

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 901 625**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2018** **E 18163545 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.10.2021** **EP 3382394**

54 Título: **Procedimiento de producción de un portador unido a la sonda y procedimiento de detección o separación de una sustancia objetivo**

30 Prioridad:

31.03.2017 JP 2017072034

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

23.03.2022

73 Titular/es:

JSR MICRO N.V. (25.0%)

Technologielaan 8

3001 Leuven, BE;

JSR CORPORATION (25.0%);

JSR LIFE SCIENCES CORPORATION (25.0%) y

JSR LIFE SCIENCES, LLC (25.0%)

72 Inventor/es:

UEYA, YUICHI y

SATOU, YASUHITO

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 901 625 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

Procedimiento de producción de un portador unido a la sonda y procedimiento de detección o separación de una sustancia objetivo

5

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de un portador unido a la sonda, y a un procedimiento de detección o separación de una sustancia objetivo.

10

TÉCNICA ANTECEDENTE

Los portadores, tales como las partículas de polímero orgánico y las partículas magnéticas, se utilizan, por ejemplo, para una fase sólida de reacción para agentes de diagnóstico con base en reacciones antígeno-anticuerpo para detectar sustancias objetivo (objetivos de inspección), tales como marcadores de enfermedades infecciosas/cáncer y hormonas. Por ejemplo, las sondas de prueba (sondas primarias), tales como los anticuerpos o los antígenos, se inmovilizan en portadores para dichos agentes de diagnóstico. Un objetivo de inspección en una muestra queda atrapado en un soporte mediante una sonda primaria y luego reacciona con una segunda sonda de prueba (sonda secundaria). En un caso en el que la sonda secundaria está, por ejemplo, marcada con un fósforo o una enzima, el objetivo de inspección puede ser detectado con base en la fluorescencia, una reacción enzimática o algo similar.

15

20

En los últimos años, hay una demanda para lograr una alta sensibilidad en las pruebas con el fin de la detección temprana de enfermedades o similares. Es una tarea importante para mejorar la sensibilidad de los agentes de diagnóstico. Con el fin de mejorar la sensibilidad de los agentes de diagnóstico que utilizan portadores también, hay una tendencia a cambiar la forma de detección de la tecnología que implica el desarrollo de color enzimático a la tecnología que implica la emisión de fluorescencia o quimioluminiscencia que puede lograr una mayor sensibilidad.

25

Por ejemplo, las partículas magnéticas que tienen grupos tosilos en la superficie de las mismas se conocen como portadores para el uso previsto anteriormente (Documento de Patente 1).

30

Documentos de la técnica relacionados**Documentos de patentes**

35

Documento de patente 1: JP H3-46565 A

YAN JUNHONG et al., "A tosyl-activated magnetic bead cellulose as solid support for sensitive protein detection", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, (20130627), vol. 167, no. 3, doi:10.1016/J.JBIOTEC.2013.06.010, ISSN 0168-1656, páginas 235 - 240, describe que la celulosa de perlas magnéticas (MBC) se preparó utilizando la transición sol-gel de la viscosa en presencia de nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). A continuación, las partículas MBC se activaron con cloruro de p-toluenosulfonilo para obtener celulosa de perlas magnéticas activada con tosilo (MBC-Ts).

40

El documento WO 2009/028449 A1 describe una partícula de polímero orgánico para separar una sustancia bioquímica de una muestra biológica mediante la interacción con una sonda. La partícula tiene un grupo funcional activo que se une a una sonda y un grupo hidrofílico no iónico. El valor obtenido al dividir el área superficial de la partícula por la cantidad de grupos funcionales activos es de 20-5.000 Å².

45

El documento JP 2006 226691 A describe una partícula magnética para el examen inmunológico, que se caracteriza porque la cantidad de los grupos funcionales en la superficie de la partícula magnética utilizada en la conexión de la sonda primaria, que está conectada a una sustancia que se va a examinar, y la partícula magnética muestran un valor superior a 50 Å² cuadrados/grupo funcional como área de estacionamiento.

50

REYMOND F. et al., "Fabrication and characterization of tosyl-activated magnetic and nonmagnetic monodisperse microspheres for use in microfluidic-based ferritin immunoassay", BIOTECHNOLOGY PROGRESS APRIL 2013 JOHN WILEY AND SONS INC. USA, (201304), vol. 29, no. 2, doi:10.1002/BTPR.1683, páginas 532 - 542 describe la preparación de microesferas no magnéticas de poli(2-hidroxietil metacrilato-co-metacrilato de glicidilo) [P(HEMA-GMA)] activadas por tosilo mediante polimerización por dispersión y de microesferas magnéticas de poli(2-hidroxietil metacrilato-co-metacrilato de etileno) [P(HEMA-EDMA)] activadas por tosilo mediante el procedimiento de polimerización por hinchamiento en varios pasos y la precipitación de óxido de hierro dentro de los poros.

