



(10) 授权公告号 CN 109154609 B

(45) 授权公告日 2022.08.05

(21) 申请号 201780031673.5	专利权人 JSR生命科学株式会社 JSR微有限公司 JSR微公司
(22) 申请日 2017.05.23	
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 109154609 A	(72) 发明人 益田刚明 小野木俊介
(43) 申请公布日 2019.01.04	(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227 专利代理师 左嘉勋 顾晋伟
(30) 优先权数据 2016-103569 2016.05.24 JP	(51) Int.Cl. G01N 33/553 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2018.11.22	(56) 对比文件 CN 101977711 A, 2011.02.16 CN 102634125 A, 2012.08.15 US 2004/0115433 A1, 2004.06.17
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/JP2017/019166 2017.05.23	审查员 赵晓明
(87) PCT国际申请的公布数据 W02017/204209 JA 2017.11.30	权利要求书1页 说明书18页 附图1页
(73) 专利权人 JSR株式会社 地址 日本东京都	

(54) 发明名称

复合粒子、被覆粒子、复合粒子的制造方法、含有配体的固相载体以及对试样中的靶物质进行检测或分离的方法

(57) 摘要

本发明涉及复合粒子、被覆粒子、复合粒子的制造方法、含有配体的固相载体以及对试样中的靶物质进行检测或分离的方法,该复合粒子是含有有机高分子和无机纳米粒子的复合粒子,该复合粒子中的所述无机纳米粒子的含量超过80质量%,体积平均粒径为10~1000nm。

1. 一种被覆粒子的制造方法,包括下述工序(1)~(4),

工序(1):将含有磁性体的磁性流体、单体和聚合引发剂以下述复合粒子中的所述磁性体的含量超过80质量%、下述复合粒子中的有机高分子的含量为10质量%以上、下述复合粒子中的来自苯乙烯系单体的构成单元的含量相对于该复合粒子所含的有机高分子的总量100质量%为80~90质量%的方式混合而制备单体混合液的工序,其中,所述单体是苯乙烯系单体或者由交联性单体与苯乙烯系单体构成,

工序(2):使所述单体混合液分散而制备乳液的工序,

工序(3):使所述乳液中的单体聚合的工序,

工序(4):在所述工序(3)中得到的复合粒子的存在下,

将选自芳香族乙烯基单体、不饱和腈、(甲基)丙烯酸甲酯、(甲基)丙烯酸乙酯、(甲基)丙烯酸丁酯、(甲基)丙烯酸2-乙基己酯、(甲基)丙烯酸月桂酯、乙二醇二(甲基)丙烯酸酯、(甲基)丙烯酸环己酯、(甲基)丙烯酸缩水甘油酯和丙烯醛中的乙烯基系单体进行均聚,

将2种以上的所述乙烯基系单体进行共聚,

将所述乙烯基系单体与选自共轭二烯烃、邻苯二甲酸二烯丙酯、(甲基)丙烯酸烯丙酯和三羟甲基丙烷三(甲基)丙烯酸酯中的单体进行共聚,或者

将所述乙烯基系单体与选自共轭二烯烃、单或二羧酸化合物、单或二羧酸化合物的酸酐、(甲基)丙烯酰胺、N-羟甲基(甲基)丙烯酰胺、N-异丙基(甲基)丙烯酰胺、(甲基)丙烯酸2-羟基乙酯、甘油单(甲基)丙烯酸酯、以链数2~40的聚乙二醇或聚丙二醇为侧链的(甲基)丙烯酸酯、邻苯二甲酸二烯丙酯、(甲基)丙烯酸烯丙酯、三羟甲基丙烷三(甲基)丙烯酸酯、苯乙烯磺酸、苯乙烯磺酸的钠盐、2-丙烯酰胺-2-甲基丙磺酸、2-丙烯酰胺-2-甲基丙磺酸的钠盐、异戊二烯磺酸、异戊二烯磺酸的钠盐、三乙基铵(甲基)丙烯酸酯和二甲基氨基(甲基)丙烯酸酯中的单体进行共聚的工序。

复合粒子、被覆粒子、复合粒子的制造方法、含有配体的固相载体以及对试样中的靶物质进行检测或分离的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及复合粒子、被覆粒子、复合粒子的制造方法、含有配体的固相载体以及对试样中的靶物质进行检测或分离的方法。

背景技术

[0002] 近年来,磁性粒子等由于能够在抗原与抗体的免疫反应、DNA彼此或DNA与RNA的杂交等中提供优异的反应场所,因此,正在积极地应用于特别是诊断药、医药品研究用等。

[0003] 如果在这样的用途中使用粒径小的磁性粒子,则该磁性粒子虽然具有每单位质量的表面积大、生化物质的结合量多的优点,但具有磁分离时间长、即、磁分离性差的缺点。另一方面,在要缩短磁分离时间的情况下,即,在重视磁分离性的情况下,例如如专利文献1中记载的那样应使用粒径大的磁性粒子,但一般而言,磁性粒子的粒径越大,每单位质量能够结合的生化物质的结合量越减少。即,难以兼具增加生化物质结合量以及优异的磁分离性。

[0004] 特别是以往的磁性粒子由于磁性体含量少,因此,例如存在在使磁性粒子小粒径化的情况下,集磁性低,或者在分散于液体中的状态下无法进行磁分离等问题。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:日本特开平6-148189号公报

发明内容

[0008] 本发明的一个实施方式提供以高含量含有磁性体等无机纳米粒子的复合粒子。

[0009] 另外,本发明的一个实施方式提供能够以高生产效率容易地制造即使为小粒径、磁分离性能也优异的期望形状的复合粒子的方法。

[0010] 本发明人等为了解决上述课题进行了深入研究,结果发现利用下述构成的复合粒子等,能够解决上述课题,以至完成了本发明。

[0011] 本发明的构成例如下。

[0012] 应予说明,在本说明书中,表示数值范围等的记载“A~B”是指A以上B以下,在该数值范围包含A和B。

[0013] <1>一种复合粒子,是含有有机高分子和无机纳米粒子的复合粒子,

[0014] 所述复合粒子中的所述无机纳米粒子的含量超过80质量%,

[0015] 体积平均粒径为10~1000nm。

[0016] <2>根据<1>所述的复合粒子,其中,体积平均粒径的变动系数为20%以下。

[0017] <3>根据<1>或<2>所述的复合粒子,其中,所述无机纳米粒子的含量超过80质量%且为95质量%以下。

[0018] <4>根据<1>~<3>中任一项所述的复合粒子,其中,所述无机纳米粒子的体积平均粒径为5~25nm。

[0019] <5>根据<1>~<4>中任一项所述的复合粒子,其中,所述复合粒子含有选自表面活性剂、含酸基的化合物、含氨基的化合物、含硅烷基的化合物和含钛原子的化合物中的至少一种。

[0020] <6>根据<1>~<5>中任一项所述的复合粒子,其中,所述无机纳米粒子为能够磁化的粒子。

[0021] <7>根据<1>~<6>中任一项所述的复合粒子,其中,所述无机纳米粒子由无机材料构成,所述无机材料选自铁、钛、钴、锌、铜、锰、镍或钐的单质、它们的氧化物或者它们的合金以及铁氧体类中的1种或2种以上。

[0022] <8>根据<1>~<7>中任一项所述的复合粒子,其中,所述无机纳米粒子为金属氧化物粒子。

[0023] <9>根据<1>~<8>中任一项所述的复合粒子,为磁性粒子。

[0024] <10>根据<1>~<9>中任一项所述的复合粒子,具有能够物理吸附至少一个配体的表面。

[0025] <11>根据<1>~<10>中任一项所述的复合粒子,具有能够与至少一个配体化学键合的表面。

[0026] <12>一种被覆粒子,具有<1>~<11>中任一项所述的复合粒子以及被覆所述粒子的聚合物层。

[0027] <13>一种复合粒子的制造方法,包括下述工序(1)~(3),

[0028] 工序(1):将磁性流体、单体和聚合引发剂混合而制备单体混合液的工序,

[0029] 工序(2):使所述单体混合液分散而制备乳液的工序,

[0030] 工序(3):使所述乳液中的单体聚合的工序。

[0031] <14>一种含有配体的固相载体,选自<1>~<11>中任一项所述的复合粒子和<12>所述的被覆粒子中的固相载体具有配体。

[0032] <15>根据<14>所述的含有配体的固相载体,其中,所述配体为选自抗体、抗原、核酸、核苷酸、核苷、蛋白质、肽、氨基酸、多糖、糖、脂质、维生素、药物、底物、激素和神经递质中的至少一种。

