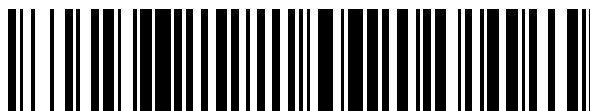


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 802**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/545 (2006.01)

G01N 33/549 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2007 PCT/JP2007/070190**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2008 WO08047799**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2007 E 07829924 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2088429**

54 Título: **Reactivo y procedimiento de análisis inmunológico**

30 Prioridad:

16.10.2006 JP 2006281841

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2019

73 Titular/es:

LSI MEDIENCE CORPORATION (50.0%)
13-4, Uchikanda 1-chome Chiyoda-ku
Tokyo 101-8517, JP y
NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA
UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

SAWAI, TOKIO;
TSUBOTA, HIROYUKI;
TANIGUCHI, TATSUO y
MIZUNO, AKIHIRO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 702 802 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

Reactivo y procedimiento de análisis inmunológico

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un reactivo para análisis inmunológico y a un procedimiento para análisis inmunológico.

El término "análisis" como se usa en este documento incluye una medida para determinar cuantitativa o semicuantitativamente una cantidad de una sustancia a analizar, y una detección para juzgar la presencia o ausencia de una sustancia a analizar.

Técnica antecedente

10 En el campo de las pruebas de diagnóstico clínico, varias sustancias, que pueden ser utilizadas como un índice de diagnóstico de enfermedades, en un gran número de muestras deben medirse con rapidez y precisión, y una retroalimentación rápida y precisa de los resultados debe ser dado a una sala de tratamiento. En particular, la medición inmunológica basada en una reacción antígeno-anticuerpo se usa ampliamente para cuantificar con precisión una cantidad traza de una sustancia a analizar. A este respecto, como procedimiento para mejorar la
15 sensibilidad o precisión de la detección, se lleva a cabo un procedimiento conocido de aglutinación con látex que utiliza partículas hechas de un polímero sintético como el poliestireno (llamado látex), en el que se encuentra un antígeno o anticuerpo específico para una sustancia a analizar, en la superficie de las partículas. El procedimiento de aglutinación de látex es un procedimiento para medir rápidamente una sustancia a analizar, detectando visual u ópticamente un grado de aglutinación de partículas de látex causada por la reacción de la sustancia a analizar con el
20 antígeno o anticuerpo inmovilizado en las partículas de látex.

Además, también se usa ampliamente un procedimiento tipo sándwich, que utiliza partículas magnéticas en lugar de las partículas de látex, atrapa una sustancia para analizarla con un primer anticuerpo inmovilizado sobre las partículas magnéticas, lavando las partículas magnéticas acumuladas por un imán para eliminar las sustancias sin reaccionar y similares (también llamada separación tipo B/F), y agregar un segundo anticuerpo marcado con una
25 sustancia que genera una señal, tal como una enzima o un agente fluorescente para realizar de este modo el análisis.

Casi todas las sustancias a analizar, que se cuantifican utilizando una reacción antígeno-anticuerpo, son generalmente componentes traza contenidos en muestras biológicas, y por lo tanto, la precisión en un intervalo de baja concentración es importante. Sin embargo, debido a que existe un caso en el que se observa un nivel
30 anormalmente alto de una sustancia a medir de acuerdo con el progreso de una enfermedad, se desea un reactivo capaz de medir con precisión desde un intervalo de baja concentración hasta un intervalo de alta concentración en el campo de pruebas de diagnóstico clínico.

En los procedimientos que utilizan partículas de látex que incluyen el procedimiento de aglutinación del látex y el procedimiento tipo sándwich, es esencial inmovilizar un antígeno o anticuerpo en la superficie de las partículas de látex, y se utiliza un procedimiento para inmovilizar física o químicamente el antígeno o el anticuerpo en la superficie. Por ejemplo, en un procedimiento para inmovilizar directamente el antígeno o el anticuerpo en las partículas de látex mediante adsorción física, o en un procedimiento para unir el antígeno o el anticuerpo a las partículas de látex mediante una unión covalente a través de un grupo funcional ubicado en la superficie de las partículas de látex, por
35 ejemplo, se usa un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo mercapto, un grupo hidroxilo, un grupo aldehído, un grupo epoxi, o similares.

Sin embargo, una cantidad del antígeno o anticuerpo capaz de ser transportado en la superficie del látex está limitada en estos procedimientos de unión física o química, y por lo tanto, hay un límite para un intervalo de medición o la sensibilidad de detección cuando se lleva a cabo el procedimiento de aglutinación del látex o se lleva a cabo el procedimiento tipo sándwich. Es decir, las propiedades (por ejemplo, la carga superficial, la proporción de grupos
45 funcionales introducidos, la distribución del tamaño de partícula, etc.) de las partículas de látex en sí mismas no son uniformes entre diferentes lotes o fabricantes, y por lo tanto, incluso si el procedimiento de unión del antígeno o anticuerpo a las partículas de látex es uniforme, las propiedades de las partículas de látex unidas al anticuerpo resultante no son uniformes. Por ejemplo, en los procedimientos de unión física o química de un antígeno o anticuerpo a la superficie del látex, no toda la cantidad del antígeno o anticuerpo se une al látex, y el antígeno o anticuerpo no unido se eliminan mediante lavado después del procedimiento de unión, o el antígeno o anticuerpo unido a menudo se separa del látex por centrifugación o dispersión. Es decir, un cambio en la cantidad de un
50 antígeno o anticuerpo unido afecta un intervalo de medición o una sensibilidad de detección.

Además, como un nuevo problema recientemente planteado, a veces se han observado muestras que causan una reacción no específica, como se muestra en la referencia 1, no de patente. Cuando un antígeno o anticuerpo se
55 une a la superficie de las partículas de látex, el antígeno o anticuerpo está desnaturalizado estructuralmente, y la

reacción no específica es causada por "una sustancia que se une a la porción desnaturalizada" contenida en las muestras. Debido a la reacción no específica, se pierde la confiabilidad de los valores medidos y no se puede hacer un diagnóstico preciso. Este problema no se resolvería mediante exámenes individuales en cuanto a un antígeno o anticuerpo, o partículas de látex, y es muy difícil de resolver.

- 5 [Referencia 1, no de patente] Rinsho Byori (The Japanese Journal of Clinical Pathology), agosto de 2000, vol. 48, nº 8, página 760-763.

