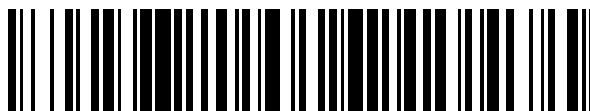


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 323**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/548** (2006.01)

**G01N 33/558** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2010 PCT/JP2010/070369**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2011 WO11062157**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2010 E 10831551 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2503337**

54 Título: **Micropartículas orgánicas coloreadas y kit de reactivo diagnóstico que contiene las mismas**

30 Prioridad:

**17.11.2009 JP 2009262004**

**16.07.2010 JP 2010161866**

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

**05.01.2017**

73 Titular/es:

**ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA (100.0%)**  
**1-105 Kanda Jinbocho, Chiyoda-ku**  
**Tokyo 101-8101, JP**

72 Inventor/es:

**YOSHIDA, SATORU;**  
**SHIOMI, YOSHIYUKI;**  
**MATSUI, TOSHIHIKO;**  
**DOI, MASANORI;**  
**MIMURA, NOBUYUKI y**  
**MATSUSE, TAKESHI**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Carlos**

ES 2 596 323 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

Micropartículas orgánicas coloreadas y kit de reactivo diagnóstico que contiene las mismas

5 **SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención se refiere a micropartículas orgánicas coloreadas derivadas de un polímero orgánico y a un kit reactivo utilizando las micropartículas.

10 **TÉCNICA ANTERIOR**

Las micropartículas compuestas por un polímero se utilizan en varios sectores debido a la facilidad para controlar su tamaño de partícula, resistencia mecánica, distribución del tamaño de partícula, forma y grado de agregación, ejemplos de los cuales incluyen tóner, materiales antibloqueo de materiales de envasado, materiales de carga aislantes, agentes de nucleación de cristal, cargas cromatográficas y abrasivos. Más recientemente, las micropartículas también se han aplicado a aplicaciones tales como vehículos para reactivos de inmunodiagnóstico, espaciadores de pantallas de cristal líquido, partículas estándar para la calibración de aparatos de análisis y las partículas estándar para las pruebas de películas porosas.

La cantidad de micropartículas compuestas por un polímero utilizado en aplicaciones de vehículos de reactivos de inmunodiagnóstico, en particular, está aumentando, y la cantidad utilizada está aumentando especialmente en procedimientos de diagnóstico que utilizan procedimientos inmunocromatográficos (a los que se hace referencia como "inmunocromatografía"). Aunque uno de los principales factores que explican este aumento es la liberación de un gran número de kits, tales como kits de embarazo caseros que se venden como cuasi fármacos y son utilizados por personas no expertas y no por profesionales de la salud, estos aumentos también han estado impulsados por una demanda creciente como medio para diversos tipos de pruebas en los puntos de atención (POCT: pruebas realizadas cerca de un paciente por un médico u otro profesional de la salud, que permite obtener resultados rápidamente), tales como las pruebas de varios virus tales como adenovirus, rotavirus o norovirus, hepatitis B, hepatitis C y otros tipos de pruebas de hepatitis, o pruebas de patógenos para patógenos tales como *E. coli* O-157. Se prevé que el número de pruebas inmunocromatográficas realizadas aumente rápidamente en el futuro teniendo en cuenta el creciente número de brotes de gripe en los últimos años. Las micropartículas también se están utilizando para inmunocromatografía en diversos campos, tales como análisis bioquímicos, análisis genéticos y otras reacciones analíticas arbitrarias, además de inmunodiagnóstico.

La inmunocromatografía se lleva a cabo mediante, por ejemplo, la reacción selectiva de un anticuerpo o antígeno (ligando) marcado con micropartículas cromogénicas compuestas de un coloide de metal o látex coloreado derivado de poliestireno con una sustancia de ensayo sobre un sustrato cromatográfico, y desarrollando mientras se forma un complejo. A continuación, un antígeno o anticuerpo (que se une específicamente con el ligando mencionado anteriormente) se inmoviliza con antelación sobre un sustrato cromatográfico en una ubicación detectada prescrita y el color se desarrolla mediante la captura del complejo desarrollado. Aunque se han examinado diversos procedimientos y se han establecido procedimientos para su utilización como procedimiento de ensayo simple, hay un deseo de aumentar aún más la sensibilidad y acelerar el proceso de diagnóstico basado en la necesidad de reducir la carga sobre el personal profesional de la salud en el entorno clínico al realizar POCT.

Al diagnosticar gripe, hay casos en los que no se obtiene un resultado positivo mediante inmunocromatografía en las primeras etapas de la infección, a pesar de obtenerse un resultado positivo al día siguiente. Es necesario aumentar aún más la sensibilidad de la prueba con el fin de resolver este problema. Además, cada vez es más frecuente diagnosticar de forma simultánea el antígeno de tipo A y el antígeno de tipo B con un único kit de inmunocromatografía. En los casos en los que hay presentes múltiples especímenes, aunque poder analizar simultáneamente una pluralidad de sustancias de ensayo con una sola prueba conduce a un diagnóstico rápido, también es necesario mejorar la visibilidad para evitar diagnósticos erróneos. Por lo tanto, es preferente generar diferentes colores (multicoloración) para cada sustancia de ensayo cuando se detectan sustancias de ensayo. El diagnóstico simultáneo de varias sustancias de ensayo utilizando un único kit también es deseable al diagnosticar diversos tipos de infecciones víricas y al analizar la seguridad de los alimentos, y se considera que la multicoloración similar es eficaz también en estas aplicaciones.

El color generado en la inmunocromatografía deriva de la sustancia utilizada para el marcaje. En el caso de los coloides metálicos, dado que el color se genera debido a los efectos de plasmones correspondientes al tipo de metal del mismo, el color resultante se limita a un solo color. Por ejemplo, solo se genera el color rojo en el caso de la utilización de coloide de oro, tal como se describe en el documento de patente 1 indicado a continuación. Al asumir la prueba simultánea de varios parámetros, aunque se pueden esperar los efectos en un cierto grado haciendo artificios en la ubicación detectada, no puede decirse que sea preferente desde los puntos de vista de la visibilidad y la prevención de diagnósticos erróneos.

Además, en el caso de los coloides metálicos, generalmente se utiliza un principio conocido como adsorción física para el procedimiento de unión del ligando. Entre los ejemplos típicos de procedimientos de unión al ligando se

incluyen adsorción física, enlace químico (enlace covalente), enlace iónico e inclusión. La adsorción física se refiere a un procedimiento de unión que utiliza la interacción hidrófoba que actúa entre un material de base (tal como partículas finas cromogénicas) y un material para la unión (tal como un ligando). En realidad, se cree que, además de la interacción hidrófoba, actúan diversos mecanismos, tales como acción electrostática, fuerzas intermoleculares y otros mecanismos. La adsorción física es ventajosa en términos de facilidad del procedimiento y costes, dado que el procedimiento puede llevarse a cabo más fácilmente que otros procedimientos de unión. Sin embargo, en el caso de la adsorción física, hay casos en los que pueden producirse problemas, tales como la ausencia de un sitio de unión fijo y la inhibición de la adsorción en presencia de un surfactante. Además, también hay casos en los que no se puede unir una cantidad adecuada de ligando.

Por otra parte, tal como se da a conocer en el documento de patente 2 indicado a continuación, en el caso de la utilización de poliestireno u otras partículas de látex, la multicoloración es posible mediante la utilización de un cromóforo formado por un colorante disperso, colorante o pigmento soluble en aceite. Además, normalmente se puede seleccionar un procedimiento arbitrario, tal como adsorción física o enlace químico, para el procedimiento utilizado para unir el ligando. En consecuencia, también se pueden evitar los problemas asociados con la adsorción física mencionada anteriormente. Sin embargo, conforme a los ejemplos dados a conocer en el documento de patente 2, la capacidad para teñir las partículas es baja aproximadamente al 6% en peso y la intensidad del color resultante es débil. En consecuencia, en el caso de su utilización para inmunocromatografía, no es posible obtener efectos de coloración distintos, lo que da lugar a una falta de fiabilidad.

Aunque el documento de patente 3 que se indica a continuación da a conocer micropartículas obtenidas mediante la tinción de celulosa, dado que la capacidad para teñir en relación con la cantidad de micropartículas de celulosa es baja aproximadamente al 20% en peso, las micropartículas teñidas resultantes se colorean ligeramente. Aunque estas micropartículas se utilizan en inmunocromatografía impartiendo un anticuerpo mediante adsorción física o enlace químico como se describe en el documento de patente 4 que se indica a continuación, dado que la cantidad de anticuerpo unido es insuficiente y la coloración de las micropartículas *per se* es débil, no se pueden obtener los resultados de coloración distinta.

Adicionalmente, el documento US 5 266 497 A da a conocer una inmunocromatografía con partículas de látex teñidas de un polímero sintético alto en forma de partículas finas a las que se unirá un antígeno o anticuerpo.

El documento EP 2 103 644 A1 da a conocer partículas finas de celulosa que tienen un diámetro de partícula pequeño y un grado de polimerización promedio alto y una dispersión líquida o una dispersión sólida de las mismas.

El documento US 2006/286683 A1 da a conocer un procedimiento para analizar y/o detectar el tipo y/o la cantidad, como mínimo, de una sustancia de muestra que se va a analizar utilizando partículas vehículo.