55

60

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION**PROBLEMAS QUE DEBE RESOLVER LA INVENCION**

65

Los portadores convencionales, tales como las partículas magnéticas divulgadas en el Documento de Patente descrito anteriormente, son insuficientes en cuanto a la relación señal/ruido (S/N) en el diagnóstico, la detección o similares

con el uso de los portadores. En este sentido, los portadores convencionales aún deben mejorar.

En una realización de la presente invención, se proporciona un portador unido a la sonda, que es poco probable que cause la adsorción no específica de sustancias biológicamente relevantes tales como proteínas y ácidos nucleicos, y mediante el cual se puede realizar una alta relación S/N en el diagnóstico, la detección o similares, y un procedimiento de producción del portador.

MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

Como resultado de los estudios intensivos para resolver los problemas descritos anteriormente, los presentes inventores encontraron que los problemas pueden ser resueltos con base en los ejemplos de configuración descritos a continuación. Esto ha llevado a la realización de la presente invención que se define por las reivindicaciones adjuntas.

Los ejemplos de configuración de la presente invención se describen a continuación.

<1> Un procedimiento de producción de un portador unido a la sonda como se define en la reivindicación 1.

<2> Un procedimiento de detección o separación de una sustancia objetivo, como se define en la reivindicación 9.

EFFECTO DE LA INVENCION

De acuerdo con una realización de la presente invención, es posible obtener fácilmente un portador unido a la sonda que tenga una alta actividad de sonda, que es poco probable que adsorba una sustancia biológicamente relevante tal como una proteína o un ácido nucleico de manera no específica. También es posible obtener resultados de alta relación S/N utilizando dicho portador en el diagnóstico, la detección o similares y, en particular, el inmunoensayo como el inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA), el inmunoensayo enzimático quimioluminiscente (CLEIA), el inmunoensayo enzimático bioluminiscente (BLEIA) o el inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) (es posible realizar el diagnóstico, la detección o similares con alta sensibilidad).

EL MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Las realizaciones preferidas de acuerdo con la presente invención se describen en detalle a continuación. Nótese que la presente invención no se limita exclusivamente a las realizaciones descritas a continuación. Debe entenderse que la presente invención puede abarcar diversos ejemplos modificados dentro del alcance que no cambia el objeto de la presente invención. Cualquier expresión utilizada en el presente documento que represente un intervalo numérico tal como "de A a B" indica lo mismo que "de no menor que A a no mayor que B" y, por tanto, el intervalo numérico incluye A y B.

Además, la expresión "... El "(me)acrilato" utilizado en el presente documento se refiere a un concepto que abarca tanto el "...acrilato" como el "...metacrilato" Las expresiones similares tienen el mismo significado.

<Procedimiento de Producción del Portador Unido a la Sonda y del Portador Unido a la Sonda>

Un procedimiento de producción de un portador unido a la sonda de acuerdo con una realización de la presente invención (en lo sucesivo también denominado "el presente procedimiento") comprende: el paso 1 de mezclar un portador que tiene grupos tosilo y una sonda; y el paso 2 de reducir la cantidad de grupos tosilo en la superficie de un portador, en el que una proporción del área S2 que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador obtenida en el paso 2 con respecto al área S1A que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie del portador utilizado en el paso 1 ($S2/S1A \times 100\%$) no es menor que 140 %.

Un portador unido a la sonda de acuerdo con una realización de la presente invención es un portador que tiene grupos tosilo, al que se une una sonda, y en el que el área S2' que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie del portador unido a la sonda no es inferior a 15 Å²/grupo tosilo.

El procedimiento de producción del portador unido a la sonda no está particularmente limitado. El procedimiento es preferentemente el presente procedimiento, aunque puede ser un procedimiento convencional.

<Paso 1>

El paso 1 descrito anteriormente no está particularmente limitado siempre que se mezcle un portador que tenga grupos tosilo con una sonda. Sin embargo, el paso 1 es preferentemente un paso de mezcla del portador y la sonda en un líquido desde el punto de vista de que, por ejemplo, el portador se pone fácilmente en contacto con la sonda, lo que permite obtener convenientemente un portador unido a la sonda. En este caso, se puede añadir un líquido y mezclarlo con una mezcla del portador y la sonda. Alternativamente, el portador puede añadirse y mezclarse con un líquido de dispersión de la sonda o con una muestra que contenga la sonda. Sin embargo, es preferible añadir una sonda a un

líquido de dispersión del portador.

La forma de mezclar no está particularmente limitada. En el caso de que el portador se mezcle con una sonda en un líquido, el líquido puede simplemente dejarse quieto o puede agitarse, por ejemplo.

