almacena en forma de una solución, la estabilidad de almacenamiento se degrada.

45

50

De esta manera, cuando se usa el método donde se aumenta el tamaño de partícula de las partículas de látex de poliestireno, a pesar de la mejora en la sensibilidad de la medición se puede esperar hasta un tamaño de partícula dado, si el tamaño de partícula se incrementa más allá del tamaño dado, surgen problemas donde la sensibilidad de la medición se degrada por el contrario y la estabilidad de almacenamiento del reactivo de medición se degrada.

55

Como contramedida, la literatura de patente 2 divulga un método para mejorar la sensibilidad de la medición mediante el aumento del índice de refracción de las partículas de látex sin aumentar el tamaño de partícula de las mismas. Incluso cuando se utilizan las partículas de látex descritas en la literatura de patentes 2, todavía surge el problema donde la sensibilidad de la medición esperada no puede alcanzarse en realidad.

60

65

**Lista de citas**

- Literatura de patentes

- 5        Literatura de patente 1: Publicación Internacional N.º WO2003/005031  
 Literatura de patente 2: JP 2001-296299 Reactivos biológicamente activos del documento EP 0 597 510 A1  
 utilizan partículas poliméricas que tienen grupos aldehídos colgantes obtenidos a partir de las siguientes tres  
 soluciones de reactivos bombeados, en agitación continua, en un recipiente de reacción caliente:  
 Solución 1: estireno, éter de p-formilfenilvinilbencilo y dodecanotiol,  
 10        Solución 2: persulfato de amonio y agua destilada,  
 Solución 3: metabisulfito de sodio y agua destilada.

**Sumario de la invención**

15 **Problema de la técnica**

Un objeto de la presente invención es proporcionar una partícula de látex para un reactivo de medición con el que se  
 puede realizar una medición de alta sensibilidad incluso en la medición de una muestra de medición que contiene  
 una sustancia de ensayo en una concentración diluida.

20 **Solución al problema**

La presente invención se refiere a una partícula de látex para un reactivo de medición de la reivindicación 1.

25 La presente invención se describirá con mayor detalle a continuación.

Los presentes inventores han investigado la razón por la cual la sensibilidad de medición esperada no se alcanza  
 por el método inmunturbidimétrico de látex utilizando partículas de látex recubiertas preparadas mediante el uso de  
 las partículas de látex descritas en la patente de Literatura 2. Como resultado, se ha encontrado que la causa es un  
 30        tensioactivo contenido en las partículas de látex. En el método descrito en la literatura de patente 2, un agente  
 tensioactivo se utiliza como emulsionante para producir partículas de látex que tienen un alto índice de refracción en  
 un estado que tiene un tamaño de partícula uniforme. Este tensioactivo permanece en las partículas de látex, lo que  
 resulta en que el agente tensioactivo inhibe el recubrimiento de antígeno o anticuerpo (inmovilización) en las  
 superficies de las partículas de látex. Por lo tanto, la cantidad del antígeno o del anticuerpo adsorbidos sobre las  
 35        partículas de látex es insuficiente, que es probablemente la razón por la cual no se alcanza la sensibilidad de la  
 medición tan alta como se esperaba.

Los presentes inventores han encontrado, como resultado de estudios serios, lo siguiente: cuando una partícula de  
 látex que comprende un copolímero obtenido por copolimerización, sin utilizar un agente tensioactivo, se utiliza una  
 40        mezcla de monómeros que comprende monómeros polimerizables específicos, incluso si su tamaño de partícula es  
 equivalente al de la partícula de látex de poliestireno convencional, se puede obtener una partícula de látex para un  
 reactivo de medición con el que la medición de alta sensibilidad se puede realizar incluso en la medición de una  
 muestra de medición que contiene una sustancia de ensayo en una concentración diluida. Por tanto, la presente  
 invención se ha realizado.

45 La partícula de látex para un reactivo de medición de la presente invención comprende, entre otras cosas, un  
 copolímero obtenido mediante copolimerización, sin usar un tensioactivo distinto del monómero polimerizable b una  
 mezcla de monómeros que comprende los siguientes monómeros polimerizables (a) a (c) y se ha definido en la  
 reivindicación 1.

50 El monómero polimerizable que tiene un grupo fenilo (a) no está especialmente limitado y los ejemplos incluyen  
 estireno, o-metilestireno, p-metil estireno, p-cloroestireno, 4-vinilbenzoato, divinilbenceno y viniltolueno. Uno de estos  
 monómeros polimerizables se pueden usar solos o dos o más de ellos pueden utilizarse en combinación. Entre  
 estos, se usa preferentemente estireno.

55 El contenido del monómero polimerizable que tiene un grupo fenilo (a) en la mezcla de monómeros tiene un límite  
 inferior de, preferentemente, 40% en moles y un límite superior de, preferentemente, 94,9 % en moles. Si el  
 contenido del monómero polimerizable que tiene un grupo fenilo (a) es menor que 40 % en moles, una distribución  
 del tamaño de partícula puede llegar a ser amplia en algunos casos, y si el contenido es superior a 94,9 % en moles,  
 60        el contenido del monómero polimerizable que tiene un grupo naftilo (c) en la mezcla de monómeros puede ser  
 demasiado pequeño para alcanzar una alta sensibilidad en algunos casos. El límite inferior del contenido del  
 monómero polimerizable que tiene un grupo fenilo (a) es, más preferentemente, 50 % en moles y el límite superior  
 de del mismo es, más preferentemente, 89,9 % en moles.

65 El monómero polimerizable que tiene un grupo fenilo y un sulfonato (b) no está especialmente limitado siempre que  
 se trate de un monómero capaz de permitir que un grupo sulfónico esté contenido en una superficie de una partícula

vehículo obtenida después de la polimerización, y los ejemplos incluyen sulfonato de estireno, sulfonato de divinilbenceno, sulfonato de o-metilestireno y sulfonato de p-metilestireno.

5 Una sal utilizada en este caso tampoco está especialmente limitada y los ejemplos incluyen una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de litio y una sal de amonio.

Uno de estos monómeros polimerizables se pueden usar solos o dos o más de ellos pueden utilizarse en combinación. Entre estos, el sulfonato de estireno se utiliza preferentemente y el sulfonato de estireno de sodio se usa más preferentemente.

10 El contenido del monómero polimerizable que tiene un grupo fenilo (a) y un sulfonato (b) en la mezcla de monómeros tiene un límite inferior de, preferentemente, 0,01 % en moles y un límite superior de, preferentemente, 5 % en moles. Si el contenido del monómero polimerizable que tiene un grupo fenilo y un sulfonato de (b) es menor que 0,01 % en moles, el tamaño de partícula puede llegar a ser demasiado grande, y si el contenido es superior a 5 % en moles, la distribución del tamaño de partícula puede llegar a ser demasiado amplia en algunos casos. El límite inferior del contenido del monómero polimerizable que tiene un grupo fenilo (a) y un sulfonato (b) es, más preferentemente, 0,05 % en moles y el límite superior del mismo es, más preferentemente, 3 % en moles.