[0033] <16>根据<1>~<11>中任一项所述的复合粒子、<12>所述的被覆粒子或者<14>或<15>所述的含有配体的固相载体,用于免疫测定或用于核酸检测。

[0034] <17>一种对试样中的靶物质进行检测或分离的方法,使用<14>或<15>所述的含有配体的固相载体。

[0035] 本发明的一个实施方式能够提供以高含量含有磁性体等无机纳米粒子的复合粒子。特别是能够提供一种复合粒子,该复合粒子尽管体积平均粒径如上所述小并且以高含量含有无机纳米粒子,也不易产生无机纳米粒子彼此的凝聚。

[0036] 这样的复合粒子能够适用作特别是需要以高含量含有无机纳米粒子的粒子的生物工程、诊断和制药等领域中的保持体、固相载体或介质。

[0037] 另外,本发明的一个实施方式能够以高生产效率容易地制造磁分离性能优异、期望形状的(例如:凝聚体的产生得到抑制,大致球状)复合粒子。

附图说明

[0038] 图1表示实施例1中得到的复合粒子的粒径分布。

[0039] 图2表示比较例1中得到的复合粒子的粒径分布。

具体实施方式

[0040] 《复合粒子》

[0041] 本发明的一个实施方式的复合粒子是含有有机高分子和无机纳米粒子的复合粒子,是该无机纳米粒子的含量超过80质量%、体积平均粒径为10~1000nm的粒子。在本说明书中,“复合粒子”只要是含有有机高分子和无机纳米粒子的粒子就没有特别限定,优选为在有机高分子中含有无机纳米粒子的粒子,更优选为在由有机高分子构成的基体中分散有无机纳米粒子的粒子,特别优选为磁性粒子。

[0042] 作为本发明的一个实施方式的复合粒子中的无机纳米粒子的含量超过80质量%。该含量的下限优选为82质量%,更优选为85质量%,上限优选为95质量%,更优选为92质量%。

[0043] 如果无机纳米粒子的含量在上述范围,则成为能够更适用作生物工程、诊断和制药等领域中的保持体、固相载体或介质的复合粒子,在该无机纳米粒子为磁性体即磁性粒子的情况下,能够得到磁分离性能和物理强度优异的复合粒子,因而优选。

[0044] 作为本发明的一个实施方式的复合粒子的体积平均粒径(以下也简称为“粒径”)为10~1000nm,优选为50~700nm,更优选为80~600nm。

[0045] 如果复合粒子的粒径为上述范围,则能够容易地得到操作性优异、虽然以高含量含有无机纳米粒子也不易引起粒子彼此的凝聚的复合粒子。

[0046] 如果上述粒径小于10nm,则得到的复合粒子的磁响应性差,如果超过1000nm,则复合粒子的单位质量的表面积变小,因此,反应性差,或者生化物质的结合量变少。

[0047] 作为本发明的一个实施方式的复合粒子由于粒径在上述范围,因此,例如在诊断药、医药品研究用等中使用作为本发明的一个实施方式的复合粒子的情况下,能够增多该复合粒子的每单位质量能够结合的配体、优选生化物质(例如:抗体、抗体片段、蛋白质、多肽、多核苷酸、核酸、核酸片段、酶)的结合量。特别是在无机纳米粒子为磁性体的情况下,即使为上述粒径的复合粒子,也成为磁分离性能优异的复合粒子,因此,能够兼具现有技术难以实现的增多生化物质结合量以及优异的磁分离性。

[0048] 作为本发明的一个实施方式的复合粒子优选粒径的变动系数(CV值)为20%以下。

[0049] 如果CV值在上述范围,则能够容易地得到偏差少、容易发挥期望的特性的复合粒子,特别是在为含有磁性体的复合粒子的情况下,在磁分离时分离时间不易产生偏差,因而优选。

[0050] 上述粒径和CV值例如可以使用动态光散射式粒径分布测定装置(日机装株式会社、Nanotracs UPA-EX150)进行测定,CV值具体而言可以由下述式算出。

[0051] $CV(\%) = (\text{粒径标准偏差}(\sigma) / \text{数均粒径}(D_n)) \times 100$

[0052] 作为本发明的一个实施方式的复合粒子只要含有有机高分子和无机纳米粒子就没有特别限制,也可以含有这些以外的其它成分,例如,在制造该复合粒子时使用磁性流体的情况下,可以含有该磁性流体中所含的以往公知的成分。

[0053] <有机高分子>

[0054] 上述有机高分子具有作为本发明的一个实施方式即复合粒子的基体的作用。

[0055] 作为上述有机高分子,可以使用公知的高分子,没有特别限定,优选例如将具有烯键式不饱和键的单体聚合而成的高分子。作为该单体,可举出苯乙烯系单体、氯乙烯、乙烯基酯类、不饱和腈类、(甲基)丙烯酸酯和它们的衍生物等。

[0056] 作为上述单体,具体而言,可举出苯乙烯、 α -甲基苯乙烯、对甲基苯乙烯、对氯苯乙烯、氯甲基苯乙烯等苯乙烯系单体;氯乙烯;乙酸乙烯酯、丙酸乙烯酯等乙烯基酯类;丙烯腈等不饱和腈类;(甲基)丙烯酸甲酯、(甲基)丙烯酸乙酯、(甲基)丙烯酸丁酯、(甲基)丙烯酸2-乙基己酯、(甲基)丙烯酸硬脂酯、乙二醇(甲基)丙烯酸酯、(甲基)丙烯酸三氟乙酯、(甲基)丙烯酸五氟丙酯、(甲基)丙烯酸环己酯、(甲基)丙烯酸四氢糠酯等(甲基)丙烯酸酯和它们的衍生物等,但并不限于这些例示。

[0057] 这些单体可以单独使用,也可以使用2种以上。

[0058] 上述有机高分子可以具有来自交联性单体的构成单元,也可以通过该构成单元进行交联。作为该交联性单体,例如可举出二乙烯基苯、乙二醇二(甲基)丙烯酸酯、1,6-己二醇二(甲基)丙烯酸酯、新戊二醇二(甲基)丙烯酸酯、三羟甲基丙烷三(甲基)丙烯酸酯、四羟甲基甲烷三(甲基)丙烯酸酯、四羟甲基丙烷四(甲基)丙烯酸酯、邻苯二甲酸二烯丙酯及其异构体、异氰脲酸三烯丙酯和它们的衍生物,但并不限于这些例示。

[0059] 这些交联性单体可以单独使用,也可以使用2种以上。

[0060] 作为上述有机高分子,从得到在水系介质中的分散性等优异的复合粒子等方面考虑,优选含有来自苯乙烯系单体的构成单元的高分子。

[0061] 从得到在水系介质中的分散性等更优异的复合粒子等方面考虑,将复合粒子中所含的有机高分子的总量设为100质量%,来自苯乙烯系单体的构成单元的含量优选为60~100质量%,更优选为70~95质量%,进一步优选为80~90质量%。

[0062] 从能够容易地得到具有能够与至少一个配体化学键合的表面的复合粒子,具体而言,能够介由反应性官能团结合抗原、抗体等的复合粒子等方面考虑,上述有机高分子除了来自上述单体的构成单元以外还可以具有来自含有反应性官能团的乙烯基单体的构成单元。

[0063] 作为上述反应性官能团,优选为能够通过共价键将抗原、抗体等结合的基团,只要根据期望的用途适当选择即可,例如可举出羧基、羟基、环氧基、氨基、三乙基铵基、二甲基氨基、磺酸基。作为含有这样的反应性官能团的乙烯基单体,例如可举出(甲基)丙烯酸、(甲基)丙烯酸-2-羟基乙酯、(甲基)丙烯酸缩水甘油酯、三乙基铵(甲基)丙烯酸酯、二甲基氨基(甲基)丙烯酸酯,但并不限于这些例示。

[0064] 这些含有反应性官能团的乙烯基单体可以单独使用,也可以使用2种以上。

[0065] 从能够容易地得到将无机纳米粒子牢固地保持且物理强度优异的复合粒子等方面考虑,并且在无机纳米粒子为磁性体的情况下,能够得到磁分离性能进一步优异的复合粒子等方面考虑,作为本发明的一个实施方式的复合粒子中的有机高分子的含量只要是无机纳米粒子的含量在上述范围且能够保持该无机纳米粒子的量就没有特别限制,优选小于20质量%,上限更优选为18质量%,特别优选为15质量%,下限优选为5质量%,更优选为8质量%,特别优选为10质量%。

