

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 524**

51 Int. Cl.:

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/545 (2006.01)

G01N 33/571 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2006 PCT/JP2006/324473**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2007 WO07066731**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2006 E 06834228 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 1956373**

54 Título: **Método para analizar anticuerpos anti- Treponema pallidum**

30 Prioridad:

07.12.2005 JP 2005354080
07.12.2005 JP 2005354081

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.06.2017

73 Titular/es:

SEKISUI MEDICAL CO., LTD. (50.0%)
13-5, NIHOMBASHI 3-CHOME CHUO-KU
TOKYO 103-0027, JP y
NOF CORPORATION (50.0%)

72 Inventor/es:

AKAMINE, TAKAYUKI;
OTA, TETSUYA y
LI, YAN

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 615 524 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

Método para analizar anticuerpos anti- *Treponema pallidum*

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere al análisis de anticuerpos anti- *Treponema pallidum*, que permite el diagnóstico preciso de la infección sifilítica mediante la prevención de la aparición de interferencia sérica.

10 **Técnica anterior**

La infección por *Treponema pallidum*, un patógeno de la sífilis, en un cuerpo vivo, causa una producción de un anticuerpo reactivo a los fosfolípidos, así como un anticuerpo contra el patógeno, en el cuerpo vivo. Un reactivo para analizar los anticuerpos anti-fosfolípidos es un reactivo para el diagnóstico de la infección de la sífilis mediante el análisis de la presencia o ausencia del anticuerpo reactivo a fosfolípidos en sangre.

Convencionalmente, el anticuerpo anti-fosfolípidos se ha analizado mediante un método manual, tal como una prueba en tarjeta RPR utilizando un portaobjetos de ensayo. Sin embargo, en los últimos años, se ha comercializado un reactivo (reactivo para un autoanalizador) aplicable a un autoanalizador bioquímico.

En el caso de que se utilice el reactivo para un autoanalizador, una cantidad de suero utilizado en el ensayo tiende a ser menor, en comparación con una cantidad del mismo utilizado en el ensayo por el método manual, a fin de reducir una carga de la sangre obtenida en un paciente. Por consiguiente, una cantidad de reacción antígeno-anticuerpo causada por una reacción entre el reactivo y el anticuerpo en la sangre también es pequeña. Por lo tanto, en el caso de que se utilice el reactivo para un autoanalizador, se puede añadir un sensibilizador para acelerar la reacción antígeno-anticuerpo. Entre los ejemplos de los sensibilizador generalmente utilizados incluyen polietilenglicol, dextrano, y similares. Además, como sensibilizador utilizado con el reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos, en el Documento de Patente 1 se divulga que la polivinilpirrolidona y el pululano funcionan de forma eficaz.

Sin embargo, el sensibilizador de este tipo tiene un problema de estabilidad cuando el reactivo se almacena durante mucho tiempo, aunque es excelente en la aceleración de la reacción antígeno-anticuerpo, y, por lo tanto, el reactivo no puede mantener su rendimiento debido a la desensibilización del sensibilizador después de un almacenamiento a largo plazo del mismo.

Por otra parte, la infección por *Treponema pallidum*, un patógeno de la sífilis, en un cuerpo vivo causa la producción de un anticuerpo contra el patógeno en el cuerpo vivo. Un reactivo para analizar los anticuerpos anti-*Treponema pallidum* es un reactivo para el diagnóstico de la infección de la sífilis mediante el análisis de la presencia o ausencia de los anticuerpos anti-*Treponema pallidum* en sangre.

Convencionalmente, el anticuerpo anti-*Treponema pallidum* se ha analizado mediante un método manual, tal como TPHA, que utiliza la hemaglutinación. Sin embargo, en los últimos años, se ha comercializado un reactivo (reactivo para un autoanalizador) aplicable a un autoanalizador bioquímico. Cuando se utiliza el reactivo, una cantidad de suero utilizado en el ensayo tiende a ser menor, en comparación con una cantidad del mismo utilizado en el ensayo por el método manual, a fin de reducir una carga de la sangre obtenida en un paciente. Por consiguiente, una cantidad de reacción antígeno-anticuerpo causada por una reacción entre el reactivo y el anticuerpo en la sangre también es pequeña. Por lo tanto, en el caso de que se utilice el reactivo para un autoanalizador, se puede añadir un sensibilizador para acelerar la reacción antígeno-anticuerpo. Entre los ejemplos de los sensibilizador generalmente utilizados incluyen polietilenglicol, dextrano, y similares. Además, dado que el sensibilizador usado con el reactivo para el ensayo de los anticuerpos anti-*Treponema pallidum*, en el Documento de Patente 2 se divulga que un polímero soluble que contiene un derivado de glucósido en una unidad monomérica y / o un copolímero soluble funciona de forma eficaz.

Sin embargo, el sensibilizador de este tipo tiene el problema de que no se puede obtener un resultado exacto del ensayo en algunas muestras, aunque es excelente en lo que respecta a la aceleración de la reacción antígeno-anticuerpo. Más específicamente, hay un problema de que, en el caso de que la muestra sea suero, se puede producir un fenómeno denominado interferencia del suero, que afecta negativamente al ensayo, debido a la variación de los componentes contenidos en el suero y, como resultado, no se puede obtener el resultado preciso del ensayo.

Documento de patente 1: Publicación japonesa abierta a inspección pública Hei-10-282096
Documento de patente 2: patente japonesa N.º 2947600

En los documentos WO 91/10138 A, GOKAY O ET AL: "Synthesis of diagnostic test kits for syphilis with polymeric particles", JOURNAL OF BIOMATERIALS SCIENCE POLYMER EDITION, vol. 16, n.º 5, mayo de 2005 (2005-05), páginas 597-610, ISSN: 0920-5063, JP 2003 344413 A y JP 2001 242171 A se divulgan reactivos obtenidos

mediante inmovilización de los antígenos de los fosfolípidos sobre polímeros derivados de 2-metacrililoixietilfosfatidilcolina. Específicamente, en el documento JP 2003 344413 A se muestra este concepto para un agente de mejora de la sensibilidad para métodos de medición de cromatografía inmunitaria que contienen polímero que tiene una base expresada en una cadena lateral, que utiliza un anticuerpo relacionado con la sífilis como material objeto de medición.

Divulgación de la invención

Problemas que ha de resolver la invención

Un objetivo de la presente invención es, a la luz de la situación actual mencionada anteriormente, el ensayo de anticuerpos anti-Treponema pallidum, permitir el diagnóstico preciso de la infección sifilítica mediante la prevención de una ocurrencia de la interferencia de suero.

La invención se define en las reivindicaciones.

MEDIO

Un reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos es un reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos utilizados para el diagnóstico de la infección sifilítica, que contiene un vehículo insoluble que soporta un antígeno fosfolípido sobre el mismo y un copolímero que tiene un segmento derivado de 2-metacrililoixietilfosforilcolina y que tiene un segmento derivado de un monómero hidrófilo.

Adicionalmente, un reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-Treponema pallidum es un reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-Treponema pallidum utilizados para el diagnóstico de la infección sifilítica, que contiene un vehículo insoluble que soporta un antígeno de Treponema pallidum sobre el mismo y un copolímero que tiene un segmento derivado de 2-metacrililoixietilfosforilcolina y que tiene un segmento derivado de un monómero hidrófilo.

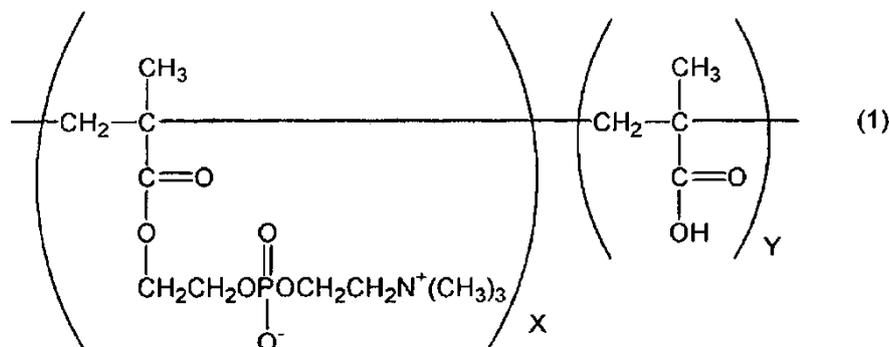
A continuación, el reactivo y la presente divulgación se describirán con detalle

Los inventores de la presente invención han llevado a cabo extensos esfuerzos de investigación y, como resultado, los inventores han encontrado que, haciendo que el reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos contenga un copolímero que tiene un segmento derivado de 2-metacrililoixietilfosforilcolina y que tenga un segmento derivado de un monómero hidrófilo como sensibilizador, se hace posible aumentar el ensayo de sensibilidad y mantener la estabilidad de almacenamiento durante un tiempo prolongado.

