(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 349 042**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **05776096 .9**
(96) Fecha de presentación : **30.08.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1801590**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2007**

(54) Título: **Método de análisis de antígeno y reactivo para el mismo.**

(30) Prioridad: **31.08.2004 JP 2004-251456**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.12.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.12.2010

(73) Titular/es: **DENKA SEIKEN Co., Ltd.**
4-2, Nihonbashikayabacho 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0025, JP

(72) Inventor/es: **Minakawa, Yasunori y**
Motoda, Shosaku

(74) Agente: **Zea Checa, Bernabé**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

Descripción

Campo Técnico

[0001] La presente invención está relacionada con un método para medir un antígeno mediante un método de aglutinación por látex y un reactivo para ello.

Antecedentes de la Técnica

[0002] Los inmunoensayos que utilizan partículas de látex se aplican a ensayos clínicos para cuantificar sustancias antigénicas contenidas en los fluidos corporales tales como suero, plasma sanguíneo y orina. Se usan ampliamente ya que permiten realizar mediciones rápidas y simples usando analizadores automáticos.

[0003] En los últimos años, se propusieron técnicas aplicadas destinadas a promover más el rendimiento de la medición. Por ejemplo, por el reactivo empleando dos tipos de partículas de látex que tienen diferente tamaño promedio de partícula sobre el que se inmoviliza el mismo anticuerpo en al menos dos cantidades diferentes (Bibliografía de Patente 1) o por el método de medición usando dos o más tipos de partículas de látex que tienen diferente tamaño promedio de partícula, sensibilizadas con un anticuerpo (Bibliografía de Patente 2), pueden obtenerse mediciones en un amplio intervalo. Puede obtenerse el mismo efecto, por el método en el cual un anticuerpo policlonal y un anticuerpo monoclonal se inmovilizan sobre partículas transportadoras insolubles que tienen un sólo tamaño promedio de partícula (Bibliografía de Patente 3). Además, se han propuesto métodos de medición en los que se usan partículas que tienen un pequeño tamaño de partícula recubiertas con un anticuerpo con una baja reactividad y partículas que tienen un gran tamaño de partícula recubiertas con un anticuerpo con una elevada reactividad (Bibliografía de Patente 4 y 5). Aún más, la Bibliografía 1 y 2, que no es de patente, describe inmunoensayos por métodos de aglutinación, que usan partículas sensibilizadas mezcladas usando dos tipos de partículas transportadoras grandes y pequeñas, en el que un anticuerpo monoclonal que tiene una baja tasa de reacción se inmoviliza sobre las partículas transportadoras que tienen un menor tamaño promedio de partícula y un anticuerpo monoclonal que tiene una alta tasa de

reacción se inmoviliza sobre las partículas transportadoras que tienen un mayor tamaño promedio de partícula.

[0004] Sin embargo, los métodos descritos en estas bibliografías tienen el inconveniente de que el intervalo de concentración en el que se consigue la medición es estrecho y la medición en la región de alta concentración es difícil.

Bibliografía de Patente 1: Publicación de Patente Japonesa (Kokoku) Nº 63-14783

Bibliografía de Patente 2: Publicación de Patente Japonesa Nº 2588174

Bibliografía de Patente 3: Solicitud de Patente Japonesa abierta a Inspección Pública (Kokai) Nº 10-90268

Bibliografía de Patente 4: Solicitud de Patente Japonesa abierta a Inspección Pública (Kokai) Nº 11-108929

Bibliografía de Patente 5: Publicación de Patente Japonesa (Kokai) Nº 3513075

Bibliografía no de Patente 1: Journal of Clinical laboratory Analysis 12:137-144 (1988)

Bibliografía no de Patente 2: Japanese Journal of Medicine and Pharmaceutical Science, 42(5):781-788, 1999

[0005] Sánchez A. *et al.* (2002) Clin. 48, nº 5-6, páginas 313-317, evalúan el resultado analítico de un método inmunoturbidimétrico de la CRP en un analizador COBAS Integra 400.

[0006] Eda S. *et al.* (1999) Scand. J. Clin. Lab. Invest., vol. 230, páginas 32-35 describen un método basado en turbidimetría potenciado con micropartículas y su uso para medir la proteína C reactiva (CRP). El método emplea una mezcla de dos tipos de reactivos de micropartículas que difieren en el tamaño de las micropartículas y en la reactividad del anticuerpo recubierto.

[0007] El documento EP 0 898 169 está relacionado con un ensayo de aglutinación por dispersión de luz potenciado con micropartículas para determinar la cantidad de un analito, y un reactivo usado en el ensayo. El ensayo usa una mezcla de partículas de fuertes propiedades de dispersión de

luz que transportan al menos un compañero de unión de alta reactividad para el analito y partículas de débiles propiedades de dispersión de luz que transportan al menos un compañero de unión de baja reactividad para el analito.

[0008] El documento US 2001/026945 describe reactivos y el uso de reactivos en un ensayo de aglutinación por dispersión de luz con micropartículas. Los reactivos comprenden una mezcla de partículas que tienen propiedades de dispersión de luz relativamente más fuertes y partículas que tienen propiedades de dispersión de luz relativamente débiles con respecto a las demás. Las partículas que tienen propiedades de dispersión de luz fuertes transportan un compañero de unión de alta reactividad con el analito. Las partículas que tienen propiedades de dispersión de luz débiles transportan un compañero de unión de baja reactividad con el analito.

[0009] Eda S. *et al.* (1998) J. Clin. Lab. Anal. vol. 12, nº 3, páginas 137-144, describen un ensayo basado en micropartículas para la proteína C reactiva. Este ensayo usa micropartículas de dos tamaños diferentes recubiertas covalentemente con dos anticuerpos monoclonales de diferente reactividad.

[0010] Katano S. (1999) Igaku a Yakugaku J. Med., vol. 42, nº 5, páginas 781-788 describe un ensayo de la proteína sérica mediante el analizador químico-clínico COBAS Integra 400 totalmente automatizado. El ensayo usa micropartículas de dos tamaños diferentes recubiertas covalentemente con dos anticuerpos monoclonales de diferente reactividad.

[0011] Benecky M. *et al.* (1997), Clin. Chem., Vol. 43, nº 9, páginas 1764-1770 describen un método de dispersión de luz con partículas acoplados para determinar la presencia de analitos múltiples en un medio. Usando mezclas de micropartículas de látex de diferente tamaño se configuran ensayos múltiples simultáneos.

[0012] Tarkkinen P. *et al.* (2002), Clin. Chem. vol. 48, nº 12, páginas 269-277, describen un inmunoensayo cinético, no competitivo, para la CRP que usa micropartículas porosas, recubiertas covalentemente con un anticuerpo de captura monoclonal. Las micropartículas usadas eran micropartículas porosas de acrilato de 60 μm.