5 El tiempo necesario para el mezclado en el paso 1 puede variar en función de condiciones tales como los tipos y pesos de un portador y una sonda que se va a utilizar. Sin embargo, el tiempo de mezcla es preferentemente no menor que 2 horas, más preferentemente no menor que 6 horas, y particularmente de manera preferida no menor que 8 horas desde el punto de vista de que, por ejemplo, puede obtenerse un portador unido a la sonda, al que está suficientemente unida. El tiempo de mezclado es también preferentemente no mayor que 48 horas, más preferentemente no mayor que 36 horas, y de manera particular preferentemente no mayor que 24 horas desde el punto de vista de que, por ejemplo, un portador unido a la sonda puede ser producido eficientemente.

15 El paso 1 puede realizarse a temperatura ambiente o durante el calentamiento.

La temperatura de calentamiento puede seleccionarse adecuadamente en función de condiciones tales como los tipos de portador y de sonda que se van a utilizar. Sin embargo, la temperatura de calentamiento es preferentemente de 4 °C a 50 °C, más preferentemente de 20 °C a 45 °C, y particularmente de manera preferida de 35 °C a 40 °C desde el punto de vista de que, por ejemplo, se puede producir eficientemente un portador unido a la sonda mientras se mantiene la actividad de la misma.

25 En un caso en el que el paso 1 es un paso de mezcla de portadores y sondas en un líquido, el pH del líquido es preferentemente de 6 a 12, más preferentemente de 7 a 11, y particularmente de manera preferida de 8 a 10 desde el punto de vista de que, por ejemplo, se mejora la cantidad de sondas unidas a los portadores.

El paso 1 se realiza normalmente en el aire. Sin embargo, puede llevarse a cabo en una atmósfera de gas específica, tal como una atmósfera de gas inerte, o en un recipiente o sistema específico, tal como una caja de cultivo, en función de un portador y una sonda que se vaya a utilizar, por ejemplo.

30 El paso 1 es un paso mezclar el portador y la sonda en presencia de sulfato de amonio.

La presencia de sulfato de amonio en un sistema de mezcla del portador y la sonda permite aumentar la cantidad de sondas unidas a los portadores. En un caso particular en el que se utiliza una sonda altamente hidrofílica, aunque la cantidad de sondas unidas a los portadores tiende a disminuir, se puede obtener fácilmente un portador unido a la sonda, que consigue una gran cantidad de sondas unidas a los portadores, realizando el lavado para hacer una proteína o similares hidrofóbica incluso con el uso de dichas sondas.

40 El paso 1 es un paso que incluye el paso 1a de mezclar el portador con el sulfato de amonio y el paso 1b de mezclar una sonda con el líquido obtenido en el paso 1a. Este paso permite evitar que las sondas se espongan a una alta concentración local de sulfato de amonio. Esto dificulta que las sondas se precipiten o se agreguen, permitiendo así que las sondas se unan a los portadores de manera más uniforme. En consecuencia, se puede lograr un bajo ruido y altas señales en el diagnóstico, la detección o similares con el uso del portador obtenido.

45 La presente divulgación también describe un procedimiento en el que el paso 1 es un paso de mezcla de un portador con una sonda en un líquido que contiene sulfato de amonio. En tal caso, la concentración de sulfato de amonio en un líquido en el que el portador se pone en contacto con la sonda puede ajustarse en función de la hidrofilia de la sonda. Sin embargo, la concentración es, pero no está particularmente limitada a, preferentemente no mayor que 2,0 mol/l, más preferentemente desde 0,1 hasta 2,0 mol/l, y particularmente de manera preferida de 0,2 a 1,0 mol/l.

50 En un caso en el que la concentración de sulfato de amonio es menor que el límite inferior, podría ser difícil unir una cantidad suficiente de sondas a los portadores. Esto puede causar una reducción de la señal en el diagnóstico, la detección o similares con el uso del portador obtenido. En el caso de que la concentración de sulfato de amonio supere el límite superior, las sondas tienden a precipitarse o agregarse, lo que puede provocar una reducción de la señal en el diagnóstico, la detección o similares con el uso del portador obtenido.

55 En un caso habitual en el que los grupos hidroxilo protegidos con grupos tosilo se unen a grupos amino o similares de las sondas, si las sondas tienen una baja hidrofilia y tienden a interactuar con las superficies de los portadores, el sulfato de amonio se utiliza a una baja concentración o no es necesario. Sin embargo, se ha comprobado que en el caso de que se utilicen sondas altamente hidrofílicas, la eficacia de la unión al portador disminuye significativamente.