Un copolímero que tiene un segmento derivado de 2-metacrililoixietilfosforilcolina y que tiene un segmento derivado de un monómero hidrófilo se obtiene mediante copolimerización de 2-metacrililoixietilfosforilcolina y el monómero hidrófilo (en adelante en el presente documento y en las reivindicaciones, también conocido simplemente como copolímero)

La siguiente fórmula general (1) indica una estructura del copolímero en el caso de que el ácido metacrílico se utilice como el monómero hidrófilo.

[Quim. 1]



La 2-metacrililoixietilfosforilcolina es, ya que se incluye un grupo metacrililo, capaz de copolimerizar con otro monómero polimerizable. Entre los ejemplos del monómero hidrófilo copolimerizable se incluyen un monómero de ácido (met)acrílico, tal como metacrilato de 2-hidroxietilo, (met)acrilato, (met)acrilamida, y similares.

El monómero hidrófilo no está particularmente limitado y entre los ejemplos del mismo se incluyen ácido (met)acrílico, (met)acrilamida, y similares. De estos, el ácido (met)acrílico, que es catiónico, es adecuado, porque se espera que el ácido (met)acrílico repela electrostáticamente la proteína y similares, en los componentes de la

sangre.

En el presente documento, ácido (met)acrílico indica ácido acrílico o ácido metacrílico.

5 Una relación entre el segmento derivado de 2-metacriloiioxietilfosforilcolina y el segmento derivado de un monómero hidrófilo en el copolímero no está particularmente limitada y puede seleccionarse adecuadamente según sea necesario. Sin embargo, es deseable que sea 5: 5 a 3:7 en una relación molar. En el caso de que la relación del segmento derivado de 2-metacriloiioxietilfosforilcolina y el segmento derivado de un monómero hidrófilo es menor que este intervalo, la aparición de interferencia de suero durante el ensayo del anticuerpo anti-Treponema pallidum
10 no se puede prevenir de manera eficiente.

Un peso molecular promedio en peso del copolímero no está particularmente limitado, sin embargo, el límite inferior deseable es 5.000 y el límite superior deseable es 5.000.000. En el caso de que el peso molecular promedio en peso sea inferior a 5.000, se puede perder un efecto de la aceleración de la aglutinación. Por el contrario, en el caso de
15 que el peso molecular promedio en peso sea más de 5.000.000, la reproducibilidad y similares se pueden deteriorar, ya que la viscosidad del reactivo se hace demasiado alta en el caso de añadir el copolímero al reactivo.

Con respecto a un contenido de copolímero en el reactivo para el ensayo de los anticuerpos anti-fosfolípidos, el límite inferior deseable es 0,1 % (p / v) y el límite superior deseable es 1,2 % (p / v). Cuando el contenido es inferior a 0,1 % (p/v), la aparición de interferencia de suero no se puede prevenir de manera eficiente. Además, cuando el contenido es de más de 1,2 % (p/v), la reproducibilidad puede deteriorarse puesto que la viscosidad del reactivo se hace demasiado alta.

25 El límite inferior más deseable es 0,2 % (p/v) y el límite superior es más deseable 0,8 % (p/v).

El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos contiene un vehículo insoluble que es una partícula de soporte de un antígeno de fosfolípido sobre el mismo.

30 Como el antígeno de fosfolípidos, es deseable, por ejemplo, un antígeno lipídico que incluye cardiolipina, fosfatidilcolina y colesterol.

Como la cardiolipina, es deseable usar cardiolipina purificada de un corazón bovino, sin embargo, también se puede usar cardiolipina sintetizada químicamente.

35 Como la fosfatidilcolina, es deseable utilizar fosfatidilcolina purificada a partir de yema de huevo de gallina, sin embargo, también se puede usar lecitina que tiene un contenido de fosfatidilcolina de 60 a 80 %.

Como el colesterol, se puede usar colesterol de origen animal o, como alternativa, se puede usar colesterol sintetizado químicamente.

40 Una proporción de mezcla de la cardiolipina, la fosfatidilcolina y el colesterol no está particularmente limitada siempre y cuando el antígeno de fosfolípido resultante permita la determinación de la presencia o ausencia de infección de la sífilis. Sin embargo, es deseable que la relación sea de 8 a 12 de la fosfatidilcolina y de 1 a 5 de la colesterol, con respecto a 1 de la cardiolipina.

45 Es deseable usar un vehículo insoluble que incluya un polímero de un monómero polimerizable que tiene un grupo fenilo y/o un monómero polimerizable aniónico.

50 El monómero polimerizable que tiene el grupo fenilo no está particularmente limitado y entre los ejemplos del mismo se incluyen estireno, divinilbenceno, etilestireno, α -metilestireno, p-cloroestireno, clorometilestireno, y similares. Cada uno de estos puede usarse solo, o dos o más clases de estos pueden usarse en combinación.

55 El monómero polimerizable aniónico no está particularmente limitado, y entre los ejemplos del mismo se pueden incluir sulfonato de estireno, ácido (met)acrílico, sulfonato de divinilbenceno, sulfonato etilestireno, α -metilsulfonato, y similares. Las sales en este caso no están particularmente limitadas, y entre ejemplos de los mismos se incluyen una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de litio, una sal de amonio, y similares. Cada uno de estos puede usarse solo, o dos o más clases de estos pueden usarse en combinación. De estos, son deseables sulfonato de estireno y/o ácido (met)acrílico. Mediante la inclusión de sulfonato de estireno y/o ácido (met)acrílico, un mismo vehículo insoluble obtenido tiene un buen nivel de emulsionabilidad.

60 El vehículo insoluble obtenido mediante la inclusión del monómero polimerizable aniónico tiene una carga superficial, y, por lo tanto, el vehículo insoluble se dispersa bien en una solución, incluso sin un emulsionante. En el presente documento, en el caso de que un emulsionante se incluya en la suspensión del vehículo insoluble y un antígeno lipídico está soportado sobre el mismo para preparar un reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos, el emulsionante puede evitar una aglutinación de esferas de polímero causada por una reacción antígeno-anticuerpo específica. En algunos casos, el emulsionante puede estar implicado en una reacción inespecífica. Por lo tanto, es
65

deseable no incluir un emulsionante en la suspensión del vehículo insoluble.

En el caso de que se utilice un vehículo insoluble que incluya el polímero del monómero polimerizable que tiene el grupo fenilo y el monómero polimerizable aniónico, los contenidos de los componentes del copolímero de los respectivos monómeros polimerizables no están particularmente limitados, sin embargo, un componente de copolímero del monómero polimerizable aniónico es, deseablemente, 50 partes en peso o menos con respecto a 100 partes en peso de un componente de copolímero del monómero polimerizable que tiene el grupo fenilo. En el caso de que el componente de copolímero del monómero polimerizable aniónico sea más de 50 partes en peso, un vehículo insoluble obtenido puede ser menos dispersivo. El componente de copolímero más deseable del monómero polimerizable aniónico es de 30 partes en peso o menos.

El vehículo insoluble tiene una carga superficial y la carga superficial incluye una carga superficial generada por el monómero polimerizable aniónico, que es el componente de copolímero descrita anteriormente, y una carga superficial generada por un anión de una pieza de un iniciador de la polimerización utilizado en la polimerización. Un ejemplo de la carga superficial generada por un anión de una pieza de un iniciador de la polimerización se puede describir de la siguiente manera: en el caso de que se use un persulfato tal como persulfato de potasio, un radical sulfato ($-\text{OSO}_3^-$), una pieza, está presente sobre una superficie de una partícula de copolímero, y el radical sulfato se hidroliza gradualmente para cambiar, como se muestra por la fórmula siguiente.



El vehículo insoluble tiene, deseablemente, una densidad de carga superficial de 0,01 a 0,4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ en términos de una concentración de disociación de aniones en un estado de suspensión. Aquí, un medio de la suspensión es un medio utilizado en una prueba de inmunoensayo y entre los ejemplos del mismo se incluyen agua, solución salina, suero, y similares.

En el caso de que la densidad de carga superficial es inferior a 0,01 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, la repulsión entre las partículas es débil, de modo que la emulsionabilidad del vehículo insoluble se puede deteriorar. Por el contrario, en el caso de que la densidad de la carga superficial sea de más de 0,4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, la repulsión eléctrica entre los vehículos insolubles se hace más fuerte, por lo que no se produce autoaglutinación y los vehículos insolubles son estables, sin embargo, también se evita la aglutinación causada por la reacción antígeno-anticuerpo y es posible que no se pueda realizar una medición altamente sensible.