#### Documentos de la técnica anterior

#### Documentos de patente

Documento de patente 1: Publicación de Patente japonesa examinada No. H7-60159

Documento de patente 2: Patente japonesa No. 2955405

Documento de patente 3: Publicación internacional No. WO 2008/084854

Documento de patente 4: Publicación internacional No. WO 2009/123148

### CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

#### Problemas que ha de resolver la invención

Con lo anterior en mente, un objetivo de la presente invención es dar a conocer micropartículas orgánicas coloreadas que son altamente cromogénicas y permiten la multicoloración, y lograr una sensibilidad alta de un kit inmunocromatográfico mediante la unión de un ligando a las mismas y la aplicación a un reactivo de diagnóstico, y en particular, a un reactivo inmunocromatográfico.

#### Medios para resolver los problemas

Como resultado de llevar a cabo extensos estudios y de la realización de experimentos repetidos, los inventores de la presente invención tuvieron éxito en la obtención de micropartículas que tienen un color profundo mediante la utilización de celulosa como material de partida. Sorprendentemente, los inventores de la presente invención descubrieron que, como resultado de la tinción de celulosa con un color intenso, la unión del ligando se hace posible mediante adsorción física, y los ligandos también se pueden unir mediante enlaces covalentes mediante la introducción de grupos reactivos según sea necesario. También se describió que, cuando esto se aplicó a inmunocromatografía utilizando como vehículo para un reactivo de diagnóstico, se podía aumentar la sensibilidad del kit de inmunocromatografía, de modo que se pudo llevar a cabo la presente invención.

A saber, la presente invención se refiere a micropartículas orgánicas coloreadas que tienen un tamaño promedio de partícula de 10 nm a 1.000 nm y una intensidad de color de 1,0 a 5,0, en las que del 10% en peso al 80% en peso de las micropartículas orgánicas coloreadas constituye un componente colorante, y en las que del 20% en peso al 90% en peso de las micropartículas orgánicas coloreadas, derivan de celulosa y en las que dicha intensidad de color se obtiene por medición de la absorbancia óptica de las micropartículas de celulosa así como las micropartículas de látex de poliestireno y coloidales de oro que sirven como ejemplos comparativos, a concentraciones del 0,01% en peso al 0,1% en peso utilizando una combinación de la esfera de integración SV-722 y JASCO-V-650 fabricado por Jasco Corp; calculando los valores dividiendo el valor máximo del pico de absorbancia (ABS) sobre un intervalo de luz visible de 400 nm a 800 nm por el porcentaje en peso de las micropartículas; y ajustando los valores a aquellos por incrementos del 0,01% en peso.

Además, la presente invención se refiere a un kit de inmunocromatografía que contiene, como marcador, las micropartículas orgánicas coloreadas de la presente invención que están unidas a un anticuerpo o antígeno que se une específicamente a un antígeno o anticuerpo como una sustancia de ensayo, y un sustrato cromatográfico sobre el que se coloca un anticuerpo o antígeno que reacciona específicamente con un antígeno o anticuerpo.

Las realizaciones preferentes son evidentes a partir de las reivindicaciones dependientes.

### Efectos de la invención

Las micropartículas orgánicas coloreadas de acuerdo con la presente invención tienen propiedades colorantes extraordinariamente superiores en comparación con las propiedades colorantes de las partículas de látex de la técnica anterior y, puesto que son capaces de adsorber el antígeno y otros ligandos, se pueden aplicar a la inmunocromatografía. Las micropartículas orgánicas coloreadas de acuerdo con la presente invención son capaces de proporcionar un kit de inmunocromatografía de alta sensibilidad como resultado de actualizar la coloración en el caso de ser capturado con una reacción selectiva y específica, y, como resultado de permitir la multicoloración, son útiles para la medición simultánea de múltiples sustancias de ensayo. Además, dado que las micropartículas orgánicas coloreadas de la presente invención permiten la selección de un procedimiento arbitrario utilizado para unirse a un ligando, tal como enlace químico, además de la adsorción física atribuible a un colorante, se pueden aplicar a diversas sustancias de ensayo. Por lo tanto, la presente invención permite un diagnóstico rápido con un nivel bajo de diagnósticos erróneos, con lo que contribuye en gran medida al diagnóstico rápido al tiempo que amplía considerablemente el campo de aplicación de la inmunocromatografía.

### REALIZACIONES DE LA INVENCION

<Tamaño promedio de partícula>

A continuación se da a conocer una explicación detallada de la invención de la presente solicitud.

Las micropartículas de la presente invención se refieren a micropartículas orgánicas coloreadas que tienen un tamaño promedio de partícula de 10 nm a 1.000 nm y una intensidad de color de 1,0 a 5,0. El intervalo preferente del tamaño promedio de partícula es 100 nm a 900 nm, y, de forma más preferente, de 200 nm a 800 nm. Si el tamaño promedio de partícula es superior a 1.000 nm, el desarrollo se vuelve lento cuando se utiliza en un kit de inmunocromatografía, se evita la rápida evaluación, las micropartículas son capturadas fácilmente en la película en desarrollo, y el fondo *per se* se colorea, lo que da lugar a una tendencia a que el color previsto en la ubicación detectada sea ambiguo. En una ubicación detectada en particular, hay muchos casos en los que el tamaño de poro de la película en desarrollo se hace más pequeño en desarrollo debido al recubrimiento del reactivo de captura. En consecuencia, el marcador tiende a ser capturado fácilmente o, en otras palabras, la tasa de falsos positivos aumenta. Como resultado, el kit de prueba no puede considerarse fiable.

<Intensidad del color>

La intensidad del color en la presente invención se define como el valor obtenido mediante la medición de la absorbancia visual de una dispersión de las micropartículas orgánicas coloreadas en una longitud de la trayectoria óptica de 10 mm utilizando una esfera de integración en el intervalo de 400 nm a 800 nm, restando el componente de fondo del medio de dispersión, obteniendo una curva de absorbancia de la matriz de dispersión en sí, dividiendo el valor máximo (ABS) de la misma por el porcentaje en peso de la matriz de dispersión, y calculando por el 0,01% en peso. Dado que la utilización de una esfera de integración hace que sea posible reducir los efectos de la luz difusa sobre las partículas, el valor resultante puede servir como indicador del grado de coloración de las micropartículas y se puede considerar que un valor más grande de las mismas indica una coloración más clara. Aunque la intensidad de color de las micropartículas de la presente invención es de 1,0 o más, la intensidad del color es, de forma preferente, lo más alta posible. La intensidad del color se puede aumentar mediante la utilización de un colorante o pigmento disperso que demuestra un alto grado de coloración o seleccionando medios para aumentar el número de veces que se lleva a cabo la tinción. Sin embargo, dado que la intensidad de color de 5,0 o más no se puede conseguir con varias rondas de tinción utilizando colorantes ordinarios, en atención a la economía, la intensidad del color es, de forma preferente, de 1,0 a 5,0, más preferentemente de 1,5 a 5,0 e incluso más

preferentemente de 2,0 a 5,0. En el caso en que la intensidad del color es inferior a 1,0, la visibilidad de un sitio detectado disminuye cuando se utiliza en un kit de inmunocromatografía debido a la coloración débil, perjudicando de este modo la fiabilidad de los resultados de las pruebas.

#### 5 <Material de las micropartículas orgánicas coloreadas>

No hay limitaciones concretas sobre el material de las micropartículas orgánicas coloreadas en la presente invención a condición de que tengan una alta intensidad de color y estén dispersas de forma estable en el que del 20% en peso al 90% en peso de las micropartículas orgánicas coloreadas se derivan de celulosa. Aunque se pueden aplicar materiales que se pueden colorear intensamente utilizando colorantes o pigmentos, la realización de una tinción intensa y una tinción fuerte es preferente cuando la prueba es inmunocromatografía y porque esto contribuye a la estabilización de la calidad del kit durante el almacenamiento a largo plazo. Con el fin de lograr una tinción fuerte, por ejemplo, se puede utilizar un colorante reactivo de unión covalente y se puede utilizar un material derivado de la celulosa que se pueda teñir con un colorante reactivo. Dado que las micropartículas compuestas por un material derivado de celulosa tienen un gran número de grupos hidroxilo, no solo son capaces de retener numerosos colorantes reactivos de unión covalente, sino que también son capaces de mantener una dispersión estable en agua después de haberse teñido de forma intensa. Por esta razón, aunque se utiliza celulosa para el material de las micropartículas orgánicas coloreadas, no hay limitaciones concretas sobre el tipo del mismo. Por ejemplo, se puede utilizar celulosa reciclada, celulosa purificada o celulosa natural. También se puede utilizar celulosa parcialmente derivatizada. Del 20% en peso al 90% en peso de las micropartículas orgánicas coloreadas deriva de celulosa. Más preferentemente, del 20% en peso al 80% en peso de las micropartículas orgánicas coloreadas deriva de celulosa. Más preferentemente, del 20% en peso al 70% en peso derivan de celulosa.

#### 25 <Procedimiento de producción de material de las micropartículas orgánicas coloreadas>

No hay limitaciones concretas sobre el procedimiento utilizado para producir el material de las micropartículas orgánicas coloreadas en la presente invención. Aunque las partículas finas de un tamaño de grano promedio deseado pueden obtenerse por encolado, en la presente invención, las micropartículas de celulosa se preparan mediante la utilización de un líquido de solidificación obtenido por disolución de celulosa en un buen disolvente de la misma y mezclando con agua, disolvente orgánico o amoníaco. La utilización de este procedimiento permite ajustar el tamaño de grano de las micropartículas de celulosa de acuerdo con la composición del líquido de solidificación. Aunque no se pretende limitar el procedimiento de producción del material de las micropartículas orgánicas coloreadas de la presente invención, a continuación se ofrece una explicación detallada del mismo utilizando un ejemplo específico.