[0013] Holownia P. *et al.* (2001), Anal. Chem., vol. 73, nº 14, páginas 3426-3431, describen el efecto del poli(etilenglicol) y otros tensioactivos para la realización de un inmunoensayo de la CRP con partículas de látex. Cada ensayo emplea un sólo tamaño de micropartículas de látex.

[0014] Pérez-Amodio S. *et al.* (2001), Anal. Chem., vol. 73, nº 14, páginas 3417-3425 describen el efecto del medio iónico, carga y química de la superficie de partícula en un inmunoensayo de la CRP con partículas de látex. Cada ensayo emplea un sólo tamaño de micropartículas de látex.

[0015] Peula J. M. *et al.* (1995), J. Biomaterials Sci. Vol. 7, nº 3, páginas 241-251, describen la estabilidad coloidal y la inmunoreactividad de partículas de látex recubiertas con BSA monomérica o un anticuerpo anti-CRP. Se describen condiciones de incubación que producen partículas de látex con estabilidad coloidal y reactividad elevadas.

[0016] SERADYN INC., 1 de septiembre del 2005, páginas 1-7 describe la fabricación y las propiedades del poliestireno y de micropartículas modificadas con carboxilato.

[0017] Griffen C. *et al*. 1994 "Microparticle reagent optimization" 1994, (SERADYN INC.) es un manual de laboratorio de referencia que describe las propiedades de reactivos de micropartículas, junto con métodos para su preparación y uso.

[0018] Borque *et al.* (2000), Clin. Chem. vol. 46, nº 11, páginas 1839-1842 describen el desarrollo y la validación de un ensayo inmunoturbidimétrico ultrasensible y automatizado para la proteína C reactiva. En cada ensayo, se usó un sólo tamaño de micropartícula.

[0019] Kondo *et al.* (1991), Biotech. y Bioeng. vol. 37, páginas 537-543 describen los efectos de las propiedades de la superficie de las partículas sobre la adsorción de proteínas sobre la partícula.

[0020] Giacomelli *et al.* (2000), J. Colloid and Interface Sci. vol.231, páginas 283-288, describen el comportamiento de la adsorción de un anticuerpo monoclonal (inmunoglobulina G) sobre partículas de látex que tienen grupos clorometil pre-recubiertos con "Chaps".

Descripción de la invención

Problemas que la invención intenta resolver

[0021] En muchos de los elementos de inspección ensayados en los ensayos inmunoserológicos clínicos el punto importante para emitir un juicio clínico es el intervalo de baja concentración. Por lo tanto, es evidente que la precisión de la medición del intervalo de baja concentración afecta en gran medida a los resultados de los ensayos. Sin embargo, mediante las técnicas que emplean una pluralidad de tipos de partículas de látex con diferentes tamaños

de partícula, se consigue un mayor intervalo de medición que el obtenido en los métodos que emplean un solo tipo de partículas y se desea que la medición en el intervalo de baja concentración también sea una medición exacta. Para la promoción de la precisión de la medición, es eficaz el aumento de la sensibilidad del sistema de medición. Sin embargo, en la técnica anterior, el aumento de la sensibilidad del sistema de medición acompaña a la reducción del intervalo de medición como se describe en la bibliografía de patente 2. Mediante los métodos descritos en la bibliografía, que no es de patente, 1 y 2, la medición en el intervalo de alta concentración es difícil y el intervalo de medición es estrecho.

[0022] Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un método de aglutinación del látex en el que se amplia el intervalo de medición y se promueva la sensibilidad de la medición en el intervalo de baja concentración.

Medios para resolver los problemas

[0023] Los presentes inventores han estudiado en profundidad descubrir que la sensibilidad de la medición en el intervalo de baja concentración puede aumentarse y el intervalo de medición en el intervalo de alta concentración puede ampliarse usando dos tipos de partículas de látex grandes y pequeñas, es decir, una mezcla de partículas de látex con un gran tamaño medio de partícula (partículas de látex grandes) sensibilizadas con (transportando) un anticuerpo en una cantidad en la que se consigue la máxima tasa de reacción o en una cantidad cercana a esta y partículas de látex que tengan un tamaño medio de partícula pequeño (partículas de látex pequeñas) sensibilizadas con el mismo anticuerpo en menor cantidad que la cantidad habitual con el fin de disminuir la tasa de reacción, cuya mezcla tenga el tamaño medio de partícula optimizado de las partículas grandes y pequeñas, y optimizando las concentraciones de las partículas en el sistema de reacción, completando de esta manera la presente invención.

[0024] Es decir, la presente invención proporciona un método para medir un antígeno de ensayo por aglutinación de látex usando partículas de látex sensibilizadas, comprendiendo el método hacer reaccionar las partículas de látex sensibilizadas suspendidas en un tampón con el antígeno de ensayo; siendo las partículas de látex sensibilizadas dos tipos de partículas, grandes y pequeñas, con diferente tamaño de partícula medio, estando cada una de las

partículas de látex sensibilizadas con el mismo anticuerpo o el mismo fragmento de unión a antígeno del mismo, cuyo anticuerpo se somete a una reacción antígeno-anticuerpo con el antígeno de ensayo; teniendo el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, inmovilizado sobre las partículas de látex, una pureza no inferior al 14% en peso basado sobre la cantidad total de proteínas transportadas sobre dichas partículas; siendo la cantidad de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, inmovilizado por una partícula de dichas partículas pequeñas, del 0,5 al 10% en peso de la cantidad del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo inmovilizado por una partícula de las partículas grandes; teniendo las partículas de látex grandes un tamaño medio de partícula de 0,15 a 0,29 μm; teniendo las partículas de látex pequeñas un tamaño medio de partícula de 0,05 μm a 0,10 μm; siendo la concentración de las partículas de látex grandes en el sistema de reacción antígeno-anticuerpo del 0,01 al 0,04% p/v; siendo la concentración de las partículas de látex pequeñas en el sistema de reacción antígeno-anticuerpo del 0,05 a 0,2% p/v; y medir ópticamente la aglutinación de las partículas de látex sensibilizadas. En este documento también se describe un reactivo para medir un antígeno, en un tampón, por el método de aglutinación de látex, que comprende dos tipos de partículas grandes y pequeñas, con diferente tamaño medio de partícula , sensibilizándose cada una de las partículas de látex con el mismo anticuerpo o el mismo fragmento de unión a antígeno del mismo, cuyo anticuerpo se somete a una reacción antígeno-anticuerpo con el antígeno de ensayo; teniendo el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, inmovilizado sobre dichas partículas de látex, una pureza no inferior al 14% en peso basado sobre la cantidad total de proteínas transportadas sobre las partículas; siendo la cantidad del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, inmovilizado por una partícula de las partículas pequeñas, del 0,5 al 10% en peso de la cantidad del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo inmovilizado por una partícula de las partículas grandes; teniendo las partículas de látex grandes un tamaño medio de partícula de 0,15 a 0,29 μm; teniendo las partículas de látex pequeñas un tamaño medio de partícula de 0,05 μm a 0,10 μm.