60 En el caso de que se utilicen sondas altamente hidrofílicas, es necesario reducir la hidrofilia de las sondas para facilitar la interacción de las sondas con las superficies de los portadores, con el fin de mejorar la eficiencia de unión de las sondas a los portadores. Sin embargo, cuando la concentración de sulfato de amonio se encuentra dentro del intervalo mencionado, es poco probable que las sondas se precipiten hasta que se complete la unión de una cantidad suficiente de sondas, lo cual es preferible. Además, cuando la concentración de sulfato de amonio está dentro del intervalo mencionado, es posible evitar que las sondas se desnaturalicen o se agreguen. Por lo tanto, es posible obtener fácilmente un portador unido a la sonda, al que la sonda está suficientemente unida, y en el que las características de

la sonda no se ven perjudicadas (la actividad de la sonda es alta), lo que permite obtener resultados de alta relación S/N utilizando el portador en el diagnóstico, la detección, o similares, y en particular, el inmunoensayo tal como CLIA o CLEIA (para realizar el diagnóstico, la detección, o similares con alta sensibilidad).

5 En el caso de que el paso 1 se lleve a cabo en un líquido, el líquido no está particularmente limitado, y puede seleccionarse en función de un portador y de una sonda que se va a utilizar. Sin embargo, se suele utilizar un medio acuoso desde el punto de vista de que, por ejemplo, se puede utilizar preferentemente para fines bioquímicos y similares, es menos probable que afecte negativamente al medio ambiente y es muy seguro para el trabajador que lo manipula. Más concretamente, se utilizan diversas soluciones tampón, agua y un disolvente mixto de agua y un disolvente orgánico, tal como el alcohol, que se mezcla con agua en una relación arbitraria, y similares. De ellas, son preferibles las soluciones tampón. Es preferible una solución tampón que tenga una capacidad de amortiguación a un pH de 6 a 12, es más preferible una solución tampón que tenga una capacidad de amortiguación a un pH de 7 a 11, y es particularmente preferible una solución tampón que tenga una capacidad de amortiguación a un pH de 8 a 10. Además, es preferible que dicha solución tampón no contenga componentes que reaccionen con los grupos tosilo. Un ejemplo es una solución tampón de borato de sodio.

El medio acuoso no está particularmente limitado mientras contenga agua, y puede contener uno o más tipos de medios no acuosos distintos del agua.

20 Además, el líquido puede contener aditivos convencionalmente conocidos, además del portador, la sonda, el sulfato de amonio y el medio acuoso. Algunos ejemplos de estos aditivos son los tensoactivos, los dispersantes, los ajustadores de pH, las sales y los estabilizadores, tales como los polímeros.

<Portadores que tienen Grupos Tosilo>

25 El portador es una partícula magnética que tiene grupos tosilos en su superficie. Normalmente, una sonda puede unirse químicamente a la superficie del portador que tiene grupos tosilo sólo mezclando o poniendo en contacto el portador con la sonda. Por lo tanto, se utiliza preferentemente un portador que tenga grupos tosilos. Además, incluso sin el uso de un agente de condensación o similares, como el portador tiene grupos tosilo, una sonda puede unirse al portador. En consecuencia, mediante el uso del portador, es posible obtener fácilmente un portador unido a la sonda para llevar a cabo convenientemente el diagnóstico, la detección o similares.

En el paso 1 pueden utilizarse dos o más tipos de portadores. Sin embargo, se suele utilizar un tipo de portador.

35 Nótese que el término "grupo tosilo" utilizado en la presente invención se refiere a un grupo p-toluenesulfonilo.

Los ejemplos de un portador en forma de partícula incluyen una partícula formada con un polímero orgánico, una partícula formada con un material inorgánico y una partícula que comprende un polímero orgánico y un material inorgánico. De estos, una partícula de polímero orgánico que comprende un polímero orgánico es preferible desde el punto de vista de que, por ejemplo, es ligero, y se puede formar fácilmente una partícula deseable.

45 La partícula de polímero orgánico puede ser un polímero entrecruzado o un polímero no entrecruzado. Sin embargo, puede ser preferentemente una partícula que tenga un polímero entrecruzado al menos en su superficie. En el caso de llevar a cabo el presente procedimiento en un líquido, la estructura entrecruzada formada con un polímero entrecruzado permite inhibir la disolución de las partículas en el líquido o el hinchamiento de las superficies de las partículas debido al líquido. En el caso de llevar a cabo el presente procedimiento en un líquido cuando una partícula de polímero orgánico no tiene un polímero entrecruzado al menos en su superficie, la superficie de la partícula puede disolverse en el líquido, lo que podría dar lugar a una reducción de la sensibilidad debido al desprendimiento de una sonda unida a la partícula, o el líquido puede causar la hinchazón de la superficie de la partícula, lo que podría promover la adsorción no específica de una sustancia biológicamente relevante.

50 Nótese que la expresión "que tiene... al menos en su superficie de partícula" utilizada en la presente invención se refiere a un componente que constituye la superficie de la partícula. Sin embargo, esto no significa necesariamente un requisito de que una partícula de polímero orgánico tenga una estructura de núcleo-caparazón. Por lo tanto, la partícula de polímero orgánico en su conjunto puede estar formada por un polímero entrecruzado.