Además, el vehículo insoluble es, deseablemente, una esfera que tiene un diámetro de partícula de 0,1 a 0,7 μm . En el caso de que el diámetro de partícula sea inferior a 0,1 μm , un cambio óptico causado por la aglutinación es pequeño, de modo que no se puede obtener una alta sensibilidad requerida para una medición. Por el contrario, en el caso de que el diámetro de partícula sea de más de 0,7 μm , una cantidad de cambio óptico causado por la aglutinación de partículas excede de un intervalo mensurable, de manera que un intervalo de medición para el ensayo puede llegar a ser más pequeño. El límite inferior más deseable es 0,2 μm y el límite superior es más deseable 0,5 μm .

Un método para la polimerización de los monómeros polimerizables no está particularmente limitado y ejemplos de los mismos incluyen un método para realizar, mediante el uso de un iniciador de polimerización, polimerización en emulsión, polimerización en suspensión, polimerización por siembra, la polimerización en dispersión, o similares.

El iniciador de polimerización no está particularmente limitado y los ejemplos del mismo incluyen persulfato, tal como persulfato de potasio y similares.

Un procedimiento para soportar el antígeno de fosfolípidos en el vehículo insoluble no está particularmente limitado, y ejemplos de los mismos se incluyen un método de soporte mediante unión física y/o enlace químico a través de un método conocido convencionalmente.

El reactivo para analizar anticuerpos anti-fosfolípidos se puede utilizar como un reactivo de látex del tipo de un componente mediante la dispersión y disolución del vehículo insoluble que soporta el antígeno de fosfolípido y el copolímero en el mismo medio, o, como alternativa, también puede usarse como un reactivo del tipo de dos componentes que incluye un primer reactivo que contiene el vehículo insoluble que soporta el antígeno de fosfolípido sobre el mismo y un segundo reactivo que incluye un tampón preparado mediante la adición del copolímero a un medio.

El medio no está particularmente limitado, y ejemplos de los mismos incluyen un tampón de fosfato, un tampón de glicina, un tampón de Tris-HCL, un tampón de Good y similares.

Además, un pH del medio no está particularmente limitado, sin embargo, el límite inferior deseable es 5,5 y el límite superior deseable es 8,5, y, además, el límite inferior más deseable es 6,5.

En el reactivo de látex del tipo de un componente, se pueden disolver además según sea adecuado seroalbúmina de bovina, sacarosa, cloruro de sodio, EDTA 2Na, tensioactivo y similares.

Además, también en el caso de que el reactivo se utilice como el reactivo del tipo de dos componentes que incluye el reactivo de látex y el reactivo de solución, seroalbúmina bovina, sacarosa, cloruro de sodio, EDTA 2Na, tensioactivo y similares pueden disolverse en los respectivos reactivos según sea adecuado.

Por otra parte, una concentración de la seroalbúmina bovina no está particularmente limitada, sin embargo, el límite inferior deseable es 0,1 % y el límite superior deseable es 15 %, y, además, el límite inferior más deseable es 1,0 % y el límite superior más deseable es 10,0 %.

Al utilizar el reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos, un grado de la aglutinación causada por la reacción antígeno-anticuerpo con el anticuerpo anti-fosfolípido en una muestra se va a medir ópticamente. Por lo tanto, el anticuerpo anti-fosfolípido en la muestra puede analizarse.

Como método para medir el grado de la aglutinación ópticamente, se utiliza un método conocido convencionalmente. Por ejemplo, el aumento y disminución de la intensidad de dispersión de luz, la absorbancia y la intensidad de la transmisión se pueden medir mediante el cambio del tamaño de las partículas del vehículo insoluble para su uso, la concentración del vehículo insoluble o el parámetro del tiempo de reacción. Además, es posible utilizar estos métodos en combinación. Aquí, una longitud de onda de la luz en la realización de la medición es, de manera deseable, de 300 a 900 nm.

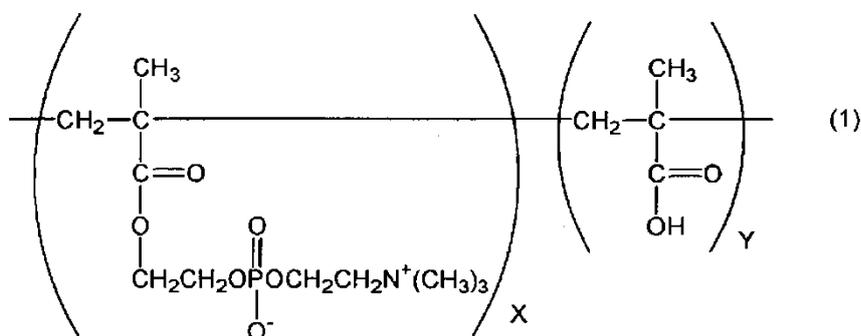
Como un aparato utilizado para la medición óptica, se pueden usar un dispositivo óptico capaz de detectar la intensidad de dispersión de luz, la intensidad de la transmisión, la absorbancia y similares, y se puede utilizar cualquiera de los analizadores automáticos bioquímicos usados generalmente.

Al tener el reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-Treponema pallidum que contiene un copolímero que tiene un segmento derivado de 2-metacrililoiloxietilfosforilcolina y que tiene un segmento derivada de un monómero hidrófilo como sensibilizador, se hace posible evitar la interferencia del suero en el ensayo del anticuerpo anti-Treponema pallidum en suero, por lo que el anticuerpo anti-Treponema pallidum puede analizarse con precisión. Por lo tanto, los inventores de la presente invención han completado el análisis de los anticuerpos anti-Treponema pallidum de la presente invención.

El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-Treponema pallidum contiene un vehículo insoluble de soporte de un antígeno frente a la sífilis sobre el mismo, y un copolímero que tiene un segmento derivado de 2-metacrililoiloxietilfosforilcolina y que tiene un segmento derivado de un monómero hidrófilo (en adelante, también denominado simplemente copolímero).

La siguiente fórmula general (1) indica una estructura del copolímero en el caso de que el ácido metacrílico se utilice como el monómero hidrófilo.

[Quim. 2]



En el reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-Treponema pallidum, el copolímero contenido en el mismo impide la interferencia del suero, incluso en el caso de que un suero se utilice como una muestra. Por lo tanto, se puede obtener un resultado preciso del ensayo.

En el presente documento, como método para analizar la interferencia de suero, por ejemplo, se puede usar una prueba de recuperación de sustancias adicionadas. La prueba de recuperación de adiciones es la siguiente: un material de referencia que contiene un antígeno o un anticuerpo, que es un material que se va a medir, en una concentración alta, se añade a una solución salina (un modelo del suero sin un componente variable contenido en el mismo) de modo que la concentración del mismo se convierte en aproximadamente 0,1 a 5 %; una diferencia entre