Efectos de la invención

[0025] Mediante la presente invención, se estableció un inmunoensayo, por el que puede conseguirse una medición con alta sensibilidad en el intervalo de baja concentración y la ampliación del intervalo de medición en el intervalo de alta concentración y obtener una precisión en la medición en el intervalo de baja concentración, que es importante para emitir un juicio clínico en los ensayos inmunoserológicos o similares aumentando de esta manera un juicio mas preciso.

[0026]

Breve Descripción de los Dibujos

La figura 1 muestra de manera comparativa las relaciones entre el nivel de CRP y la cantidad de cambio de absorbancia, que se obtuvo usando los Reactivos 1, 2 y 3 preparado en el Ejemplo, respectivamente.

La figura 2A muestra la relación entre el nivel CRP y la cantidad de cambio de absorbancia, que se obtuvo usando el Reactivo 4 preparado en el Ejemplo.

La figura 2B es una vista ampliada que muestra el intervalo de baja concentración de CRP en la Figura 2A.

La Figura 3A muestra de manera comparativa las relaciones entre el nivel de CRP y la cantidad de cambio de absorbancia, que se obtuvo usando el reactivo descrito en la presente memoria y un reactivo de acuerdo con el Ejemplo Comparativo, respectivamente.

La figura 3B es una vista ampliada que muestra el intervalo de baja concentración de CRP en la Figura 3A.

La Figura 4 muestra la relación entre la isoterma de adsorción y la cantidad máxima de adsorción sobre la línea de adsorción del 100%.

Mejor Modo de Realizar la Invención

[0027] Las partículas de látex usadas en un método de la presente invención se sensibilizan con (es decir, transportan) un anticuerpo que se somete a una reacción antígeno-anticuerpo con el antígeno a medir (en lo sucesivo en este documento denominado “anticuerpo específico”) o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo específico puede ser un anticuerpo

policlonal o un anticuerpo monoclonal. En lugar de con el anticuerpo, las partículas pueden sensibilizarse con un fragmento del anticuerpo, que pueda unirse al antígeno correspondiente, tal como un fragmento Fab o fragmento $F(ab')_2$ (denominado “fragmento de unión a antígeno” en la presente descripción y reivindicaciones).

[0028] La pureza del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno del mismo inmovilizado sobre las partículas de látex no es inferior al 14% en peso, preferiblemente no es inferior al 16% en peso basándose en la cantidad de proteínas transportadas sobre las partículas. Si la pureza es inferior al 14% en peso, no se obtiene una sensibilidad de medición suficiente en el intervalo de baja concentración. Por ejemplo, habitualmente se prepara un anticuerpo policlonal inyectando un antígeno a un animal; extrayendo la sangre del animal después de pasar un tiempo prescrito; y sometiendo la sangre extraída como material de partida a una cromatografía de afinidad usando una columna de Proteína A o similar. Por lo tanto, el anticuerpo policlonal contiene otras inmunoglobulinas además del anticuerpo específico que se somete a la reacción antígeno-anticuerpo con el antígeno. En la presente invención, el porcentaje (pureza) de la cantidad del anticuerpo específico (mg/ml) basándose en la cantidad de las proteínas totales (mg/ml) en la solución del anticuerpo es importante y puede usarse preferiblemente un anticuerpo (solución de anticuerpo) que contenga el anticuerpo específico en una cantidad no inferior al 14% en peso. Con respecto al anticuerpo monoclonal, puede usarse un anticuerpo (solución de anticuerpo) obtenido por purificación de ascites o medio de cultivo que contenga el anticuerpo específico como un material de partida, que se obtuvo en el cultivo de hibridomas produciendo el anticuerpo en la cavidad abdominal de un ratón o en un aparato de cultivo. Como en el caso del anticuerpo policlonal, puede usarse preferiblemente un anticuerpo monoclonal (solución de anticuerpo) que contenga el anticuerpo específico en una cantidad (mg/ml) no inferior al 14% en peso basándose en la cantidad total (mg/ml) de proteínas.

[0029] La cantidad de las proteínas totales (mg/ml) en la solución del anticuerpo puede medirse mediante un método conocido en el que se mide la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm. La cantidad del anticuerpo específico puede medirse mediante el método convencional de Becker (Experimental Methods A in Immunology, páginas 164-171, 1976, publicado por Japanese Society por Immunology; Original article: Becker W.:

Immunochemistry, 6: 539-546, 1969).

[0030] En el método de la presente invención, se usan dos tipos de partículas grandes y pequeñas, con diferente tamaño medio de partícula. Las partículas de látex que tienen el mayor tamaño medio de partícula (partículas de látex grandes) tienen un tamaño medio de partícula (diámetro) de 0,15 a 0,29 μm, preferiblemente de 0,20 a 0,29 μm. Si el tamaño medio de partícula de las partículas de látex grandes está dentro de este intervalo, se consigue una alta sensibilidad de medición en el intervalo de baja concentración. Por otro lado, el tamaño medio de partícula (diámetro) de las partículas de látex que tienen el menor tamaño medio de partícula (partículas de látex pequeñas) es de 0,05 a 0,10 μm, preferiblemente de 0,06 a 0,08 μm. Si el tamaño medio de partícula de las partículas de látex pequeñas está dentro de este intervalo, puede obtenerse una medición precisa en el intervalo de alta concentración, de manera que el intervalo de concentración en el que puede obtenerse la medición se extiende hacia el lado de alta concentración.

[0031] Como partículas de látex, pueden emplearse aquellas partículas convencional y ampliamente usadas, tales como, por ejemplo, las fabricadas de un polímero de poliestireno, estireno-butadieno, copolímero de estireno-estireno sulfonato.

[0032] Las partículas de látex grandes y pequeñas descritas anteriormente se sensibilizan con el mismo anticuerpo específico o el mismo fragmento de unión a antígeno del mismo. La sensibilización de las partículas de látex con el anticuerpo específico o el fragmento de unión a antígeno del mismo puede realizarse mediante un método convencional bien conocido. Por ejemplo, la sensibilización puede obtenerse suspendiendo las partículas de látex en una solución del anticuerpo específico o el fragmento de unión a antígeno del mismo y agitando la suspensión para adsorber físicamente el anticuerpo específico o el fragmento de unión a antígeno del mismo.

[0033] En la presente invención, la cantidad (media) del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que inmoviliza una partícula de las partículas pequeñas es del 0,5 al 10% en peso de la cantidad (media) del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que inmoviliza una partícula de las partículas grandes. Como la tasa de reacción puede disminuirse disminuyendo la cantidad del anticuerpo inmovilizado sobre las partículas de látex, la cantidad óptima del anticuerpo puede seleccionarse a partir del transcurso de tiempo medido de la reacción. De este modo, la curva

de calibración puede ampliarse hacia el lado del intervalo de alta concentración, y el intervalo de concentración en el que puede obtenerse la medición se amplia hacia el lado de alta concentración. La cantidad de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo inmovilizado sobre las partículas puede ajustarse libremente diluyendo el anticuerpo específico o el fragmento de unión a antígeno del mismo con una solución tampón. La cantidad optima de sensibilización dentro del intervalo descrito anteriormente puede seleccionarse apropiadamente dependiendo del tipo del antígeno a medir, del propósito de la medición, del intervalo de medición, de la titulación del anticuerpo etcétera (véanse los Ejemplos del Ensayo a continuación).