60 El portador es una partícula magnética que tiene un cuerpo magnético. Resulta fácil, por ejemplo, eliminar los componentes unidos al portador y los demás componentes utilizando una partícula magnética como portador, lo que permite simplificar notablemente la operación de diagnóstico, detección, separación o similares.

Ejemplos específicos de la partícula magnética incluyen las siguientes partículas (i) a (iv). De éstas, es preferible una partícula (ii) o (iii) que tenga una estructura de núcleo-caparazón y una partícula (iii) es más preferible desde el punto de vista de que, por ejemplo, el tamaño de la partícula o el contenido del cuerpo magnético pueden ajustarse fácilmente.

65 (i) Partícula que tiene una fase continua que contiene un polímero orgánico o un material inorgánico tal como

silíce, en la que se dispersan las partículas del cuerpo magnético

(ii) Partícula que tiene un núcleo formado con una partícula de cuerpo magnético o un agregado secundario de partículas de cuerpo magnético y un caparazón formado con un polímero orgánico o un material inorgánico tal como silíce

5 (iii) Partícula que tiene un núcleo formado con una partícula base que tiene una partícula nuclear que comprende un polímero orgánico o un material inorgánico tal como silíce y una capa de cuerpo magnético (capa de agregado secundario) que comprende partículas de cuerpo magnético formadas en la superficie de la partícula nuclear y que tiene un caparazón que es una capa que comprende un polímero orgánico

10 (iv) Partícula que es una partícula porosa que consiste en un polímero orgánico o un material inorgánico que tiene poros, en la que se dispersan las partículas del cuerpo magnético, que la partícula puede estar provista con una capa que comprende un polímero orgánico como caparazón en la capa más externa de la partícula

15 El polímero orgánico no está particularmente limitado, y, por lo tanto, puede ser un polímero natural como la agarosa, el dextrano o la celulosa o un polímero sintético. Los ejemplos del polímero orgánico incluyen polímeros obtenidos a partir de uno o más tipos de polímeros seleccionados entre monómeros monofuncionales y monómeros de entrecruzamiento.

20 Los ejemplos de monómeros monofuncionales incluyen: monómeros vinílicos aromáticos monofuncionales tales como estireno, α -metilestireno y estireno halogenado; monómeros monofuncionales de (met)acrilato tal como metil(met)acrilato, etil(met)acrilato, estearil(met)acrilato, el ciclohexil(met)acrilato, isobornil(met)acrilato, 2-aminoetil(met)acrilato y mono(met)acrilato de 1,4-ciclohexanodimetanol; monómeros que contienen grupo glicidilo, tales como glicidil(met)acrilato, alilglicidiléter, 3,4-epoxiciclohexil(met)acrilato, y metilglicidilo(met)acrilato; monómeros que contienen grupos hidroxilo tales como 2-hidroxiethyl (met)acrilato, 2-hidroxiethyl(met)acrilamida, 2-hidroxiethyl(met)acrilato, 2-hidroxiethyl(met)acrilamida, 2-hidroxiethyl(met)acrilato, 2-hidroxiethyl(met)acrilamida, 2-hidroxiethyl(met)acrilato, 2-hidroxiethyl(met)acrilamida, glicerol mono(met)acrilato y glicerol mono(met)acrilamida.

25 Entre los ejemplos de monómeros entrecruzados se encuentran los monómeros vinílicos aromáticos polifuncionales, tales como divinilbenceno; monómeros de (met)acrilato polifuncionales, tales como etilenglicol di(met)acrilato, trimetilolpropano tri(met)acrilato, dipentaeritritol hexa(met)acrilato y alil(met)acrilato; y diolefinas conjugadas tales como butadieno e isopreno.

30 Es preferible utilizar uno o más tipos de monómeros que contengan grupos glicidilo y monómeros que contengan grupos hidroxilo para el polímero orgánico desde el punto de vista de que, por ejemplo, los grupos tosilo pueden introducirse fácilmente en la superficie de un portador.

35 La partícula (iii) se describe a continuación.

40 La partícula nuclear es básicamente una sustancia no magnética. Para ello puede utilizarse una sustancia orgánica o una sustancia inorgánica y seleccionarse adecuadamente en función del uso previsto de un portador unido a la sonda o similares. Sin embargo, es preferible una partícula que consiste en un polímero orgánico en vista de la capacidad de trabajo tras la conjugación, las propiedades de ligereza y similares.

45 El polímero orgánico que constituye la partícula nuclear es preferentemente un polímero de vinilo y más preferentemente poliestireno entrecruzado, acrilato entrecruzado o polimetilmetacrilato entrecruzado. En estos polímeros puede introducirse un grupo funcional, tal como un grupo carboxilo.