El documento JPS 63-200065 (A) describe un procedimiento para medir una reacción antígeno-anticuerpo, que comprende las etapas de mezclar un reactivo de látex con una muestra que contiene un antígeno, un anticuerpo o una mezcla de los mismos, para causar la reacción de aglutinación del látex en esta mezcla líquida, y la medición de la absorbancia de la mezcla, en donde el reactivo de látex se prepara inmovilizando un anticuerpo o un antígeno en un vehículo compuesto por una partícula de polímero de alto peso molecular dispersable en agua que tiene un grupo carboxilo obtenido por copolimerización en emulsión, en un medio acuoso, de una mezcla monomérica específica.

El documento GB-A-1533579 describe una sustancia biológicamente activa inmovilizada que comprende partículas esféricas microporosas que consisten en una red polimérica orgánica tridimensional, en la que las partículas tienen un diámetro menor de 10 μm y un diámetro promedio dentro del intervalo de, 0,5 a 4 μm , la sustancia biológicamente activa queda atrapada en las mallas de la red de tal manera que dicha sustancia biológicamente activa puede ejercer su actividad biológica contra sustancias que no son capaces de penetrar sustancialmente en la red de las partículas.

El documento US-B-4.061.466 describe una composición biológicamente activa que comprende partículas esféricas microporosas en forma de gel, teniendo dichas partículas una red polimérica tridimensional, diámetros menores de 10 μm y un diámetro promedio de 0,5 a 4 μm y una sustancia macromolecular biológicamente activa inmovilizada dentro de las mallas de dicha red polimérica pero que mantiene su actividad biológica.

Divulgación de la invención

Problemas a resolver por la invención

25 Los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos para resolver los problemas anteriores en el procedimiento de aglutinación del látex, y encontraron que la coexistencia de un antígeno o anticuerpo específico de una sustancia a analizar en la síntesis de partículas de látex puede mejorar la reactividad en comparación con los procedimientos convencionales, y que se puede evitar la reacción no específica observada cuando se usan partículas de látex convencionales.

30 Es decir, cuando las partículas de látex se producen por polimerización en miniemulsión que se lleva a cabo en la coexistencia del antígeno o anticuerpo a baja temperatura en la síntesis de las partículas de látex, el antígeno o anticuerpo se introduce en la superficie de las partículas de látex cuando se completa la síntesis, y como resultado, se puede evitar la eliminación del antígeno o del anticuerpo no unido de las partículas de látex mediante el lavado o el pelado del antígeno o anticuerpo unido de las partículas de látex mediante centrifugación o dispersión. Además, se puede obtener una alta reactividad utilizando dichas partículas de látex.

Además, en las partículas de látex producidas por polimerización en miniemulsión que se lleva a cabo en la coexistencia del antígeno o anticuerpo en la síntesis de las partículas de látex, porque el antígeno o anticuerpo se introduce en la superficie de las partículas de látex cuando la síntesis se completa, la desnaturalización debida al impedimento estérico por la unión no se produce, y por lo tanto, se puede evitar una reacción con una muestra en la que se observa una reacción no específica cuando se usan partículas de látex convencionales. La presente invención se basa en estos hallazgos.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un reactivo y un procedimiento para el análisis inmunológico, que tenga una excelente sensibilidad de detección y que sea capaz de evitar la reacción no específica que se producía anteriormente.

45 Medios para resolver los problemas

El problema puede resolverse mediante la presente invención, que se refiere a un reactivo para análisis inmunológico, que comprende una suspensión de partículas de látex que tiene un antígeno o un anticuerpo específico para una sustancia a analizar introducida en la superficie de las partículas de látex, producido por polimerización de un monómero en presencia del antígeno o anticuerpo para sintetizar así las partículas de látex, en donde la polimerización es una polimerización en miniemulsión, y donde parte del antígeno o anticuerpo está incrustado en las partículas de látex.

La presente invención se refiere a un procedimiento para análisis inmunológico, que comprende la etapa de poner, en un líquido, (1) una muestra sospechosa de contener una sustancia para analizar, en contacto con (2) partículas de látex que tienen un antígeno o un anticuerpo específico para la sustancia introducida en la superficie de las partículas de látex, producido mediante la polimerización de un monómero en presencia del antígeno o anticuerpo

para sintetizar así las partículas de látex, en el que la polimerización es una polimerización en miniemulsión y en el que parte del antígeno o el anticuerpo está incrustado en las partículas de látex.

Una realización preferida del procedimiento de la presente invención comprende además la etapa de analizar ópticamente un grado de aglutinación de partículas de látex causada por una reacción antígeno-anticuerpo, después de la etapa de contacto.

Otra realización preferida del procedimiento de la presente invención comprende, además, después de la etapa de contacto, la etapa de separar las partículas de látex del líquido, y analizar ópticamente la sustancia a analizar unida a las partículas de látex, o la sustancia a ser analizada que permanece en el líquido.

En el presente documento también se divulga

[1] un proceso para producir partículas de polímero que tienen un antígeno o un anticuerpo introducido en su superficie, caracterizado por comprender la etapa de llevar a cabo la polimerización en miniemulsión usando un monómero, un iniciador de polimerización por radicales, un emulsionante y un hidrófobo en presencia del antígeno o anticuerpo para producir las partículas de polímero,

[2] el proceso de [1], en el que la reacción de polimerización se lleva a cabo a baja temperatura en la polimerización en miniemulsión,

[3] el proceso de [1] o [2], en el que el iniciador de polimerización por radicales es un iniciador redox,

[4] el proceso de [3], en el que el iniciador redox es una combinación de ácido ascórbico y H_2O_2 ,

[5] el proceso de [1] a [4], en el que el emulsionante es un surfactante,

[6] el proceso de [1] a [5], en el que el emulsionante es un tensioactivo polimérico que tiene una cadena de polietilenglicol,

[7] el proceso de [1] a [6], en el que el hidrófobo es hexadecano o poliestireno, y

[8] una partícula de polímero que tiene un antígeno o un anticuerpo introducido en su superficie, obtenible por el proceso de [1] a [7].

Efectos de la invención

Según la presente invención, se proporciona un reactivo y un procedimiento para el análisis inmunológico, que tiene una excelente sensibilidad de detección y es capaz de evitar la reacción no específica que se producía previamente.