[0066] <无机纳米粒子>

[0067] 作为上述无机纳米粒子的材质,没有特别限制,优选能够磁化的材料,更优选磁性体,具体而言,优选选自铁、钛、钴、锌、铜、锰、镍或钆等的单质、它们的氧化物或者它们的合金;以及铁氧化物类中的1种或2种以上的无机材料等。其中,从得到磁分离性能更优异的复合粒子等方面考虑,优选从作为氧化物的赤铁矿等金属氧化物;磁铁矿、锰铁氧化物、镍铁氧化物或锰锌铁氧化物等铁氧化物类;钴合金;以及镍合金中进行选择。

[0068] 作为上述能够磁化的材料,从得到磁分离性能更优异的复合粒子等方面考虑,优选没有剩余磁性的具有超顺磁性的材料。作为具有超顺磁性的材料,没有特别限定,例如可举出四氧化三铁(Fe_3O_4)、 γ -三氧化二铁($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)等各种铁氧化物类。特别是优选金属氧化物,更优选能够磁化的金属氧化物,特别优选四氧化三铁(Fe_3O_4)。

[0069] 作为上述磁性体,可以使用通过将以1:2的比例含有 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的混合液滴加于碱性的溶液并使其进行共沉淀反应而得到的 Fe_3O_4 等。另外,也可以使用EMG2001(Ferrotec公司制)等磁性流体中所含的磁性体、FERRICOLLOID HC-50(Taiho Kohzai株式会社制)等市售品。

[0070] 从得到能够充分地发挥无机纳米粒子所具有的特性的复合粒子,特别是得到磁分离性能优异的复合粒子等方面考虑,复合粒子中的上述无机纳米粒子的粒径优选为5~25nm,更优选为5~20nm,进一步优选为8~15nm。

[0071] 上述有机高分子中的无机纳米粒子的分散粒径的下限优选为1nm,上限优选为30nm。如果上述分散粒径小于1nm,则除无机纳米粒子的制造本身困难以外,还存在无机纳米粒子为磁性体时的磁响应特性降低,磁分离性能降低的趋势。另外,如果上述分散粒径超过30nm,则无机纳米粒子为磁性体时,容易产生剩余磁性,容易产生自凝聚,除此以外,该磁性体容易在复合粒子的表面露出。

[0072] 上述分散粒径的更优选的下限为5nm,更优选的上限为20nm。

[0073] 上述分散粒径可以使用透射型电子显微镜(TEM)进行测定。

[0074] <其它成分>

[0075] 作为本发明的一个实施方式的复合粒子可以含有在制造该复合粒子时使用磁性流体的情况下该磁性流体中所含的以往公知的成分或者制造该复合粒子时使用的表面活性剂等以往公知的成分。作为这样的以往公知的成分,可举出表面活性剂、该表面活性剂以外的含酸基的化合物、含氨基的化合物、含硅烷基的化合物和含钛原子的化合物等稳定剂,但并不限于这些例示。

[0076] 这些稳定剂可以分别单独使用,也可以使用2种以上。

[0077] 作为上述表面活性剂,没有特别限制,可以适当使用以往使用的化合物,例如可举出油酸盐、羧酸盐、磺酸盐、硫酸酯盐、磷酸酯盐等阴离子性表面活性剂;氨基酸盐、季铵盐等阳离子性表面活性剂;甘油脂肪酸酯等酯型、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯烷基苯基醚等醚型、脂肪酸聚乙二醇酯等酯·醚型等非离子性表面活性剂;烷基甜菜碱等两性表面活性剂。

[0078] 作为上述含酸基的化合物,例如可举出日本特开2008-258564号公报中记载的具有羧基或磺基的化合物、无机酸,但并不限于这些例示。

[0079] 作为上述含氨基的化合物,例如可举出日本特开平7-94315号公报中记载的含氟胺,但并不限于这些例示。

[0080] 作为上述含硅烷基的化合物,例如可举出含硅烷基的表面处理剂,作为该表面处理剂,例如可举出日本特开平10-4006号公报中记载的烷氧基硅烷、日本特开2004-205481号公报中记载的硅烷化合物,但并不限于这些例示。

[0081] 作为上述含钛原子的化合物,可举出钛偶联剂,作为该偶联剂,例如可举出三异硬脂酰基异丙醇钛、(2-正丁氧基羰基苯甲酰氧基)三丁氧基钛、乙酰丙酮钛、异丁氧基乙酰乙酸乙酯钛、钛酸四异丙酯、钛酸四正丁酯,但并不限于这些例示。

[0082] 从能够容易地在抗原与抗体的免疫反应、DNA彼此或DNA与RNA的杂交等中提供优异的反应场所,特别是能够容易地在诊断药、医药品研究用等中使用等方面考虑,作为本发明的一个实施方式的复合粒子优选为具有能够物理吸附至少一个配体的表面的复合粒子,优选为具有能够通过疏水性相互作用进行吸附的疏水性表面的复合粒子或具有能够与至少一个配体化学键合的表面的复合粒子,优选为具有能够与配体反应的反应性官能团的复合粒子。

[0083] 上述具有能够物理吸附配体的表面的复合粒子例如可以通过使用上述有机高分子成为疏水性高分子这样的单体而得到,上述能够化学键合配体的复合粒子例如可以通过在合成上述有机高分子时使用具有反应性官能团的单体而得到。

[0084] 作为上述配体,只要是对靶物质具有适度的亲和性的配体,其种类就没有特别限定。作为配体的具体例,可举出抗体;抗原;DNA、RNA等核酸;核苷酸;核苷;蛋白A、蛋白G、蛋白L、Fc结合蛋白、亲和素、链霉亲和素、酶、凝集素、它们的功能性变异体等蛋白质;胰岛素等肽;氨基酸;肝素、路易斯X、神经节苷脂等糖类或多糖类;脂质;生物素等维生素;药物;底物;激素;神经递质等。这些配体可以直接使用该化合物,但也可以使用通过将 these 化合物进行酶处理等而得到的其片段。另外,上述配体可以为人工合成的肽、肽衍生物、重组体。

[0085] 例如,作为适于免疫球蛋白的分离或精制的配体,可举出包含免疫球蛋白结合结构域的蛋白质,可以具有多个相同或不同种类的免疫球蛋白结合结构域。作为免疫球蛋白结合结构域,优选选自蛋白A的免疫球蛋白结合结构域、蛋白G的免疫球蛋白结合结构域和蛋白L的免疫球蛋白结合结构域中的1种或2种以上的免疫球蛋白结合结构域。

[0086] 作为上述配体,从能够容易地得到适于诊断药用等的含有配体的固相载体等方面考虑,优选抗体、抗原。

[0087] 抗体、抗原只要与靶物质结合就没有特别限制,例如可举出抗纤溶酶抗体、抗D二聚体抗体、抗FDP抗体、抗tPA抗体、抗(凝血酶·抗凝血酶复合物)抗体、抗FPA抗体等凝血纤溶相关检查用抗体或与其对应的抗原;抗BFP抗体、抗CEA抗体、抗AFP抗体、抗TSH抗体、抗铁蛋白抗体、抗CA19-9抗体等肿瘤相关检查用抗体或与其对应的抗原;抗载脂蛋白抗体、抗 β 2-微球蛋白抗体、抗 α 1-微球蛋白抗体、抗免疫球蛋白抗体、抗CRP抗体等血清蛋白相关检查用抗体或与其对应的抗原;抗HCG抗体等内分泌功能检查用抗体或与其对应的抗原;抗地高辛抗体、抗利多卡因抗体等药物分析用抗体或与其对应的抗原;HBs抗原、HCV抗原、HIV-1抗原、HIV-2抗原、HTLV-1抗原、支原体抗原、弓形虫抗原、链球菌溶血素O抗原等感染病相关检查用抗原或与其对应的抗体;DNA抗原、热变性人IgG等自身免疫相关检查用抗原或与其对应的抗体等。

[0088] 应予说明,抗体可以为多克隆抗体,也可以为单克隆抗体。

[0089] <复合粒子的制造方法>

[0090] 作为制造本发明的一个实施方式即复合粒子的方法,没有特别限定,例如可举出应用了悬浮聚合法、微悬浮聚合法、微乳液聚合法、分散聚合法等的方法。其中,从能够容易地制造粒径小的粒子出发,优选应用了微乳液聚合法的方法。