En primer lugar, la celulosa linter se disuelve en un buen disolvente de celulosa. En la presente invención, una solución de cupramonio preparada utilizando un procedimiento conocido se utiliza para el disolvente bueno. Un sistema mixto de disolvente orgánico, agua y amoníaco se utiliza principalmente para el líquido de solidificación. La solidificación se lleva a cabo mediante la adición de la solución de cupramonio preparada con agitación de este líquido de solidificación. A continuación, a través de una regeneración adicional mediante neutralización con la adición de ácido sulfúrico, se puede obtener una suspensión que contiene las micropartículas de celulosa objetivo. Se puede obtener una dispersión de micropartículas de celulosa o micropartículas de celulosa mediante dilución, purificación y secado de esta suspensión.

#### 45 <Procedimiento de coloración>

No hay limitaciones concretas sobre el procedimiento utilizado para colorear el material de las micropartículas orgánicas coloreadas en la presente invención y se pueden utilizar diversos procedimientos, tales como los procedimientos que utilizan colorantes o procedimientos que utilizan pigmentos. Un procedimiento que utiliza un pigmento es particularmente preferente en términos de aumentar la intensidad del color y se pueden utilizar diversos tipos de agentes colorantes, tal como un colorante directo, un colorante que contiene metal, un colorante ácido, un colorante básico, un colorante disperso, un colorante de sulfuro, un colorante vegetal o un colorante de naftol.

En el caso de la utilización de micropartículas de celulosa para las micropartículas orgánicas coloreadas en la presente invención, dado que el área de la superficie de las micropartículas de celulosa es considerablemente mayor que el área de la superficie de las fibras, se puede hacer que la capacidad de coloración sea extremadamente grande y se pueden obtener micropartículas en las que el 10% en peso o más de las micropartículas orgánicas coloreadas es un componente colorante. Sin embargo, desde los puntos de vista de las propiedades colorantes y la economía, el componente colorante representa del 10% en peso al 80% en peso, de forma preferente del 20% en peso al 80% en peso, y más preferentemente del 30% en peso al 80% en peso de las micropartículas orgánicas coloreadas. Por otra parte, en la presente invención, dado que las micropartículas de celulosa se pueden teñir hasta un color intenso y tienen una estabilidad superior a largo plazo o, en otras palabras, fijación del color en húmedo, se selecciona, de forma preferente, un colorante reactivo desde el punto de vista de que sea deseable teñir mediante enlace covalente.

La proporción del componente colorante en relación con las micropartículas orgánicas coloreadas en la presente

invencción puede calcularse a partir del cambio en el peso. En la presente invencción, aunque puede haber casos en los que no se pueden recuperar todas las partículas, dado que la tinción se utiliza para el procedimiento de coloración y la separación centrífuga se utiliza durante el curso de la misma, en este caso, la proporción del componente colorante se puede calcular a partir del peso de las partículas que pueden recuperarse y el peso de las partículas antes de la tinción. Por ejemplo, en el caso de haber teñido 1,0 g de celulosa y se han obtenido 2,0 g de micropartículas orgánicas coloreadas, la proporción del componente colorante es del 50% en peso. Además, la proporción del componente colorante también se puede calcular mediante la separación de las micropartículas orgánicas y el componente colorante mediante la utilización de un procedimiento para la separación de las micropartículas orgánicas coloreadas y el componente colorante según sea necesario, tales como la rotura de los enlaces covalentes mediante tratamiento con ácido o base, haciendo que las micropartículas se hinchen, o utilizando otro procedimiento de limpieza óptimo.

<Ligando>

El ligando en la presente invencción se refiere a una sustancia que tiene la propiedad de unirse forma selectiva y específica a una sustancia de ensayo específica. Aunque no hay limitaciones concretas sobre el tipo de los mismos, entre los ejemplos de ligandos se incluyen anticuerpos, antígenos, enzimas, genes, hormonas, células, ácidos nucleicos, péptidos y proteínas.

<Adsorción física de ligando por tinción>

Un ligando puede adsorberse físicamente en la presente invencción simplemente mediante la tinción de la celulosa hasta un color intenso utilizando un colorante. En los casos en los que el rendimiento de la adsorción física adecuada solamente con la tinción, el equilibrio hidrófobo e hidrófilo se puede ajustar mediante la combinación con derivatización de celulosa según sea necesario. Aunque la razón por la cual un ligando puede ser físicamente adsorbido simplemente mediante tinción de la celulosa hasta un color intenso no está clara, en general, aunque los grados de hidrofiliidad y de hidrofobicidad se pueden determinar mediante la medición del ángulo de contacto en el caso de una película, es difícil medir el ángulo de contacto en el caso de las nanopartículas. Por lo tanto, cuando el ángulo de contacto se midió por tinción de Cellophane (marca comercial registrada) utilizado como modelo de celulosa plana hasta un color intenso, en contraste con el ángulo de contacto de la celulosa sin teñir que es de aproximadamente 20 grados a 30 grados, se pudo confirmar que el ángulo de contacto del Cellophane (marca comercial registrada) había alcanzado de 40 grados a 100 grados en proporción a la capacidad de teñido del colorante. Los colorantes típicos, tales como benceno, naftaleno, antraquinona o colorantes azo, tienen una estructura fuertemente hidrófoba. En la presente invencción, como resultado de una gran cantidad de colorante, que normalmente no sería posible en condiciones de tinción de fibras, unido a la celulosa, se predice que se podía alcanzar un grado de hidrofobicidad que permitió la adsorción física de anticuerpo. Cuando se midió el anticuerpo IgG de ratón unido utilizando el procedimiento de Lowry de utilización habitual en los ensayos de proteínas, la unión del anticuerpo se pudo confirmar en el caso de tinción adecuada, como en la forma de las micropartículas orgánicas coloreadas de la presente invencción. Por otro lado, si intensidad de la tinción es excesivamente baja, se observaron pocas diferencias entre las partículas teñidas y las partículas no teñidas, y la cantidad de anticuerpo unido tendía a ser baja.

<Enlace químico del ligando mediante grupos reactivos>

El enlace químico se puede seleccionar para el procedimiento de unión al ligando además de la adsorción física en la presente invencción. En general, aunque la adsorción física ofrece las ventajas de un procedimiento más simple y costes más bajos, también se ha indicado que tiene problemas como los que se indican a continuación. Entre los ejemplos de tales problemas se incluyen una pérdida de selectividad de la reacción debido a que el sitio de unión del ligando no es constante y a que el ligando se elimina por la presencia de surfactante. Por lo tanto, con el fin de resolver estos problemas, se puede utilizar un procedimiento de enlace químico que forma un enlace covalente con un ligando que corresponde a las circunstancias. Además, un procedimiento de enlace químico puede ser capaz de aumentar aún más el número de ligandos unidos en comparación con la adsorción física.

<Grupos reactivos>

Los grupos reactivos en la presente invencción se utilizan para la unión covalente de ligandos. Entre los ejemplos típicos de grupos reactivos se incluyen grupos carboxilo, grupos amino, grupos aldehído, grupos tiol, grupos epoxi y grupos hidroxilo. Aunque no hay limitaciones concretas sobre el tipo de los mismos, los grupos carboxilo y los grupos amino son preferentes. En el caso de grupos carboxilo, se forma un enlace covalente con un grupo amino de un ligando utilizando una carbodmiimida. El momento en el que se introduce el grupo reactivo puede ser antes de la tinción o después de la tinción. El sitio donde se introduce el grupo reactivo puede ser micropartículas orgánicas o una parte teñida. Además, una parte de la estructura del colorante puede utilizarse como un grupo reactivo.

La introducción de grupos reactivos en la presente invencción se puede confirmar con un analizador de espectros de infrarrojos. Por ejemplo, en el caso de un grupo carboxilo, la absorción a aproximadamente  $1730\text{ cm}^{-1}$  se puede confirmar en el caso de un ácido libre. Por ejemplo, en el caso de un grupo amino, la absorción a aproximadamente

1.600  $\text{cm}^{-1}$  se puede confirmar en el caso de un grupo amino primario. Sin embargo, es extremadamente difícil de cuantificar la cantidad de grupos reactivos introducidos. Esto es debido a la gran cantidad de componente colorante presente, evitando de este modo la cuantificación mediante procedimientos de cuantificación ordinarios. En la presente invención, un analizador de espectros infrarrojos solo se puede utilizar para determinar si un grupo reactivo se ha introducido o no.

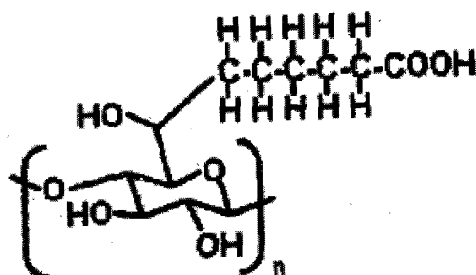
<Estructura espaciadora>

Los grupos reactivos en la presente invención tienen, de forma preferente, una estructura espaciadora de tres átomos o más. Los inventores de la presente invención encontraron que, cuando un grupo reactivo se introduce en micropartículas orgánicas coloreadas altamente coloreadas, se une un ligando covalentemente y luego se utiliza en inmunocromatografía, la sensibilidad se mejora aún más si el grupo reactivo tiene una estructura espaciadora de tres átomos o más. Aunque la razón de esto no está clara, se ha considerado la posibilidad de que una reacción selectiva entre el ligando y la sustancia de ensayo está alterada por los efectos del impedimento estérico y la carga del colorante que está presente en una gran cantidad.