[0034] Por otra parte, a mayor cantidad de anticuerpo adsorbido sobre las partículas de látex, mayor tasa de reacción, y a mayor tamaño de partícula, mayor tasa de reacción. Por tanto, sensibilizando las partículas de látex grandes con el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo en una cantidad tan grande como sea posible, la sensibilidad de la medición en el intervalo de baja concentración aumenta. Por lo tanto, preferiblemente la cantidad del anticuerpo específico o fragmento de unión a antígeno del mismo inmovilizado sobre las partículas de látex grandes es tan grande como sea posible. Por lo tanto, se prefiere la cantidad del 85% al 120%, más preferiblemente del 95% al 120% de la cantidad de adsorción máxima sobre la línea de isoterma de adsorción del 100%. Sin embargo, la cantidad del anticuerpo específico o fragmento de unión a antígeno del mismo puede seleccionarse apropiadamente dependiendo del tipo de antígeno a medir, del propósito de la medición, del intervalo de medición, de la titulación del anticuerpo etcétera. La cantidad de adsorción máxima sobre la línea de isoterma de adsorción del 100% puede determinarse fácilmente basándose en el concepto de isoterma de adsorción bien conocido en la técnica de la química de superficie. Este método se describe, por ejemplo, en Microparticle Reagent Optimization, Seradyn, Inc. 1994, y se describirá con detalle a continuación.

[0035] La cantidad de adsorción máxima sobre la línea del 100% mostrada por la isoterma de adsorción (línea de isoterma de adsorción del 100%) puede determinarse concretamente como sigue: Es decir, la cantidad de proteína (μg) por 1 mg de partículas de látex, cuya proteína se añadió durante la etapa de sensibilización de las partículas de látex, se toma a lo largo del eje X, y la cantidad de proteína adsorbida (μg) por 1 mg de partículas de

látex, que se midió después de la sensibilización se toma a lo largo del eje Y, preparando de esta manera una isoterma de adsorción. Después, se dibuja una línea recta de Y=X (línea de adsorción del 100%), y se determina la adsorción máxima sobre la línea de adsorción del 100%. Para explicar esto de manera más comprensiva, en la Figura 4 se muestra un gráfico. La cantidad de la proteína adsorbida (μg) por 1 mg de las partículas de látex se determina midiendo la cantidad de proteína (μg) después de filtración la centrifugación del sobrenadante después de la sensibilización a través de una unidad de filtro de 0,1 μm (ULTRAFREE-MC, Milipore), y restando la cantidad medida de esta manera de la cantidad de proteína (μg) antes de la sensibilización. La proporción de adsorción (%) se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\textbf{Proporción de Adsorción (\%)} = \frac{\textbf{Cantidad de Proteína Adsorbida (μg)}}{\textbf{Cantidad de Proteína antes de la Sensibilización (μg)}}$$

[0036] En el método de la presente invención, la concentración de las partículas de látex grandes en el sistema de reacción es del 0,01 al 0,04% p/v, y la concentración de las partículas de látex pequeñas en el sistema de reacción es del 0,05 al 0,2% p/v. Si las concentraciones de las partículas de látex grandes y pequeñas están dentro de estos intervalos, puede obtenerse mejor una medición muy sensible en el intervalo de baja concentración y ampliar el intervalo de medición en el intervalo de alta concentración.

[0037] El método de aglutinación de látex de por sí, puede realizarse exactamente de la misma manera que el método convencional. Es decir, el método de aglutinación de látex puede realizarse mezclando en un tampón una muestra de ensayo y una suspensión de las partículas de látex grandes y pequeñas sensibilizadas descritas anteriormente y medir ópticamente la aglutinación producida por la reacción antígeno-anticuerpo. La medición óptica puede realizarse de la siguiente manera: Por ejemplo, cuando las partículas de látex sensibilizadas con el anticuerpo y una muestra de ensayo se mezclan en una celda fabricada de plástico o vidrio, si en la muestra de ensayo existe la sustancia antigénica a medir, las partículas de látex sensibilizadas con el anticuerpo aglutinan debido a la reacción antígeno-anticuerpo. En este momento, radiando una luz desde el exterior, con una longitud de onda adecuada seleccionada del intervalo de 0,3 μm a 2,4 μm y

midiendo el cambio de absorbancia, puede medirse la sustancia antigénica diana existente en la muestra de ensayo. El cambio de absorbancia puede medirse midiendo el cambio de absorbancia entre 60 segundos y 90 segundos desde el inicio de la reacción antígeno-anticuerpo. Sin embargo, el tiempo de medición no está limitado a este intervalo, y la sustancia antigénica diana puede medirse midiendo el cambio de absorbancia o similar durante un periodo de tiempo arbitrario dentro de una fase de la reacción relativamente temprana. Dado que la tasa de aglutinación se correlaciona con el nivel de antígeno en la muestra de ensayo, el nivel de antígeno en una muestra de ensayo puede determinarse aplicando la tasa de aglutinación medida con respecto a una curva de calibración que se preparó preliminarmente sometiendo algunas soluciones convencionales con niveles de antígeno conocidos, respectivamente, a la reacción y midiendo la tasa de aglutinación. La temperatura de reacción no está limitada y normalmente se prefiere una temperatura de aproximadamente 37ºC.

[0038] El antígeno que puede medirse por el método de la presente invención no se limita en absoluto y por el método de la presente invención puede medirse cualquier antígeno cuyo anticuerpo correspondiente pueda preparase. Los ejemplos del antígeno incluyen proteínas que sirven como un marcador de enfermedades tales como la proteína C-reactiva (CRP), y patógenos tales como bacterias y virus, pero el antígeno no se limita a esto. La muestra de ensayo tampoco se limita en absoluto y ejemplos de los mismos incluyen, pero sin limitación, fluidos corporales tales como suero, plasma sanguíneo, orina y frotis de garganta; medios de cultivo; alimentos y bebidas y extractos de los mismos. En los casos en que es difícil obtener una medición exacta cuando se aplica un fluido corporal o similar a la medición debido a que el nivel de antígeno es demasiado alto, no es necesario decir, que como muestra de ensayo puede usarse una dilución del fluido corporal o similar diluida con solución salina fisiológica.