Es decir, cuando las partículas de látex se producen por polimerización en miniemulsión que se lleva a cabo en la coexistencia de un antígeno o anticuerpo a baja temperatura en la síntesis de las partículas de látex, el antígeno o anticuerpo se introduce en la superficie de las partículas de látex cuando se completa la síntesis, y como resultado, se pueden evitar la eliminación del antígeno o el anticuerpo no unidos de las partículas de látex mediante el lavado o el pelado del antígeno o el anticuerpo unidos de las partículas de látex mediante centrifugación o dispersión, que se produce en las partículas de látex producidas por los procedimientos convencionales. Además, se puede obtener una alta reactividad utilizando dichas partículas de látex. Además, debido a que el antígeno o el anticuerpo se introducen en la superficie de las partículas de látex cuando se completa la síntesis, no se produce la desnaturalización debida al impedimento estérico por la unión, y por lo tanto, se puede evitar una reacción con una muestra en la que se observa una reacción no específica cuando se usan partículas de látex convencionales.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos al medir series diluidas 2 veces de una solución estándar de un anticuerpo anti-BSA, usando un reactivo de la presente invención que contiene partículas de látex introducidas a BSA, o un reactivo convencional que contiene partículas de látex unidas a BSA.

La Figura 2 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos al medir series diluidas 2 veces de una solución estándar de un anticuerpo anti-IgG, usando un reactivo de la presente invención que contiene partículas de látex introducidas a BSA, o un reactivo convencional que contiene partículas de látex unidas a BSA.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

En la presente invención, se usan partículas de látex que tienen un antígeno o anticuerpo (es decir, un compañero inmunológico) introducido en la superficie de las partículas de látex (en lo sucesivo denominadas como partículas de látex introducidas a un compañero), en lugar de partículas de látex convencionales que portan un antígeno o anticuerpo en la superficie de las mismas mediante unión física o química.

En partículas de látex convencionales, por ejemplo, un antígeno o anticuerpo se inmoviliza directamente sobre las partículas de látex por adsorción física, o un antígeno o un anticuerpo se une a las partículas de látex mediante una

unión covalente a través de un grupo funcional ubicado en la superficie de las partículas de látex, por ejemplo, un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo mercapto, un grupo hidroxilo, un grupo aldehído, un grupo epoxi, o similares. En las partículas de látex introducidas a antígeno o anticuerpo obtenibles mediante el proceso de la presente invención, el antígeno o anticuerpo se transporta sobre la superficie del látex incrustando parte del antígeno o anticuerpo en las partículas de látex.

Las partículas de látex introducidas a el compañero usadas en la presente invención no están particularmente limitadas, siempre que el antígeno o anticuerpo se transporte sobre la superficie del látex incrustando parte del antígeno o anticuerpo en las partículas de látex. Las partículas de látex introducidas a el compañero pueden prepararse, por ejemplo, mediante el proceso de la presente invención.

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

La polimerización convencional en miniemulsión puede comprender, pero de ninguna manera se limita a, las etapas, por ejemplo, de mezclar un monómero, un iniciador de polimerización por radicales, un emulsionante y un hidrófobo para preparar una mezcla, cortar la mezcla y calentar la mezcla cortada a una temperatura de inicio de la polimerización para llevar a cabo así la polimerización. En la polimerización en miniemulsión, después de mezclar un monómero para la polimerización con un emulsionante, se lleva a cabo una etapa de corte, por ejemplo, por radiación supersónica, para romper el monómero por una fuerza de corte y formar gotitas de monómero recubiertas con el emulsionante. Las gotitas de monómero se polimerizan calentando la mezcla a la temperatura de inicio de la polimerización del iniciador de la polimerización por radicales para obtener las partículas de polímero.

El antígeno o anticuerpo usado en la presente invención no está particularmente limitado, siempre que muestre una actividad superficial, y es preferible un antígeno o anticuerpo que pueda usarse en un procedimiento de látex (por ejemplo, un procedimiento de aglutinación de látex o una separación tipo B/F usando látex). Si un determinado antígeno o anticuerpo exhibe o no una actividad superficial puede confirmarse mediante un procedimiento conocido, tal como la medición de la tensión superficial, o una medición de un espectro de fluorescencia utilizando pireno como sonda fluorescente. Un antígeno o anticuerpo preferido usado en la presente invención exhibe una relación de intensidad (I1/I3) del primer pico de emisión (I1) al tercer pico de emisión (I3) de 0,5 a 1,6 (más preferiblemente de 0,6 a 1,5) en la medición del espectro de fluorescencia utilizando pireno como sonda fluorescente. Los ejemplos del antígeno o anticuerpo incluyen varios anticuerpos, receptores, enzimas, lípidos y cadenas de azúcar, más particularmente, IgG, proteína C reactiva (CRP), ferritina, microglobulina β -2, α -fetoproteína (AFP), IgE, virus de la hepatitis B (anticuerpo HBs o anticuerpo HBc), dímero D, producto de degradación de fibrina/fibrinógeno (FDP), fibrina soluble (SF), complejo inhibidor de plasmina- α 2-plasmina (PPI), antígeno prostático específico (PSA), elastasa 1, elastasa XDP, trombomodulina y albúmina (preferiblemente albúmina sérica).

Como anticuerpo, se puede usar un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. El anticuerpo puede usarse como la molécula de inmunoglobulina misma, o un fragmento de la misma, como Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv.

Un monómero que se puede usar en la polimerización convencional en miniemulsión se puede usar en la presente invención. Los ejemplos del monómero incluyen estireno, derivados de estireno (por ejemplo, clorometil estireno o sulfonato de estireno sódico), ácido acrílico o ácido metacrílico, ésteres de ácido acrílico o ésteres de ácido metacrílico [por ejemplo, (meta)acrilato de metilo, (meta)acrilato de etilo, (meta)acrilato de butilo, (meta)acrilato de hexadecilo] y acetato de vinilo.

En la presente invención se puede usar un iniciador de polimerización por radicales que se puede usar en la polimerización convencional en miniemulsión, y puede ser, por ejemplo, un iniciador de peróxido, un iniciador de persulfato, un iniciador azo o un iniciador redox. El iniciador redox es preferible en la presente invención, porque la reacción de polimerización puede ser a baja temperatura. Cuando el antígeno o anticuerpo que coexiste en la reacción de polimerización tiene actividades fisiológicas, se puede suprimir una disminución de las actividades fisiológicas realizando la reacción de polimerización a baja temperatura.