Dicha partícula nuclear puede producirse de acuerdo con procedimientos convencionales tales como los descritos en los documentos JP S57-24369 B, JP S61-215602 A, JP S61-215603 Ay JP S61-215604 A.

50 El tamaño promedio de las partículas en volumen (en lo sucesivo también denominado simplemente "tamaño de las partículas") de la partícula nuclear puede medirse por el procedimiento descrito en los Ejemplos. El tamaño de las partículas es preferentemente de 0,1 a 10 μm , más preferentemente de 0,2 a 5 μm , y particularmente de manera preferible de 0,3 a 2 μm desde el punto de vista de que, por ejemplo, se consigue una excelente propiedad de separación magnética, es improbable que se produzca sedimentación gravitacional y se puede generar un campo de reacción uniforme.

55 Los ejemplos del cuerpo magnético incluyen el tetraóxido de trihierro (Fe_3O_4), trióxido de dihierro ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), diversas ferritas, metales tales como hierro, manganeso, níquel, cobalto y cromo, y aleaciones de cobalto, níquel y manganeso.

60 De éstas, son preferibles las partículas finas superparamagnéticas de óxido de hierro que tienen tamaños de partícula no mayores que 50 nm y preferentemente de 5 a 30nm. Son más preferibles las partículas finas superparamagnéticas que contienen ferrita representada por AFe_2O_4 (A denota Mn, Co, Ni, Mg, Cu, Zn, Lio.sFeo.s, o similares), magnetita (Fe_3O_4), o $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Las partículas finas superparamagnéticas que consisten en $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y/o Fe_3O_4 son particularmente preferibles debido a la fuerte magnetización saturada y a las pocas magnetizaciones residuales.

65 Nótese que el tamaño de las partículas del cuerpo magnético es un valor promedio de los tamaños de las partículas

de 100 partículas seleccionadas al azar en una imagen de microscopio electrónico.

La partícula del cuerpo magnético es preferentemente una partícula con superficie hidrófoba

5 Un procedimiento para hidrofobizar la superficie de una partícula de cuerpo magnético no está particularmente limitado. Sin embargo, los ejemplos del procedimiento incluyen un procedimiento en el que una sustancia hidrófoba que tiene una porción que tiene alta afinidad por una partícula de cuerpo magnético y una porción hidrófoba en su molécula se pone en contacto con una partícula de cuerpo magnético, uniendo así la sustancia hidrófoba y la partícula de cuerpo magnético. Ejemplos específicos del procedimiento incluyen un procedimiento en el que se obtiene una partícula a partir de un fluido magnético aceitoso disponible en el mercado y la partícula se seca.

10 La cantidad de la partícula de cuerpo magnético utilizada puede ser cambiada, si es apropiado, dependiendo del tamaño de partícula de una partícula base, una partícula de cuerpo magnético o similares, y, por lo tanto, no está particularmente limitada. Sin embargo, la partícula de cuerpo magnético se utiliza preferentemente en una cantidad que permita que una pluralidad de partículas de cuerpo magnético cubra toda la superficie de la partícula nuclear y, más preferentemente, en una cantidad que permita que la relación de masas de la partícula nuclear y la partícula de cuerpo magnético sea de 10: 1 a 1: 3.

15 Un procedimiento de producción de una partícula base, en el que una capa del cuerpo magnético se forma en la superficie de una partícula nuclear, no está particularmente limitado. Sin embargo, los ejemplos de la misma incluyen un procedimiento en el que una partícula nuclear, tal como una partícula de polímero orgánico que es un cuerpo no magnético, y una partícula de cuerpo magnético se mezclan en seco, y se aplica externamente una fuerza física, conjugando así ambas partículas.

20 Los ejemplos de un procedimiento de aplicación de fuerza física incluyen un procedimiento que utiliza un mortero, un mortero automático o un molino de bolas, un procedimiento de compresión de polvo por presurización de cuchillas, un procedimiento que utiliza efectos mecanoquímicos tales como un procedimiento de mecanofusión, y un procedimiento que utiliza un impacto dado por una corriente de aire de alta velocidad utilizando un molino de chorro, un hibridador, o similares. Para conseguir una fuerte conjugación, es preferible que la capacidad de adsorción física sea fuerte. Esto puede lograrse, por ejemplo, agitando en un recipiente equipado con una cuchilla agitadora a una velocidad circunferencial de la cuchilla agitadora que preferentemente no sea menor que 15 m/segundo, más preferentemente que no sea menor que 30 m/segundo, y más preferentemente de 40 a 150 m/segundo. En el caso de que la velocidad circunferencial de la cuchilla agitadora sea inferior a 15 m/segundo, podría ser incapaz de permitir que una partícula del cuerpo magnético se adsorba suficientemente a la superficie de una partícula nuclear. Además, aunque el límite superior de la velocidad circunferencial de la cuchilla agitadora no está particularmente limitado, puede determinarse en función de un sistema que se va a utilizar, la eficiencia energética y otras condiciones.