20 El monómero polimerizable que tiene un grupo naftilo (c) no está especialmente limitado y los ejemplos incluyen 1-vinilnaftaleno, 2-vinilnaftaleno,  $\alpha$ -naftil(met) acrilato y  $\beta$ -naftil(met) acrilato. Uno de estos monómeros polimerizables se pueden usar solos o dos o más de estos pueden utilizarse en combinación. Entre estos, se usa preferentemente 1-vinilnaftaleno.

25 El contenido del monómero polimerizable que tiene un grupo naftilo (c) en la mezcla de monómeros tiene un límite inferior de, preferentemente, 5 % en moles y un límite superior de, preferentemente, 59,9 % en moles. Si el contenido del monómero polimerizable que tiene un grupo naftilo (c) es menor que 5 % en moles, puede no alcanzarse una alta sensibilidad en algunos casos, y si el contenido es superior a 59,9 % en moles, las partículas pueden no formarse mediante polimerización o la distribución del tamaño de partícula puede ser amplia en algunos casos. El límite inferior del contenido del monómero polimerizable que tiene un grupo naftilo (c) es, más preferentemente, 10 % en moles y el límite superior de del mismo es, más preferentemente, 49,9 % en moles.

La mezcla de monómeros puede comprender además un monómero insaturado polimerizable.

35 El monómero insaturado polimerizable no está especialmente limitado siempre que se pueda usar para la polimerización radical en general, y los ejemplos incluyen ácido (met)acrílico, éster (met)acrílico, (met)acrilonitrilo, (met)acrilamida, haluro de vinilo, éster de vinilo, (met)acroleína, un derivado de ácido maleico y un derivado de ácido fumárico.

Se observa que ácido (met)acrílico en el presente documento significa ácido acrílico o ácido metacrílico.

40 En el caso donde la mezcla de monómeros comprende, además, el monómero insaturado polimerizable, el contenido del monómero insaturado polimerizable deberá fijarse de manera que no debiliten el contenido preferible del monómero polimerizable que tiene un grupo fenilo (a), el monómero polimerizable que tiene un grupo fenilo grupo y un sulfonato de (b) y el monómero polimerizable que tiene un grupo naftilo (c).

45 En el caso donde la mezcla de monómeros comprende el monómero insaturado polimerizable, el contenido del monómero insaturado polimerizable tiene un límite superior de, preferentemente, 20 % en moles. Si el contenido del monómero insaturado polimerizable no supera el 20 % en moles, la alta sensibilidad puede no alcanzarse en algunos casos. El límite superior del contenido del monómero insaturado polimerizable es, más preferentemente, 50 5 % en moles.

Un límite inferior preferible del contenido del monómero insaturado polimerizable no está especialmente limitado, pero depende de las propiedades que se han de controlar, tales como la dureza, la elasticidad y la resistencia al agua, de la partícula de látex, y puede fijarse adecuadamente mediante, por ejemplo, un experimento.

55 La partícula de látex para un reactivo de medición de la presente invención se obtiene por copolimerización de la mezcla de monómeros. Aquí, es extremadamente importante que un agente tensioactivo ampliamente utilizado como un emulsionante (por ejemplo, una sal de metal alcalino de ácido alquilbencenosulfónico) no se utiliza en la copolimerización. Si se utiliza un agente tensioactivo, el agente tensioactivo permanece en la partícula de látex resultante y el tensioactivo restante inhibe el recubrimiento de antígeno o anticuerpo (inmovilización) sobre la superficie de la partícula de látex. Por lo tanto, la cantidad del antígeno o del anticuerpo adsorbido en la partícula de látex es insuficiente, y, por lo tanto, no se puede obtener una medición de alta sensibilidad.

65 Como método para la copolimerización, se puede usar cualquiera de los métodos conocidos convencionalmente, excepto que la copolimerización se lleva a cabo en un medio acuoso sin utilizar un agente tensioactivo, y por ejemplo, la mezcla de monómero mencionada anteriormente y un iniciador de la polimerización se ponen en un

recipiente de reacción cargado con un medio acuoso utilizado como disolvente, para calentarse en atmósfera de nitrógeno con agitación.

5 El medio acuoso es un disolvente mixto de agua y un alcohol monovalente que tiene de 1 a 4 átomos de carbono (en lo sucesivo denominado a veces "alcohol de C<sub>1-4</sub>"), y contiene el alcohol de C<sub>1-4</sub> en una concentración de 7,5 a 25 % en peso. Los ejemplos del alcohol de C<sub>1-4</sub> incluyen alcoholes lineales, tales como metanol y etanol; y alcoholes de cadena ramificada, tales como alcohol isopropílico y alcohol t-butilo. Entre estos, se usa preferentemente etanol.

10 La concentración del alcohol de C<sub>1-4</sub> en el medio acuoso está en un intervalo de 7,5 a 25 % en peso. Si la concentración del alcohol de C<sub>1-4</sub> es mayor que 25% en peso, la distribución del tamaño de partícula se hace tan grande que el tamaño de partícula varía. Por otro lado, si la concentración del alcohol de C<sub>1-4</sub> es inferior a 7,5 % en peso, aunque el tamaño de partícula no se distribuye ampliamente, no se puede alcanzar una alta sensibilidad de la medición cuando dicho medio acuoso se utiliza para la preparación de la partícula de látex para un reactivo de medición. Cuando el medio acuoso se utiliza en una concentración en el intervalo mencionado anteriormente, es posible producir una partícula de látex excelente para un reactivo de medición donde la propagación de la distribución del tamaño de partícula se controla para que varíe mínimamente el tamaño de partícula y una cantidad suficiente de un antígeno o un anticuerpo puede ser adsorbido para alcanzar una alta sensibilidad de la medición.

20 Como el iniciador de la polimerización se puede usar cualquiera de los iniciadores de radicales conocidos. Los ejemplos específicos incluyen persulfatos tales como persulfato de potasio, persulfato de sodio y persulfato de amonio; compuestos azo tales como 2,2'-azobisisobutironitrilo, 2,2'-azobis(4-metoxi-2,4-dimetilvaleronitrilo) y 2,2'-azobis-2,4-dimetilvaleronitrilo; y peróxidos orgánicos tales como peróxido de benzoilo, peróxido de di-t-butilo, peróxido de lauroilo y t-butil-peroxi-2-etilhexanoato. Entre éstos, se utilizan preferentemente persulfatos, y persulfato de potasio se utiliza con mayor preferencia.

25 El contenido del iniciador de polimerización no está especialmente limitado y generalmente es de 0,01 a 1 % en peso basado en la cantidad total de los monómeros polimerizables.

30 En la copolimerización, una temperatura de polimerización es, preferentemente, de 50 a 100 °C y, más preferentemente, de 60 a 85 °C. Además, el tiempo de polimerización depende de las condiciones tales como las composiciones y las concentraciones de los monómeros polimerizables y el iniciador de polimerización utilizado, y es generalmente de 5 a 50 horas.