Los ejemplos del iniciador de peróxido incluyen peróxido de benzoilo (BPO), peróxido de di-t-butilo (DBPO) y peróxido de amonio. Los ejemplos del iniciador de persulfato incluyen persulfato de potasio (KPS), persulfato de amonio (APS) y persulfato de sodio (NPS). Los ejemplos del iniciador azo incluyen azobisisobutironitrilo (AIBN), 2,2'-azobisisobutirato de dimetilo (MAIB), 4,4'-azobis(ácido 4-cianoalélico) y 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo).

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

Se pueden usar diversos tensioactivos que se pueden usar en la polimerización convencional en miniemulsión como emulsionantes en la presente invención, y pueden incluir compuestos aniónicos, compuestos catiónicos y compuestos no iónicos. Los ejemplos de los compuestos no iónicos incluyen un agente tensioactivo polimérico que tiene una cadena de polietilenglicol (PEG), un alcohol de cadena larga, alcohol polivinílico y Brij 35 (PIERCE).

El tensioactivo polimérico que tiene una cadena de polietilenglicol (PEG) puede ser, por ejemplo, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_3$ (n es un número entero de 2 o más, preferiblemente de 2 a 100, más preferiblemente de 5 a 80, aún más preferiblemente 8 a 50, lo más preferiblemente 9 a 23), más particularmente, por ejemplo, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{23}\text{CH}_3$ [$n = 23$; (nombre del producto) éster de NK M-230G; Shin-nakamura Chemical Co. Ltd.], o $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_9\text{CH}_3$ [$n = 9$; (nombre del producto) éster de NK M-90G; Shin-nakamura Chemical Co. Ltd.]. La estabilidad de la dispersión debida a la repulsión estérica se puede obtener utilizando el agente tensioactivo polimérico anterior como emulsionante.

Los ejemplos de alcohol de cadena larga incluyen 1-pentanol y decanol.

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

Las condiciones de reacción en la polimerización, tal como un disolvente, una proporción de mezcla, una temperatura o un tiempo de reacción, pueden seleccionarse apropiadamente, por ejemplo, llevando a cabo un experimento piloto, de acuerdo con el tipo de monómero y el antígeno o anticuerpo usado, el tamaño de partícula promedio de las partículas de polímero a sintetizar, la cantidad del antígeno o anticuerpo transportado en la superficie de las partículas, o similares.

Por ejemplo, con respecto a 40 mmol de un monómero para polimerización (por ejemplo, un monómero de estireno), un antígeno o anticuerpo [por ejemplo, albúmina de suero bovino, IgG o $\text{F}(\text{ab}')_2$] pueden usarse en una cantidad generalmente de 0,01 a 5 g, preferiblemente de 0,02 a 2 g, más preferiblemente de 0,08 a 0,8 g; un iniciador de polimerización por radicales (por ejemplo, ácido ascórbico o H_2O_2) en una cantidad generalmente de 0,01 a 4 mmol, preferiblemente de 0,02 a 2 mmol; y un emulsionante (por ejemplo, éster de NK M-230G o éster de NK M-90G) en una cantidad generalmente de 0,1 a 10 mmol, preferiblemente de 0,2 a 5 mmol, más preferiblemente de 0,4 a 4 mmol, respectivamente. El tiempo de reacción es generalmente de 1 hora o más, preferiblemente de 3 a 48 horas, más preferiblemente de 4 a 24 horas. La temperatura de reacción es generalmente de 0 a 80°C, preferiblemente de 0 a 60°C, más preferiblemente de 0 a 40°C.

En el proceso de la presente invención, no se aclara el mecanismo de introducción del antígeno o anticuerpo coexistente en la superficie de las partículas de polímero (por ejemplo, látex) en la polimerización en miniemulsión, pero los presentes inventores suponen el siguiente mecanismo. Es decir, el antígeno o anticuerpo usado en la presente invención exhibe una actividad superficial, y por lo tanto, se considera que el antígeno o anticuerpo existe en la superficie de las partículas de polímero (por ejemplo, látex), como una interfaz con el agua, debido a la porción hidrofílica. En este sentido, la presente invención no se limita a la suposición.

En la presente invención, se usa un procedimiento de látex (un procedimiento de aglutinación de látex o una separación tipo B/F usando látex) para realizar el análisis. En un sistema en el que las partículas de látex en las que se introduce un antígeno o anticuerpo específico para una sustancia a analizar se ponen en contacto con la sustancia a analizar (es decir, un sistema en el que se lleva a cabo una reacción antígeno-anticuerpo en el látex), la desnaturalización debida al impedimento estérico no se produce en el antígeno o anticuerpo introducido, y por lo tanto, las partículas de látex no reaccionan con una muestra no específica para la porción desnaturalizada, y como resultado, la sustancia a analizar puede analizarse (detectarse o medirse, preferiblemente medirse) a una sensibilidad más alta, en comparación con los procedimientos convencionales.

Una sustancia que puede analizarse mediante la presente invención (una sustancia a analizar) no está particularmente limitada, siempre que pueda analizarse como un antígeno o un anticuerpo utilizando generalmente una reacción antígeno-anticuerpo, y se prefieren las sustancias fisiológicamente activas. Los ejemplos de la sustancia a analizar incluyen proteínas, lípidos y cadenas de azúcar, más particularmente, IgG, proteína C reactiva (CRP), ferritina, microglobulina β -2, α -fetoproteína (AFP), IgE, virus de la hepatitis B (anticuerpo HBs o anticuerpo HBc), dímero D, producto de degradación de fibrina/fibrinógeno (FDP), fibrina soluble (SF), complejo inhibidor de plasmina- α 2-plasmina (PPI), antígeno prostático específico (PSA), elastasa 1, elastasa XDP, trombomodulina, y albúmina (preferiblemente albúmina sérica).

Una muestra que puede ser analizada por la presente invención no está particularmente limitada, siempre que se sospeche que contiene la sustancia anterior a analizar. La muestra puede ser, en particular, muestras biológicas, tales como sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, extractos celulares o líquidos de tejido alterado.

En la presente invención, se usa un procedimiento de látex para realizar el análisis. En el procedimiento de látex de la presente invención, se utilizan partículas de látex en las que se introduce un antígeno o anticuerpo específico para una sustancia a analizar.

Se puede seleccionar apropiadamente un tamaño de partícula promedio de las partículas de látex introducidas a el compañero de acuerdo con una concentración de detección de la sustancia a analizar, o el aparato de medición. El tamaño de partícula promedio puede seleccionarse adecuadamente dentro de un intervalo de generalmente de 0,05

a 0,5 μm .