Una estructura espaciadora se refiere a los átomos presentes entre los grupos reactivos y las micropartículas orgánicas coloreadas. Además, en el caso en que la estructura espaciadora esté ramificada, se refiere al número de átomos de la cadena principal. Por ejemplo, en el caso de la carboximetilcelulosa conocida habitualmente, una parte de los grupos hidroxilo de la celulosa están sustituidos con grupos carboximetilo. Los grupos reactivos en este caso son los grupos carboximetilo y la estructura espaciadora se convierte en  $-\text{CH}_2-$ , a saber, un espaciador de un átomo. En ejemplos de la presente invención, los grupos reactivos que tienen una estructura espaciadora se introducen utilizando los siguientes cuatro tipos de procedimientos. Las estructuras de los compuestos 1 a 4 se indican, respectivamente, con las fórmulas químicas 1 a 4. Aunque el colorante también está unido de forma inherente a una parte de los grupos hidroxilo, el colorante se omite de las fórmulas.

<Compuesto 1>

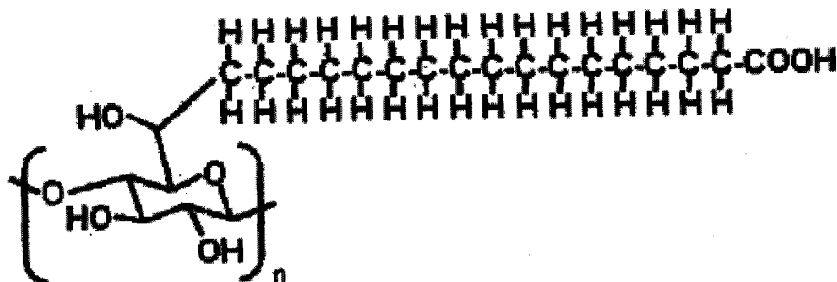
[Fórmula química 1]



Se dejan reaccionar las micropartículas de celulosa teñida y ácido 5-hexenoico para introducir grupos carboxilo. El número de átomos de la cadena principal, a saber, el número de átomos de la estructura espaciadora, es 5.

<Compuesto 2>

[Fórmula química 2]

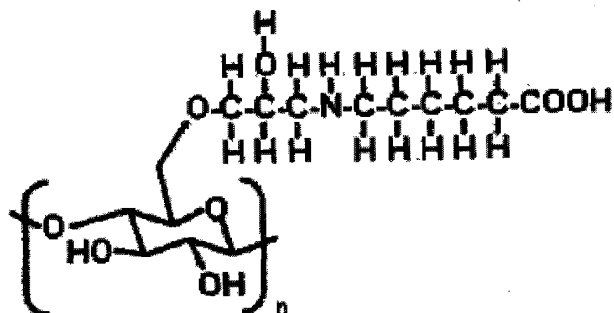


Se dejan reaccionar las micropartículas de celulosa teñida y ácido 16-heptadecenoico para introducir grupos carboxilo. El número de átomos de la cadena principal, a saber, el número de átomos de la estructura espaciadora, es 16.

<Compuesto 3>

[Fórmula química 3]

5



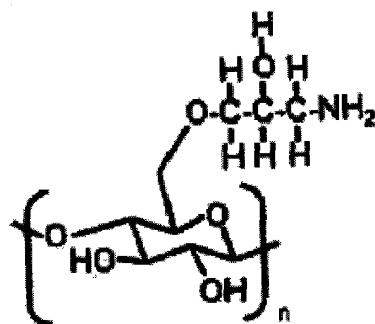
Se dejan reaccionar las micropartículas de celulosa teñida y epíclorhidrina para introducir grupos epoxi y estos, a continuación, reaccionan con ácido 6-aminohexanoico para introducir grupos carboxilo. El número de átomos de la cadena principal, a saber, el número de átomos de la estructura espaciadora, es 9.

10

<Compuesto 4>

[Fórmula química 4]

15



Se dejan reaccionar las micropartículas de celulosa teñida y epíclorhidrina con los grupos epoxi introducidos y estos, a continuación, reaccionan con amoníaco para introducir grupos amino primarios. El número de átomos de la cadena principal, a saber, el número de átomos de la estructura espaciadora, es 3.

20

Aunque las estructuras espaciadoras mencionadas anteriormente tienen un número máximo de átomos de 16, la estructura espaciadora puede ser más larga. Se pueden conseguir estructuras espaciadoras más largas cambiando el compuesto que se hace reaccionar con las micropartículas de celulosa teñidas, o la estructura espaciadora se puede alargar adicionalmente mediante la utilización de un grupo reactivo introducido. Aunque en teoría se pueden introducir estructuras espaciadoras extremadamente largas, cuando se considera desde los puntos de vista de la facilidad de introducción y el coste, el número de átomos es, de forma preferente, de 3 a 100, más preferentemente, de 3 a 50 y, aún más preferentemente, de 3 a 20.

25

30 <Procedimiento de dispersión de micropartículas orgánicas coloreadas>

Aunque las micropartículas orgánicas coloreadas obtenidas utilizando el procedimiento de coloración mencionado anteriormente, a saber, las micropartículas de celulosa teñidas, se pueden utilizar sin secado al permitir que permanezcan en la forma de una dispersión, la dispersión se puede estabilizar mediante la adición de varios tipos de reactivos, surfactantes y tampones. Además, las micropartículas se pueden utilizar solas o la dispersión se puede ajustar a diversas concentraciones por secado de la dispersión según sea necesario. En la presente invención, no hay limitaciones concretas sobre el tipo de líquido en el que se dispersan las micropartículas siempre que no disuelva las micropartículas ni haga que las micropartículas se hinchen. Se pueden utilizar agua, soluciones acuosas de diversos compuestos inorgánicos, alcoholes, éteres, aldehídos, cetonas, ácidos grasos, aminas u otros disolventes orgánicos. Se puede utilizar un disolvente que se obtiene mediante la mezcla de diversos compuestos en una proporción arbitraria, o estos disolventes se pueden utilizar mediante la mezcla con un disolvente hidrófobo compatible.

35

40



## &lt;Distribución del tamaño de partícula&gt;

La distribución del tamaño de grano de las micropartículas orgánicas coloreadas de la presente invención se determina con la siguiente fórmula (1):

5 valor del CV = (desviación estándar de la distribución del tamaño de grano en volumen determinada con un analizador del tamaño de partícula)/(mediana del diámetro promedio en volumen determinado con un analizador del tamaño de partícula) x 100 (1).

10 Aunque no hay limitaciones concretas al respecto, como se ha señalado anteriormente, dado que tienden a observarse coloración de fondo y falsos positivos en un kit de inmunocromatografía si el tamaño de grano es excesivamente grande, la distribución del tamaño de grano es, de forma preferente, tan pequeña como sea posible, y es, de forma preferente, del 70% o menor. Aunque el valor de CV se puede ajustar de acuerdo con las condiciones de producción de las micropartículas cuando se desea hacerlas más pequeñas, las partículas pueden dimensionarse mediante un procedimiento tal como filtración o separación centrífuga en cualquier etapa antes de o después de la tinción. En la presente invención, en atención a la economía, el intervalo de los valores de CV es, de forma preferente, del 10% al 70%, más preferentemente, del 10% al 60% y, aún más preferentemente, del 10% al 50%.

## &lt;Inmunocromatografía&gt;

20 Las micropartículas orgánicas coloreadas de la presente invención se utilizan, de forma preferente en un inmunoensayo basado en inmunocromatografía.

25 Aunque a continuación se ofrece una explicación de un ejemplo típico de inmunocromatografía, la presente invención no se limita al mismo, sino que se puede aplicar a todos los ensayos de tipo sándwich en general. En términos generales, la inmunocromatografía implica, en primer lugar, la unión de un marcador en forma de micropartículas cromogénicas compuestas por un coloide metálico o látex coloreado derivado de poliestireno a un anticuerpo o antígeno que se une específicamente a un antígeno o anticuerpo que actúa como sustancia de ensayo. Por otra parte, un anticuerpo o antígeno que reacciona específicamente con un antígeno o anticuerpo se recubre en líneas en ubicaciones prescritas en un sustrato de cromatografía. Durante la prueba se forma un complejo poniendo en contacto el anticuerpo o antígeno marcado con el antígeno o anticuerpo que sirve como sustancia de ensayo y aunque este complejo se desarrolla después sobre el sustrato cromatográfico, este complejo puede ser capturado por el anticuerpo primario revestido en forma de líneas (ensayo de tipo sándwich). Dado que el marcador también se captura en este momento, la coloración se produce en la ubicación prescrita. Dado que la presencia de la sustancia de ensayo se puede determinar visualmente, este procedimiento se ha vuelto muy popular en los últimos años como un sencillo procedimiento de prueba. Además, se pueden realizar varios tipos de pruebas mediante la utilización de no solo una reacción inmune con antígeno o anticuerpo, sino también mediante la utilización de un ligando que reacciona específicamente con una sustancia de ensayo. Además de los reactivos de inmunodiagnóstico, la inmunocromatografía se utiliza en varios otros campos, tales como los análisis bioquímicos, análisis genéticos y otras reacciones analíticas arbitrarias.