35 Las partículas de látex para un reactivo de medición de la presente invención producido de esta manera se obtienen en un estado de suspensión en agua o en un disolvente acuoso. La concentración de las partículas de látex para un reactivo de medición en la suspensión no está especialmente limitado, y es, preferentemente, de 1 a 20 % en peso en general. Si la concentración es menor que 1 % en peso, es necesario concentrar la suspensión en la preparación de partículas de látex recubiertas, y si excede de 20 % en peso, las partículas pueden agregarse en algunos casos.

40 Un tamaño promedio de partícula de las partículas de látex para un reactivo de medición de la presente invención se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con un método específico del método inmunoturbidimétrico de látex, la especificación de un dispositivo de medición usado y similares, y tiene un límite inferior de, preferentemente, 0,01 µm y un límite superior de la misma de, preferentemente, 1,0 µm. Si el tamaño promedio de partícula es menor de 0,01 µm, el cambio óptico causado por la agregación puede ser demasiado pequeño para alcanzar la sensibilidad necesaria para la medición, o el coste de producción se puede aumentar porque es necesario un periodo de tiempo mayor para la centrifugación o similar en la preparación de partículas de látex recubiertas. Si el tamaño promedio de partícula es superior a 1,0 µm, el cambio óptico causado por la agregación de partículas de látex recubiertas puede estar más allá de un intervalo mensurable de un dispositivo de medición óptica cuando la concentración de una sustancia de ensayo en una muestra de medición es alto, y por lo tanto, el cambio óptico causado de acuerdo con la cantidad de la sustancia de ensayo puede no obtenerse en algunos casos. El límite inferior y el límite superior del tamaño promedio de partícula son, respectivamente, más preferentemente, 0,05 µm y 0,7 µm, y aún más preferentemente de 0,1 µm y 0,4 µm.

55 Un coeficiente de variación (valor de CV) de tamaño de partícula de las partículas de látex para un reactivo de medición de la presente invención es, preferentemente, 10 % o menor. Si el coeficiente de variación (valor de CV) es superior a 10 %, la reproducibilidad de la producción alcanzada en la preparación de partículas de látex recubiertas puede reducirse, a fin de degradar el rendimiento (reproducibilidad de la medición) de un reactivo de medición resultante. El coeficiente de variación (valor de CV) es, más preferentemente, 5 % o menos y aún más preferentemente 3 % o menos. Accidentalmente, el coeficiente de variación del tamaño de partícula se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación (1):

**Ecuación (1): Coeficiente de variación (valor de CV) del tamaño de partícula=**

**= desviación estándar del tamaño de partícula/tamaño de partícula promedio**

65

Como se ha descrito anteriormente, la propagación de la distribución del tamaño de partícula puede converger en un cierto intervalo de acuerdo con la concentración del alcohol de C<sub>1-4</sub> en el disolvente acuoso empleado en la reacción de copolimerización. Los expertos en la materia apropiada pueden seleccionar y usar partículas de látex para un reactivo de medición que tiene un coeficiente de variación adecuado en consideración de las características (propiedades físicas, una concentración en una muestra de medición y similares) de una sustancia de ensayo, las características de un antígeno o un anticuerpo que se van a usar para el recubrimiento de las partículas de látex, la reproducibilidad entre lotes de producción y similares.

Cuando se usa la partícula de látex para un reactivo de medición de la presente invención como vehículo para llevar a una sustancia que se une específicamente a una sustancia de ensayo, se puede producir una partícula de látex recubierta.

La partícula de látex recubierta que comprende la partícula de látex para un reactivo de medición de la presente invención que lleva una sustancia que se une específicamente a una sustancia de ensayo es también otro aspecto de la presente invención.

La sustancia que se une específicamente a una sustancia de ensayo no está especialmente limitada siempre que se trate de una sustancia biológicamente activa que generalmente se usa como un reactivo para ensayos de suero inmunológico (uno utilizado en una reacción de agregación o reacción de la inhibición de la agregación) o se usa en la medición bioquímica. Especialmente, se usa adecuadamente una sustancia utilizable en una reacción de antígeno-anticuerpo.

En la presente invención, los ejemplos de la sustancia útil como antígeno o anticuerpo en una reacción de antígeno-anticuerpo incluyen proteína, ácido nucleico, nucleoproteína, hormona tal como estrógeno, lípidos o similares.

Los ejemplos del antígeno incluyen varios antígenos, receptores y enzimas. Los ejemplos más específicos incluyen microglobulina β<sub>2</sub>, proteína C reactiva (CRP), fibrinógeno humano, ferritina, factor reumatoide (RA), α-fetoproteína (AFP), un antígeno de micoplasma y un antígeno de HBs.

Los ejemplos del anticuerpo incluyen anticuerpos contra diversas toxinas, agentes infecciosos y similares. Ejemplos más específicos incluyen un anticuerpo O anti-estreptolisina, un anticuerpo antiestrógenos, un anticuerpo de microglobulina β<sub>2</sub>, un anticuerpo frente a *Treponema pallidum*, un anticuerpo contra el antígeno lipídico de la sífilis, un anticuerpo anti-HBs, un anticuerpo anti-HBc, un anticuerpo anti-HBe, un anticuerpo anti-PSA y un anticuerpo anti-CRP.

De forma accidental, el anticuerpo que se llevará en la partícula de látex para un reactivo de medición para la producción de la partícula de látex recubierta puede ser no solo una molécula de inmunoglobulina en sí, sino también un fragmento tal como un F(ab')<sub>2</sub>. Además, el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo se puede obtener por un método empleado generalmente.

Los términos de "reacción antígeno-anticuerpo", "antígeno" y "anticuerpo" usados en el presente documento tienen los significados generales, así como pueden connotar, en algunos casos, el concepto mencionado anteriormente y formar que las partículas de látex recubiertas pueden agregarse a través de una reacción de unión específica y, por tanto, no debe entenderse que estos términos son restrictivos.

Un método para producir una partícula de látex recubierta permitiendo que la partícula de látex para un reactivo de medición de la presente invención porte a una sustancia que se une específicamente a una sustancia de ensayo no está especialmente limitado, y se puede usar cualquier de los métodos portadores convencionalmente conocidos través de un enlace físico y/o químico.

La cantidad de una sustancia que se une específicamente a una sustancia de ensayo para ser portada por la partícula de látex recubierta de la presente invención depende del tipo de la sustancia que se une específicamente a una sustancia de ensayo que se va a utilizar y pueden fijarse de forma experimental adecuadamente a una cantidad óptima.

De forma accidental, los términos "portar", "recubrir" e "inmovilizar" en el presente documento tienen los significados generales y se utilizan en sustancialmente los mismos significados.

La partícula de látex recubierta de la presente invención obtenida de esta manera se somete a un tratamiento de recubrimiento (bloqueo) con seroalbúmina bovina o similar si es necesario y se dispersa en una solución tampón adecuada para su uso como una dispersión de partículas de látex recubiertas. La dispersión de partículas de látex recubiertas se puede utilizar como un reactivo de medición para el método inmunoturbidimétrico.