[0091] 进而,作为本发明的一个实施方式即复合粒子的制造方法,从能够以高生产效率容易地制造磁分离性能优异、期望形状的(凝聚体的产生得到抑制,大致球状)复合粒子等方面考虑,更优选包括下述工序(1)~(3)的方法(以下也称为“本方法”)。

[0092] 工序(1):将磁性流体、单体和聚合引发剂混合而制备流体状的混合物(以下,称为“单体混合液”)的工序

[0093] 工序(2):使上述单体混合液分散而制备乳液的工序

[0094] 工序(3):使上述乳液中的单体聚合的工序

[0095] 〈工序(1)〉

[0096] 上述工序(1)是将磁性流体、单体和聚合引发剂混合而制备单体混合液的工序。

[0097] 在上述工序(1)中,制备这样的单体混合液,使用该混合液经由其后的工序制造复合粒子,因此,能够容易地以高生产效率制造以高含量、特别是上述范围含有磁性体(无机纳米粒子)的复合粒子。特别是在上述工序(1)中,由于使用磁性流体,因此,能够以该流体中所含的磁性体均匀分散的状态制造复合粒子,能够容易地制造有机高分子中的磁性体(无机纳米粒子)的分散粒径在上述范围的复合粒子,能够容易地制造磁性体的凝聚得到抑制的期望的复合粒子。另外,在上述工序(1)中,由于制备含有单体和聚合引发剂的混合液,因此,磁性体在由有机高分子构成的基体中均匀地分散且不易产生磁性体的凝聚,因此,能够得到磁性体含量超过80质量%的高含量的复合粒子。另外,由于不易产生磁性体的凝聚体,因此,复合粒子的粒径的控制和形状的控制容易,能够缩窄粒度分布。

[0098] 另一方面,在以往的复合粒子的制造方法中,为了使磁性体以规定的分散粒径微分散于有机高分子中等,首先,制备使磁性体分散在有机溶剂中而成的磁性体分散液,具体而言,从磁性流体除去作为液状介质的水或有机溶剂而将磁性体分离,在分离的磁性体中进一步添加另一溶剂,由此制备磁性体分散液,在其中加入单体、聚合引发剂和共表面活性剂,由此制备单体混合液。

[0099] 然而,本发明人进行了深入研究,结果可知在这样的以往的制造方法中,在从磁性流体除去液状介质时磁性体彼此凝聚,分散状态变差,因此,作为结果,无法容易地以高生产效率得到以高含量含有磁性体的复合粒子。

[0100] 另外,在另一以往的复合粒子的制造方法中,在含有磁性体的乳液中添加单体和聚合引发剂。

[0101] 然而,本发明人进行深入研究,结果可知在这样的以往的制造方法中,在将单体聚合时,成为大致球状以外的形状或者产生凝聚体,无法容易地以高生产效率制造以高含量含有磁性体的期望形状的复合粒子。

[0102] 因此,在本方法中,优选不经过对磁性流体进行处理,例如,从磁性流体除去液状介质的工序,直接使用磁性流体且将该流体与单体和聚合引发剂混合而制备单体混合液。

[0103] (磁性流体)

[0104] 工序(1)中使用的磁性流体含有无机纳米粒子。

[0105] 通常,磁性流体含有(a)作为无机纳米粒子的直径几nm~几十nm的磁性体、(b)水、

有机溶剂或油等液体(分散介质)以及(c)用于使磁性体稳定地分散于分散介质的稳定剂。

[0106] 在磁性流体中,通常,在磁性体表面存在表面活性剂等稳定剂层,因此,在磁性体彼此间产生排斥力,不会发生凝聚、沉淀,磁性体在该流体中保持稳定的分散状态。另外,磁性流体具有如下性质:在未产生磁场的情况下,作为通常的液体进行动作,但如果施加磁场,则液体的粘度发生变化,就像液体整体具有强磁性那样行动。另外,具有如下特征:即使从外部施加磁场、重力、离心力等外力,流体中的无机纳米粒子、具体而言磁性体的分散状态也被维持,因此,不论液体如何均被磁铁吸引。

[0107] 作为(a)直径几nm~几十nm的磁性体,可以使用直径几nm~几十nm的、优选粒径为5~25nm的上述磁性体材料,优选的粒子(材料、粒径等)也与上述无机纳米粒子的栏中举出的粒子同样。

[0108] 该磁性体可以单独使用,也可以使用2种以上。

[0109] 作为(b)水、有机溶剂或油等液体(分散介质),优选为磁性体的分散性优异、不使磁性体溶解且能够与单体混合的液体。作为这样的分散介质,优选有机溶剂,作为该有机溶剂,优选含有脂肪族烃系溶剂。作为上述脂肪族烃系溶剂,从磁性体的分散性特别优异的方面考虑,优选碳数5~20的直链或支链的化合物,更优选碳数5~7的直链或支链的化合物。具体而言,可举出戊烷、己烷、庚烷、异丁烷、异戊烷等,但并不限于这些例示。

[0110] 上述分散介质可以单独使用,也可以使用2种以上。

[0111] 作为上述有机溶剂中的脂肪族烃系溶剂的含量,优选为80质量%以上。如果为80质量%以上,则磁性体的分散性优异,能够抑制作为本发明的一个实施方式的复合粒子中的磁性体的凝聚,也能够抑制作为本发明的一个实施方式的复合粒子中的磁性体含量的偏差。

[0112] 作为上述磁性流体中的有机溶剂的含量,相对于磁性体100质量份,优选下限为20质量份,优选上限为500质量份。如果有机溶剂的含量小于20质量份,则有时无法充分地将磁性体分散,如果超过500质量份,则有时需要在下述工序(3)之后除去残留溶剂,制造复合粒子的操作变得繁杂。上述有机溶剂的含量的更优选的下限为30质量份,更优选的上限为300质量份。

[0113] 作为(c)用于使磁性体稳定地分散于分散介质的稳定剂,可以适当使用以往用于磁性流体的稳定剂,可举出与上述复合粒子的其它成分的栏中说明的稳定剂同样的稳定剂等。

[0114] 该稳定剂可以分别单独使用,也可以使用2种以上,例如,磁性流体优选含有选自表面活性剂、含酸基的化合物、含氨基的化合物、含硅烷基的化合物和含钛原子的化合物中的至少一种。

[0115] (单体)

[0116] 作为工序(1)中使用的单体,可举出与合成上述有机高分子时使用的单体同样的单体,优选的单体也同样。

[0117] 该单体可以单独使用,也可以使用2种以上。

[0118] 作为上述单体的使用量,没有特别限定,优选为得到的复合粒子中的无机纳米粒子(磁性体)含量成为上述范围的量,具体而言,相对于磁性流体中的磁性体100质量份,优选为1~100质量份,更优选为3~50质量份,进一步优选为5质量份以上,特别优选为10质量

份以上,进一步优选小于20质量份。

[0119] 如果以这样的量使用单体,则能够容易地得到无机纳米粒子(磁性体)的含量在上述范围内并且磁分离性能和物理强度优异的复合粒子。

[0120] (聚合引发剂)

[0121] 作为工序(1)中使用的聚合引发剂,优选热聚合性的自由基聚合引发剂,例如可举出2,2'-偶氮双异丁腈、2,2'-偶氮双-(2-甲基丙腈)、2,2'-偶氮双-(2,4-二甲基戊腈)、2,2'-偶氮双-(2-甲基丁腈)、1,1'-偶氮双-(环己烷甲腈)、2,2'-偶氮双-(2,4-二甲基-4-甲氧基戊腈)、2,2'-偶氮双-(2,4-二甲基戊腈)、2,2'-偶氮双-(2-脒基丙烷)盐酸盐等偶氮系引发剂;过氧化苯甲酰、异丙苯过氧化氢、过氧化氢、过氧化乙酰、过氧化月桂酰、过硫酸盐(例如:过硫酸铵)、过氧化酯(例如:过辛酸叔丁酯、 α -枯基过氧化新戊酸酯)等过氧化物型的自由基系聚合引发剂,但并不限于这些例示。

[0122] 该聚合引发剂可以单独使用,也可以使用2种以上。

[0123] 作为上述聚合引发剂的使用量,没有特别限定,相对于单体100质量份,优选为0.1~30质量份,更优选为0.5~20质量份,进一步优选为1~10质量份。