**EJEMPLOS**

45 Aunque a continuación se ofrece una explicación detallada de la presente invención a través de ejemplos de la misma, la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

En primer lugar, se ofrece una explicación detallada de un procedimiento para la medición de micropartículas orgánicas coloreadas o una dispersión de micropartículas coloreadas en la presente invención.

50 Todos los procedimientos se llevaron a cabo en un ambiente a 25°C, a menos que se indique específicamente lo contrario.

(1) Distribución del tamaño de partícula (diámetro de la partícula):

55 Una dispersión de micropartículas de celulosa se midió utilizando el analizador del tamaño de partículas UPA-EX150 Nanotrak fabricado por Nikkiso Co., Ltd. A menos que se indique específicamente lo contrario, se utilizó agua para el líquido en el que se dispersaron las micropartículas de celulosa, las micropartículas de celulosa se midieron a una concentración aproximadamente del 0,1% en peso, y el número acumulado de mediciones fue de 30. Además, los valores de CV se calcularon dividiendo la desviación estándar de la distribución del tamaño de grano en volumen obtenida mediante 30 rondas de medición por la mediana del diámetro promedio en volumen.

(2) Intensidad del color:

65 Se midió la absorbancia óptica de las micropartículas de celulosa, así como del látex de poliestireno coloreado y el oro coloidal que sirven como ejemplos comparativos, utilizando una combinación de esferas de integración SV-722 y JASCO-V-650 fabricadas por Jasco Corp. Las micropartículas se midieron a concentraciones del 0,01% en peso al

0,1% en peso. A continuación, los valores calculados dividiendo el valor máximo del pico de absorbancia (ABS) en un intervalo de la luz visible de 400 nm a 800 nm por el porcentaje en peso de las micropartículas se determinaron en incrementos del 0,01% en peso.

5 (3) Confirmación de la introducción de grupos reactivos:

Una dispersión de micropartículas introducidas con grupos reactivos se secó para obtener micropartículas introducidas con grupos reactivos. Se midió el espectro de absorción de infrarrojos mediante el procedimiento de reflexión utilizando el analizador de espectros de infrarrojos Spectrum 100 fabricado por Perkin Elmer Co., Ltd., y se realizó una comparación de los espectros antes y después de la introducción de grupos reactivos. En el caso de grupos carboxilo, se confirmó la absorción de ácido libre de aproximadamente  $1730\text{ cm}^{-1}$ , mientras que en el caso de los grupos amino, se confirmó la absorción de los grupos amino primarios de aproximadamente  $1600\text{ cm}^{-1}$ .

15 Además, se utilizó el homogeneizador de presión ultraalta hidráulico M-110-E/H fabricado por Microfluidics Corp. para romper los agregados de micropartículas en la dispersión de micropartículas de celulosa y la dispersión de micropartículas de celulosa teñida. La presión de tratamiento en ese momento era de 50 MPa y las micropartículas se hicieron pasar 10 veces a través de la cámara que sirve como la parte de presión alta del homogeneizador.

20 [Ejemplo 1]

<Preparación de micropartículas>

La celulosa linter se disolvió en una solución de cupramonio, seguido de dilución con agua y amoníaco para preparar una solución de celulosa de solución de cupramonio que tiene una concentración de celulosa del 0,37% en peso. La concentración de cobre de dicha solución era del 0,13% en peso, y la concentración de amoníaco era del 1,00% en peso. A continuación, se preparó un líquido de solidificación que tenía una concentración de tetrahidrofurano del 90% en peso y una concentración de agua del 10% en peso. A continuación se añadieron 500 g de la solución de celulosa de cupramonio preparada previamente con una concentración de celulosa del 0,37% en peso al tiempo que se agitaban lentamente 5.000 g del líquido de solidificación utilizando un agitador magnético. Después de continuar agitando durante aproximadamente 5 segundos, se añadieron 1.000 g del 10% en peso de ácido sulfúrico para llevar a cabo la neutralización y la regeneración y obtener 26.500 g de una suspensión que contiene las micropartículas de celulosa objetivo. A continuación, la suspensión resultante se centrifugó durante 10 minutos a una velocidad de 10.000 rpm. El precipitado se separó por decantación y se inyectó agua desionizada y se agitó, seguido por centrifugación de nuevo. Este procedimiento se repitió varias veces hasta que el pH alcanzó de 6,0 a 7,0, a continuación de dicho tratamiento de dispersión se llevó a cabo con un homogeneizador de alta presión para obtener 150 g de una dispersión de micropartículas de celulosa. Además, todos los procedimientos se llevaron a cabo en un ambiente a 25°C.

40 <Tinción de micropartículas>

A continuación, se tiñeron las micropartículas de celulosa preparadas de la manera descrita anteriormente. Se añadieron 30 g de sulfato de sodio y 1 g de Levafix Navy CA Gr. (marca comercial registrada) fabricado por Dystar GmbH Corp. (también se puede denominar colorante azul A) como colorante reactivo a 100 g de la dispersión de micropartículas de celulosa ajustada a una concentración de micropartículas del 1,0% en peso, seguido de calentamiento a 60°C utilizando un baño de temperatura constante mientras se agitaba. Una vez alcanzada la temperatura de 60°C, se añadieron 4 g de carbonato de sodio, seguido de tinción durante 2 horas. Continuando, las micropartículas teñidas en crudo resultantes se lavaron con una solución acuosa de hidróxido de sodio al 5% en peso, se recuperaron mediante separación centrífuga, se lavaron con agua pura y, a continuación, se recuperaron mediante separación centrífuga. Esta serie de procedimientos se definió como un ciclo. Estos procedimientos se llevaron a cabo durante un máximo de 3 ciclos para obtener micropartículas teñidas. La proporción del componente de colorante fue del 49% del peso de las micropartículas orgánicas coloreadas.

Los resultados de la medición del tamaño de grano promedio y la intensidad del color antes y después de la tinción se muestran en la siguiente tabla 1.

55 [Ejemplo 2]

Aunque las micropartículas de celulosa no teñidas obtenidas en el ejemplo 1 se tiñeron utilizando el mismo procedimiento, el procedimiento se llevó a cabo para un total de 10 ciclos para obtener micropartículas teñidas. Los resultados de la medición del tamaño de partícula promedio y la intensidad del color antes y después de la tinción se muestran en la siguiente tabla 1.

[Ejemplo 3]

65 Las micropartículas de celulosa y las micropartículas de celulosa teñida se obtuvieron utilizando el mismo procedimiento que en el ejemplo 1 con la excepción de que se utilizó Levafix Rubine CA Gr. (marca comercial

registrada) fabricado por Dystar GmbH Corp. (también puede denominarse colorante rojo B) como reactivo de tinción para teñir las micropartículas de celulosa no teñidas obtenidas en el ejemplo 1. Los resultados de la medición del tamaño de grano promedio y la intensidad del color antes y después de tinción se muestran en la siguiente tabla 1.

5 [Ejemplo 4]

10 Las micropartículas de celulosa y las micropartículas de celulosa teñidas se obtuvieron utilizando el mismo procedimiento que en el ejemplo 1 con la excepción de la utilización para la solidificación de un fluido de solidificación con una concentración de tetrahidrofurano del 95% en peso y una concentración de agua del 5% en peso. Los resultados de la medición del tamaño de partícula promedio y la intensidad del color antes y después de la tinción se muestran en la siguiente tabla 1.

[Ejemplo 5]

15 Las micropartículas de celulosa y las micropartículas de celulosa teñida se obtuvieron utilizando el mismo procedimiento que en el ejemplo 1 con la excepción de que se utilizó Levafix Rubine CA Gr.® fabricado por Dystar GmbH Corp. (colorante rojo B) como reactivo de tinción para teñir las micropartículas de celulosa no teñidas obtenidos en el ejemplo 4. Los resultados de la medición del tamaño de partícula promedio y la intensidad del color antes y después de tinción se muestran en la siguiente tabla 1.

20 [Ejemplo 6]

25 Las micropartículas de celulosa y las micropartículas de celulosa teñidas se obtuvieron utilizando el mismo procedimiento que en el ejemplo 1 con la excepción de la utilización para la solidificación de un fluido de solidificación con una concentración de acetona del 26,5% en peso, una concentración de amoniaco del 0,20% en peso y una concentración de agua del 73,3% en peso. Los resultados de la medición del tamaño de partícula promedio y la intensidad del color antes y después de la tinción se muestran en la siguiente tabla 1.

30 [Ejemplo comparativo 1]

35 Las micropartículas de celulosa y las micropartículas de celulosa teñidas se obtuvieron utilizando el mismo procedimiento que en el ejemplo 1 con la excepción de la utilización para la solidificación de un fluido de solidificación con una concentración de tetrahidrofurano del 97% en peso y una concentración de agua del 3% en peso. Los resultados de la medición del tamaño de partícula promedio y la intensidad del color antes y después de la tinción se muestran en la siguiente tabla 1.

[Ejemplo 7]

40 Las micropartículas de celulosa teñidas obtenidas en el ejemplo comparativo 1 se filtraron utilizando una película de filtración derivada de nitrocelulosa que tiene un tamaño de poro de 0,8 µm fabricada por Nihon Millipore K.K., seguido de toma de muestras del filtrado. Los resultados de la medición del tamaño de partícula promedio y la intensidad del color se muestran en la siguiente tabla 1.

45 [Ejemplo 8]

50 Aunque las micropartículas teñidas se obtuvieron mediante la tinción de las micropartículas de celulosa no teñidas obtenidas en el ejemplo 1 utilizando mismo procedimiento que en el ejemplo 1, solo se llevó a cabo un ciclo del procedimiento de tinción. Los resultados de la medición del tamaño de partícula promedio y la intensidad del color antes y después de la tinción se muestran en la siguiente tabla 1.