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

- 5 El agente para el análisis inmunológico de la presente invención se puede preparar en diversas formas, por ejemplo, un sistema de un componente reactivo que contiene un regulador y las partículas de látex en las que se introduce un antígeno o un anticuerpo; un sistema de dos componentes reactivos en el que el primer reactivo contiene un regulador y el segundo reactivo contiene un anticuerpo monoclonal y las partículas de látex en las que se introduce un antígeno o anticuerpo; o un sistema de dos componentes reactivos en el que el primer reactivo contiene un regulador y las partículas de látex introducidas y el segundo reactivo contiene partículas de látex sensibilizadas con un antígeno o anticuerpo.

15 En el procedimiento de la presente invención, el o los reactivos anteriores se utilizan para llevar a cabo una reacción de aglutinación, y un grado de aglutinación se analiza ópticamente (particularmente se mide) para analizar (particularmente medir) una cantidad de la sustancia a analizar contenida en una muestra. El análisis óptico de un grado de aglutinación de partículas de látex se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante un instrumento óptico para medir la intensidad de una luz dispersada, una absorbancia o la intensidad de una luz transmitida. Una longitud de onda de medición preferida es de 300 a 800 nm. El grado de aglutinación se puede llevar a cabo, de acuerdo con un procedimiento conocido, seleccionando un tamaño (tamaño de partícula promedio) de la partícula de látex, una concentración de partículas de látex o un tiempo de reacción, y midiendo un aumento o disminución en la intensidad de la luz dispersada, una absorbancia, o una intensidad de una luz transmitida, o una combinación de ellas.

Alternativamente, una cantidad de la sustancia a analizar contenida en una muestra puede ser analizada (particularmente medida), poniendo el o los reactivos anteriores en contacto con una muestra en un líquido, llevando a cabo una separación tipo B/F para separar las partículas de látex del líquido, y analizar (particularmente midiendo) la sustancia a analizar unida a las partículas de látex, o la sustancia a analizar que permanece en el líquido.

- 25 En la presente invención, la reacción de aglutinación de partículas de látex se puede medir con mayor precisión, se puede extender un intervalo medible en una concentración baja y se puede evitar una reacción no específica, no solo seleccionando el tipo de antígeno o de anticuerpo a introducir, sino también ajustando otros factores que pueden afectar la reacción de aglutinación del látex. Como factores, se pueden mencionar, por ejemplo, la concentración de partículas de látex, la cantidad de un anticuerpo introducido en las partículas de látex o el tamaño de partícula de la partícula de látex.

La reacción antígeno-anticuerpo usada en la presente invención puede llevarse a cabo en las mismas condiciones que las de una reacción convencional antígeno-anticuerpo. Como medio de reacción, se pueden seleccionar apropiadamente varios reguladores de acuerdo con el tipo de sustancia a analizar. La fuerza iónica y el pH del regulador no están particularmente limitados, siempre que el regulador no inactive la sustancia a analizar y no inhiba la reacción antígeno-anticuerpo. Como regulador, por ejemplo, se puede usar un regulador de Good, un regulador de glicina o un regulador tris. El pH en la reacción es preferiblemente de 5 a 10, más preferiblemente de 6 a 8. La temperatura de reacción es preferiblemente de 0 a 50°C, más particularmente de 20 a 40°C. El tiempo de reacción puede ser seleccionado apropiadamente.

Ejemplos

- 40 La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente, pero no está limitada de ninguna manera a, los siguientes Ejemplos.

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

(1) Preparación de partículas de látex introducidas a BSA

Después de 40 mmol de estireno, se mezclaron 4 mmol de hexadecano, 200 mg de BSA, 0,8 mmol de CH₂=C(CH₃)COO₂₃CH₃ (éster de NK M-230G; Shin-nakamura Chemical Co. Ltd.), 0,4 mmol de ácido ascórbico y 20 g de agua, la mezcla se sonicó [salida: 80%, pulso: 50%, UH-300 (SMT Co., Ltd.)] en un baño de hielo durante 15 minutos. El conjunto se transfirió a un matraz de tres bocas y se burbujeó gas nitrógeno a través de toda la masa durante 15 minutos mientras se agitaba a 100 rpm. Además, se añadieron 0,4 mmol de H₂O₂ y se polimerizó a 30°C o 60°C durante 6 horas mientras se agitaba a 200 rpm para preparar partículas de látex introducidas a BSA. Los tamaños de partícula promedio de las partículas de látex introducidas a BSA resultantes fueron de 0,109 μm (polimerización a 30°C) y 0,121 μm (polimerización a 60°C).

(2) Preparación de la suspensión de partículas de látex introducidas a BSA.

Con respecto a 1 mL de las partículas de látex introducidas a BSA (concentración: 1%), se añadió 1 mL de un reactivo de bloqueo para la medición inmunológica N101 (NOF Corporation), y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esta mezcla se centrifugó a 35.000 rpm. El precipitado resultante (es decir, látex) se suspendió

en 10 mL de un regulador Tris (pH 8,0) para preparar una suspensión de partículas de látex introducidas a BSA.

(3) Preparación del regulador.

Se añadió cloruro de sodio a un regulador Tris de 0,1 mol/L (pH 8,0) que contenía el 0,5% en peso de BSA para convertirse en una concentración del 0,9% en peso para preparar un regulador. En lo sucesivo, un regulador Tris que contiene NaCl sin BSA se denomina "regulador A", y un regulador Tris que contiene NaCl con BSA se denomina "regulador B".

(4) Reactivo para medir el anticuerpo anti-BSA.

Se evaluó un sistema de dos componentes reactivos que consiste en la suspensión de partículas de látex introducidas a BSA (segundo reactivo) preparadas en el Ejemplo 1 (2) y el regulador A o B (primer reactivo) preparado en el Ejemplo 1 (3) en los siguientes ejemplos, como reactivo para medir un anticuerpo anti-BSA, un reactivo para análisis inmunológico de la presente invención.

Ejemplo 2: Medición de una solución estándar de anticuerpo anti-BSA

(1) Preparación de una solución estándar de anticuerpo anti-BSA.