- los valores medidos antes y después de la adición del material de referencia se calcula; se añade el material de referencia del suero que contiene un antígeno o un anticuerpo, que es un material que se va a medir, y se calcula una diferencia entre los valores medidos antes y después de la adición del material de referencia de la misma manera; definir que la diferencia de los valores medidos en el caso de añadir el material de referencia para la solución salina es 100 %, una relación de la diferencia de los valores medidos en el caso de añadir el material de referencia al suero se calcula como una relación de recuperación; por lo tanto, se analiza la aparición de la interferencia de suero.
- La 2-metacrililoixietilfosforilcolina es, ya que se incluye un grupo metacrililo, capaz de copolimerizar con otro monómero polimerizable. Entre los ejemplos de un monómero hidrófilo copolimerizable se incluyen un monómero de ácido (met)acrílico, tal como metacrilato de 2-hidroxietilo, (met)acrilato, (met)acrilamida, y similares.
- El monómero hidrófilo no está particularmente limitado y entre los ejemplos del mismo se incluyen ácido (met)acrílico, (met)acrilamida, y similares. De estos, el ácido (met)acrílico, que es catiónico, es adecuado, porque se espera que el ácido(met)acrílico repela electrostáticamente la proteína y similares, en los componentes de la sangre.
- En el presente documento, ácido (met)acrílico indica ácido acrílico o ácido metacrílico.
- Una relación entre el segmento derivado de 2-metacrililoixietilfosforilcolina y un segmento derivado de un monómero hidrófilo en el copolímero no está particularmente limitada y puede seleccionarse adecuadamente según sea necesario. Sin embargo, es deseable que sea 5: 5 a 3:7 en una relación molar. En el caso de que la relación del segmento derivado de 2-metacrililoixietilfosforilcolina y el segmento derivado de un monómero hidrófilo es menor que este intervalo, la aparición de interferencia de suero durante el ensayo del anticuerpo anti-Treponema pallidum no se puede prevenir de manera eficiente.
- Un peso molecular promedio en peso del copolímero no está particularmente limitado, sin embargo, el límite inferior deseable es 50000 y el límite superior deseable es 5.000.000. En el caso de que el peso molecular promedio en peso sea inferior a 50000, se puede perder un efecto de la aceleración de la aglutinación. Por el contrario, en el caso de que el peso molecular promedio en peso sea más de 5.000.000, la reproducibilidad y similares se pueden deteriorar, ya que la viscosidad del reactivo se hace demasiado alta en el caso de añadir el copolímero al reactivo.
- Con respecto a un contenido de copolímero en el reactivo para el ensayo de los anticuerpos anti-Treponema pallidum, el límite inferior deseable es 0,11 % (p / v) y el límite superior deseable es 1,2 % (p / v). Cuando el contenido es inferior a 0,11 % (p/v), la aparición de interferencia de suero no se puede prevenir de manera eficiente. Además, cuando el contenido es de más de 1,2 % (p/v), la reproducibilidad puede deteriorarse puesto que la viscosidad del reactivo se hace demasiado alta.
- El límite inferior más deseable es 0,2 % (p/v) y el límite superior es más deseable 0,8 % (p/v).
- El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-Treponema pallidum contiene un vehículo insoluble que soporta el antígeno de Treponema pallidum antígeno sobre el mismo, además de copolímero.
- Como el antígeno de Treponema pallidum, por ejemplo, un antígeno derivado de una célula bacteriana de un Treponema pallidum es deseable.
- El vehículo insoluble no está particularmente limitado y entre ejemplos de los mismos se incluyen un vehículo insoluble que comprende poliestireno, polímero de estireno-estirenosulfonato, copolímero de acrilonitrilo-butadieno-estireno, copolímero de cloruro de vinilo-acrilato, acetato acrilato de polivinilo o similares.
- Con respecto al diámetro de partícula del vehículo insoluble, aunque dependiendo de un método de medición o un aparato de medición que se utilizará, el límite inferior deseable es 0,05 μm y el límite superior deseable es 1.0 μm . En el caso de que el diámetro de partícula sea inferior a 0,05 μm , un cambio óptico causado por la aglutinación puede ser pequeño, de modo que no se puede obtener una alta sensibilidad requerida para la medición. Por el contrario, en el caso de que el diámetro de partícula sea de más de 1,0 μm , el cambio óptico causado por la aglutinación de partículas excede de un intervalo mensurable, de manera que un intervalo de medición para el ensayo puede llegar a ser más pequeño.
- Un procedimiento para soportar el antígeno de Treponema pallidum en el vehículo insoluble no está particularmente limitado, y ejemplos de los mismos se incluyen un método de soporte mediante unión física o enlace químico a través de un método conocido convencionalmente. El antígeno Treponema pallidum utilizado en el presente documento puede ser células bacterianas trituradas o células bacterianas purificadas. Además, uno o más tipos de un antígeno compuesto artificialmente por ingeniería genética se pueden usar en combinación.
- El reactivo para analizar anticuerpos anti-Treponema pallidum se puede utilizar como un reactivo de látex del tipo de un componente mediante la dispersión y disolución del vehículo insoluble que soporta el antígeno de Treponema

pallidum y el copolímero en el mismo medio, o, como alternativa, también puede usarse como un reactivo del tipo de dos componentes que incluye un primer reactivo que contiene el vehículo insoluble que soporta el antígeno de *Treponema pallidum* sobre el mismo y un segundo reactivo que incluye un tampón preparado mediante la adición del copolímero a un medio.

5 El medio no está particularmente limitado, y ejemplos de los mismos incluyen un tampón de fosfato, un tampón de glicina, un tampón de Tris-HCL, y similares.

10 En el reactivo de látex del tipo de un componente, se pueden disolver según sea adecuado seroalbúmina de bovina, sacarosa, cloruro de sodio, EDTA 2Na, tensioactivo y similares.

15 Además, también en el caso de que el reactivo se utilice como el reactivo del tipo de dos componentes, seroalbúmina bovina, sacarosa, cloruro de sodio, EDTA 2Na, tensioactivo y similares pueden disolverse en los respectivos reactivos según sea adecuado.

Por otra parte, una concentración de la seroalbúmina bovina no está particularmente limitada, sin embargo, el límite inferior deseable es 0,1 % y el límite superior deseable es 15 %, y, además, el límite inferior más deseable es 1,0 % y el límite superior más deseable es 10,0 %.

20 Al utilizar el reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-*Treponema pallidum*, un grado de la aglutinación causada por la reacción antígeno-anticuerpo con el anticuerpo anti-*Treponema pallidum* en una muestra se va a medir ópticamente. Por lo tanto, el anticuerpo anti-*Treponema pallidum* en la muestra puede analizarse.

25 El límite inferior deseable de un pH cuando se lleva a cabo la reacción antígeno-anticuerpo mediante el uso del reactivo para el ensayo de los anticuerpos anti-*Treponema pallidum* es 4,5 y el límite superior deseable es 10,0, y, además, el límite inferior más deseable es 6,0 y el límite superior más deseable es de 8,0.

30 Por otra parte, el límite inferior deseable de una temperatura de reacción es de 0 °C y el límite superior deseable es 50 °C. Se selecciona un tiempo de reacción según sea apropiado.

35 Como método para medir el grado de la aglutinación ópticamente, se utiliza un método conocido convencionalmente. Por ejemplo, el aumento y disminución de la intensidad de dispersión de luz, la absorbancia y la intensidad de la transmisión se pueden medir mediante el cambio del tamaño de las partículas del vehículo insoluble para su uso, la concentración del vehículo insoluble o el parámetro del tiempo de reacción. Además, es posible utilizar estos métodos en combinación. Aquí, una longitud de onda de la luz en la realización de la medición es, de manera deseable, de 300 a 900 nm.

40 Como un aparato utilizado para la medición óptica, se pueden usar un dispositivo óptico capaz de detectar la intensidad de dispersión de luz, la intensidad de la transmisión, la absorbancia y similares, y se puede utilizar cualquiera de los analizadores automáticos bioquímicos usados generalmente.

45 Como método para observar visualmente el grado de la aglutinación, normalmente se pueden usar un método para mezclar una muestra y el reactivo para el ensayo de anticuerpos anti- *Treponema pallidum* en un portaobjetos de prueba y para la determinación de una presencia o ausencia de aglutinación después de vibrar la mezcla líquida, y similares pueden. Aquí, para observar el grado de aglutinación, un método para grabar un estado de aglutinación con una cámara de vídeo y para el procesamiento de la imagen también se puede utilizar, además de la observación visual.

50 De acuerdo con la presente divulgación, es posible proporcionar el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos, que permite un diagnóstico preciso de la infección sifilítica y es excelente en la estabilidad de almacenamiento a largo plazo, y el ensayo de anticuerpos anti-*Treponema pallidum*, que permite el diagnóstico preciso de la infección sifilítica mediante la prevención de la aparición de interferencia de suero.

(Ejemplo 1)

55 (1) Preparación de un reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos

De acuerdo con los procedimientos siguientes, se preparó un reactivo del tipo de dos componentes que incluye un primer reactivo y un segundo reactivo.

60 (1-1) Preparación del primer reactivo

65 Se añadió una cantidad de 1,2 % en peso de LipidureD02 (fabricado por NOF Corp., peso molecular de 550.000) neutralizada con NaOH a un tampón fosfato que contenía 1 % de seroalbúmina bovina ("Lote A", hecha por Serologicals Corporation), para preparar el primer reactivo.

(1-2) Preparación del segundo reactivo

5 Como segundo reactivo Se utilizó un líquido de látex de Mediace RPR (fabricado por Sekisui Chemical Co., Ltd.) como tal. El líquido de látex se preparó mediante la sensibilización de un antígeno de lípidos incluyendo cardiolipina, fosfatidilcolina y colesterol a un látex de poliestireno con un diámetro promedio de partícula de 0,400 μm y que tenía un grupo sulfona de 0,38 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$.

(Ejemplo 2)

10 El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que, en la preparación del primer reactivo (1-1), se añadió 0,70 % en peso de LipidureD03 (fabricado por NOF Corp., peso molecular de 1.000.000) neutralizado con NaOH a un tampón de fosfato que contenía 1 % de seroalbúmina bovina ("Lote A", hecho por Serologicals Corporation) a fin de preparar el primer reactivo.