[Ejemplo 9]

55 Aunque las micropartículas teñidas se obtuvieron mediante la tinción de las micropartículas de celulosa no teñidas obtenidas en el ejemplo 1 utilizando el mismo procedimiento que en el ejemplo 1 con la excepción de que se utilizaron 0,5 g de Levafix Rubine CA Gr. (marca comercial registrada) fabricado por Dystar GmbH Corp. (colorante rojo B) para el colorante reactivo, solo se llevó a cabo un ciclo del procedimiento de tinción. Los resultados de la medición del tamaño de partícula promedio y la intensidad del color antes y después de la tinción se muestran en la siguiente tabla 1.

60 [Ejemplo comparativo 2]

65 Las micropartículas teñidas se obtuvieron utilizando las micropartículas no teñidas obtenidas en el ejemplo 1 mediante la realización del mismo procedimiento que en el ejemplo 8 con la excepción de que se utilizaron 0,2 g de Levafix Navy CA Gr. (marca comercial registrada) fabricado por Dystar GmbH Corp. (colorante azul A) para el colorante reactivo. Los resultados de la medición del tamaño de partícula promedio y la intensidad del color antes y después de la tinción se muestran en la siguiente tabla 1.

[Ejemplo comparativo 3]

5 Las micropartículas teñidas se obtuvieron utilizando las micropartículas no teñidas obtenidas en el ejemplo 6 mediante la realización del mismo procedimiento que en el ejemplo 8 con la excepción de que se utilizaron 0,2 g de Remazol Black B HI-GRAN 150 (marca comercial registrada) fabricado por Dystar GmbH Corp. (colorante azul C) para el colorante reactivo. Los resultados de la medición del tamaño de partícula promedio y la intensidad del color antes y después de la tinción se muestran en la siguiente tabla 1.

10 [Ejemplo comparativo 4]

15 La intensidad del color se midió utilizando DS02B (Primary Blue (marca comercial registrada), tamaño promedio de grano: 0,47  $\mu\text{m}$ ) fabricado por Bangs Laboratories, Inc. como partículas de látex de poliestireno teñidas. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 1.

[Ejemplo comparativo 5]

20 Los resultados de la medición de la intensidad de color de las partículas coloidales de oro que tienen un tamaño promedio de partícula de 0,04  $\mu\text{m}$  se muestran en la siguiente tabla 1.

[Tabla 1]

	Sin color		Partículas coloreadas				
	Tamaño promedio de partícula (nm)	Valor de CV (%)	Tamaño promedio de partícula (nm)	Valor de CV (%)	Colorante	Capacidad de tinción (%)	Intensidad del color
Ej. 1	248	22	372	30	Azul A	49	2,9
Ej. 2	"	"	494	40	Azul A	72	4,1
Ej. 3	"	"	391	31	Rojo B	53	2,8
Ej. 4	484	25	579	43	Azul A	45	3,2
Ej. 5	"	"	590	30	Rojo B	41	2,6
Ej. 6	44	19	62	31	Azul A	39	3,2
Ej. comp.1	912	32	1105	51	Azul A	41	3,1
Ej. 7	"	"	887	36	"	"	2,8
Ej. 8	248	22	269	28	Azul A	20	1,6
Ej. 9	"	"	270	25	Rojo B	13	1,2
Ej. comp.2	"	"	255	25	Azul A	9	0,8
Ej. comp.3	44	19	49	23	Azul C	8	0,6
Ej. comp.4	--	--	470	22			0,4
Ej. Comp. 5	40	31	--	--			2,2

<Evaluación del rendimiento 1>

25 Una evaluación del rendimiento se llevó a cabo mediante la preparación de kits de inmunocromatografía utilizando las partículas cromogénicas coloreadas o teñidas de los ejemplos 1 a 9 y los ejemplos comparativos 1 a 5.

<Preparación de micropartículas teñidas unidas a anticuerpos mediante adsorción física>

30 Las micropartículas teñidas o coloreadas obtenidas en los ejemplos 1 a 9 y los ejemplos comparativos 1 a 4 se diluyeron con una solución tampón fosfato (a la que se hará referencia como "PBS") a una concentración de sólidos del 1% en peso, 1 ml de la suspensión en tampón fosfato de micropartículas teñidas al 1% en peso resultante y 1 ml de anticuerpo diluido obtenido diluyendo el anticuerpo derivado de ratón frente a la gonadotropina coriónica humana (denominada "hCG") (anticuerpo anti-hCG No. de referencia 504 fabricado por Medix Biochemica Ab) con PBS a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$  se introdujeron en un tubo de centrifuga Eppendorf y se agitaron durante 2 horas a temperatura ambiente, y el anticuerpo monoclonal se unió a las micropartículas teñidas, seguido de lavado por centrifugación 3 veces que contenía PBS que contenía seroalbúmina bovina (BSA) a una concentración del 1% en peso y se volvieron a dispersar a un volumen final de 2 ml para obtener una dispersión de micropartículas teñidas unidas al anticuerpo.

## &lt;Preparación de coloide de oro unido a anticuerpos&gt;

5 Se llevaron a ebullición 200 ml de una solución acuosa de cloruro de oro que tenía una concentración del 0,01% en peso, seguido de la adición a la misma de una solución acuosa de citrato de sodio que tiene una concentración del 1% en peso y se continuó calentando y llevando a ebullición hasta que el color de la solución cambió desde amarillo claro a rojo-violeta para preparar una dispersión de las partículas coloidales de oro que tienen un tamaño promedio de partícula de 0,04  $\mu\text{m}$  indicado en el ejemplo comparativo 5. A continuación, se añadió una solución de dihidrógeno fosfato de potasio 50 mM a la dispersión resultante de coloide de oro para ajustar el pH a 8, seguido de la adición de anticuerpo monoclonal a hCG a una velocidad de 10  $\mu\text{g}$  por 1 ml de la dispersión de coloide de oro, añadiendo 0,1 ml de BSA (seroalbúmina bovina) que tiene una concentración del 30% en peso a 10 ml del mismo, centrifugación, eliminando el sobrenadante, lavando mediante centrifugación y precipitando tres veces con PBS que contiene BSA a una concentración del 0,1% en peso, y volviendo a dispersar para obtener una dispersión de partículas de coloide de oro unidas al anticuerpo.

15 <Preparación del sustrato cromatográfico (membrana)>

20 Un anticuerpo de carrera de la prueba se pulverizó e imprimió sobre una anchura de aproximadamente 1 mm en una ubicación a 7 mm desde un extremo (en lo sucesivo, en el presente documento indicando el extremo inferior de una tira, e indicando el otro extremo el extremo superior de la tira) de una membrana de filtro disponible comercialmente (HA120 fabricado por Nihon Millipore KK, 25 mm x 300 mm) utilizando un dispositivo de pulverización de líquido perpendicular a la dirección del desarrollo, o, en otras palabras, en paralelo al lado largo de la membrana. Más específicamente, se utilizó la subunidad  $\alpha$  del anticuerpo anti-h derivado de ratón (No. de referencia 6601 fabricado por Medix Biochemica Ab) para el anticuerpo de carrera de la prueba, y un líquido preparado a una concentración de 0,5 mg/ml con PBS se pulverizó a 1,0  $\mu\text{l}/\text{cm}$ . Además, un anticuerpo de línea de control se pulverizó e imprimió sobre una anchura de 1 mm en una ubicación a 12 mm desde el extremo inferior de la misma manera. Más específicamente, se utilizó anticuerpo anti-ratón derivado de conejo (Z0259 fabricado por Dako Group, Inc.) para el anticuerpo de línea de control y un líquido preparado a una concentración de 0,5 mg/ml con PBS se pulverizó a 1,0  $\mu\text{l}/\text{cm}$ . Después de pulverizar cada anticuerpo, se secaron los sustratos durante 1 hora, seguido de bloqueo utilizando la solución tampón de borato que contiene caseína de la leche, lavando con tampón de Tris-HCl que contiene sacarosa, y fijando durante la noche a temperatura ambiente para preparar una membrana de cromatografía.

35 <Preparación de muestras para evaluación cromatográfica>

40 Una almohadilla de absorción de papel de filtro que medía 20 mm x 300 mm se puso en contacto con las membranas cromatográficas utilizando las micropartículas teñidas resultantes descritas en cada uno de los ejemplos y ejemplos comparativos en sus respectivos lados largos de manera que se superpusieron a una distancia de 5 mm desde sus extremos superiores, seguido por corte cada 5 mm de anchura con un cortador de guillotina para preparar las muestras. Se pueden obtener 60 muestras sobre la base de un cálculo simple.

## &lt;Evaluación cromatográfica&gt;

45 Se prepararon muestras que contenían hCG utilizadas en una prueba de desarrollo de la manera descrita a continuación.

50 Se diluyó hCG con PBS que contenía BSA a una concentración del 1% en peso para contener hCG a concentraciones de 100, 10 y 0 mUI/ml, respectivamente. Una parte de 2 mm desde el extremo inferior de las muestras del kit de 5 mm de anchura obtenidas tal como se ha descrito anteriormente se sumergió en las soluciones de la muestra, seguido por el desarrollo de las soluciones de la muestra. Diez minutos más tarde, se observó visualmente la coloración en el sitio de reacción (parte impresa con el marcador) en el filtro de membrana. Los criterios de evaluación consistieron en una evaluación de (-) en el caso de que no se observara color en la línea de prueba, (+) en el caso de observar color, (++) en el caso de que la coloración fuera claramente visible, y (+++) en el caso de observar una coloración intensa. Los resultados de la evaluación se muestran en la tabla 2 siguiente.