Un anticuerpo anti-BSA (albúmina de vaca anticonejo; DAKO, 900 unidades) se diluyó en serie dos veces con solución salina fisiológica para preparar una serie de diluciones en serie de un anticuerpo anti-BSA estándar que tiene concentraciones de 900, 450, 225, 113, 56, 28, 14 y 7 unidades.

(2) Medición de solución estándar de anticuerpo anti-BSA

Después de que se mezclaron 90 μ L de regulador A o B preparado en el Ejemplo 1 (3) con 15 μ L de cada una de las series de dilución, y se incubaron a 37°C durante un período de tiempo predeterminado, se añadieron adicionalmente 90 μ L de la suspensión de partículas de látex introducidas a BSA preparadas en el Ejemplo 1 (2) y se agitó. A partir de la última adición, se midieron las absorbancias a longitudes de onda de 800 nm y 570 nm durante 5 minutos. La diferencia entre una variación de la absorbancia (es decir, una cantidad de cambio en la absorbancia) a 570 nm y una variación de la absorbancia a 800 nm se consideró como una variación de la absorbancia (Δ Ab). La medición se llevó a cabo utilizando un analizador automatizado (Hitachi 7170, Hitachi Ltd.).

Para comparación, se utilizaron partículas de látex de poliestireno con un tamaño de partícula promedio de 0,11 μ m (JSR Corporation, contenido de sólidos: 10%) para preparar una suspensión de partículas de látex unidas a BSA sensibilizando 1 mL de las partículas (concentración: 1 %) con 0,3% (3 mg/mL) de BSA.

Los resultados se muestran en la Tabla 1 y la Figura 1, y en la Tabla 2. La Tabla 1 y la Figura 1 muestran los resultados del reactivo (temperatura de polimerización = 30°C) de la presente invención descrito en el Ejemplo 1 (4) utilizando un regulador A o B, así como los resultados de un reactivo convencional. La Tabla 2 muestra los resultados de los reactivos (temperatura de polimerización = 30°C o 60°C) de la presente invención descritos en el Ejemplo 1 (4) usando un regulador A (es decir, sin BSA), así como los resultados de un reactivo convencional.

Como se desprende de la Tabla 1 y la Figura 1, cuando se usó el regulador A (es decir, sin BSA), la suspensión de partículas de látex introducidas a BSA (reactivo de la presente invención) mostró una variación de la absorbancia (Δ Ab) de 24.513 a una concentración de anticuerpo anti-BSA de 900 unidades, mientras que la suspensión de partículas de látex unidas a BSA (reactivo convencional) mostró una variación de la absorbancia (Δ Ab) de 385 a una concentración de anticuerpo anti-BSA de 900 unidades, y por lo tanto, la suspensión de las partículas de látex introducidas a BSA aparentemente mostraron una mayor sensibilidad. Cuando se usó el regulador B (es decir, con BSA al 0,5%), no se observó reacción con la serie de dilución del anticuerpo anti-BSA usando cualquiera de las suspensiones.

Tabla 1

Anticuerpo anti-BSA (título)	Variación de absorbancia (Δ Ab)			
	Reactivo convencional, partículas unidas a BSA		Reactivo de la invención, partículas introducidas por BSA	
	regulador A	regulador B	regulador A	regulador B
0	-20	-10	-102	-50
7	-38	-7	84	-50

(continuación)

Anticuerpo anti-BSA (título)	Variación de absorbancia (ΔAb)			
	Reactivo convencional, partículas unidas a BSA		Reactivo de la invención, partículas introducidas por BSA	
	regulador A	regulador B	regulador A	regulador B
14	-19	-7	407	-48
28	-19	-9	1.439	-46
56	-18	-6	4.546	-45
113	-15	-6	7.024	-48
225	-5	-2	11.471	-49
450	63	2	16.397	-43
900	385	11	24.513	-46

5 Como se desprende de la Tabla 2, cuando se usaron las suspensiones de partículas de látex introducidas a BSA (reactivo de la presente invención), se obtuvo la suspensión de partículas de látex introducidas a BSA llevando a cabo la reacción de polimerización a baja temperatura (30°C) mostró una variación de la absorbancia (ΔAb) de 24.513 a una concentración de anticuerpo anti-BSA de 900 unidades, mientras que la suspensión de partículas de látex introducidas en BSA obtenida al llevar a cabo la reacción de polimerización a una temperatura alta (60°C) mostró una variación de la absorbancia (ΔAb) de 8.480 a una concentración de anticuerpo anti-BSA de 900 unidades y, por lo tanto, la suspensión de partículas de látex introducidas a BSA preparadas a baja temperatura exhibió una mayor sensibilidad. Además, la suspensión de partículas de látex unidas a BSA (reactivo convencional) 10 mostró una variación de la absorbancia (ΔAb) de 385 a una concentración de anticuerpo anti-BSA de 900 unidades, y por lo tanto, las suspensiones de partículas de látex introducidas a BSA aparentemente mostraron una mayor sensibilidad.

Tabla 2

Anticuerpo anti-BSA (título)	Variación de la Absorbancia (ΔAb)		
	Partículas unidas a BSA	Partículas introducidas a BSA	
		Temperatura de polimerización	
		30°C	60°C
0	-20	-102	-73
14	-19	407	-55
28	-19	1.439	-1
56	-18	4.546	114
113	-15	7.024	406

15

(continuación)

Anticuerpo anti-BSA (título)	Variación de la Absorbancia (ΔAb)		
	Partículas unidas a BSA	Partículas introducidas a BSA	
		Temperatura de polimerización	
		30°C	60°C
225	-5	11.471	1.169
450	63	16.397	3.507
900	385	24.513	8.480

Ejemplo 3: Medición de sueros humanos utilizando reactivo para medir el anticuerpo anti-BSA

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

Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Como se muestra en la Tabla 3, las muestras de suero normales (Nos. 1 a 5) y las muestras de suero no específicas (Nos. 6 a 8) no reaccionaron con la suspensión de partículas de látex introducidas a BSA. Sin embargo, la suspensión de partículas de látex unidas a BSA reaccionó fuertemente con las muestras no específicas cuando se usó el regulador sin BSA (regulador A) o el regulador en el que se suspendió BSA al 0,5% (regulador B).