30 El caparazón puede formarse, por ejemplo, llevando a cabo la polimerización en un líquido al que se han añadido materiales principales (por ejemplo, uno o más tipos de los monómeros monofuncionales y monómeros de entrecruzamiento descritos anteriormente) y, si es necesario, materiales auxiliares (por ejemplo, un iniciador de la polimerización, un emulsionante, un dispersante, un tensoactivo, un electrolito, un agente de entrecruzamiento y un ajustador del peso molecular) bajo presencia de partículas base preparadas de la manera descrita anteriormente.

35 La partícula de polímero orgánico o la partícula magnética tiene grupos tosilo en su superficie. Un procedimiento de producción de una partícula que tenga grupos tosilo en su superficie puede ser, por ejemplo, un procedimiento de preparación de una partícula utilizando un monómero que tenga grupos tosilo o un procedimiento de generación de grupos tosilo a través de una reacción para formar un caparazón o similares. Sin embargo, un procedimiento en el que se prepara una partícula que tiene grupos hidroxilo en su superficie y luego se permite que los grupos hidroxilo reaccionen con un compuesto que contiene grupos tosilo, tal como el cloruro de p-toluenesulfonilo, bajo la presencia de una amina o similares, introduciendo así grupos tosilo, es preferible desde el punto de vista de que, por ejemplo, se puede obtener fácilmente un portador deseable.

40 El procedimiento de producción de una partícula que tiene grupos hidroxilos en su superficie no está particularmente limitado y puede llevarse a cabo de acuerdo con un procedimiento convencionalmente conocido. Sin embargo, el procedimiento es preferentemente, por ejemplo, un procedimiento en el que el monómero que contiene grupos hidroxilo se utiliza como un polímero orgánico para formar el caparazón un procedimiento en el que un monómero que contiene grupos glicidilo se utiliza como un polímero orgánico para formar el caparazón y el grupo glicidilo se hace abrir en anillo con un ácido o similares.

45 El grupo hidroxilo es preferentemente un grupo 2,3-dihidroxiopropilo (-CH₂CH(OH)CH₂(OH)) desde el punto de vista de que, por ejemplo, los grupos tosilo pueden introducirse eficaz y fácilmente en la superficie de un portador.

50 Un portador, en el que aún no se han introducido grupos tosilo, es preferentemente altamente hidrofílico. Tal portador tiene un ángulo de contacto con el agua (25 °C) y es preferentemente no mayor que 40°, más preferentemente no mayor que 30°, y particularmente preferentemente de 10° a 25°.

Cuando el ángulo de contacto se encuentra dentro del intervalo anterior, se puede obtener fácilmente un portador unido a la sonda, mediante el cual se puede lograr una alta relación S/N en el diagnóstico, la detección o similares. Cuando el ángulo de contacto supera el límite superior del intervalo, se puede promover la adsorción no específica de una sustancia biológicamente relevante a un portador unido a la sonda.

5 En la presente invención, en la que un portador está en forma de partículas, el ángulo de contacto se mide utilizando una película de recubrimiento seca formada con el portador.

10 La película de recubrimiento seca es una película de recubrimiento obtenida aplicando 0,2 ml de un líquido de dispersión de agua que contiene 50 mg de partículas portadoras a un material de base liso, tal como un portaobjetos de vidrio, utilizando un aplicador y secando el líquido de dispersión de agua a una humedad del 40 % y una temperatura del aire de 25 °C durante 24 horas.

15 El ángulo de contacto entre la película de recubrimiento seca y el agua se determina añadiendo gota a gota aproximadamente 1 µl de una gota de agua (25 °C) a la película de recubrimiento seca, tomando inmediatamente una imagen de la película de recubrimiento desde la dirección horizontal, y obteniendo un ángulo entre la línea horizontal de la película de recubrimiento y el contorno de la gota, que se asume como una parte de la circunferencia de un círculo.

20 Un portador que tenga un ángulo de contacto que caiga dentro del intervalo anterior, en el que aún no se hayan introducido grupos tosilo, puede prepararse ajustando condiciones tales como la cantidad y el tipo de un monómero utilizado para formar una partícula (superficie).

25 Los grupos tosilo pueden introducirse permitiendo que al menos un grupo hidroxilo en la superficie de la partícula reaccione con un compuesto que contenga grupos tosilo.

30 Por lo tanto, una partícula obtenida mediante la introducción de grupos tosilo en una partícula que tenga grupos 2,3-dihidroxipropilo puede ser una partícula que tenga cualquiera de los grupos 2-hidroxi-3-(4'-metilfenilo) sulfonilpropilo, grupos 3-hidroxi-2-(4'-metilfenilo) sulfonilpropilo y grupos 2,3-di(4'-metilfenilo) sulfonilpropilo.