[0039] En la presente memoria también se describe un reactivo para usar en el método descrito anteriormente de acuerdo con la presente invención. Es decir, en este documento se describe un reactivo para medir un antígeno, en un tampón, por el método de aglutinación de látex, que comprende dos tipos de partículas grandes y pequeñas, con diferente tamaño medio de partícula; sensibilizándose cada una de las partículas de látex con el mismo anticuerpo o el mismo fragmento de unión a antígeno del mismo, cuyo anticuerpo se

somete a una reacción antígeno-anticuerpo con el antígeno de ensayo; teniendo el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, inmovilizado sobre la partícula de látex, una pureza no inferior al 14% en peso basándose en la cantidad total de proteínas transportada sobre la partícula; siendo la cantidad de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inmoviliza una partícula de las partículas pequeñas del 0,5 al 10 % en peso de la cantidad del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que inmoviliza una partícula de las partículas grandes; teniendo las partículas de látex grandes un tamaño medio de partícula de 0,15 a 0,29 μm; teniendo las partículas de látex pequeñas un tamaño medio de partícula de 0,05 μm a 0,10 μm.

[0040] Usando las partículas de látex pequeñas sensibilizadas, cuya tasa de reacción es pequeña, el método de la presente invención permite capturar eficazmente la sustancia antigénica en la muestra de ensayo dependiendo de la concentración de la misma, potenciando de esta manera la precisión de la medición. Por otra parte, en casos en los que la concentración de la sustancia antigénica en la muestra de ensayo sea muy pequeña, las partículas de látex grandes sensibilizadas capturarán preferencialmente la sustancia antigénica para producir aglutinación, de manera que un pequeño grado de reacción pueda detectarse como un gran cambio óptico. En casos en los que la concentración de la sustancia antigénica en la muestra de ensayo sea alta, el anticuerpo sobre las partículas de látex grandes, cuya tasa de reacción es alta, se consume rápidamente y las partículas de látex grandes sensibilizadas aglutinan instantáneamente. Por otra parte, las partículas de látex pequeñas sensibilizadas cuya tasa de reacción es baja mantienen lenta la reacción y la reacción de aglutinación de las partículas de látex pequeñas sensibilizadas se mantiene, por lo que la reacción puede continuar reduciendo al mismo tiempo el cambio óptico. De acuerdo con el método de la presente invención, estos efectos amplían el intervalo de medición y puede obtenerse la medición en el intervalo de baja concentración con una mayor sensibilidad. Además, de acuerdo con la presente invención, optimizando el tamaño medio de partícula de las partículas de látex grandes y pequeñas que transporta la cantidad optima del anticuerpo y optimizando la proporción de concentraciones de las mismas en el sistema de reacción, puede obtenerse la ampliación del intervalo de medición y especialmente el aumento de la sensibilidad de la medición en el intervalo de baja concentración.

[0041] El método de la presente invención se describirá ahora más concretamente a modo de Ejemplos de los mismos. Sin embargo, la presente invención no se limita a los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1 Medición de la CRP

[0042] Se sensibilizaron partículas de látex de poliestireno con un tamaño de partícula de 0,28 μm y partículas de látex de poliestireno con un tamaño de partícula de 0,06 μm con un anticuerpo policlonal anti-CRP de conejo (una solución de anticuerpo en la que la cantidad del anticuerpo específico (mg/ml) basándose en la cantidad de proteína total (mg/ml) fue del 17%), y las partículas de látex resultantes se suspendieron en tampón de glicina para preparar un reactivo. Es decir, el reactivo se preparó, en un tampón (MES 50 mM pH 6,0, MES: ácido 2-Morfolinoetanosulfónico, monohidratado) mezclando las cantidades de anticuerpo y las partículas de látex de poliestireno prescritas; agitando suficientemente la mezcla a temperatura ambiente durante 60 minutos, realizando de esta manera la sensibilización; extrayendo el sobrenadante después de la centrifugación; bloqueando las regiones no sensibilizadas en la superficie de las partículas de látex de poliestireno con tampón de glicina que contenía albúmina de suero bovino; recogiendo de nuevo las partículas de látex de poliestireno sensibilizadas con el anticuerpo mediante centrifugación y dispersando y suspendiendo las partículas de látex en tampón de glicina aplicando ultrasonido de una manera suficiente.

[0043] Se preparó un tipo de las partículas de látex de poliestireno con un tamaño de partícula de 0,28 μm sensibilizadas con el anticuerpo en una cantidad del 120% de la cantidad de adsorción máxima sobre la línea de adsorción del 100% mostrada por la isoterma de adsorción y tres tipos de partículas de látex de poliestireno con un tamaño de partícula de 0,06 μm sensibilizadas con el anticuerpo en una cantidad de 2,29, 1,61 o 1,45% en peso de la cantidad del anticuerpo inmovilizado por una partícula de las partículas de látex de poliestireno con un tamaño de partícula de 0,28 μm se preparó.

La cantidad del anticuerpo inmovilizado se controló concretamente realizando la sensibilización después de diluir preliminarmente el anticuerpo en un tampón (MES, 50mM, pH 6,0) a una concentración ajustada para la cantidad deseada del anticuerpo a inmovilizar.

Reactivos Constituidos por Cada Tipo de Partículas antes de Mezclar

[0044] Como ejemplos de los reactivos descritos en la presente memoria, se prepararon suspensiones de las partículas descritas anteriormente con un tamaño de partícula de 0,06 μm sensibilizadas con el anticuerpo en cantidades de 2,29, 1,61 y 1,45% en peso, respectivamente, suspendidas en tampón de glicina a una concentración de partícula de 0,175% (p/v) y se diseñó el Reactivo 1, Reactivo 2 y Reactivo 3, respectivamente. Se preparó una suspensión de las partículas transportadoras de anticuerpo con un tamaño de partícula de 0,28 μm suspendidas en tampón de glicina a una concentración del 0,04% (p/v) y diseñó el Reactivo 4.

Reactivo Constituido por Partículas Mezcladas

[0045] Se preparó un reactivo como se ha descrito en esta memoria mezclando las partículas transportadoras de anticuerpo con un tamaño de partícula de 0,28 μm y las partículas (las mismas partículas que las usadas en el Reactivo 2) con un tamaño de partícula de 0,06 μm transportando el anticuerpo en una cantidad del 1,61% en peso en tampón de glicina para obtener concentraciones de partícula del 0,04% (p/v) y 0,175% (p/v) respectivamente. Como ejemplo comparativo, se usó un reactivo preparado por el método descrito en la Bibliografía de Patente 5.

Como una muestra para la medición, se usaron CRP convencionales preparadas diluyendo antígeno CRP humano purificado con suero humano normal. Las concentraciones de la CRP convencionales eran de acuerdo con Preparaciones Patrón Internacionales de Proteínas Plasmáticas en Sangre CRM470. Se prepararon patrones que tenían concentraciones de 0,25, 0,50, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 48, 67 y 100 mg/dl, respectivamente. Como un patrón con una concentración de 0 mg/dl, se usó solución salina fisiológica. Las mediciones se realizaron usando el Analizador Automático para Ensayos Biomédicos TBA-80FR (producido por TOSHIBA) bajo los siguientes parámetros condicionales: Es decir, a 3 μl de la muestra para la medición, se añadieron 150 μl de tampón de glicina como un primer reactivo, y 150 μl del reactivo preparado como un segundo reactivo, y el analizador se ajustó de manera que el cambio en absorbancia (ΔABS/min) por 1 minuto entre el Punto Fotométrico 21 y el Punto Fotométrico 27 después del comienzo de la reacción (después de añadir el segundo reactivo) se midió a una longitud de

onda de 572 cm. ΔABS/min x 10.000 se definió como el cambio en absorbancia.