El reactivo de medición para el método inmunoturbidimétrico que comprende la partícula de látex recubierta de la presente invención dispersa en una solución tampón es también otro aspecto de la presente invención.

5 El reactivo de medición para el método inmunoturbidimétrico de la presente divulgación se puede combinar con un diluyente (solución tampón), una sustancia estándar y similar utilizada para la medición, a fin de utilizarse como kit de reactivo de medición.

El diluyente se utiliza para la dilución de una muestra de medición o similar.

10 Como diluyente, se puede usar cualquiera de las soluciones tampón de pH 5,0 a 9,0. Los ejemplos específicos incluyen un tampón fosfato, un tampón de glicina, un tampón Tris, un tampón borato, un tampón de citrato y un tampón de Good.

15 El reactivo de medición y el diluyente para el método inmunoturbidimétrico de la presente divulgación pueden contener diversos sensibilizadores para el propósito de mejorar la sensibilidad de la medición y acelerar una reacción antígeno-anticuerpo.

20 Los ejemplos de los sensibilizadores incluyen polisacáridos alquilados, tales como metilcelulosa y etilcelulosa, pululano y polivinilpirrolidona.

25 El reactivo de medición y el diluyente para el método inmunoturbidimétrico de la presente divulgación pueden contener: proteína tal como albúmina (seroalbúmina bovina o albúmina de huevo), caseína, la gelatina o un hidrolizado de los mismos; un aminoácido; un tensioactivo; o similares para el propósito de inhibir una reacción de agregación no específica causada por una sustancia distinta de una sustancia de ensayo presente en una muestra de medición, o la mejora de la estabilidad del reactivo de medición.

30 Cuando se utiliza el reactivo de medición para el método inmunoturbidimétrico de la presente divulgación, la cantidad de una sustancia de ensayo contenida en una muestra de medición se puede medir midiendo ópticamente el grado de agregación de las partículas de látex recubiertas causado a través de una reacción entre la sustancia de ensayo contenida en la muestra de medición y una sustancia que se une específicamente a la sustancia de ensayo portada sobre las partículas de látex recubiertas.

35 Para medir ópticamente el grado de agregación, se puede usar un dispositivo óptico capaz de detectar la intensidad de la luz dispersada, la intensidad de la luz transmitida, la absorbancia o similares, o un dispositivo óptico provisto de una pluralidad de métodos de detección de estos. Por lo general, se puede usar cualquiera de los autoanalizadores bioquímicos ampliamente utilizados para las pruebas de laboratorio.

40 Como un método para medir ópticamente el grado de agregación, se puede usar cualquiera de los métodos conocidos convencionalmente y los ejemplos del método incluyen nefelometría, donde la formación de agregación se detecta por el aumento de la turbidez, un método donde la formación de agregación se detecta por el cambio de una distribución de tamaño de partícula o un tamaño medio de partícula, y un método de turbidez de la esfera de integración donde el cambio de luz dispersada hacia delante causado por la formación de agregación se mide mediante el uso de una esfera de integración para la comparación con una relación con la intensidad de la luz transmitida.

45 Además, los ejemplos de un método de medición incluyen una prueba velocidad (ensayo de velocidad) donde se obtienen al menos dos valores de medición en diferentes puntos de tiempo a fin de obtener el grado de agregación sobre la base de incremento (una velocidad de incremento) del valor medido causado entre estos puntos de tiempo, y una prueba de punto final (ensayo de punto final) donde se obtiene un valor medido en un punto de tiempo (un punto de tiempo considerado como un punto final de una reacción en general) a fin de obtener el grado de agregación sobre la base del valor medido. Entre estos, la prueba de punto final mediante la nefelometría se usa adecuadamente, ya que la medición se puede realizar fácil y rápidamente.

55 Los términos "inmunoturbidimétrico" y "método inmunoturbidimétrico" utilizados en el presente documento connotan todos los conceptos y formas mencionados anteriormente y estos términos no deben entenderse de manera restrictiva.

### **Efectos ventajosos de la invención**

60 La presente invención puede proporcionar una partícula de látex para un reactivo de medición con el que se puede realizar una medición de alta sensibilidad incluso en una muestra de medición que contiene una sustancia de ensayo en una concentración diluida.

65 La partícula de látex para un reactivo de medición de la presente invención se puede mejorar en cuanto a la sensibilidad de medición para una sustancia de ensayo en una región de concentración diluida con un tamaño de partícula mantenido al mismo nivel que las partículas de látex de poliestireno convencionales y sin reducir la

cantidad de proteína que se va a adsorber. Además, cuando se usa la partícula de látex para un reactivo de medición de la presente invención, se puede obtener un reactivo de medición altamente sensible libre de la degradación de la estabilidad de almacenamiento del reactivo de medición a través de la precipitación de las partículas.

5

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra curvas de sensibilidad (curvas analíticas) obtenidas mediante la medición de una solución estándar de antígeno CRP mediante el uso de partículas de látex de un reactivo de medición producido en los Ejemplos 1 y 2 y en los Ejemplos Comparativos 1 y 2.

10

La figura 2 ilustra curvas de sensibilidad (curvas analíticas) obtenidos mediante la medición de una solución estándar de antígeno CRP mediante el uso de partículas de látex para un reactivo de medición producido en los Ejemplos 1 a 5 y los Ejemplos Comparativos 1 a 5, donde la Figura 2(a) ilustra la totalidad de la región de la concentración medida y la Figura 2(b) ilustra de forma ampliada las curvas de sensibilidad en una región de concentración de 0,6 mg/dl o menos.

15

### Descripción de las realizaciones

La presente invención se describirá a continuación con más detalle con referencia a los ejemplos, pero cabe destacar que la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

20

(Ejemplo 1)

Un recipiente de reacción de vidrio (con un volumen de 1 l) equipado con un agitador, un condensador de reflujo, un detector de temperatura, un tubo de introducción de nitrógeno y una camisa se cargó con 400 g de agua ultrapura, 100 g de etanol, 19 g de un monómero de estireno, 25 g de 1-vinilnaftaleno, 0,01 g de sulfonato de estireno de sodio y 0,15 g de persulfato potásico, y, después de sustituir el interior del recipiente por un gas de nitrógeno, se realizó la polimerización durante 24 horas con agitación a 70 °C y a una velocidad de 160 rpm.

25

Una vez completada la polimerización, la solución resultante se sometió a un tratamiento de filtración con un filtro de papel, sacando de este modo las partículas de látex. Después de ello, las partículas de látex se sometieron a un tratamiento de diálisis con una membrana de diálisis durante 48 horas, y, por lo tanto, se obtuvieron partículas de látex refinado para un reactivo de medición. Las partículas de látex obtenidas de este modo tenían un tamaño promedio de partícula de 0,351  $\mu\text{m}$  y un valor de CV del tamaño de partícula de 3,8 %.