55

[Tabla 2]

	Después de la tinción			Coloración de la línea de prueba a cada concentración (10 min)			
	Tamaño promedio de partícula (nm)	Colorante	Intensidad del color	(mUI/ml)			
				1000	100	10	0
Ej. 1	372	Azul A	2,9	+++	+++	++	-
Ej. 2	494	Azul A	4,1	+++	+++	+++	-
Ej. 3	391	Rojo B	2,8	+++	++	++	-
Ej. 4	579	Azul A	3,2	+++	++	++	-
Ej. 5	590	Rojo B	2,6	+++	++	+	-
Ej. 6	62	Azul A	3,2	++	++	+	-
Ej. comp.1	1105	Azul A	3,1	++	++	++	+
Ej. 7	887	Azul A	2,8	++	++	+	-
Ej. 8	269	Azul A	1,6	+++	++	+	-
Ej. 9	270	Rojo B	1,2	++	++	+	-
Ej. comp.2	255	Azul A	0,8	+	-	-	-
Ej. comp.3	49	Azul C	0,6	-	-	-	-
Ej. comp.4	470	Azul	0,4	++	+	-	-
Ej. Comp. 5	40	Rojo	2,2	+++	++	+	-

5 Se observó coloración de la línea de control en todos los ejemplos y ejemplos comparativos. A una concentración de hCG de 100 mUI/ml, se observó la coloración de la línea de prueba en los ejemplos 1 a 9 y los ejemplos comparativos 4 y 5. Además, también a una concentración de hCG de 10 mUI/ml o menos, la coloración de la prueba se observó en los ejemplos 1 a 9 y los ejemplos comparativos 4 y 5.

10 En el ejemplo comparativo 1, se observó un fenómeno en el que la sensibilidad aparente disminuyó debido a la coloración de fondo, particularmente a concentraciones de antígeno altas. Además, se observó una tendencia en la que la coloración se produjo incluso en ausencia de hCG en las muestras, es decir, una tendencia a la aparición de falsos positivos. En el ejemplo 7, cuando se utilizaron las partículas del ejemplo comparativo 1 después de filtrar, aunque quedaba coloración de fondo, ya no se observaron falsos positivos, lo que indica que el tamaño de partícula excesivamente grande conduce a la aparición de falsos positivos. Un tamaño de partícula excesivamente grande no es adecuado para los kits de reactivos para diagnóstico. Dado los falsos positivos no se observaron en los ejemplos 1 a 9, se puede decir que los ejemplos 1 a 9 tienen una sensibilidad alta.

15 Por otra parte, en los ejemplos comparativos 2 a 4, no pudo detectarse coloración a una concentración de hCG de 10 mUI/ml debido a la baja intensidad de color del colorante. Por lo tanto, puede entenderse que la utilización de las micropartículas orgánicas coloreadas de la presente invención tiene una sensibilidad alta en comparación con el látex de poliestireno.

20 Además, en una comparación con el coloide de oro del ejemplo comparativo 5, se puede entender que se puede demostrar una sensibilidad igual o mayor por las micropartículas inorgánicas coloreadas de la presente invención. A saber, la utilización de las micropartículas inorgánicas coloreadas de la presente invención permite un diagnóstico de alta sensibilidad con color azul o color rojo.

<Introducción de grupos reactivos>

30 Continuando, los grupos reactivos, tales como grupos carboxilo o grupos amino, se introdujeron en las micropartículas teñidas obtenidas en el ejemplo 1.

[Ejemplo 10]

35 A una parte de la dispersión de micropartículas teñidas de azul obtenidas en el ejemplo 1 se añadieron agua pura y alcohol isopropílico (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., de calidad de reactivo) para ajustar la proporción entre el alcohol isopropílico y el agua en el medio de dispersión a 85:15 y la concentración de las micropartículas en el medio de dispersión al 0,50% en peso. 20 g de la dispersión de micropartículas de celulosa teñidas resultante se colocó en

un tubo de ensayo junto con un rotor, seguido de fijación del tubo de ensayo a un tubo de reflujo de vidrio. La dispersión de micropartículas de celulosa se calentó durante 30 minutos en un baño de agua a una temperatura de 50°C mientras se enfriaba sometiendo a reflujo con agua corriente a aproximadamente 10°C. Adicionalmente, el calentamiento se llevó a cabo en agitación suave utilizando un agitador magnético. Posteriormente, se añadieron 74 mg de solución al 40% en peso de hidróxido de sodio mientras se agitaba, seguido agitación continua durante 30 minutos y, a continuación, la adición de 216 mg de cloroacetato de sodio (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Los grupos carboxilo se introdujeron continuando la agitación y el reflujo durante 3 horas. Tres horas más tarde, el calentamiento en el baño de agua se interrumpió, un matraz de recuperación se enfrió con agua con hielo, y la suspensión se enfrió después de la reacción a una temperatura de 20°C. Después de enfriar, se añadió 1,0 g de 10% en peso de ácido clorhídrico mientras se continuaba agitando, para ajustar el pH de la suspensión después de la reacción a un pH ácido. La dilución mediante decantación y agua desionizada se repitió varias veces utilizando la misma centrífuga que la utilizada para lavar las micropartículas, el pH se ajustó a de 6,0 a 7,0 y se llevó a cabo un tratamiento de dispersión con un homogeneizador de alta presión para obtener una dispersión de micropartículas teñidas carboxiladas. Los resultados de la medición del tamaño de partícula promedio y la intensidad del color de una parte de la dispersión resultante se muestran en la siguiente tabla 3.

#### [Ejemplo 11]

A una parte de la dispersión de micropartículas teñidas de azul obtenidas en el ejemplo 1 se añadieron agua pura y acetona (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., de calidad de reactivo) para ajustar la proporción entre acetona y agua en el medio de dispersión a 1:1 y la concentración de las micropartículas en el medio de dispersión al 1,0% en peso. 10 g de la dispersión de micropartículas de celulosa teñidas resultante se colocó en un tubo de ensayo junto con un rotor, seguido de fijación del tubo de ensayo a un tubo de reflujo de vidrio. La dispersión de micropartículas de celulosa se calentó durante 30 minutos en un baño de agua a una temperatura de 40°C mientras se enfriaba sometiendo a reflujo con agua corriente a aproximadamente 10°C. Adicionalmente, el calentamiento se llevó a cabo en agitación suave utilizando un agitador magnético. Posteriormente, se añadieron 705 mg de ácido 5-hexenoico (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 677 mg de nitrato de diamonio de cerio (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 617 ml de 1 mol/l de ácido nítrico (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Los grupos carboxilo se introdujeron continuando la agitación y el reflujo durante 3 horas. El tratamiento después de la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 10 para obtener una dispersión de micropartículas teñidas carboxiladas. Los resultados de la medición del tamaño de partícula promedio y la intensidad del color de una parte de la dispersión resultante se muestran en la siguiente tabla 3.

#### [Ejemplo 12]

Se obtuvo una dispersión de micropartículas teñidas carboxiladas utilizando el mismo procedimiento que en el ejemplo 11 con la excepción que se utilizaron 1.654 g de ácido 16-heptadecenoico (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para el agente de reacción añadido para llevar a cabo la carboxilación. Los resultados de la medición del tamaño de partícula promedio y la intensidad del color de una parte de la dispersión resultante se muestran en la siguiente tabla 3.

#### [Ejemplo 13]

Se añadió agua pura a una parte de la dispersión de micropartículas teñidas de azul obtenida en el ejemplo 1 para ajustar la concentración de las micropartículas en el medio de dispersión al 1,0% en peso. 10 g de la dispersión de micropartículas de celulosa teñidas resultante se colocó en un tubo de ensayo junto con un rotor, seguido de fijación del tubo de ensayo a un tubo de reflujo de vidrio. La dispersión de micropartículas de celulosa se calentó durante 30 minutos en un baño de agua a una temperatura de 35°C mientras se enfriaba sometiendo a reflujo con agua corriente a aproximadamente 10°C. Adicionalmente, el calentamiento se llevó a cabo en agitación suave utilizando un agitador magnético. Posteriormente, se añadieron 571 mg de epiclorhidrina, seguido de agitación continua y reflujo durante 30 minutos para introducir grupos epoxi. Posteriormente, la temperatura del baño de agua se elevó a 50°C, seguido de la adición de 810 g de ácido 6-aminohexanoico (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se continuó la agitación y a reflujo durante 1 hora para introducir los grupos carboxilo. El tratamiento después de la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 10 para obtener una dispersión de micropartículas de teñidas carboxiladas. Los resultados de la medición del tamaño de partícula promedio y la intensidad del color de una parte de la dispersión resultante se muestran en la siguiente tabla 3.

#### [Ejemplo 14]

Se obtuvo una dispersión de micropartículas teñidas aminadas de la misma manera que el ejemplo 13 con la excepción que se utilizaron 840 g de amoniaco acuoso (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para el agente de reacción añadido para llevar a cabo la introducción de grupos epoxi. Los resultados de la medición del tamaño de grano promedio y la intensidad del color de una parte de la dispersión resultante se muestran en la siguiente tabla 3.