Ejemplo de ensayo 1

[0046] Se prepararon las curvas de calibración mostrando la relación entre el nivel de la CRP y la cantidad de cambio en absorbancia, usando el Reactivo 1, 2 y 3, respectivamente. Esto se muestra en la Figura 1. Como se muestra en la Figura 1, con el Reactivo 1, dado que la tasa de reacción es alta, la curva de calibración se eleva a sólo 48 mg/dl. Con el Reactivo 2, dado que la tasa de reacción es menor que con el Reactivo 1, la curva de calibración se eleva a 100 mg/dl. Con el Reactivo 3, dado que la tasa de reacción es demasiado baja, la elevación inicial de la curva de calibración es baja. Además, dado que la cantidad de anticuerpo necesaria para la reacción es insuficiente, la curva de calibración se eleva a sólo 67 mg/dl. A partir de estos resultados, puede observarse que usando el Reactivo 2, la curva de calibración se eleva en el intervalo de alta concentración, de manera que puede conseguirse la medición precisa en el intervalo de alta concentración y la ampliación del intervalo de concentración medible en el lado de alta concentración. Por lo tanto, el efecto de ralentizar la reacción preparando la cantidad de anticuerpo adsorbido a las pequeñas partículas de látex es evidente

Ejemplo de ensayo 2

[0047] Se preparó una curva de calibración mostrando la relación entre el nivel de la CRP y la cantidad de cambio en absorbancia usando el Reactivo 4. Esto se muestra en las Figuras 2A y 2B. La Figura 2B muestra a mayor escala el área del nivel de la CRP de 0 a 2 mg/dl. La curva de calibración se eleva bien en el intervalo de baja concentración entre 0 y 0,25 mg/dl, de manera que puede observarse que la sensibilidad de la medición es mayor. Sin embargo, dado que el anticuerpo reacciona instantáneamente, la curva de calibración se eleva en el intervalo de alta concentración.

Ejemplo de Ensayo 3

[0048] Se prepararon curvas de calibración mostrando la relación entre el nivel de la CRP y la cantidad de cambio en absorbancia usando el reactivo descrito en este documento y el reactivo de acuerdo con el Ejemplo

Comparativo, respectivamente. Esto se muestra en las Figuras 3A y 3B. La Figura 3B muestra a mayor escala el área del nivel de la CRP de 0 a 8 mg/dl. Como muestran los resultados con el reactivo descrito en este documento, se consigue la detección con mayor sensibilidad que con el reactivo del Ejemplo Comparativo en el intervalo de baja concentración entre 0 y 2 mg/dl (véase Figura 3B). Además, en el intervalo de alta concentración, mientras que con el reactivo de acuerdo con el Ejemplo Comparativo puede conseguirse una medición solo hasta 67 mg/dl, con el reactivo descrito en este documento la medición puede conseguirse hasta 100 mg/dl (véase Figura 3A). Como se muestra en las Figuras 3A y 3B, con el reactivo descrito en este documento, puede conseguirse la medición con una mayor sensibilidad en el intervalo de bajo nivel de CRP y la medición puede conseguirse hasta un intervalo de mayor concentración que con el reactivo de acuerdo con el Ejemplo Comparativo. Además, comparando las dos curvas de calibración obtenidas con el Reactivo 2 mostrado en la Figura 1 y obtenidas con el reactivo descrito en este documento mostrado en la Figura 3A, puede observarse que con el reactivo descrito en este documento, el cambio en absorbancia en el intervalo de alta concentración de 67 a 100 mg/dl es mas grande que con el Reactivo 2, de manera que puede observarse que mezclando los dos tipos de partículas también es eficaz para amplificar la cantidad de cambio en absorbancia. A partir de estos resultados, es evidente que el método de la presente invención que usa dos tipos de partículas de látex grandes y pequeñas, con diferentes tamaños medios de partícula, en las que se inmovilizan las cantidades prescritas del mismo anticuerpo, respectivamente, es decir, usando partículas de látex grandes sensibilizadas que muestran una alta tasa de reacción y partículas de látex pequeñas sensibilizadas que muestran una baja tasa de reacción, es superior.

Disponibilidad Industrial

[0049] Mediante el inmunoensayo de acuerdo con la presente invención, puede conseguirse una medición altamente sensible en el intervalo de baja concentración y ampliar el intervalo de medición en el intervalo de alta concentración, de manera que la precisión de la medición en el intervalo de baja concentración, que es importante para el criterio clínico en los ensayos inmunoserológicos y similares, aumenta y puede hacerse un criterio más preciso. Por lo tanto, la presente invención es útil en inmunoensayos

mediante el método de aglutinación de látex ampliamente usado en diagnósticos de diversas enfermedades y similares.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para medir un antígeno de ensayo mediante aglutinación de látex usando partículas de látex sensibilizadas, comprendiendo dicho procedimiento:

hacer reaccionar partículas de látex sensibilizadas suspendidas en un tampón con dicho antígeno de ensayo; siendo dichas partículas de látex sensibilizadas dos tipos de partículas grandes y pequeñas, que tienen diferentes tamaños medios de partícula, sensibilizándose cada una de dichas partículas de látex con el mismo anticuerpo o el mismo fragmento de unión a antígeno del mismo, cuyo anticuerpo se somete a una reacción antígeno-anticuerpo con dicho antígeno de ensayo; teniendo dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, inmovilizado sobre dichas partículas de látex, una pureza no inferior al 14% en peso basado sobre la cantidad total de proteínas transportadas sobre dichas partículas; siendo la cantidad de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, inmovilizado por una partícula de dichas partículas pequeñas, del 0,5 al 10% en peso de la cantidad de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo inmovilizado por una partícula de dichas partículas grandes; teniendo dichas partículas de látex grandes un tamaño medio de partícula de 0,15 a 0,29 μm; teniendo dichas partículas de látex pequeñas un tamaño medio de partícula de 0,05 μm a 0,10 μm; siendo la concentración de dichas partículas de látex grandes en el sistema de reacción antígeno-anticuerpo del 0,01 al 0,04% p/v; siendo la concentración de dichas partículas de látex pequeñas en el sistema de reacción antígeno-anticuerpo del 0,05 a 0,2% p/v; y

medir ópticamente la aglutinación de dichas partículas de látex sensibilizadas.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se inmoviliza sobre dicha partícula de látex grande en una cantidad del 85% al 120% de la cantidad de adsorción máxima sobre una línea isoterma de adsorción del 100%.