30

De forma accidental, el tamaño de partícula y el valor de CV de las partículas de látex se obtuvieron por el método siguiente: las partículas de látex se colocaron en una membrana de colodión mediante un método habitual, una imagen de las partículas se capturó mediante el uso de un microscopio electrónico de transmisión, y se midieron tamaños de partículas de 100 o más partículas observadas en la imagen.

35

(Ejemplo 2)

Las partículas de látex para un reactivo de medición se obtuvieron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que se usaron 450 g de agua ultrapura, 50 g de etanol, 35 g de un monómero de estireno, 20 g de 1-vinilnaftaleno, 0,01 g de sulfonato de estireno de sodio y 0,18 g de persulfato de potasio en lugar de "400 g de agua ultrapura, 100 g de etanol, 19 g de un monómero de estireno, 25 g de 1-vinilnaftaleno, 0,01 g de sulfonato de estireno de sodio y 0,15 g de persulfato de potasio.

40

Las partículas de látex obtenidas de este modo tenían un tamaño promedio de partícula de 0,355  $\mu\text{m}$  y un valor de CV del tamaño de partícula de 2,2 %.

45

(Ejemplo comparativo 1)

Las partículas de látex para un reactivo de medición se obtuvieron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que se usaron 200 g de agua ultrapura, 200 g de etanol, 12 g de un monómero de estireno, 18 g de 1-vinilnaftaleno, 0,30 g de persulfato de potasio y 0,06 g de dodecibencenosulfonato de sodio (un tensioactivo) en lugar de "400 g de agua ultrapura, 100 g de etanol, 19 g de un monómero de estireno, 25 g de 1-vinilnaftaleno, 0,01 g de sulfonato de estireno de sodio y 0,15 g de persulfato de potasio.

50

Las partículas de látex obtenidas de este modo tenían un tamaño promedio de partícula de 0,433  $\mu\text{m}$  y un valor de CV del tamaño de partícula de 15,0 %.

55

Las partículas de látex de este ejemplo comparativo corresponden a las partículas de látex descritas en la literatura de patentes 2.

60

65



(Ejemplo comparativo 2)

5 Las partículas de látex para un reactivo de medición se obtuvieron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que se usaron 500 g de agua ultrapura, 45 g de un monómero de estireno, 0,01 g de sulfonato de estireno de sodio y 0,15 g de persulfato de potasio en lugar de "400 g de agua ultrapura, 100 g de etanol, 19 g de un monómero de estireno, 25 g de 1-vinilnaftaleno, 0,01 g de sulfonato de estireno de sodio y 0,15 g de persulfato de potasio.

10 Las partículas de látex obtenidas de este modo tenían un tamaño promedio de partícula de 0,405  $\mu\text{m}$  y un valor de CV del tamaño de partícula de 3,3 %.

Las partículas de látex de este ejemplo comparativo corresponden a las partículas de látex descritas en la literatura de patentes 1.

(Evaluación 1)

15 (1) Evaluación de la cantidad de adsorción de proteínas de las partículas de látex para el reactivo de medición

20 Las partículas de látex de un reactivo de medición producido en cada uno de los Ejemplos 1 y 2 y los Ejemplos Comparativos 1 y 2 se mezclaron con BSA y un tampón de fosfato (pH 7,4) a fin de alcanzar concentraciones finales de partículas de látex de 0,4 % en peso (4 mg como una cantidad de un sólido), BSA de 0,8 mg/ml y una solución de tampón fosfato de 20 mmol/l, y la mezcla resultante se agitó mediante el uso de un rotor de onda (50 rpm) durante 3 horas en una habitación fría de 4 °C, haciendo así que la BSA se adsorba sobre las partículas de látex. A partir de entonces, la solución resultante se centrifugó (12.000 rpm, 30 minutos, 15 °), se dispensó un sobrenadante y una concentración de proteína en el sobrenadante se midió mediante el uso de un kit de prueba A/G Wako (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). La concentración de proteína en el sobrenadante se restó de una concentración de proteína en un control negativo (sin partículas de látex contenidas), calculando así una cantidad de proteína de unión adsorbida sobre las partículas de látex (una cantidad de unión a BSA por unidad de superficie de las partículas de látex).

30 Los resultados se muestran en la Tabla 1.

[Tabla 1]

	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo comparativo 2	Ejemplo comparativo 3	Ejemplo comparativo 4	Ejemplo comparativo 5
Agua ultrapura (g)	400	450	375	400	462,5	200	500	250	350	475
Etanol (g)	100	50	125	100	37,5	200	0	250	150	25
Estireno (g)	19	35	35	35	35	12	45	35	35	35
1-vinilafaleno (g)	25	20	20	20	20	18	0	20	20	20
Sulfonato de estireno de sodio (g)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0,01	0,01	0,01
persulfato de potasio (g)	0,15	0,18	0,18	0,18	0,18	0,3	0,15	0,18	0,18	0,18
Dodecilbencenosulfonato de sodio (g)	0	0	0	0	0	0,06	0	0	0	0
Concentración de etanol (% en peso)	20	10	25	20	7,5	50	0	50	30	5
Tamaño de partícula (µm)	0,351	0,355	0,361	0,359	0,345	0,433	0,405	0,401	0,368	0,343
valor de CV del tamaño de partícula (%)	3,8	2,2	7,8	4,1	3,1	15	3,3	17,1	13	2,8
Cantidad de unión a BSA (mg/m <sup>2</sup> )	3,16	3,33	3,11	3,22	3,05	1,52	3,61	3,28	3,16	3,04

A partir de la Tabla 1 se entiende que la cantidad de BSA adsorbida es extremadamente pequeña en el uso de las partículas de látex para un reactivo de medición del Ejemplo Comparativo 1, en comparación con la alcanzada en el uso de las partículas de látex de los Ejemplos 1 y 2 y el Ejemplo Comparativo 2. Por otra parte, las partículas de látex para un reactivo de medición de los Ejemplos 1 y 2 mostraron la cantidad de BSA adsorbida equivalente a la de las partículas de látex para un reactivo de medición del ejemplo comparativo 2.

Basándose en estos resultados, se confirmó que las partículas de látex para un reactivo de medición de la presente invención pueden adsorber una gran cantidad de anticuerpo o similar útiles para construir un reactivo de medición para el método inmunoturbidimétrico en comparación con las partículas de látex para un reactivo de medición del Ejemplo comparativo 1 producido mediante el uso de un agente tensioactivo.

(2) Evaluación de la sensibilidad de medición del reactivo de medición utilizando partículas de látex recubiertas

Después de que las partículas de látex para un reactivo de medición producido en cada uno de los Ejemplos 1 y 2 y los Ejemplos Comparativos 1 y 2 se refinaron mediante centrifugación, un anticuerpo anti-CRP se recubrió sobre partículas de látex.

Las partículas de látex recubiertas con el anticuerpo obtenidas de este modo se sometieron a tres lavados centrífugos con una solución tampón que contiene 0,1 % de BSA y después se sometieron a un tratamiento de bloqueo. Posteriormente, la concentración de las partículas de látex recubiertas de anticuerpo se ajustó a 0,025 % en peso con una solución tampón, con lo que se produjo un reactivo de medición (segundo reactivo) que contenía las partículas de látex recubiertas de anticuerpo.