15 (Ejemplo 3)

20 El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que, en la preparación del primer reactivo (1-1), se añadió 0,45 % en peso de LipidureD05 (fabricado por NOF Corp., peso molecular de 1.000.000) neutralizado con NaOH a un tampón de fosfato que contenía 1 % de seroalbúmina bovina ("Lote A", hecho por Serologicals Corporation) a fin de preparar el primer reactivo.

[Ejemplo comparativo 1]

25 El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que, en la preparación del primer reactivo (1-1), se añadió 1,2 % en peso de pululano (fabricado por Hayashibara Co., Ltd.) en lugar de LipidureD02, a un tampón de fosfato que contenía 1 % de seroalbúmina bovina ("Lote A", hecho por Serologicals Corporation) y se disolvió en el mismo.

30 [Ejemplo comparativo 2]

35 El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que, en la preparación del primer reactivo (1-1), se añadió 1,0 % en peso de polivinilpirrolidona (fabricado por Hayashibara Co., Ltd.) en lugar de LipidureD02, a un tampón de fosfato que contenía 1 % de seroalbúmina bovina ("Lote A", fabricado por Serologicals Corporation) y se disolvió en el mismo.

[Ejemplo comparativo 3]

40 El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que, en la preparación del primer reactivo (1-1), se añadió 2,0 % en peso de dextrano (peso molecular de 500.000 fabricado por Sigma Co.), en lugar de LipidureD02, a un tampón de fosfato que contenía 1 % de seroalbúmina bovina ("Lote A", fabricado por Serologicals Corporation) y se disolvió en el mismo.

Evaluación (1)

45 Con respecto a cada uno de los reactivos para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos obtenidos en los Ejemplos 1 a 3 y los Ejemplos Comparativos 1 a 3, se llevaron a cabo las siguientes evaluaciones.

(1) Medición de la cantidad de cambio de la absorbancia inmediatamente después de la preparación

50 Usando cada uno de los sueros de referencia de RPRP (fabricados por Sekisui Chemical Co., Ltd.) que tienen cinco concentraciones diferentes de 0,0, 1,0, 2,0, 4,0 y 8,0 U.R., como solución de referencia del anticuerpo anti-fosfolípidos, se llevó a cabo la medición siguiente.

55 Una cantidad de 20 μl de suero de referencia RPR se obtuvo como muestra como la solución de referencia del anticuerpo anti-fosfolípidos y, a continuación, 180 μl del primer reactivo se mezclaron y se mantuvieron a 37 °C durante un período de tiempo adecuado. A continuación, se añadieron 60 μl del segundo reactivo y se agitaron. continuación, se midió la cantidad del cambio de la absorbancia en un periodo de entre aproximadamente 80 segundos y 300 segundos a una longitud de onda de 700 nm para obtener la cantidad del cambio de absorbancia (Δabs). Para la medición de la absorbancia, se utilizó un autoanalizador Hitachi 7170. Aquí, U.R. es una unidad que indica un título de anticuerpo del anticuerpo anti-fosfolípidos derivado de la infección sifilítica en el caso de que el suero se mida mediante el uso de Mediace RPR (fabricado por Sekisui Chemical Co., Ltd.), que es un reactivo para analizar los anticuerpos anti -fosfolípidos.

60 Los resultados se muestran en la tabla 1.

[Tabla 1]

Sensibilizante	Ejemplo 1		Ejemplo 2		Ejemplo 3		[Ejemplo comparativo 1]		[Ejemplo comparativo 2]		[Ejemplo comparativo 3]	
	LipidureD02	LipidureD03	LipidureD02	LipidureD03	LipidureD05	LipidureD05	Pululano	PVP	Dextrano			
Cantidad de cambio de absorbancia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,0 U.R.	420	537	367	569	389	527	569	389	527	389	527	527
1,0 U.R.	995	1088	872	994	867	1045	994	867	1045	867	1045	1045
4,0 U.R.	2264	2582	2152	2315	2359	2084	2315	2359	2084	2359	2084	2084
8,0 U.R.	4056	4239	3770	4012	4307	3293	4012	4307	3293	4307	3293	3293

Unidad: Δ abs

(2) Evaluación de la estabilidad de almacenamiento

Después del almacenamiento del primer reactivo a una temperatura de 30 ° C, la medición de la solución de referencia del anticuerpo anti-fosfolípido se llevó a cabo como se describe en la medición (1) para obtener una relación de reducción de Δ abs cuando la Δ abs se definió inmediatamente después la preparación como 100 %; Por lo tanto, se evaluó la estabilidad de almacenamiento. En general, los reactivos para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos se almacenan a una temperatura de 2 a 10 °C, sin embargo, el almacenamiento de los mismos a una temperatura de 30 °C permite la evaluación de la estabilidad de almacenamiento como un ensayo acelerado.

En el presente documento, la medición se llevó a cabo después de un intervalo de 5 días, 15 días, 18 días y 25 días a partir de la preparación.

Los resultados obtenidos mediante el uso de cada una de las soluciones de referencia del anticuerpo anti-fosfolípidos de 1,0, 2,0, 4,0 y 8,0 U.R. se muestran, respectivamente, en la Figura 1 a la figura 4.

El uso de cualquiera de las soluciones de referencia del anticuerpo anti-fosfolípido con una concentración de 1,0 U.R. o 2,0 U.R., como se muestra en la Figura 1 y la figura 2 causó reducciones del 15 al 30 % en las cantidades de cambio de absorbancia después de un intervalo de 25 días en los casos en que se utilizaron pululano, PVP y dextrano. Por el contrario, en los casos donde se utilizaron LipidureD02, LipidureD03 y LipidureD05, se encontró que las cantidades de cambio de absorbancia eran del 5 % o menos.

(Ejemplo 4)

El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que, en la preparación del primer reactivo (1-1), se añadió 0,66 % en peso de LipidureD03 (fabricado por NOF Corp.) neutralizado con NaOH, a un tampón de fosfato que contenía 1 % de seroalbúmina bovina (Lote B).

(Ejemplo 5)

El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que, en la preparación del primer reactivo (1-1), se añadió 0,66 % en peso de LipidureD03 (fabricado por NOF Corp.) neutralizado con NaOH, a un tampón de fosfato que contenía 1 % de seroalbúmina bovina (Lote C).

(Ejemplo 6)

El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que, en la preparación del primer reactivo (1-1), se añadió 0,66 % en peso de LipidureD03 (fabricado por NOF Corp.) neutralizado con NaOH, a un tampón de fosfato que contenía 1 % de seroalbúmina bovina (Lote D).

[Ejemplo comparativo 4]

El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que, en la preparación del primer reactivo (1-1), se añadió 1,1 % en peso de pululano (fabricado por Hayashibara Co., Ltd.) en lugar de LipidureD02, a un tampón de fosfato que contenía 1 % de seroalbúmina bovina (Lote B) y se disolvió en el mismo.

[Ejemplo comparativo 5]

El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que, en la preparación del primer reactivo (1-1), se añadió 1,1 % en peso de pululano (fabricado por Hayashibara Co., Ltd.) en lugar de LipidureD02, a un tampón de fosfato que contenía 1 % de seroalbúmina bovina (Lote C) y se disolvió en el mismo.

[Ejemplo comparativo 6]

El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que, en la preparación del primer reactivo (1-1), se añadió 1,1 % en peso de pululano (fabricado por Hayashibara Co., Ltd.) en lugar de LipidureD02, a un tampón de fosfato que contenía 1 % de seroalbúmina bovina (Lote D) y se disolvió en el mismo.

Evaluación (2)

Con respecto a cada uno de los reactivos para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos obtenidos en los Ejemplos 4 a 6 y los Ejemplos Comparativos 4 a 6, se llevaron a cabo las siguientes evaluaciones.

ES 2 615 524 T3

(1) Medición de la cantidad de cambio de la absorbancia inmediatamente después de la preparación

5 Usando cada uno de los sueros de referencia de RPRP (fabricados por Sekisui Chemical Co., Ltd.) que tienen cinco concentraciones diferentes de 0,0, 1,0, 2,0, 4,0 y 8,0 U.R., como solución de referencia del anticuerpo anti-fosfolípidos, se llevó a cabo la medición siguiente.

10 Una cantidad de 20 μ l de suero de referencia RPR se obtuvo como muestra como la solución de referencia del anticuerpo anti-fosfolípido y, a continuación, 180 μ l del primer reactivo se mezclaron y se mantuvieron a 37 °C durante un período de tiempo adecuado. A continuación, se añadieron 60 μ l del segundo reactivo y se agitaron. continuación, se midió la cantidad del cambio de la absorbancia en un periodo de entre aproximadamente 80 segundos y 300 segundos a una longitud de onda de 700 nm para obtener la cantidad del cambio de absorbancia (Δ abs). Para la medición de la absorbancia, se utilizó un autoanalizador Hitachi 7170. Los resultados se muestran en la tabla 2.