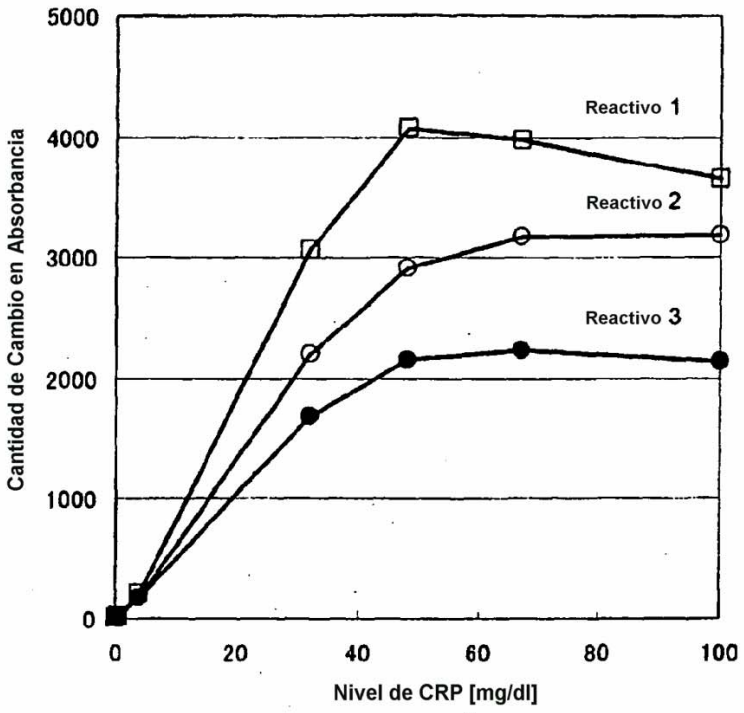
5000
4000
3000
2000
1000
0
Cantidad de Cambio en Absorbancia
Reactivo 1
Reactivo 2
Reactivo 3
0
20
40
60
80
100
Nivel de CRP [mg/dl]

Fig.1

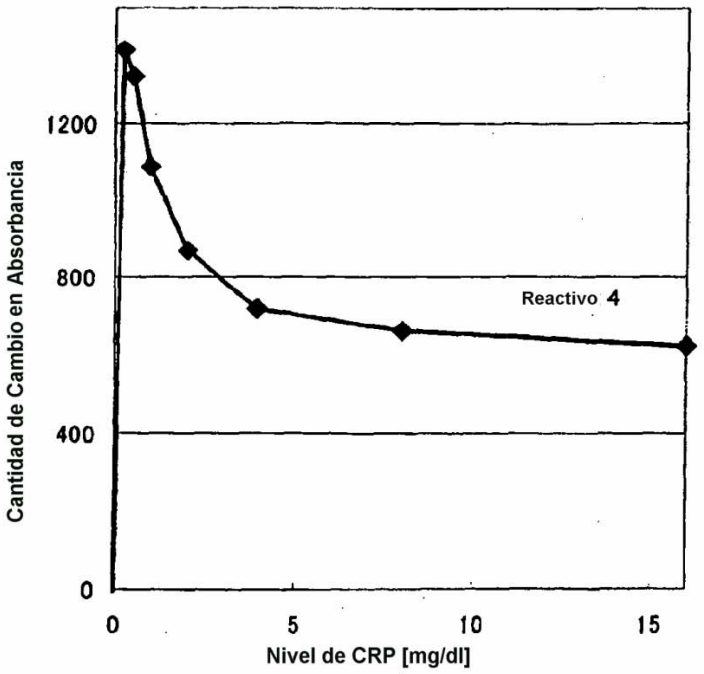
1200
800
400
0
Cantidad de Cambio en Absorbancia
Reactivo 4
0
5
10
15
Nivel de CRP [mg/dl]

Fig.2A

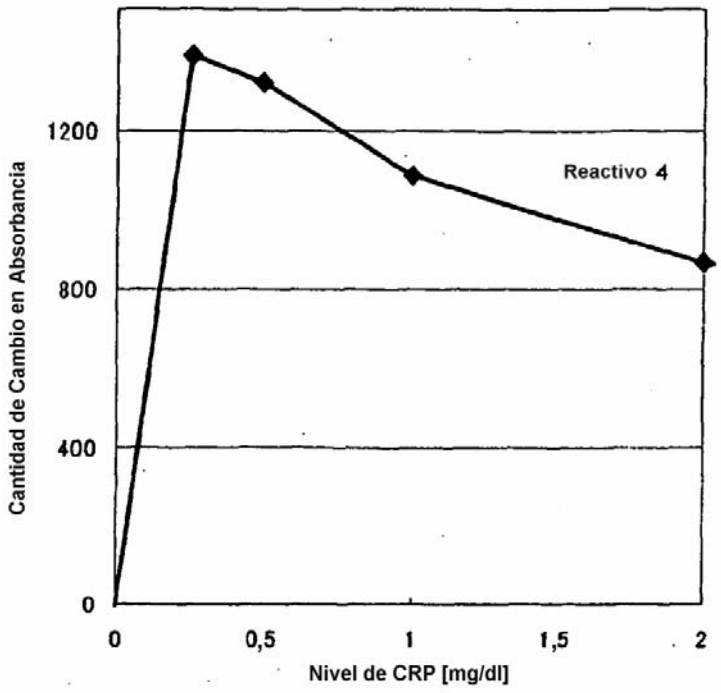
Cantidad de Cambio en Absorbancia
1200
800
400
0
Reactivo 4
0
0,5
1
1,5
2
Nivel de CRP [mg/dl]

Fig.2B

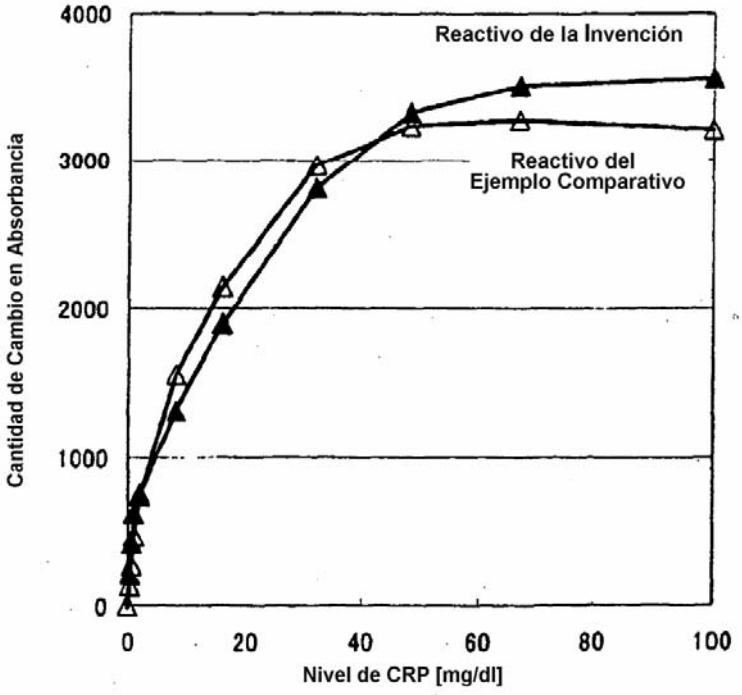
Cantidad de Cambio en Absorbancia
4000
3000
2000
1000
0
Reactivo de la Invención
Reactivo del
Ejemplo Comparativo
0
20
40
60
80
100
Nivel de CRP [mg/dl]