Los reactivos de medición obtenidos de este modo se utilizaron para la medición de una solución estándar de antígeno CRP, obteniendo de este modo las curvas de sensibilidad (curvas analíticas).

Las curvas de sensibilidad obtenidas se muestran en la Figura 1.

Las condiciones de la medición fueron las siguientes:

(Condiciones de medición A)  
 Aparato: Autoanalizador Hitachi 7170  
 Longitud de onda: 570 nm/800 nm  
 Punto fotométrico: 18 - 34 (ensayo de punto final) Temperatura de medición: 37 °C  
 Muestra de medición (soluciones estándar de PCR de 0-36 mg/dL): 2 µl  
 Concentraciones de PCR en las respectivas soluciones estándar de CRP: 0,2, 0,3, 0,6, 6, 18, 36 mg/dl  
 Primer reactivo: Nanopia (marca registrada) Solución tampón para CRP 100 µl  
 Segundo reactivo: 100 µl

La medición se realizó mediante un ensayo de punto final como sigue: Una muestra de medición y el primer reactivo se mezclaron y se agitaron, se añadió el segundo reactivo adicional a la misma, y la solución resultante se mezcló y se agitó. Después de un cierto período de tiempo, se midió la turbidez.

Haciendo referencia a la figura 1, el reactivo de medición con las partículas de látex recubiertas de anticuerpo preparadas a partir de las partículas de látex para un reactivo de medición del ejemplo comparativo 1 (utilizando un agente tensioactivo en la copolimerización) no pudo alcanzar la sensibilidad sustancial a una concentración de CRP de 0,6 mg/dl o menos y tampoco pudo alcanzar suficientes diferencias de sensibilidad entre las concentraciones respectivas cuando la concentración de CRP fue de 6 mg/ml o más.

Por otra parte, el reactivo de medición con las partículas de látex recubiertas de anticuerpo preparadas a partir de las partículas de látex para un reactivo de medición del ejemplo comparativo 2 (que no contiene un monómero polimerizable que tiene un grupo naftilo) mostró una sensibilidad notablemente mejorada a una concentración de 6 mg/dl en comparación con la del Ejemplo comparativo 1, pero pudo alcanzar una sensibilidad solo ligeramente mejorada a una concentración de 0,6 mg/dl o menos en comparación con la del Ejemplo comparativo 1.

Por el contrario, los reactivos de medición utilizando las partículas de látex recubiertas de anticuerpo preparadas a partir de las partículas de látex para un reactivo de medición de los Ejemplos 1 y 2 mostraron ambos una sensibilidad notablemente mejorada en cualquier concentración de CRP en comparación con las de los Ejemplos Comparativos 1 y 2. En particular, la sensibilidad se mejoró claramente a una concentración de 0,6 mg/dl o menos donde no se pudo observar una sensibilidad sustancial por los de los ejemplos comparativos 1 y 2. Así pues, se confirmó que la sensibilidad puede mejorarse en los Ejemplos 1 y 2, aunque la cantidad de proteína adsorbida sea equivalente a la alcanzada en el Ejemplo Comparativo 2.

## (Ejemplo 3)

Las partículas de látex para un reactivo de medición se obtuvieron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que se usaron 375 g de agua ultrapura, 125 g de etanol, 35 g de un monómero de estireno, 20 g de 1-vinilnaftaleno, 0,01 g de sulfonato de estireno de sodio y 0,18 g de persulfato de potasio en lugar de "400 g de agua ultrapura, 100 g de etanol, 19 g de un monómero de estireno, 25 g de 1-vinilnaftaleno, 0,01 g de sulfonato de estireno de sodio y 0,15 g de persulfato de potasio".

Las partículas de látex obtenidas de este modo tenían un tamaño promedio de partícula de 0,361  $\mu\text{m}$  y un valor de CV del tamaño de partícula de 7,8 %.

## (Ejemplo 4)

Las partículas de látex para un reactivo de medición se obtuvieron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que se usaron 400 g de agua ultrapura, 100 g de etanol, 35 g de un monómero de estireno, 20 g de 1-vinilnaftaleno, 0,01 g de sulfonato de estireno de sodio y 0,18 g de persulfato de potasio en lugar de "400 g de agua ultrapura, 100 g de etanol, 19 g de un monómero de estireno, 25 g de 1-vinilnaftaleno, 0,01 g de sulfonato de estireno de sodio y 0,15 g de persulfato de potasio".

Las partículas de látex obtenidas de este modo tenían un tamaño promedio de partícula de 0,359  $\mu\text{m}$  y un valor de CV del tamaño de partícula de 4,1 %.

## (Ejemplo 5)

Las partículas de látex para un reactivo de medición se obtuvieron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que se usaron 462,5 g de agua ultrapura, 37,5 g de etanol, 35 g de un monómero de estireno, 20 g de 1-vinilnaftaleno, 0,01 g de sulfonato de estireno de sodio y 0,18 g de persulfato de potasio en lugar de "400 g de agua ultrapura, 100 g de etanol, 19 g de un monómero de estireno, 25 g de 1-vinilnaftaleno, 0,01 g de sulfonato de estireno de sodio y 0,15 g de persulfato de potasio".

Las partículas de látex obtenidas de este modo tenían un tamaño promedio de partícula de 0,345  $\mu\text{m}$  y un valor de CV del tamaño de partícula de 3,1 %.

## (Ejemplo comparativo 3)

Las partículas de látex para un reactivo de medición se obtuvieron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que se usaron 250 g de agua ultrapura, 250 g de etanol, 35 g de un monómero de estireno, 20 g de 1-vinilnaftaleno, 0,01 g de sulfonato de estireno de sodio y 0,18 g de persulfato de potasio en lugar de "400 g de agua ultrapura, 100 g de etanol, 19 g de un monómero de estireno, 25 g de 1-vinilnaftaleno, 0,01 g de sulfonato de estireno de sodio y 0,15 g de persulfato de potasio".

Las partículas de látex obtenidas de este modo tenían un tamaño promedio de partícula de 0,401  $\mu\text{m}$  y un valor de CV del tamaño de partícula de 17,1 %.

## (Ejemplo comparativo 4)

Las partículas de látex para un reactivo de medición se obtuvieron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que se usaron 350 g de agua ultrapura, 150 g de etanol, 35 g de un monómero de estireno, 20 g de 1-vinilnaftaleno, 0,01 g de sulfonato de estireno de sodio y 0,18 g de persulfato de potasio en lugar de "400 g de agua ultrapura, 100 g de etanol, 19 g de un monómero de estireno, 25 g de 1-vinilnaftaleno, 0,01 g de sulfonato de estireno de sodio y 0,15 g de persulfato de potasio".

Las partículas de látex obtenidas de este modo tenían un tamaño promedio de partícula de 0,368  $\mu\text{m}$  y un valor de CV del tamaño de partícula de 13,0 %.