## &lt;Confirmación de grupos reactivos con analizador de espectros de infrarrojos&gt;

Las dispersiones de micropartículas teñidas carboxiladas y aminadas obtenidas en los ejemplos 10 a 14 se secaron para preparar micropartículas teñidas carboxiladas y aminadas, y la introducción de grupos reactivos se confirmó con un analizador de espectros de infrarrojos. La absorción se incrementó a aproximadamente  $1.730\text{ cm}^{-1}$  para las micropartículas teñidas carboxiladas y a aproximadamente  $1.600\text{ cm}^{-1}$  para las micropartículas teñidas aminadas, lo que confirma el éxito de la introducción de grupos reactivos.

[Tabla 3]

	Tipo de grupos reactivos	Número de átomos de la estructura espaciadora	Tamaño promedio de partícula (nm)	Valor de CV (%)	Intensidad del color
Ejemplo 10	Grupos carboxilo	1	370	32	2,8
Ejemplo 11	Grupos carboxilo	5	375	33	2,6
Ejemplo 12	Grupos carboxilo	16	383	38	2,5
Ejemplo 13	Grupos carboxilo	9	380	34	2,6
Ejemplo 14	Grupos amino	3	374	31	2,7

## &lt;Evaluación del rendimiento 2&gt;

Se llevó a cabo una evaluación del rendimiento mediante la preparación de kits de inmunocromatografía después del enlace químico de un anticuerpo a las micropartículas teñidas introducidas con grupos reactivos de los ejemplos 10 a 14.

## &lt;Preparación de micropartículas teñidas unidas a anticuerpos mediante enlace químico 1&gt;

Un tampón de 2-morfolinoetanosulfonato (al que se hace referencia como "MES") que tiene un pH de 5,2 y una concentración de 50 mM se preparó utilizando ácido 2-morfolinoetanosulfónico (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), hidróxido de sodio y agua pura, y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., al que se hace referencia como "carbodiimida") se disolvió en tampón MES y se ajustó a una concentración de carbodiimida del 20% en peso. Después de la precipitación de las micropartículas teñidas carboxiladas obtenidas en los ejemplos 10 a 13 utilizando una centrífuga, las micropartículas se volvieron a dispersar en el tampón MES y la concentración de sólidos se ajustó a una concentración del 1% en peso para obtener dispersiones de tampón de MES de micropartículas teñidas carboxiladas. Se añadió 1 g de solución de carbodiimida al 20% en peso a 10 g de las dispersiones de tampón MES de micropartículas teñidas carboxiladas y se dejaron reaccionar durante 1 hora en un ambiente a  $25^{\circ}\text{C}$  utilizando un baño de agua en agitación a temperatura constante, seguido de centrifugación durante 30 minutos a una velocidad de 10.000 rpm después de la finalización de la reacción. El precipitado se separó mediante decantación, seguido de la adición de tampón fosfato y agitación para obtener micropartículas teñidas activadas por carbodiimida dispersas en tampón fosfato. La dilución con solución tampón fosfato de decantación se repitió tres veces utilizando la misma centrífuga como la utilizada para lavar las micropartículas para eliminar la carbodiimida sin reaccionar. Las micropartículas teñidas activadas con carbodiimida resultantes se utilizaron a continuación para preparar las micropartículas teñidas unidas a anticuerpos mediante enlace químico utilizando el mismo procedimiento que el utilizado para preparar las micropartículas teñidas unidas a anticuerpos mediante absorción física.

## &lt;Preparación de micropartículas teñidas unidas a anticuerpos mediante enlace químico 2&gt;

Después de la precipitación de la dispersión de micropartículas teñidas aminadas utilizando una centrífuga, las micropartículas se volvieron a dispersar en el tampón fosfato mencionado anteriormente y la concentración de sólidos se ajustó a una concentración del 1% en peso para obtener una dispersión de tampón PBS de micropartículas teñidas aminadas. Se añadió 1 g de una solución de glutaraldehído al 25% en peso (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a 10 g de las dispersiones de tampón PBS de micropartículas teñidas aminadas y se dejaron reaccionar durante 2 horas en un ambiente a  $37^{\circ}\text{C}$  utilizando un baño de agua en agitación a temperatura constante, seguido de centrifugación durante 30 minutos a una velocidad de 10.000 rpm después de la finalización de la reacción. El precipitado se separó mediante decantación, seguido de la adición de tampón fosfato y agitación para dispersar las micropartículas teñidas activadas por glutaraldehído en tampón fosfato. La dilución con solución tampón fosfato de decantación se repitió tres veces utilizando la misma centrífuga como la utilizada para lavar las micropartículas para eliminar el glutaraldehído sin reaccionar. Las micropartículas teñidas activadas con glutaraldehído resultantes se utilizaron a continuación para preparar las micropartículas teñidas unidas a anticuerpos mediante enlace químico utilizando el mismo procedimiento que el utilizado para preparar las micropartículas teñidas unidas a anticuerpos mediante absorción física. Los aldehídos que no reaccionaron se separaron mediante la adición de 1 g de glicina antes de la adición de seroalbúmina bovina a una concentración del 0,1% en peso.



<Evaluación cromatográfica>

5 Las micropartículas teñidas unidas a anticuerpos mediante enlaces químicos obtenidos en los ejemplos 10 a 14 y las micropartículas unidas a anticuerpo mediante absorción física obtenidas en el ejemplo 1 se evaluaron para determinar su utilización como micropartículas de inmunocromatografía.

10 Las evaluaciones se llevaron a cabo utilizando el mismo procedimiento que se describió anteriormente y se utilizaron tres niveles de concentraciones de hCG que consistían en 10, 1 y 0 mUI/ml. Los resultados de la evaluación se muestran en la tabla 4 siguiente.

[Tabla 4]

	Después de la tinción		Procedimiento de unión a anticuerpo	Coloración de la línea de prueba a cada concentración (10 min)		
	Tamaño promedio de partícula (nm)	Intensidad del color		(mUI/ml)		
				10	1	0
Ejemplo 1	372	2,9	Adsorción física	++	-	-
Ejemplo 10	370	2,8	Enlace químico	++	-	-
Ejemplo 11	375	2,6	Enlace químico	++	+	-
Ejemplo 12	383	2,5	Enlace químico	++	++	-
Ejemplo 13	380	2,6	Enlace químico	++	+	-
Ejemplo 14	374	2,7	Enlace químico	++	+	-

15 Se observó coloración de las micropartículas teñidas unidas al anticuerpo en el que el anticuerpo se unió mediante enlace químico de los ejemplos 11 a 14, incluso a una concentración de hCG de 1 mUI/ml. En cada uno de estos casos, el número de átomos de los espaciadores de los grupos reactivos fue de 3 o más. En contraste, no se observó coloración para las micropartículas teñidas en las que el anticuerpo se unió mediante la adsorción física del ejemplo 1 o para las micropartículas teñidas unidas al anticuerpo del ejemplo 9 en el que el número de átomos del espaciador fue de 1 a una concentración de hCG de 1 mUI/ml. Sobre la base de estos resultados, se determinó que las micropartículas orgánicas coloreadas de la presente invención podían soportar un ligando mediante enlace químico.

20

**APLICABILIDAD INDUSTRIAL**

25 Las micropartículas orgánicas coloreadas de la presente invención son útiles para su utilización como marcador para inmunodiagnóstico e inmunocromatografía, y se pueden utilizar, de forma preferente, en un kit de inmunocromatografía muy sensible que permite la evaluación rápida.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Micropartículas orgánicas coloreadas que tienen un tamaño promedio de partícula de 10 nm a 1.000 nm y una intensidad de color de 1,0 a 5,0, en las que del 10% en peso al 80% en peso de las micropartículas orgánicas coloreadas constituyen un componente colorante, y en las que del 20% en peso al 90% en peso de las micropartículas orgánicas coloreadas derivan de celulosa, y en las que dicha intensidad del color se obtiene mediante la medición de la absorbancia óptica de las micropartículas de celulosa así como de las micropartículas coloreadas de látex de poliestireno y de coloides de oro que sirven como ejemplos comparativos, a concentraciones del 0,01% en peso al 0,1% en peso utilizando una combinación de la esfera de integración SV-722 y JASCO-V-650
- 10 fabricados por Jasco Corp; mediante el cálculo de los valores dividiendo el valor máximo del pico de absorbancia (ABS) sobre un intervalo de la luz visible de 400 nm a 800 nm por el porcentaje en peso de las micropartículas; y ajustando los valores a aquellos por incrementos del 0,01% en peso.
- 15 2. Micropartículas orgánicas coloreadas, según la reivindicación 1, en las que el componente de coloración es un colorante.
3. Micropartículas orgánicas coloreadas, según la reivindicación 1, en las que un ligando está unido mediante adsorción física.
- 20 4. Micropartículas orgánicas coloreadas, según la reivindicación 1, que tienen un grupo reactivo.
5. Micropartículas orgánicas coloreadas, según la reivindicación 4, en las que el grupo reactivo tiene una estructura espaciadora que tiene 3 o más átomos.
- 25 6. Micropartículas orgánicas coloreadas, según la reivindicación 4, en las que un ligando está unido al grupo reactivo mediante enlaces covalentes.
- 30 7. Kit de inmunocromatografía que contiene, como marcador, las micropartículas orgánicas coloreadas, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que están unidas a un anticuerpo o antígeno que se une específicamente a un antígeno o anticuerpo como una sustancia de ensayo, y un sustrato cromatográfico que se recubre con un anticuerpo o antígeno que reacciona específicamente con un antígeno o anticuerpo.