Tabla 3

Muestras de suero humano	Variación de la Absorbancia (ΔAb)			
	Reactivo convencional, partículas unidas a BSA		Reactivo de la invención, partículas introducidas por BSA	
	regulador A	regulador B	regulador A	regulador B
[Normales]				
No. 1	-76	-54	-4	2
No. 2	-88	25	-31	-16
No. 3	53	63	-47	-39
No. 4	89	92	-5	16
No. 5	100	129	2	14
[No específicas]				
No. 6	6.382	6.463	20	60

(continuación)

	Variación de la Absorbancia (ΔAb)			
Muestras de suero humano	Reactivo convencional, partículas unidas a BSA		Reactivo de la invención, partículas introducidas por BSA	
	regulador A	regulador B	regulador A	regulador B
No. 7	2.536	3.570	23	71
No. 8	1.571	2.317	13	74

Ejemplo 4: Preparación del reactivo para medir anti-IgG

(1) Preparación de partículas de látex introducidas a IgG

Después de 40 mmol de estireno, se mezclaron 4 mmol de hexadecano, 200 mg de IgG, 0,6 mmol de $CH_2=C(CH_3)COO_{23}CH_3$ (éster de NK M-230G; Shin-nakamura Chemical Co. Ltd.), 0,4 mmol de ácido ascórbico y 20 g de agua, la mezcla se sonicó [salida: 80%, pulso: 50%, UH-300 (SMT Co., Ltd.)] en un baño de hielo durante 15 minutos. El conjunto se transfirió a un matraz de tres bocas y se burbujeó gas nitrógeno a través de toda la masa durante 15 minutos mientras se agitaba a 100 rpm.

Además, se añadieron 0,4 mmol de H_2O_2 y se polimerizó a 30°C durante 6 horas mientras se agitaba a 200 rpm para preparar partículas de látex introducidas a IgG. Los tamaños de partícula promedio de las partículas de látex introducidas a IgG resultantes fueron de 0,318 μm .

(2) Preparación de la suspensión de partículas de látex introducidas a IgG.

Con respecto a 1 mL de las partículas de látex introducidas a IgG (concentración: 1%), se añadió 1 mL de un reactivo de bloqueo para la medición inmunológica N101 (NOF Corporation), y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esta mezcla se centrifugó a 35.000 rpm. El precipitado resultante (es decir, látex) se suspendió en 10 mL de un regulador Tris (pH 8,0) para preparar una suspensión de partículas de látex introducidas a IgG.

(3) Reactivo para medir el anticuerpo anti-IgG.

Un sistema de dos componentes reactivos que consiste en la suspensión de partículas de látex introducidas a IgG (segundo reactivo) preparadas en el Ejemplo 4 (2) y el regulador B (primer reactivo) preparado en el Ejemplo 1 (3) se evaluó en los siguientes ejemplos, como un reactivo para medir un anticuerpo anti-IgG, un reactivo para análisis inmunológico de la presente invención.

Ejemplo 5: Medición de una solución estándar de anticuerpo anti-IgG

(1) Preparación de una solución estándar de anticuerpo anti-IgG.

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

(2) Medición de una solución estándar de anticuerpo anti-IgG

Después de que se mezclaron 90 μL del regulador preparado en el Ejemplo 1 (3) con 2 μL de cada una de las series de dilución, y se incubaron a 37°C durante un período de tiempo predeterminado, se agregaron adicionalmente y se agitaron 90 μL de la suspensión de partículas de látex introducidas a IgG preparadas en el Ejemplo 4 (2). Desde la última adición, se midieron las absorbancias a longitudes de onda de 800 nm y 570 nm durante 5 minutos. La diferencia entre una variación de la absorbancia a 570 nm y una variación de la absorbancia a 800 nm se consideró como una variación de la absorbancia (ΔAb). La medición se llevó a cabo utilizando un analizador automatizado (Hitachi 7170, Hitachi Ltd.).

Para comparación, se usaron partículas de látex de poliestireno con un tamaño de partícula promedio de 0,283 μm (Sekisui, contenido de sólidos: 10%) para preparar una suspensión de partículas de látex unidas a IgG sensibilizando 1 mL de las partículas (concentración: 1%) con 1% (10 mg/mL) de IgG, y se usaron la suspensión resultante de partículas de látex unidas a IgG y una suspensión de partículas de látex no sensibilizadas con IgG.

Los resultados del reactivo de la presente invención descritos en el Ejemplo 4 (3) se muestran en la Tabla 4 y la Figura 2, junto con los resultados del reactivo convencional.

Como se desprende de la Tabla 4 y la Figura 2, la suspensión de partículas de látex introducidas a IgG (reactivo de la presente invención) mostró una variación de la absorbancia (ΔAb) de 812 a una concentración de anticuerpo anti-IgG de 1,4 mg/mL, mientras que la suspensión de partículas de látex unidas a IgG (reactivo convencional) mostró una variación de la absorbancia (ΔAb) de 219, y por lo tanto, la suspensión de partículas de látex introducidas a IgG aparentemente mostró una mayor sensibilidad.

Tabla 4

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

Ejemplo 6: Preparación de reactivo de medición introducido por anticuerpo $F(ab')_2$ anti-CRP

(1) Preparación de partículas de látex introducidas por anticuerpo $F(ab')_2$ anti-CRP

- Después de 10 mmol de estireno, se mezclaron 1 mmol de hexadecano, 50 mg de anticuerpo $F(ab')_2$ anti-CRP, 0,2 mmol de $CH_2=C(CH_3)COO(CH_2CH_2O)_{23}CH_3$ (éster de NK M-230G; Shin-nakamura Chemical Co. Ltd.), 0,1 mmol de ácido ascórbico y 5 g de agua, la mezcla se sonicó [salida: 50%, pulso: 50%, UH-300 (SMT Co., Ltd.)] en un baño de hielo durante 15 minutos. El conjunto se transfirió a un matraz de tres bocas y se burbujeó gas nitrógeno a través de toda la masa durante 15 minutos mientras se agitaba a 100 rpm. Además, se añadieron 0,1 mmol de H_2O_2 y se polimerizó a temperatura ambiente durante 6 horas mientras se agitaba a 200 rpm para preparar partículas de látex con introducción del anticuerpo $F(ab')_2$ anti-CRP. Los tamaños de partícula promedio de las partículas de látex con introducción del anticuerpo $F(ab')_2$ anti-CRP resultante fueron de 0,249 μm .