[Tabla 2]

	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo 6	[Ejemplo comparativo 4]	[Ejemplo comparativo 5]	[Ejemplo comparativo 6]
Lote de BSA	B	C	D	B	C	D
Sensibilizante	LipidureD03	LipidureD03	LipidureD03	Pululano	Pululano	Pululano
Cantidad de cambio de absorbancia	0	0	0	0	0	0
0,0 U.R.	281	353	417	207	295	329
1,0 U.R.	759	931	1043	559	723	793
2,0 U.R.	2187	2432	2589	1611	1926	2058
4,0 U.R.	4042	4276	4392	3445	3797	3897
8,0 U.R.						

Unidad: Δ abs

(2) Evaluación de la estabilidad de almacenamiento

Después del almacenamiento del primer reactivo a una temperatura de 30 ° C, la medición de la solución de referencia del anticuerpo anti-fosfolípido se llevó a cabo como se describe en la medición (1) para obtener una relación de reducción de Δ abs cuando la Δ abs se definió inmediatamente después la preparación como 100 %; Por lo tanto, se evaluó la estabilidad de almacenamiento. En general, el reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-fosfolípidos se almacenan a una temperatura de 2 a 10 °C, sin embargo, el almacenamiento de los mismos a una temperatura de 30 °C permite la evaluación de la estabilidad de almacenamiento como un ensayo acelerado.

En el presente documento, la medición se llevó a cabo después de un intervalo de 7 días y 14 días, a partir de la preparación.

Los resultados obtenidos mediante el uso de cada una de las soluciones de referencia del anticuerpo anti-fosfolípidos de 1,0 y 2,0, U.R. se muestran, respectivamente, en las Figuras 5 y 6.

Como se muestra en las Figuras 5 y 6 en el caso de utilizar el lote D de PSA y pululano en combinación, se observó una gran pérdida de sensibilidad después del almacenamiento a una temperatura de 30 °C durante 14 días. Sin embargo, en el caso de utilizar el lote D de BSA y LipidureD03 en combinación, solo se observó una pequeña pérdida de sensibilidad. En consecuencia, el resultado muestra que era menos probable que la BSA afectara a la estabilidad de almacenamiento.

(Ejemplo 7)

(1) Preparación de un reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-Treponema pallidum

De acuerdo con los procedimientos siguientes, se preparó un reactivo del tipo de dos componentes formado por un primer reactivo que incluye una solución de látex con antígeno de de Treponema pallidum y un segundo reactivo que incluye un diluyente de la muestra.

(1-1) Preparación de solución de látex con antígeno de Treponema pallidum

Una cantidad de 400 μ l de solución de antígeno de Treponema pallidum disuelto en un tampón de fosfato 100 mM (pH 7,4) para tener una concentración de proteína de 150 μ g/ml se añadió a 100 μ l de líquido de látex de poliestileno (10 % (p / v) de contenido de sólidos, fabricado por Sekisui Chemical Co., Ltd.) que tiene un diámetro promedio de partícula de 0,400 μ m, y se agitó a una temperatura de 4 °C durante 1 hora. Posteriormente, se añadieron 2 ml de un tampón de fosfato 100 mM (pH 7,4) que contenía 1 (p/v) de seroalbúmina bovina (fabricada por Serologicals Corporation; BSA, Lote 1) y se agitó durante 1,5 horas.

El líquido resultante se centrifugó a 18.000 rpm a una temperatura de 10 °C durante 30 minutos y se añadió el precipitado obtenido a 4 ml de un tampón de fosfato 100 mM (pH 7,4) que contenía 0,25 % (p / v) de BSA (Lote 1) para suspender el látex, por lo que se preparó una solución de látex con antígeno de Treponema pallidum.

(1-2) Preparación del diluyente de la muestra

Una cantidad de 0,2 % (p / v) de Lipidure (copolímero de 2-metacrilóiloxietilfosforilcolina y ácido metacrílico, de peso molecular de 1.000.000, fabricado por NOF Corp.) se añadió a un tampón de fosfato 100 mM (pH 7,4) que contenía 1 % (p / v) de BSA (Lote 1).

(Ejemplo 8)

El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-Treponema pallidum se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que se añadieron 5 ml de un tampón de fosfato 100 mM (pH 7,4) que contenía 0,25 % (p/v) de BSA (Lote 2) al precipitado obtenido en la preparación de una solución de látex con antígeno de Treponema pallidum de (1-1) del Ejemplo 7, y se añadió 0,6 % (p/v) de Lipidure al tampón de fosfato 100 mM (pH 7,4) en la preparación de un diluyente de la muestra (1-2).

(Ejemplo 9)

El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-Treponema pallidum se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que se añadieron 12 ml de un tampón de fosfato 100 mM (pH 7,4) que contenía 0,25 % (p/v) de BSA (Lote 2) al precipitado obtenido en la preparación de una solución de látex con antígeno de Treponema pallidum de (1-1) del Ejemplo 7, y se añadió 1,0 % (p/v) de Lipidure al tampón de fosfato 100 mM en la preparación de un diluyente de la muestra (1-2).

[Ejemplo comparativo 7]

El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-Treponema pallidum se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que se añadió 1 % (p / v) de pGEMA (homopolímero de metacrilato de glicosilo de etilo, de peso molecular promedio de 1.140.000, fabricado por Nippon Fine Chemical Co., Ltd.), en lugar de Lipidure a la solución tampón de fosfato 100 mM (pH 7,4) que contenía 1 % de BSA (lote 1) en la preparación de un diluyente de la muestra (1-2) en el Ejemplo 7.

Evaluación (3)

(1) Medición de la solución de referencia de anticuerpos anti-Treponema pallidum

Usando cada uno de los sueros de referencia positivos para sífilis (fabricados por Sekisui Chemical Co., Ltd.) que tienen cinco concentraciones diferentes como solución de referencia del anticuerpo anti-fosfolípidos, se llevó a cabo la medición siguiente.

Se obtuvieron muestras de una cantidad de 16 µl de suero de referencia positivo para sífilis como solución de referencia como del anticuerpo anti-Treponema pallidum. Una cantidad de 175 µl de diluyente de la muestra se mezcló y se mantuvo a una temperatura de 37 °C durante un período de tiempo adecuado y, después, se añadieron 25 µl de la solución de látex con antígeno de Treponema pallidum y se agitó. A continuación, se midió la cantidad del cambio de la absorbancia en un periodo de entre aproximadamente 80 segundos y 300 segundos a una longitud de onda de 700 nm para obtener la cantidad del cambio de absorbancia (Δabs). Para la medición de la absorbancia, se utilizó un autoanalizador Hitachi 7170. Los resultados se mostraron en la Tabla 3. En el presente documento, T.U. en la Tabla 3 es una unidad que indica un título de anticuerpos del -anticuerpo anti-Treponema pallidum en el caso donde el suero se mide mediante el uso de Mediace TPLA (fabricado por Sekisui Chemical Co., Ltd.), que es el reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-Treponema pallidum. El valor de 10 T.U. o más se considera positivo.

[Tabla 3]

	Ejemplo 7	Ejemplo 8	Ejemplo 9	[Ejemplo comparativo 7]	
Cantidad de cambio de absorbancia (Δ abs)	0.T.U.	-48	-5	46	11
	18 T.U.	1	166	296	212
	37 T.U.	79	423	553	552
	119 T.U.	384	1611	931	1884
	234 T.U.	817	2736	985	2874

(2) Prueba de recuperación de sustancias adicionadas

Una cantidad de 5µ l de la solución de referencia de los anticuerpos anti-Treponema pallidum de 2000 T.U. se añadió a 245 µl de solución salina. A continuación, se obtuvo una diferencia de los títulos de anticuerpos medidos antes y después de la adición midiendo las cantidades de los cambios de absorbancia antes y después de la adición de la misma manera que en la evaluación (1). De la misma manera, se añadieron 5 µl de la solución de referencia de anticuerpo anti-Treponema pallidum de 2000 T.U. a, respectivamente, 245 µl de las soluciones de referencia en cinco variaciones y se obtuvo la diferencia de los títulos de anticuerpos medidos antes y después. A continuación, se calculó la relación de recuperación, definiendo dicha diferencia de los títulos de anticuerpos medidos antes y después de la adición en el caso de añadir la solución de referencia del anticuerpo anti-Treponema pallidum a la solución salina como 100 %. Los resultados se muestran en la tabla 4.