[0124] 将磁性流体、单体和聚合引发剂混合时的混合的顺序没有特别限制,另外,在该混合时,可以根据需要使用表面活性剂。

[0125] 〈工序(2)〉

[0126] 上述工序(2)是使上述单体混合液分散而制备乳液的工序。在该工序(2)中,优选上述单体混合液分散于溶解有表面活性剂的水系介质。

[0127] 作为上述水系介质,没有特别限定,通常使用蒸馏水、离子交换水等水。

[0128] 水系介质是指水占至少50质量%以上的介质。

[0129] 作为上述表面活性剂,没有特别限定,阴离子性表面活性剂、阳离子性表面活性剂、非离子性表面活性剂均可以使用。其中,优选阴离子性表面活性剂。

[0130] 上述表面活性剂可以单独使用,也可以使用2种以上。

[0131] 作为阴离子性表面活性剂,没有特别限定,可举出十二烷基硫酸、十二烷基苯硫酸、癸基苯硫酸、十一烷基苯硫酸、十三烷基苯硫酸、壬基苯硫酸等的钠、钾或铵盐等。

[0132] 作为阳离子性表面活性剂,没有特别限定,可举出十六烷基三甲基溴化铵、氯化十六烷基吡啶**鎓**、十六烷基三甲基氯化铵等。

[0133] 作为非离子性表面活性剂,没有特别限定,例如可举出聚乙烯醇。另外,作为非离子性表面活性剂,例如可举出Triton X-100、X-114、X-305、N-101(以上为Union Carbide公司制)、Tween 20、40、60、80、85(以上为ICI公司制)、Brij 35、58、76、98(以上为ICI公司制)、Nonidet P-40(Shell公司制)、Igepol C0530、C0630、C0720、C0730(Rhone Poulenc公司制)等市售品。

[0134] 另外,作为上述表面活性剂,也可以使用具有能够与上述单体聚合的反应基团的反应性表面活性剂。作为该反应基团,例如,优选乙烯基、烯丙基、(甲基)丙烯酰基等烯键式不饱和基团。

[0135] 作为上述表面活性剂的使用量,没有特别限定,从能够容易地制备乳液等方面考虑,相对于单体混合液100质量份,优选为0.01~100质量份,更优选为0.1~5质量份。

[0136] 作为使单体混合液分散的方法,例如可举出在含有表面活性剂的水系介质中加入

上述单体混合液,利用产生高剪切力的剪切混合装置使其乳化的方法。

[0137] 作为上述剪切混合装置,没有特别限定,例如可举出均化器(IKA公司制)、Physotron(Microtec·Nition公司制)、Polytron(Kinematica公司制)和TK自动匀浆混合机(特殊机化工业株式会社制)等分批式乳化机;Ebara Milder(太平洋机工株式会社制)、TK Fil Mix、TK管路式匀浆机(特殊机化工业株式会社制)、胶体磨(神钢环境舒立净株式会社制)、Clearmix(M Technique公司制)、切碎器、三角湿式微粉碎机(日本焦炭工业株式会社制)、Cabitron(Eurotech公司制)和Fine Flow Mill(太平洋机工株式会社制)等连续式乳化机;Microfluidizer(Mizuho工业株式会社制)、Nanomizer(Nanomizer公司制)和APV Gaulin(Gaulin公司制)等高压乳化机;膜乳化机(冷化工业株式会社制)等膜乳化机;Vibromixer(冷化工业株式会社制)等振动式乳化机;超声波均化器(Branson公司制)等超声波乳化机,其中,优选使用探针式的超声波分散机。

[0138] 在工序(2)中,从与上述同样的效果的方面考虑,优选以得到的乳液中的液滴的粒径成为与期望的复合粒子的粒径相同程度的方式使上述单体混合液分散,具体而言,优选以得到含有与上述复合粒子的粒径同样(优选的范围也同样)的粒径的液滴的乳液的方式使上述单体混合液分散。

[0139] 作为这样的单体混合液的分散条件,例如,在使上述单体混合液分散时使用超声波分散机的情况下,超声波输出的优选的下限为5W,优选的上限为200W。超声波输出小于5W时,有时因分散力不足而产生大的液滴,工序(3)中的聚合反应变得困难,如果超过200W,则有时无法得到期望的复合粒子。

[0140] 另外,作为超声波的照射时间,也取决于超声波输出,优选在1次超声波照射的时间为10秒~10分钟的范围进行,更优选30秒~5分钟的范围,进一步优选1分钟~3分钟的范围。

[0141] 应予说明,超声波的照射可以为1次,也可以为多次。

[0142] 〈工序(3)〉

[0143] 上述工序(3)是使上述乳液中的单体聚合的工序。通过该工序,能够得到复合粒子。

[0144] 上述聚合的条件只要根据使用的单体等适当选择即可,通常通过在50~95℃加热5~24小时左右而进行。

[0145] 应予说明,在以往的复合粒子的制造方法中,为了制造磁性体含量不同的复合粒子,需要在使单体聚合后,将期望的磁性体含量的复合粒子分级并回收的工序,但根据本方法,由于能够得到磁性体含量大致一定的复合粒子,因此,不需要这样的进行分级的工序,能够容易地制备以高含量含有磁性体的复合粒子。因此,本方法可以说是生产率优异的方法。

[0146] 〈其它工序〉

[0147] 本方法可以根据需要包括上述工序(1)~(3)以外的其它工序。

[0148] 作为该其它工序,例如可举出将上述工序(3)中得到的复合粒子分散液通过磁分离法并利用水等进行清洗的工序。

[0149] 《被覆粒子》

[0150] 作为本发明的一个实施方式的被覆粒子具有作为上述本发明的一个实施方式的

复合粒子以及被覆该复合粒子的聚合物层。作为上述本发明的一个实施方式的复合粒子可以直接用于各种用途,但为了形成对应于期望用途的粒子表面,优选用聚合物层被覆该复合粒子。

[0151] 该聚合物层例如可以通过在复合粒子的存在下,根据需要在聚合引发剂、乳化剂、分散剂、表面活性剂、电解质、交联剂、分子量调节剂等的存在下,将(共)聚合性单体在液体中进行(共)聚合而形成。通过如此形成聚合物层,能够对该聚合物层的表面导入期望的官能团等,能够容易地得到具有期望表面特性的被覆粒子,因而优选。另外,也可以在形成上述聚合物层后,通过烯键式不饱和羧酸烷基酯的碱水解、乙烯基酯的碱皂化等方法来改变可能存在于被覆粒子表面的官能团。

[0152] 进而,可以进行2次以上的上述聚合物层的形成。即,上述被覆粒子可以具有2层以上的聚合物层。

[0153] 应予说明,作为如此形成聚合物层时的使复合粒子与(共)聚合性单体接触的方法,没有特别限制,例如可举出将上述(共)聚合性单体通过一次方式、分次方式或连续添加方式中的任一方式添加于复合粒子或复合粒子分散液的方法。

[0154] 上述聚合的条件只要根据使用的单体、聚合引发剂等适当选择即可,聚合温度通常为10~90℃,优选为30~85℃,聚合时间通常为1~30小时左右。

[0155] 上述被覆粒子成为根据该粒子中的无机纳米粒子的含量而能够更适用作生物工程、诊断和制药等领域中的保持体、固相载体或介质的被覆粒子,该无机纳米粒子为磁性体时,从得到磁分离性能优异的被覆粒子等方面考虑,被覆粒子中的无机纳米粒子的含量优选为1~95质量%,更优选为35~95质量%,进一步优选为45~95质量%。

[0156] 作为上述聚合物层的成分,没有特别限制,优选乙烯基系聚合物,作为其合成中使用的乙烯基系单体,可举出苯乙烯、 α -甲基苯乙烯、卤化苯乙烯、二乙烯基苯等芳香族乙烯基单体;乙酸乙烯酯、丙酸乙烯酯等乙烯基酯类;丙烯腈等不饱和腈类;(甲基)丙烯酸甲酯、(甲基)丙烯酸乙酯、(甲基)丙烯酸丁酯、(甲基)丙烯酸2-乙基己酯、(甲基)丙烯酸月桂酯、乙二醇二(甲基)丙烯酸酯、(甲基)丙烯酸环己酯等烯键式不饱和羧酸酯;丙烯醛等,但并不限于这些例示。