(2) Preparación de la suspensión de partículas de látex con introducción del anticuerpo $F(ab')_2$ anti-CRP

- Con respecto a 1 mL de las partículas de látex con introducción del anticuerpo $F(ab')_2$ anti-CRP (concentración: 1%), se agregó 1 mL de un reactivo de bloqueo para la medición inmunológica N101 (NOF Corporation), y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esta mezcla se centrifugó a 35.000 rpm. El precipitado resultante (es decir, látex) se suspendió en 10 mL de un regulador Tris (pH 8,0) para preparar una suspensión de partículas de látex con introducción del anticuerpo $F(ab')_2$ anti-CRP.

(3) Reactivo para medir CRP.

- Un sistema de dos componentes reactivos que consiste en la suspensión de partículas de látex con introducción del anticuerpo $F(ab')_2$ anti-CRP (segundo reactivo) preparado en el Ejemplo 6 (2) y regulador B (primer reactivo) preparado en el Ejemplo 1 (3) se evaluó en los siguientes ejemplos, como un reactivo para medir la CRP, un reactivo para análisis inmunológico de la presente invención.

Ejemplo 7: Medición de solución estándar de CRP

- (1) Preparación de solución estándar de CRP.

CRP (Oriental Yeast Co., Ltd., Una solución de CRP recombinante, 100 mg/dL) se diluyó en serie con solución salina fisiológica para preparar una serie de seis diluciones en serie de un CRP estándar con concentraciones de 3,2; 1,6; 0,8; 0,4; 0,2 y 0,1 mg/dL.

(2) Medición de la solución estándar de CRP.

- 5 Después de que se mezclaron 90 μ L del regulador preparado en el Ejemplo 1 (3) con 2 μ L de cada una de las series de dilución, y se incubaron a 37°C durante un período de tiempo predeterminado, se agregaron y agitaron adicionalmente 90 μ L de la suspensión de partículas de látex con introducción de anticuerpo F(ab')₂ anti-CRP preparada en el Ejemplo 6 (2). Desde la última adición, se midieron las absorbancias a longitudes de onda de 800 nm y 570 nm durante 5 minutos. La diferencia entre una variación de la absorbancia a 570 nm y una variación de la absorbancia a 800 nm se consideró como una variación de la absorbancia (Δ Ab). La medición se llevó a cabo utilizando un analizador automatizado (Hitachi 7170, Hitachi Ltd.).

Los resultados del reactivo de la presente invención descritos en el Ejemplo 6 (3) se muestran en la Tabla 5.

- 15 Como se desprende de la Tabla 5, la suspensión de partículas de látex con introducción del anticuerpo F(ab')₂ anti-CRP (reactivo de la presente invención) mostró una reactividad dependiente de la concentración con las soluciones estándar de CRP en el intervalo de 0,1 a 3,2 mg/dL.

Tabla 5

	Variación de la absorbancia (Δ Ab)
CRP (mg/dL)	Reactivo de la invención. Partículas con introducción del anticuerpo F(ab') ₂ anti-CRP
0	-36
0,1	6
0,2	57
0,4	154
0,8	315
1,6	482
3,2	533

Aplicabilidad industrial

- 20 La presente invención se puede aplicar al análisis inmunológico, particularmente a un procedimiento de aglutinación con látex.

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas, varios cambios y modificaciones obvias para los expertos en la técnica son posibles sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo para análisis inmunológico, que comprende una suspensión de partículas de látex que tienen un antígeno o un anticuerpo específico para una sustancia a analizar introducida en la superficie de las partículas de látex, producido mediante la polimerización de un monómero en presencia del antígeno o anticuerpo para sintetizar así las partículas de látex, en el que la polimerización es una polimerización en miniemulsión, y en el que parte del antígeno o anticuerpo está incrustado en las partículas de látex.
5
2. Un procedimiento para análisis inmunológico, que comprende la etapa de poner, en un líquido, (1) una muestra sospechosa de contener una sustancia para analizar, en contacto con (2) partículas de látex que tienen un antígeno o un anticuerpo específico para la sustancia introducida en la superficie de las partículas de látex, producidas mediante la polimerización de un monómero en presencia del antígeno o anticuerpo para sintetizar así las partículas de látex, en el que la polimerización es una polimerización en miniemulsión, y en el que parte del antígeno o anticuerpo está incrustado en partículas de látex.
10
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende además la etapa de analizar ópticamente un grado de aglutinación de partículas de látex causada por una reacción antígeno-anticuerpo, después de la etapa de contacto.
15
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende, además, después de la etapa de contacto, la etapa de separar las partículas de látex del líquido, y analizar ópticamente la sustancia a analizar unida a las partículas de látex, o la sustancia a analizar que permanece en el líquido.

Figura 1

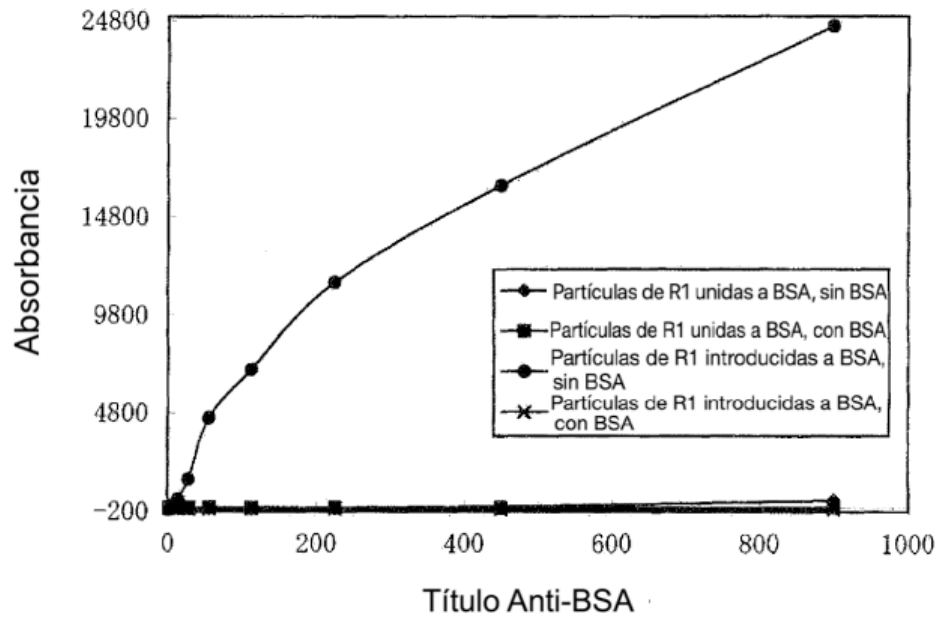


Figura 2