[Tabla 4]

	Ejemplo 7	Ejemplo 8	Ejemplo 9	[Ejemplo comparativo 7]	
Relación de recuperación (%)	Solución salina	100	100	100	100
	Suero 1	107	90	102	80
	Suero 2	80	92	92	78
	Suero 3	93	98	107	83
	Suero 4	88	97	72	69
	Suero 5	107	98	84	81

Como se muestra en la Tabla 4, la relación de recuperación mejoró significativamente en cada uno de los ejemplos 7 a 9, donde se utilizó Lipidure como acelerador de la reacción, en comparación con el ejemplo comparativo 7, donde se utilizó pGEMA como el acelerador de la reacción.

(Ejemplo 10)

Un diluyente de muestra se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que se usó BSA (Lote 2) en la preparación del diluyente de la muestra (1-2) en el Ejemplo 7.

(Ejemplo 11)

ES 2 615 524 T3

Un diluyente de muestra se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que se usó BSA (Lote 3) en la preparación del diluyente de la muestra (1-2) en el Ejemplo 7.

5 (Ejemplo 12)

Un diluyente de muestra se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que se usó BSA (Lote 4) en la preparación del diluyente de la muestra (1-2) en el Ejemplo 7.

10 [Ejemplo comparativo 8]

Un diluyente de muestra se preparó de la misma manera que en el Ejemplo comparativo 7, excepto que se usó BSA (Lote 2) en la preparación del diluyente de la muestra (1-2) en el Ejemplo comparativo 7.

15 [Ejemplo comparativo 9]

Un diluyente de muestra se preparó de la misma manera que en el Ejemplo comparativo 7, excepto que se usó BSA (Lote 3) en la preparación del diluyente de la muestra (1-2) en el Ejemplo comparativo 7.

20 [Ejemplo comparativo 10]

Un diluyente de muestra se preparó de la misma manera que en el Ejemplo comparativo 7, excepto que se usó BSA (Lote 4) en la preparación del diluyente de la muestra (1-2) en el Ejemplo comparativo 7.

25 [Ejemplo comparativo 11]

El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-Treponema pallidum se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que se añadió 1 % (p / v) de pululano (fabricado por Hayashibara Co., Ltd.), en lugar de Lipidure a la solución tampón de fosfato 100 mM (pH 7,4) que contenía 1 % de BSA (lote 1) en la preparación de un diluyente de la muestra (1-2) en el Ejemplo 7.

30

[Ejemplo comparativo 12]

Un diluyente de muestra se preparó de la misma manera que en el Ejemplo comparativo 11, excepto que se usó BSA (Lote 2) en la preparación del diluyente de la muestra (1-2) en el Ejemplo comparativo 11.

35

[Ejemplo comparativo 13]

Un diluyente de muestra se preparó de la misma manera que en el Ejemplo comparativo 11, excepto que se usó BSA (Lote 3) en la preparación del diluyente de la muestra (1-2) en el Ejemplo comparativo 11.

40

[Ejemplo comparativo 14]

El reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-Treponema pallidum se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que se añadió 0,1 % (p / v) de alginato de sodio (fabricado por Nacalai Tesque, Inc.), en lugar de Lipidure a la solución tampón de fosfato 100 mM (pH 7,4) que contenía 1 % de BSA (lote 2) en lugar de BSA (Lote 1) en la preparación de un diluyente de la muestra (1-2) en el Ejemplo 7.

45

[Ejemplo comparativo 15]

50

Un diluyente de muestra se preparó de la misma manera que en el Ejemplo comparativo 14, excepto que se usó BSA (Lote 3) en la preparación del diluyente de la muestra (1-2) en el Ejemplo comparativo 14.

[Ejemplo comparativo 16]

55

Un diluyente de muestra se preparó de la misma manera que en el Ejemplo comparativo 14, excepto que se usó BSA (Lote 4) en la preparación del diluyente de la muestra (1-2) en el Ejemplo comparativo 14.

Evaluación (4)

60

(1) Prueba de estabilidad durante el almacenamiento

Con respecto al reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-Treponema pallidum obtenidos en cada uno de los Ejemplos 7, 10 a 12, y los Ejemplos Comparativos 7 a 16, se llevó a cabo una prueba de estabilidad en almacenamiento.

65

Inmediatamente después de la preparación del reactivo y después del almacenamiento del diluyente de la muestra a

una temperatura de 30 °C, se midieron las estabildades de almacenamiento mediante la medición de 37 T.U. del suero de referencia positivo para sífilis de la misma manera que el método en el procedimiento (1) de Evaluación (3) a fin de obtener la cantidad del cambio de absorbancia en el caso de que el cambio de absorbancia inmediatamente después de la preparación se definió como 100 %. En general, los reactivos para el ensayo de anticuerpos anti-

5 *Treponema pallidum* se almacenan a una temperatura de 2 a 10 °C, sin embargo, el almacenamiento de los mismos a una temperatura de 30 °C permite la evaluación de la estabilidad de almacenamiento como un ensayo acelerado.

En el presente documento, con respecto a cada uno de los Ejemplos 7 y 10 a 12, las mediciones se llevaron a cabo después de un intervalo de 7 días y 24 días a partir de la preparación. Además, se llevaron a cabo las mediciones:

10 después de un intervalo de 14 días y 31 días desde la preparación, con respecto a cada uno de los Ejemplos Comparativos 7 a 10; después de un intervalo de 11 días y 20 días después de la preparación, con respecto a cada uno de los ejemplos comparativos 11 a 13; y después de un intervalo de 5 días y 14 días a partir de la preparación, en relación con los ejemplos comparativos 14 a 16. Los resultados se muestran en la Figura 7

15 Como se muestra en la Fig. 7, en el caso de que se usó Lipidure como acelerador de la reacción, la estabilidad de almacenamiento fue excelente, independientemente de una variación de lote a lote de BSA. Sin embargo, en el caso de utilizar otro acelerador de la reacción, la variación de lote a lote de BSA produjo un reactivo con una estabilidad de almacenamiento significativamente escasa, en algunos casos. En consecuencia, en el caso de usar Lipidure como acelerador de la reacción, se hace posible proporcionar un reactivo para el ensayo de anticuerpos anti-

20 *Treponema pallidum*, que permita el ensayo de alta precisión y también tienen una excelente estabilidad de almacenamiento.

Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 es un gráfico que ilustra una transición de las cantidades del cambio de absorbancia en los Ejemplos 1 a 3 y en los Ejemplos Comparativos 1 a 3, donde se usan las soluciones de referencia del anticuerpo anti-fosfolípido de 1,0 U.R.

30 La figura 2 es un gráfico que ilustra una transición de las cantidades del cambio de absorbancia en los Ejemplos 1 a 3 y en los Ejemplos Comparativos 1 a 3, donde se usan las soluciones de referencia del anticuerpo anti-fosfolípido de 1,0 U.R.

La figura 3 es un gráfico que ilustra una transición de las cantidades del cambio de absorbancia en los Ejemplos 1 a 3 y en los Ejemplos Comparativos 1 a 3, donde se usan las soluciones de referencia del anticuerpo anti-fosfolípido de 1,0 U.R.

35 La figura 4 es un gráfico que ilustra una transición de las cantidades del cambio de absorbancia en los Ejemplos 1 a 3 y en los Ejemplos Comparativos 1 a 3, donde se usan las soluciones de referencia del anticuerpo anti-fosfolípido de 1,0 U.R.

La figura 5 es un gráfico que ilustra una transición de las cantidades del cambio de absorbancia en los Ejemplos 1 a 6 y en los Ejemplos Comparativos 4 a 6, donde se usan las soluciones de referencia del anticuerpo anti-fosfolípido de 4 U.R.

40 La figura 6 es un gráfico que ilustra una transición de las cantidades del cambio de absorbancia en los Ejemplos 1 a 6 y en los Ejemplos Comparativos 4 a 6, donde se usan la solución de de referencia del anticuerpo anti-fosfolípido de 2 U.R.