[0157] 上述乙烯基系聚合物可以为均聚物,也可以为2种以上的单体的共聚物。

[0158] 另外,上述聚合物层可以为由共聚物构成的层,该共聚物是上述乙烯基系单体与丁二烯、异戊二烯等共轭二烯烃;(甲基)丙烯酸、衣康酸、马来酸酐、巴豆酸等单或二羧酸化合物或其酸酐;(甲基)丙烯酰胺、(甲基)丙烯酸缩水甘油酯、N-羟甲基(甲基)丙烯酰胺、N-异丙基(甲基)丙烯酰胺、(甲基)丙烯酸2-羟基乙酯、甘油单(甲基)丙烯酸酯、以链数2~40的聚乙二醇或聚丙二醇为侧链的(甲基)丙烯酸酯、邻苯二甲酸二烯丙酯、(甲基)丙烯酸烯丙酯、三羟甲基丙烷三(甲基)丙烯酸酯、苯乙烯磺酸和其钠盐、2-丙烯酰胺-2-甲基丙磺酸和其钠盐、异戊二烯磺酸和其钠盐等能够与上述乙烯基系单体共聚的单体的共聚物。

[0159] 进而,上述聚合物层除来自上述单体的构成单元以外,还可以具有来自含有反应性官能团的乙烯基单体的构成单元。

[0160] 作为该反应性官能团,优选为能够通过共价键将抗原、抗体等键合的基团,只要根据期望的用途适当选择即可,例如可举出羧基、羟基、环氧基、氨基、三乙基铵基、二甲基氨

基、磺酸基。

[0161] 作为含有这样的反应性官能团的乙烯基单体,例如可举出(甲基)丙烯酸、(甲基)丙烯酸-2-羟基乙酯、(甲基)丙烯酸缩水甘油酯、三乙基铵(甲基)丙烯酸酯、二甲基氨基(甲基)丙烯酸酯,但并不限于这些例示。

[0162] 含有这些反应性官能团的乙烯基单体可以单独使用,也可以使用2种以上。

[0163] 上述聚合物层的含量(厚度)没有特别限制,优选为得到的被覆粒子中的无机纳米粒子的含量成为上述范围这样的量。

[0164] 作为上述聚合引发剂,如果从在水中的溶解性的观点出发进行分类,则优选油溶性的聚合引发剂。如果使用水溶性的聚合引发剂,则不是复合粒子表面的聚合,而存在大量产生仅由不含复合粒子的聚合物层构成的新粒子的趋势。

[0165] 作为上述油性聚合引发剂,可举出过氧化苯甲酰、过氧化月桂酰、叔丁基过氧化2-乙基己酸酯、二(3,5,5-三甲基己酰基)过氧化物、偶氮双异丁腈等过氧化物·偶氮化合物等,但并不限于这些例示。

[0166] 上述聚合引发剂可以单独使用,也可以使用2种以上。

[0167] 上述聚合引发剂的使用量相对于单体100质量份,优选为0.01~8质量份。

[0168] 作为上述乳化剂,可以使用通常所使用的阴离子性表面活性剂或非离子性表面活性剂等。

[0169] 上述乳化剂可以单独使用,也可以使用2种以上。

[0170] 作为上述阴离子性表面活性剂,可举出高级醇硫酸酯的碱金属盐、烷基苯磺酸的碱金属盐、琥珀酸二烷基酯磺酸的碱金属盐、烷基二苯基醚二磺酸的碱金属盐、聚氧乙烯烷基(或烷基苯基)醚的硫酸酯盐、聚氧乙烯烷基(或烷基苯基)醚的磷酸酯盐、萘磺酸钠的甲醛缩合物等以及Latemul S-180A(花王株式会社制)、Eleminol JS-2(三洋化成株式会社制)、Aqualon HS-10(第一工业制药株式会社制)、Adeka Reasoap SE-10N(ADEKA株式会社制)等,但并不限于这些例示。

[0171] 另外,作为非离子性表面活性剂,可举出聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯烷基苯基醚等以及Aqualon RS-20(第一工业制药株式会社制)、Adeka Reasoap NE-20(ADEKA株式会社制)等。

[0172] 作为上述被覆粒子,从能够容易地在抗原与抗体的免疫反应、DNA彼此或DNA与RNA的杂交等中提供优异的反应场所,特别是能够容易地在诊断药、医药品研究用等中使用等方面考虑,优选为具有能够物理吸附至少一个配体的表面的被覆粒子,优选为具有能够通过疏水性相互作用进行吸附的疏水性表面的被覆粒子或具有能够化学键合至少一个配体的表面的被覆粒子,优选为具有能够与配体反应的反应性官能团的被覆粒子,除来自上述单体的构成单元以外,还可以具有来自含有反应性官能团的乙烯基单体的构成单元。

[0173] 《含有配体的固相载体》

[0174] 作为本发明的一个实施方式的含有配体的固相载体是具有配体的上述复合粒子或具有配体的上述被覆粒子,是使配体结合于选自上述复合粒子和上述被覆粒子中的固相载体而成的载体。

[0175] 作为该配体,可举出与上述复合粒子的栏中说明的配体同样的配体等。这些之中,从能够容易地得到适于诊断药用等的含有配体的固相载体等方面考虑,优选抗体、抗原。

[0176] 该配体可以为1种,也可以为2种以上。

[0177] 配体的结合只要依照常规方法进行即可,优选通过共价键法进行。例如,反应性官能团为羧基、配体为具有氨基的配体时,只要使用脱水缩合剂使其键合即可。

[0178] <用途>

[0179] 作为本发明的一个实施方式的复合粒子、被覆粒子和含有配体的固相载体能够广泛利用于体外诊断、生物化学领域中的研究等,例如能够在生物工程、诊断和制药的领域中适用作保持体、固相载体或介质,具体而言,能够适用作对抗原、抗体、生物分子、核酸以及其它等检体进行分离和/或检知的手段,特别是,特别适于免疫测定和核酸检测。

[0180] 在这样的用途中,可以直接使用作为本发明的一个实施方式的复合粒子或被覆粒子,也可以使用使上述配体结合于作为本发明的一个实施方式的复合粒子或被覆粒子而成的含有配体的固相载体。

[0181] 更具体而言,可以在作为本发明的一个实施方式的复合粒子或被覆粒子上结合蛋白质等抗原或抗体,通过与作为测定对象的抗体或抗原的抗原抗体反应对测定对象进行定量·定性;可以在作为本发明的一个实施方式的复合粒子和被覆粒子上结合抗体并结合作为抗原的病毒·细菌·细胞·激素·二噁英类等化学物质等,进行回收·浓缩;可以在作为本发明的一个实施方式的复合粒子和被覆粒子上结合DNA等核酸类似物,进行利用核酸的杂交的核酸的回收·检测或者对结合于核酸的蛋白质、色素等化学物质进行回收·检测;可以在作为本发明的一个实施方式的复合粒子和被覆粒子上结合亲和素或生物素对具有生物素或亲和素的分子进行回收并检测;可以在作为本发明的一个实施方式的复合粒子和被覆粒子上结合抗体、抗原并利用比色法、化学发光进行酶免疫测定。

[0182] 另外,对于以往的使用96孔板等作为载体的诊断项目,通过使用作为本发明的一个实施方式的复合粒子、被覆粒子或含有配体的固相载体,能够替换为利用磁性的自动分析机而使用。作为成为诊断的对象物质,可举出来自生物体的蛋白质、黄体形成激素、甲状腺刺激激素等激素;各种癌细胞;前列腺特异性标记物、膀胱癌标记物等作为癌的标记物的蛋白质;乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、单纯疱疹病毒等病毒;淋球菌、MRSA等细菌;念珠菌、隐球菌等真菌;弓形虫等原虫·寄生虫;作为这些病毒·细菌·真菌·原虫·寄生虫等的构成要素的蛋白质、核酸;二噁英类等环境污染物质;抗生素、抗癫痫剂等医药品等化学物质等。

[0183] <对靶物质进行检测或分离的方法>

[0184] 本发明的一个实施方式涉及的对试样中的靶物质进行检测或分离的方法使用上述含有配体的固相载体。

[0185] 上述靶物质为与配体结合的物质,具体而言,可举出抗原;单克隆抗体、多克隆抗体等抗体;细胞(正常细胞、大肠癌细胞、血中循环癌细胞等癌细胞);DNA、RNA等核酸;蛋白质、肽、氨基酸、糖、多糖、脂质、维生素等生物体相关物质等,可以为作为药物靶标的药物、生物素等小分子化合物。应予说明,靶物质可以利用荧光物质等进行标记。