## (Ejemplo comparativo 5)

Las partículas de látex para un reactivo de medición se obtuvieron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que se usaron 475 g de agua ultrapura, 25 g de etanol, 35 g de un monómero de estireno, 20 g de 1-vinilnaftaleno, 0,01 g de sulfonato de estireno de sodio y 0,18 g de persulfato de potasio en lugar de "400 g de agua ultrapura, 100 g de etanol, 19 g de un monómero de estireno, 25 g de 1-vinilnaftaleno, 0,01 g de sulfonato de estireno de sodio y 0,15 g de persulfato de potasio".

Las partículas de látex obtenidas de este modo tenían un tamaño promedio de partícula de 0,343  $\mu\text{m}$  y un valor de CV del tamaño de partícula de 2,8 %.

(Evaluación 2)

(1) Evaluación de la cantidad de adsorción de proteínas de las partículas de látex para el reactivo de medición

5 Las partículas de látex de un reactivo de medición producido en cada uno de los Ejemplos 3 a 5 y los Ejemplos Comparativos 3 a 5 se utilizaron para el cálculo de la cantidad de unión de la proteína adsorbida en las partículas de látex (una cantidad de unión a BSA de por unidad de superficie de las partículas de látex) a través de la misma operación y por el mismo método que se ha descrito anteriormente en el punto "(1) Evaluación de la cantidad de adsorción de proteínas de partículas de látex para el reactivo de medición" de la "Evaluación 1".

10 Los resultados se muestran en la Tabla 1.

(2) Evaluación de la sensibilidad del reactivo de medición utilizando partículas de látex

15 Las partículas de látex de un reactivo de medición producido en cada uno de los Ejemplos 3 a 5 y los Ejemplos Comparativos 3 a 5 se utilizaron para la fabricación de un reactivo de medición que contiene las partículas de látex para un reactivo de medición de cada uno de los ejemplos 3 a 5 y los ejemplos Comparativos 3 a 5 a través de la misma operación y por el mismo método que se ha descrito anteriormente en el punto "(2) Evaluación de la sensibilidad de la medición del reactivo de medición utilizando partículas de látex" de la "Evaluación 1".

20 Los reactivos de medición obtenidos de este modo se utilizaron para la medición de una solución estándar de antígeno CRP en las condiciones A de medición mencionadas anteriormente para obtener las curvas de sensibilidad (curvas analíticas).

25 Las curvas de sensibilidad obtenidas se muestran en la Figura 2 y LAS absorbancias medidas se muestran en la Tabla 2.

30 Accidentalmente, los resultados obtenidos en los Ejemplos 1 y 2 y los Ejemplos Comparativos 1 y 2 descritos anteriormente también se muestran en la Figura 2 y en la Tabla 2.

[Tabla 2]

Concentración de CRP en solución estándar de CRP (mg/dl)	Absorbancia (mOD) (longitud de onda 570 nm/800 nm)									
	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo comparativo 2	Ejemplo comparativo 3	Ejemplo comparativo 4	Ejemplo comparativo 5
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,2	12,6	6,4	6,0	7,8	5,5	0,9	3,0	2,0	4,0	3,8
0,3	19,7	10,1	9,5	13,5	8,6	1,8	5,1	4,0	7,2	6,8
0,6	28,6	15,8	14,1	20,6	13,2	2,9	7,9	6,5	10,6	9,4
6	40,4	32,0	30,8	36,5	29,8	3,3	19,8	17,2	24,2	23,0
18	60,0	48,0	46,1	54,0	45,1	8,3	28,8	25,1	38,8	37,0
36	72,0	60,0	57,0	67,0	55,0	8,5	37,9	33,5	49,9	47,5

Nota: Todos los resultados son los valores después de la reducción en blanco.

5 Con referencia a la Tabla 1, las partículas de látex producidas en los Ejemplos Comparativos 1 y 3 (donde una concentración de etanol fue del 50 %) y en el Ejemplo Comparativo 4 (donde la misma fue de 30 %) tenían valores de CV superiores al 10 % a diferencia de las partículas de látex producidas en los ejemplos 1 y 4 (donde la misma fue del 20 %), el Ejemplo 2 (donde la misma fue del 10 %), el ejemplo 3 (donde la misma fue del 25 %), el Ejemplo 5 (donde la misma fue del 7,5 %) y el Ejemplo comparativo 5 (donde la misma fue del 5 %). Se encontró sobre la base de estos resultados que el valor de CV se varía a fin de variar en gran medida el tamaño de partícula de las partículas de látex obtenidas por un reactivo de medición cuando la concentración de etanol es más alta más allá del intervalo de concentración preferible de la presente invención. Además, las partículas de látex producidas en el Ejemplo Comparativo 2 (donde la misma fue del 0 %) y el Ejemplo Comparativo 5 (donde la misma fue del 5%)  
10 tenían valores de CV equivalentes a los de las partículas de látex de los ejemplos (como se muestra en la Tabla 1), pero la sensibilidad de la medición mostrada por los reactivos de medición obtenidos mediante el uso los mismos era insuficiente y más baja que la mostrada por los reactivos de medición obtenidos mediante el uso de las partículas de látex de los Ejemplos. Se encontró que la sensibilidad de la medición era insuficiente y menor también en los Ejemplos comparativos 1, 3 y 4 que la de los reactivos de medición obtenidos mediante el uso de las partículas de látex de los ejemplos (como se muestra en la Figura 2 y la Tabla 2).  
15

20 De forma accidental, la cantidad de BSA adsorbida fue sustancialmente la misma en los ejemplos respectivos y los ejemplos comparativos, excepto por el Ejemplo Comparativo 1 que usa agente tensioactivo en la copolimerización (como se muestra en la Tabla 1).

25 Se confirmó, en base a la Tabla 1, que las partículas de látex para un reactivo de medición de los Ejemplos 3 a 5 son equivalentes a las partículas de látex para un reactivo de medición de los Ejemplos Comparativos 3 a 5 en la cantidad de BSA adsorbida.

30 Como se ha descrito hasta el momento, se confirmó que una partícula de látex para un reactivo de medición con el que la medición de la sensibilidad alta se puede realizar incluso en una muestra de medición que contiene una sustancia de ensayo en una concentración diluida puede producirse de acuerdo con la presente invención.

35 Además, se confirmó que la partícula de látex para un reactivo de medición de la presente invención se puede mejorar en la sensibilidad de la medición de una sustancia de ensayo en una región de concentración diluida sin reducir una cantidad de proteína adsorbida con el tamaño de partícula mantuvo en el mismo nivel que las partículas de látex de poliestireno convencionales-

40 Por otra parte, se confirmó que la partícula de látex para un reactivo de medición de la presente invención tiene una distribución de tamaño de partícula convergente con un valor de CV de 10 % o menos, y dado que la variación en el tamaño de partícula es por lo tanto pequeña, la reproducibilidad de la producción en la preparación de una partícula de látex recubierta se estabiliza, dando como resultado también la estabilización del rendimiento (reproducibilidad de medición) de un reactivo de medición que la usa.