45 La figura 7 es un gráfico que ilustra una transición de las cantidades del cambio de absorbancia en los Ejemplos 1 a 10 y en los Ejemplos Comparativos 7 a 16, donde se usan las soluciones de referencia del anticuerpo anti-*Treponema pallidum* de 37 T.U.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para ensayar un anticuerpo anti- *Treponema pallidum* que comprende poner en contacto un reactivo que comprende una partícula que soporta un antígeno de *Treponema pallidum* sobre la misma y un copolímero disuelto en un medio y obtenido por copolimerización de 2-metacrililoixietilfosforilcolina y un monómero hidrófilo con una muestra tomada de un sujeto
- 10 para producir en la muestra una reacción entre un anticuerpo anti- *Treponema pallidum* con el antígeno de *Treponema pallidum* soportado sobre la partícula, y medir en la muestra ópticamente un grado de aglutinación causada por la reacción para analizar el anticuerpo anti-*Treponema pallidum*.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, donde el antígeno de *Treponema pallidum* es un antígeno derivado de una célula bacteriana de un *Treponema pallidum*.
- 20 3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, donde un contenido del copolímero en el reactivo para el ensayo del anticuerpo anti- *Treponema pallidum* es de 0,1 a 1,2 % (p/v).
4. El método de las reivindicaciones 1, 2 o 3, donde la partícula es un polímero de un monómero polimerizable que comprende un grupo fenilo y/o un polímero de un monómero polimerizable aniónico, y tiene una densidad de carga superficial de 0,01 a 0,4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ en términos de una concentración de disociación de aniones en un estado de suspensión y tiene una forma esférica de 0,1 a 0,7 μm de diámetro de partícula.

Fig. 1

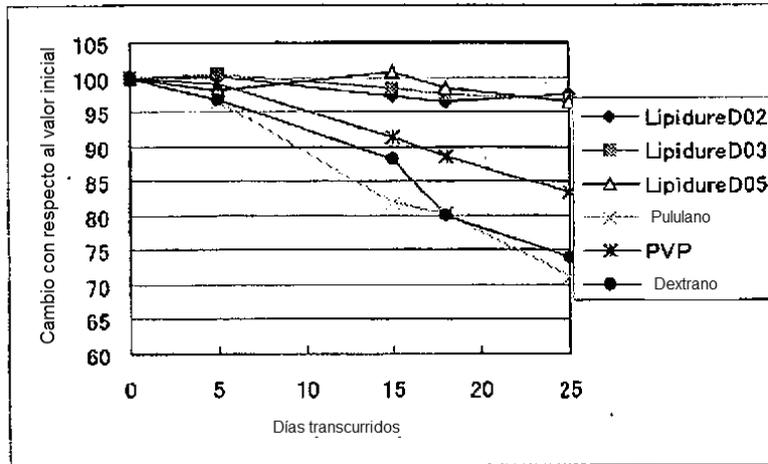


Fig. 2

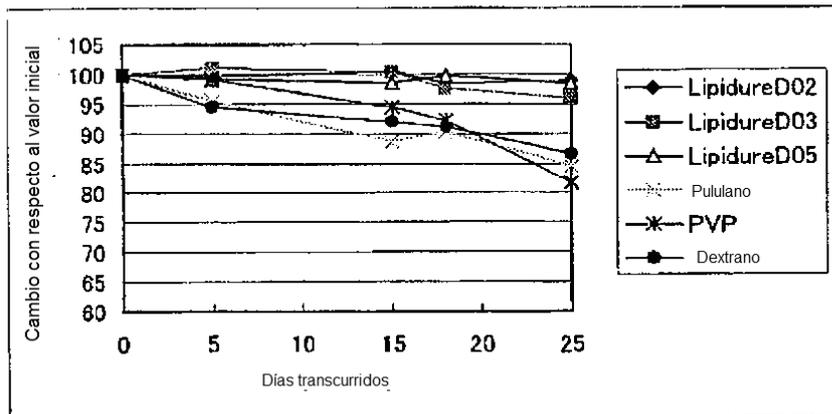


Fig. 3

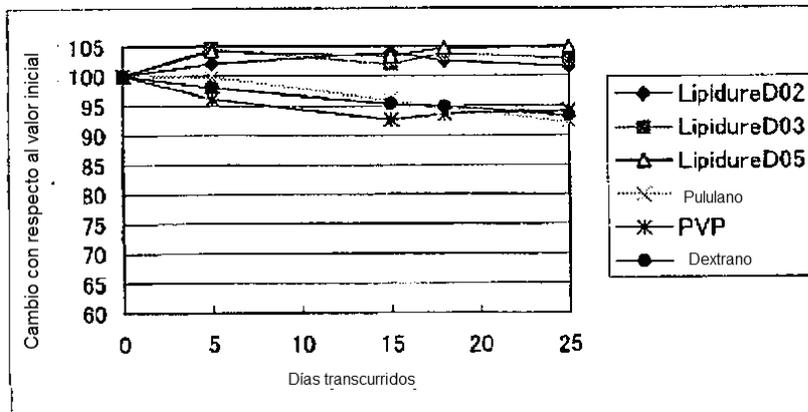


Fig. 4

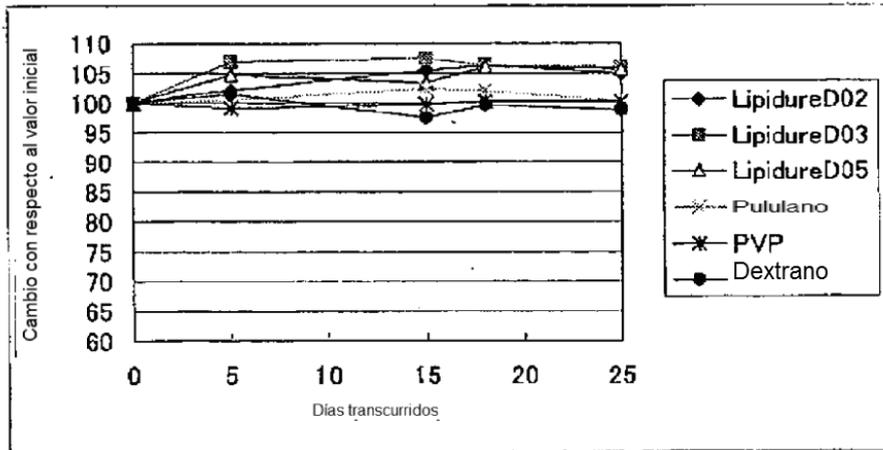


Fig. 5

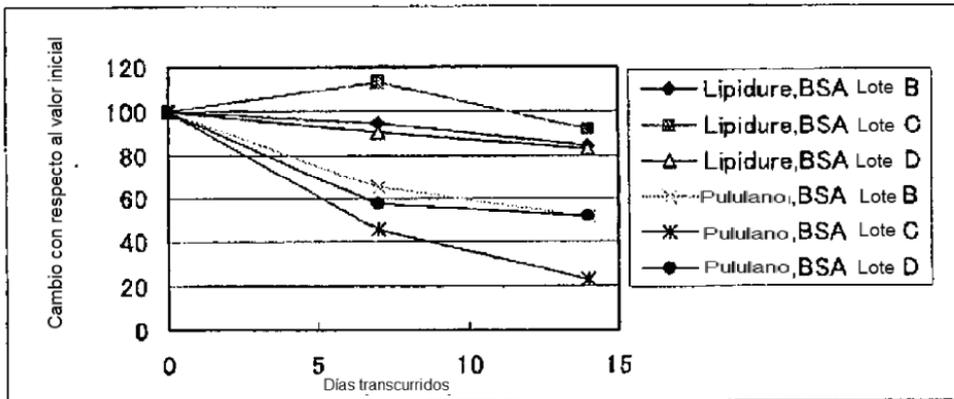


Fig. 6

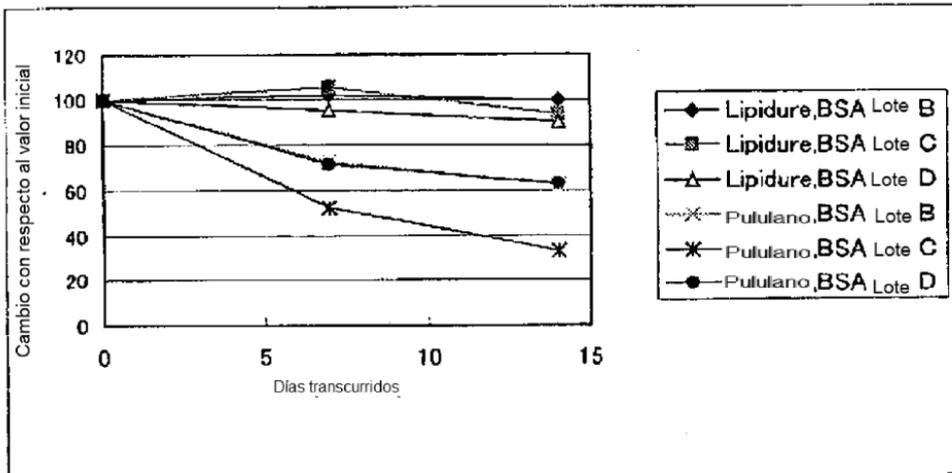


Fig. 7