[0186] 上述试样只要是含有上述靶物质的试样或者有可能含有靶物质的试样即可,具体而言,可举出血液、血浆、血清、含有靶物质的缓冲溶液等。

[0187] 对作为本发明的一个实施方式的对靶物质进行检测或分离的方法除使用上述含有配体的固相载体以外,只要依照常规方法进行即可。例如可举出包括如下工序的方法:将

上述含有配体的固相载体和含有靶物质的试样进行混合等而使其接触的工序(接触工序),以及使用磁铁等从试样分离出捕捉有靶物质的含有配体的固相载体的工序(分离工序)。应予说明,在该分离工序之后,可以包括对靶物质进行检测的工序或者使配体和靶物质解离的工序。

[0188] 实施例

[0189] 以下,举出实施例对本发明详细地进行说明,但本发明并不限于这些实施例。实施例中的各分析条件如下所示。

[0190] 下述实施例和比较例的溶液中的分散质或粒子的体积平均粒径使用动态光散射式粒径分布测定装置(日机装株式会社制,Nanotracer UPA-EX150)进行测定。此外,作为测定结果的一个例子,将实施例1中得到的复合粒子的粒径分布示于图1,将比较例1中得到的复合粒子的粒径分布示于图2。图1和图2的粒径值均为体积平均粒径。

[0191] 另外,下述实施例和比较例中得到的复合粒子中的磁性体含量使用差动型差示热天秤(Rigaku株式会社制,TG-8120)在500℃进行测定。

[0192] 在下述实施例和比较例中,作为磁性流体,使用“EMG2001”(在该磁性流体27.0g中含有磁性体14.3g,庚烷分散液,Ferrotec公司制)。即使对该磁性流体施加磁场、重力或离心力,在该磁性流体中也不会产生磁性体的浓度不均,该磁性流体中的磁性体的分散状态被维持。这样的分散状态可以通过目视确认没有沉淀、没有磁性体与分散液的分离来判断。

[0193] [实施例1]

[0194] 在磁性流体“EMG2001”27.0g中加入苯乙烯1.35g、二乙烯基苯0.15g和2,2'-偶氮双异丁腈0.06g,进行混合而得到单体混合液。接着,在得到的单体混合液中加入溶解十二烷基硫酸钠0.75g而成的水溶液75g,使用超声波均化器(日本精机制作所株式会社制,US300T)在冰冷下进行超声波处理(2分钟的超声波照射(超声波输出:150W)以及其后的2分钟的超声波照射的停止)。重复10次该超声波处理,制备含有磁性体的单体混合液分散在水中而成的乳液。得到的乳液中的液滴的体积平均粒径为104nm。

[0195] 接着,将得到的乳液在70℃聚合7小时,通过磁分离并利用水进行清洗,由此得到复合粒子A的分散液。如此得到的粒子分散液中的复合粒子A的体积平均粒径为103nm,该复合粒子A的磁性体含量为90质量%。可知该磁性体含量的值与理论值一致,生产效率良好,得到复合粒子(分散液)。应予说明,理论值(质量%)是指假定装入的磁性体、单体、引发剂全部成为复合粒子时的值,由“磁性体量×100/(磁性体量+各单体量+引发剂量)”求出。另外,如图1所示,可知得到的复合粒子的粒径分布成为一组,因此,能够以高生产效率得到期望形状的复合粒子。

[0196] [实施例2]

[0197] 将使用的单体从苯乙烯1.35g和二乙烯基苯0.15g变更为甲基丙烯酸甲酯1.35g和三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯(以下称为“TMP”)0.15g,除此以外,与实施例1同样地制作复合粒子B(的分散液),结果该复合粒子B的体积平均粒径为107nm,该复合粒子B的磁性体含量为89质量%。该磁性体含量的值与理论值的差为1质量%这样的细微差别,因此,生产效率良好,得到复合粒子(分散液)。

[0198] [实施例3]

[0199] 在混合有甲基丙烯酸甲酯1.2g、TMP0.3g、甲基丙烯酸0.3g和二(3,5,5-三甲基己

酰基)过氧化物(日油株式会社制;Peroyl 355)0.1g的液体中添加溶解十二烷基硫酸钠0.15g而成的水溶液30g,利用超声波均化器(US300T)制作乳液c。

[0200] 在可分离式烧瓶中放入实施例1中制作的复合粒子A的分散液73.5g(含有3.0g的复合粒子A),一边用水浴将温度控制为60℃一边用2小时滴加上述乳液c。滴加结束后,将温度保持为60℃,用1小时进行聚合,升温到80℃后,用2小时结束反应。将得到的分散液通过磁分离并利用水进行清洗,由此制作被覆粒子C的分散液。得到的粒子分散液中的被覆粒子C的体积平均粒径为109nm,该被覆粒子C的磁性体含量为59质量%。

[0201] [实施例4]

[0202] 将十二烷基硫酸钠的使用量变更为0.3g,重复4次超声波处理,除此以外,与实施例1同样地制作复合粒子E(的分散液),结果得到的复合粒子E的体积平均粒径为232nm,该复合粒子E的磁性体含量为86质量%。

[0203] [实施例5]

[0204] 将上述超声波处理变更为1分钟的超声波照射(超声波输出:150W)以及其后的1分钟的超声波照射的停止,重复3次该超声波处理,除此以外,与实施例1同样地制作复合粒子F(的分散液),结果得到的复合粒子F的体积平均粒径为515nm,该复合粒子F的磁性体含量为88质量%。

[0205] [实施例6]

[0206] 将使用的装置从超声波均化器(US300T)变更为胶体磨(IKA公司制,magic LAB),除此以外,与实施例1同样地制备乳液。应予说明,使用胶体磨时的处理条件为25000rpm、20min。得到的乳液中的液滴的体积平均粒径为110nm。

[0207] 接下来,与实施例1同样地进行聚合,制作复合粒子G(的分散液),结果得到的复合粒子G的体积平均粒径为108nm,该复合粒子G的磁性体含量为89质量%。

[0208] [实施例7]

[0209] 使10mg的复合粒子A分散于pH9.5的硼酸缓冲液,在其中添加溶解链霉亲和素0.2mg而成的溶液0.1mL,在37℃旋转搅拌16小时后,利用tris缓冲液清洗4次,制备在复合粒子A的表面固定有链霉亲和素的链霉亲和素结合粒子。通过二辛可宁酸(BCA)检测来调查链霉亲和素的结合量,结果为20μg/mg复合粒子。

[0210] [实施例8]

[0211] 使10mg的被覆粒子C分散于pH5.0的100mM MES(2-吗啉乙磺酸一水合物)缓冲液1mL,在其中添加将1-乙基-3-二甲基氨基丙基碳二亚胺盐酸盐(WSC,同仁化学研究所株式会社)以成为10mg/mL的浓度的方式溶解于pH5.0的100mM MES缓冲液而成的WSC溶液0.1mL,在室温旋转搅拌2小时。在其中进一步添加溶解链霉亲和素0.2mg而成的pH5.0的100mM MES缓冲液0.1mL,在室温旋转搅拌8小时后,利用tris缓冲液清洗4次,由此除去未反应的链霉亲和素,制备在被覆粒子C的表面固定有链霉亲和素的链霉亲和素结合粒子。通过BCA检测来调查链霉亲和素的结合量,结果为18μg/mg复合粒子。

[0212] [实施例9]

[0213] 将在制作乳液c时使用的甲基丙烯酸甲酯1.2g、TMP0.3g和甲基丙烯酸0.3g变更为甲基丙烯酸缩水甘油酯1.2g和甲基丙烯酸0.3g,将复合粒子A的分散液变更为实施例3中制作的被覆粒子C的分散液73.5g(含有1.5g的复合粒子A),除此以外,与实施例3同样地制作

被覆粒子D(的分散液),结果该被覆粒子D的体积平均粒径为165nm,该被覆粒子D的磁性体含量为41质量%。

[0214] 使用被覆粒子D代替被覆粒子C,除此以外,与实施例8同样地制备链霉亲和素结合粒子。通过BCA检测来调查链霉亲和素的结合量,结果为17 μ g/mg复合粒子。

[0215] [比较例1]