#### 40 **Aplicabilidad industrial**

45 La presente invención puede proporcionar una partícula de látex para un reactivo de medición con el que se puede realizar en la medición de alta sensibilidad incluso en una muestra de medición que contiene una sustancia de ensayo en una concentración diluida.

**REIVINDICACIONES**

1. Una partícula de látex para un reactivo de medición, que comprende un copolímero obtenido por copolimerización de una mezcla de monómeros que comprende los siguientes monómeros polimerizables (a) a (c):
- 5
- (a) un monómero polimerizable que tiene un grupo fenilo;
  - (b) un monómero polimerizable que tiene un grupo fenilo y un sulfonato; y
  - (c) un monómero polimerizable que tiene un grupo naftilo;
- 10 en un medio acuoso que contiene 7,5 a 25 % en peso de alcohol C<sub>1-4</sub> sin utilizar cualquier tensioactivo distinto de dicho monómero polimerizable (b).
2. La partícula de látex para un reactivo de medición de acuerdo con la reivindicación 1, donde el alcohol C<sub>1-4</sub> es etanol.
- 15
3. La partícula de látex para un reactivo de medición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde la mezcla de monómeros comprende además un monómero insaturado polimerizable.
- 20
4. La partícula de látex para un reactivo de medición de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, donde el monómero polimerizable que tiene un grupo fenilo es estireno (a), el monómero polimerizable que tiene un grupo fenilo y un sulfonato de (b) es sulfonato de estireno, y el monómero polimerizable que tiene un grupo naftilo (c) es 1-vinilnaftaleno.
- 25
5. La partícula de látex para un reactivo de medición de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3 o 4, donde la partícula de látex tiene un tamaño promedio de partícula de 0,01 a 1,0 µm.
6. Una partícula de látex recubierta que comprende una partícula de látex para un reactivo de medición de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5 que lleva una sustancia que se une específicamente a una sustancia de ensayo.
- 30
7. Un reactivo de medición para el método inmunturbidimétrico, que comprende una partícula de látex recubierta de acuerdo con la reivindicación 6 dispersada en una solución tampón.



FIG. 1

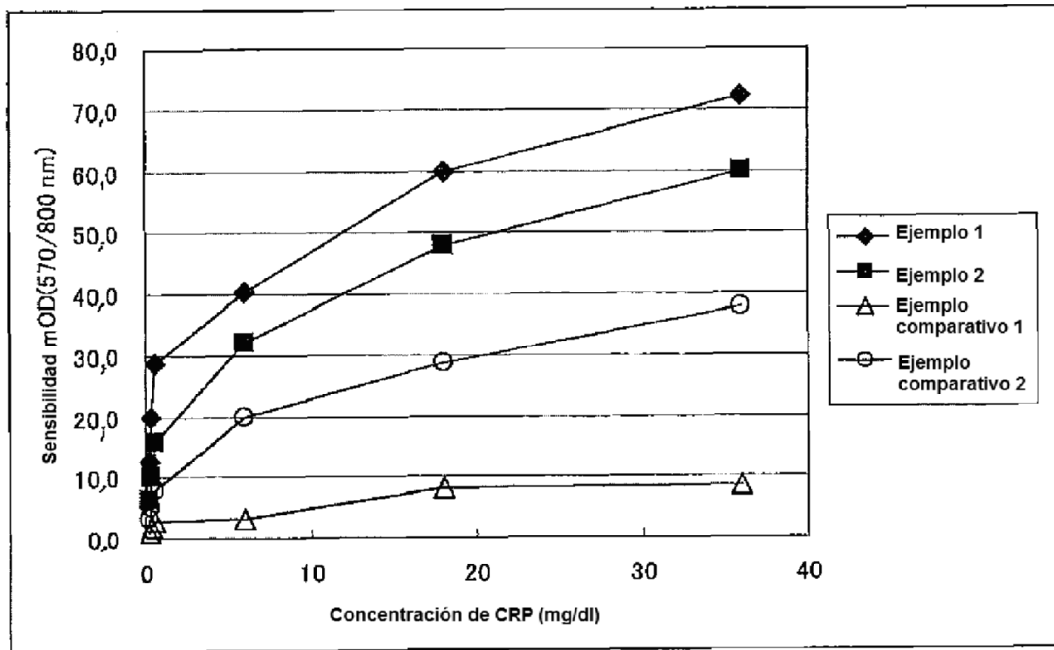
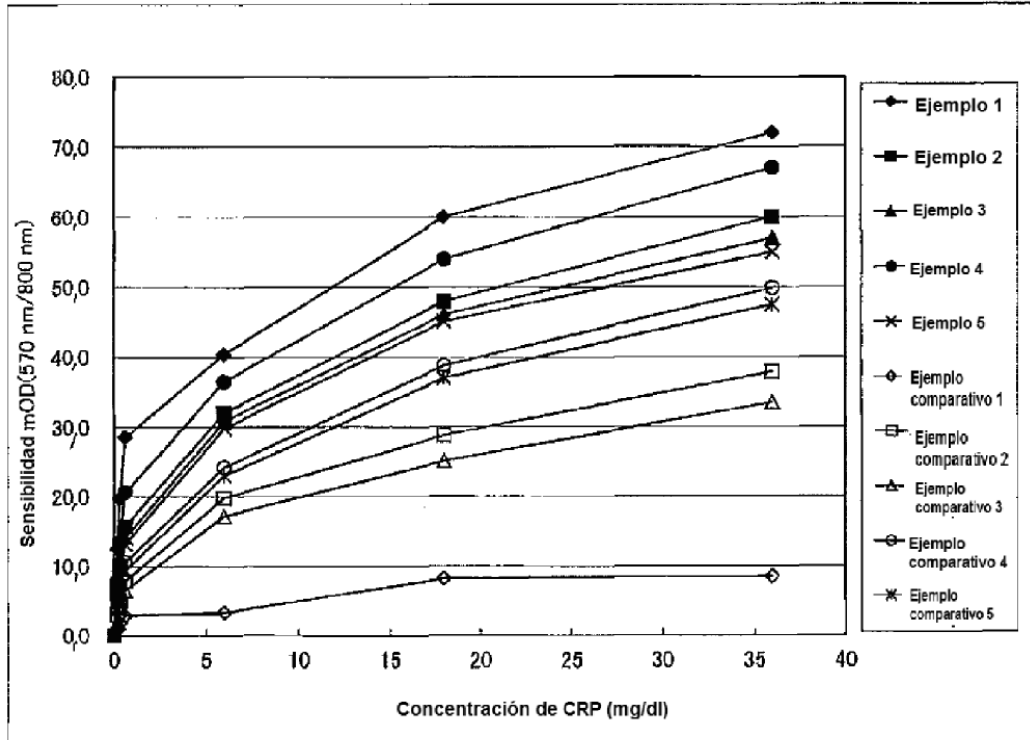


FIG.2

(a)



(b)