Fig.3A

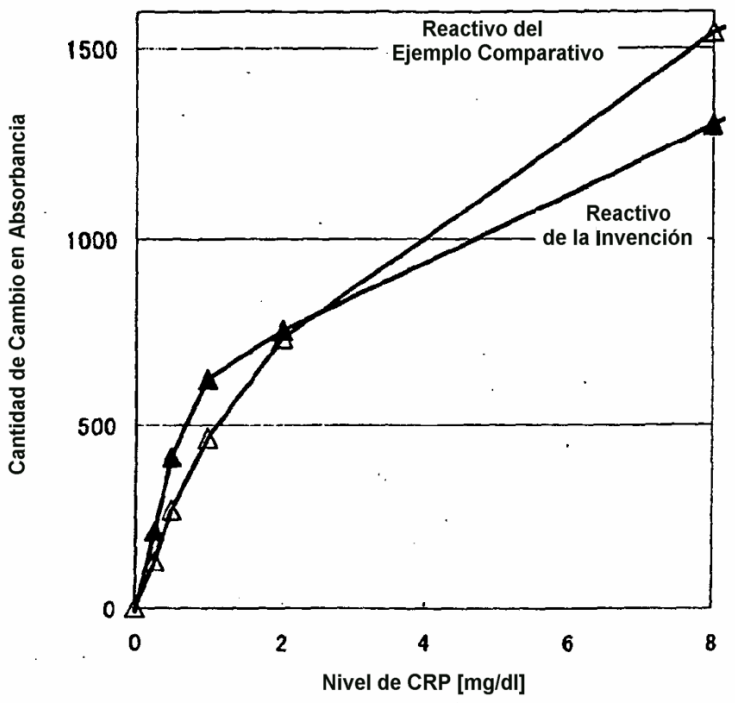
Reactivo del
Ejemplo Comparativo
Reactivo
de la Invención
Cantidad de Cambio en Absorbancia
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
Nivel de CRP [mg/dl]

Fig.3B

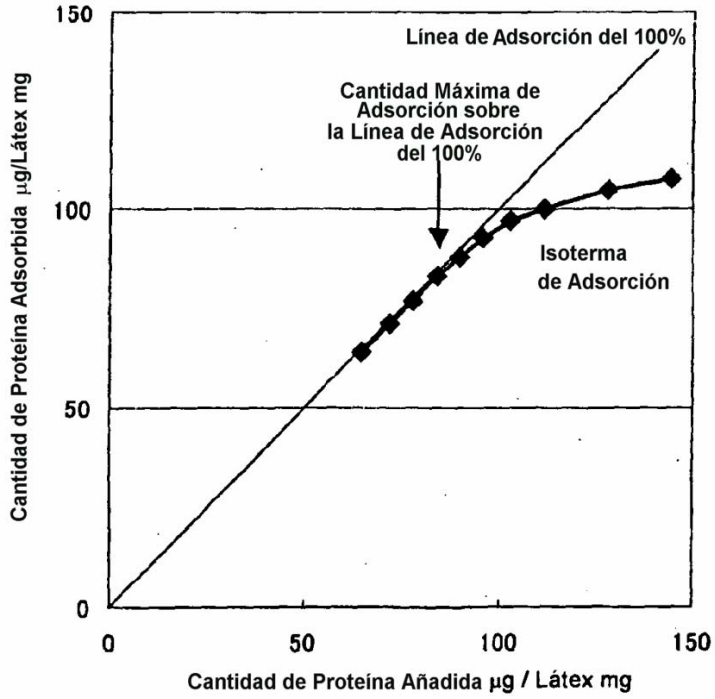
Línea de Adsorción del 100%
Cantidad Máxima de
Adsorción sobre
la Línea de Adsorción
del 100%
Isoterma
de Adsorción
Cantidad de Proteína Adsorbida µg/Látex mg
150
100
50
0
0
50
100
150
Cantidad de Proteína Añadida µg / Látex mg

Fig.4

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- JP 63014783 B **[0004]**
- JP 2588174 B **[0004]**
- JP 10090268 A **[0004]**
- JP 11108929 A **[0004]**
- JP 3513075 A **[0004]**
- EP 0898169 A **[0007]**
- US 2001026945 A **[0008]**

Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- *Journal of Clinical Laboratory Analysis,* 1988, vol. 12, 137-144 **[0004]**
- *Japanese Journal of Medicine and Pharmaceutical Science,* 1999, vol. 42 (5), 781-788 **[0004]**
- **Sanchez A. et al.** *Clin.,* 2002, vol. 48 (5-6), 313-317 **[0005]**
- **Eda S. et al.** *Scand. J. Clin. Lab. Invest.,* 1999, vol. 230, 32-35 **[0006]**
- **Eda S. et al.** *J. Clin. Lab. Anal.,* 1998, vol. 12 (3), 137-144 **[0009]**
- **Katano S.** *Igaku to Yakugaku J. Med.,* 1999, vol. 42 (5), 781-788 **[0010]**
- **Benecky M. et al.** *Clin. Chem.,* 1997, vol. 43 (9), 1764-1770 **[0011]**
- **Tarkkinen P. et al.** *Clin. Chem.,* 2002, vol. 48 (2), 269-277 **[0012]**
- **Holownia P. et al.** *Anal. Chem.,* 2001, vol. 73 (14), 3426-3431 **[0013]**
- **Perez-Amodio S. et al.** *Anal. Chem.,* 2001, vol. 73 (14), 3417-3425 **[0014]**
- **Peula JM. et al.** *J. Biomaterials Sci.,* 1995, vol. 7 (3), 241-251 **[0015]**
- Microparticle reagent optimization. **Griffen C. et al.** Microparticle reagent optimization. SERADYN INC, 1994 **[0017]**
- **Borque et al.** *Clin. Chem.,* 2000, vol. 46 (11), 1839-1842 **[0018]**
- **Kondo et al.** *Biotech. and Bioeng.,* 1991, vol. 37, 537-543 **[0019]**
- **Giacomelli et al.** *J. Colloid and Interface Sci.,* 2000, vol. 231, 283-288 **[0020]**
- Experimental Methods A in Immunology. Japanese Society for Immunology, 1976, 164-171 **[0029]**
- **Becker W.** *Immunochemistry,* 1969, vol. 6, 539-546 **[0029]**
- Microparticle Reagent Optimization. Seradyn, Inc, 1994 **[0034]**