[0216] 将磁性流体“EMG2001”27.0g在孵育箱中在80 $^{\circ}$ C干燥12小时,得到经浓缩的磁性体17g。在得到的磁性体中加入庚烷10g,搅拌过夜,由此得到磁性体分散液。使磁铁接近得到的磁性体分散液,由此施加磁场,结果磁性体分散液中的磁性体被磁铁吸引,无法维持分散状态。因此,上述磁性体分散液与磁性流体不同。

[0217] 使用得到的磁性体分散液代替磁性流体“EMG2001”,除此以外,与实施例1同样地制作复合粒子(的分散液),结果如图2所示,得到粒径分布成为两组的复合粒子,另外,以目视进行确认,结果在得到的复合粒子的分散液内存在磁性体的凝聚体。得到的复合粒子的体积平均粒径为177nm,该复合粒子的磁性体含量为68质量%。该磁性体含量的值与理论值的差为24质量%,大幅偏离,另外,如图2所示,可知得到的复合粒子的粒径分布成为两组,因此,无法生产效率良好地得到期望形状的复合粒子(分散液)。

[0218] 应予说明,上述磁性体分散液由于与磁性流体不同,因此,比较例1的上述复合粒子的制造方法不属于本方法。

[0219] [比较例2]

[0220] 将在溶解十二烷基硫酸钠0.75g而成的水溶液75g中加入磁性流体“EMG2001”27.0g而得到的混合液与实施例1同样地进行超声波处理,由此制备磁性流体分散在水中而成的乳液。得到的乳液中的液滴的体积平均粒径为98nm。

[0221] 接着,在得到的乳液中添加苯乙烯1.35g、二乙烯基苯0.15g和2,2'-偶氮双异丁腈0.06g的混合液。然后升温到70 $^{\circ}$ C,聚合7小时,通过磁分离并利用水进行清洗,由此得到复合粒子分散液。如此得到的复合粒子分散液中的复合粒子的体积平均粒径为131nm,该复合粒子的磁性体含量为77质量%。可知该磁性体含量的值与理论值的差为13质量%,大幅偏离,无法生产效率良好地得到复合粒子(分散液)。应予说明,在得到的复合粒子分散液中存在磁性体的凝聚体,进而,混合存在不是球状的异形的复合粒子、该复合粒子的凝聚物。

[0222] 将关于上述实施例和比较例中得到的复合粒子(的分散液)的结果示于下述表1。应予说明,在下述表1中,将得到的复合粒子中的磁性体含量与理论值的差为10质量%以下的情况判断为生产效率为“○”(生产效率优异,能够控制磁性体含量),将超过10质量%的情况判断为生产效率为“×”(生产效率差,无法控制磁性体含量)。

[0223] [表1]

[0224]

	体积平均 粒径 (nm)	磁性体 含量 (质量%)	磁性体含量与 理论值的差 (质量%)	异形粒子、 凝聚物的 有无	生产效率
实施例1	103	90	0	无	○
实施例2	107	89	1	无	○
实施例4	232	86	4	无	○
实施例5	515	88	2	无	○
实施例6	108	89	1	无	○
比较例1	177	68	24	有	×
比较例2	131	77	13	有	×

[0225] 如表1所示,在实施例1、2和4~6中,能够生产率良好、容易且稳定地制作磁性体含量多的体积平均粒径100~500nm左右的复合粒子。

[0226] 另一方面,在比较例1中,由于未使用磁性流体,因此,磁性体的分散变得不均匀,产生磁性体的凝聚体,在比较例2中,产生磁性体的凝聚体且乳液中的液滴与单体的接触变得不均匀,得到的复合粒子的一部分为不是球状的异形或者成为凝聚物(块)。另外,在比较例1和2中,无法制作磁性体含量多的复合粒子,生产效率显著降低。

[0227] [实施例10]

[0228] 将复合粒子C的分散液进行磁分离并除去上清液,利用0.1M MES缓冲液(pH5.5)清洗2次。清洗后,进行磁分离并除去上清液,以相对于1mg复合粒子C、抗体为10 μ g的方式加入0.1M MES缓冲液(pH5.5)和抗PSA(前列腺特异性抗原)抗体溶液,再以相对于1mg的复合粒子C为100 μ g的方式加入EDC(1-乙基-3-二甲基氨基丙基碳二亚胺盐酸盐(同仁化学研究所株式会社制,3mg/mL)并在25 $^{\circ}$ C翻转混合2小时。反应结束后,进行磁分离并除去上清液,利用tris缓冲液/0.01%Triton X-100清洗2次。接着,进行磁分离并除去上清液,将缓冲液替换成50mM的tris缓冲液,进一步进行磁分离并除去上清液后,使得到的粒子悬浮于含BSA缓冲液(含有1重量%BSA的50mM的tris缓冲液,pH7.5),由此得到抗体结合粒子分散液(复合粒子浓度0.05重量%)。

[0229] 分注制备的抗体结合粒子分散液25 μ L,接着,在分注的抗体结合粒子分散液中分注样品(人血清或标准溶液(含有PSA抗原的液体:0~1000pg/mL))25 μ L,进一步分注ALP(碱性磷酸酶)标记抗PSA抗体液25 μ L,在25 $^{\circ}$ C反应20分钟。反应后,通过磁分离将粒子分离后,使用96孔板用清洗器(Tecan Japan株式会社制,Hydro Flex),利用tris缓冲液/0.01% Triton X-100进行清洗后,添加ALP的底物液(Lumipulse底物液:Fujirebio株式会社制),在25 $^{\circ}$ C反应5分钟,对发光强度进行测定(ARVO X5(PerkinElmer公司制))。将结果示于表2。

[0230] 可以确认得到依赖于抗原浓度、具有稀释直线性的发光强度,因此,复合粒子C能够用作免疫测定用的固相载体。

[0231] [表2]

[0232]

抗原浓度 (p g/mL)	发光强度 (强度)
0	2 2 5
1 0	3 4 7
2 5	4 9 8
5 0	7 8 2
1 0 0	1 1 8 2
2 5 0	2 5 9 5
5 0 0	4 9 6 3
1 0 0 0	1 0 7 8 2

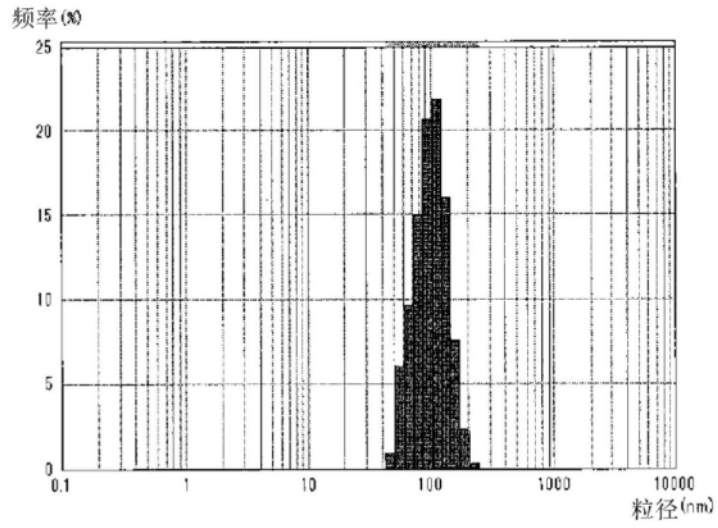


图1

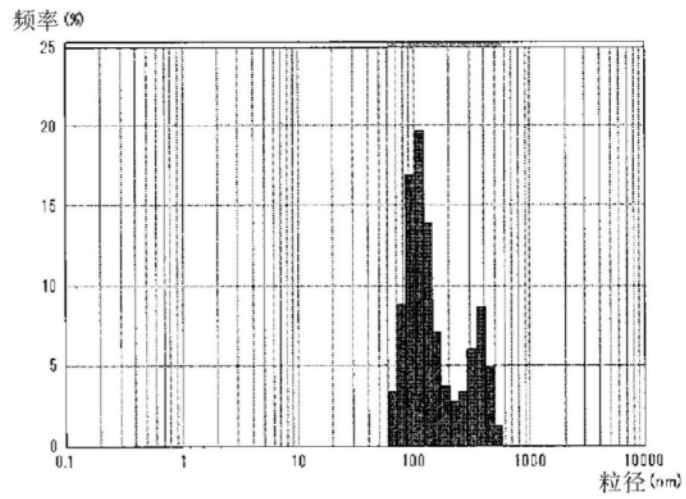


图2