Los grupos hidroxilo no tosilados restantes contribuyen a hacer que un portador sea hidrófilo y, por lo tanto, tienden a contribuir a reducir el ruido tras el diagnóstico, la detección o similares.

Tamaño de las Partículas

35 El tamaño de las partículas magnéticas del portador es preferentemente de 0,1 a 20 µm, más preferentemente de 0,2 a 15 µm, y particularmente de manera preferida de 0,3 a 10 µm.

40 Cuando el tamaño de la partícula se encuentra dentro del intervalo anterior, se puede obtener fácilmente un portador que tenga una gran cantidad de sondas unidas por unidad de volumen. Al utilizar dicho portador, se puede mejorar la sensibilidad en el diagnóstico, la detección o similares. En el caso de que el tamaño de las partículas esté por debajo del límite inferior del intervalo anterior, la separación por centrifugación o similares tiende a ser muy larga. Además, la separación de las partículas de un disolvente de lavado tal como el agua tiende a ser insuficiente, lo que puede dar lugar a una eliminación insuficiente de moléculas indeseables (por ejemplo, una sustancia biológicamente relevante tal como una proteína o un ácido nucleico). Esto hace que, en algunos casos, sea imposible realizar una depuración suficiente. Mientras tanto, cuando el tamaño de las partículas supera el límite superior del intervalo anterior, el área de superficie específica tiende a disminuir y la cantidad de sondas unidas al portador tiende a disminuir, lo que puede dar lugar a una baja sensibilidad.

50 El tamaño de las partículas se determina por el procedimiento de la resistencia eléctrica de los poros (procedimiento de la zona de detección eléctrica). Los detalles se describen más adelante.

Área Ocupada por Un Grupo Tosilo en la Superficie del Portador

55 El área ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador (ya sea el área S1A que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador utilizado en el paso 1 o el área S1A' que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador al que aún no se ha unido una sonda) no es menor que 20 Å²/grupo tosilo, y preferentemente no es mayor que a 80 Å²/grupo tosilo, más preferentemente no es mayor que 60 Å²/grupo tosilo, y particularmente de manera preferida no es superior a 40 Å²/grupo tosilo.

60 En un caso en el que S1A o S1A' caen dentro del intervalo anterior, se puede obtener fácilmente un portador unido a la sonda, mediante el cual se puede lograr una alta relación S/N en el diagnóstico, la detección o similares.

65 En un caso en el que las áreas S1A y S1A' están por debajo del límite inferior del intervalo anterior, ya que la densidad de grupos tosilo en la superficie de un portador es alta, una sonda tiende a unirse en múltiples sitios en la superficie de un portador, lo que podría causar la reducción de la señal debido a la desnaturalización de las sondas. Además,

un exceso de grupos tosilo tiende a permanecer en un portador unido a la sonda, lo que tiende a hacer que la superficie del portador sea más hidrófoba. Por lo tanto, podría causar un aumento de ruido en el diagnóstico, la detección, o similares con el uso del portador. Mientras tanto, en un caso en el que las áreas S1A y S1A' superan el límite superior del intervalo anterior, es probable que sea imposible unir una cantidad suficiente de sondas a los portadores. Esto podría causar la reducción de la señal en el diagnóstico, la detección, o similares con el uso del portador.

Como resultado de estudios intensivos, los presentes inventores encontraron que en un caso en el que el portador es una partícula que contiene un polímero orgánico, al medir la cantidad de grupos tosilo en un medio orgánico, no sólo se miden los grupos tosilo presentes en la superficie del portador, sino también los grupos tosilo presentes en el interior del portador, debido al hinchamiento del mismo, y por lo tanto, dicho procedimiento de medición no es apropiado como procedimiento de evaluación de las propiedades de la superficie del portador. En consecuencia, los presentes inventores lograron determinar cuantitativamente la cantidad de grupos tosilo en la superficie del portador exclusivamente mediante la determinación de la cantidad de grupos tosilo en la superficie del portador en un medio acuoso. Los detalles se describen a continuación. Como resultado, se ha podido evaluar la cantidad de grupos tosilo que intervienen en la unión de las sondas y la cantidad de grupos tosilo que pueden causar una adsorción no específica.

El área ocupada por un grupo tosilo es un valor obtenido por medición en un medio acuoso según la presente invención. Los detalles se describen a continuación.

Ángulo de contacto

El ángulo formado entre la superficie de un portador que tiene grupos tosilo y el agua (25 °C) es preferentemente no menor que 50°. Como el portador está en forma de partículas, un ángulo de contacto formado entre una película de recubrimiento seca que consiste en el portador y el agua (25 °C) es preferentemente no menor que 70°, más preferentemente no menor que 90°, y particularmente de manera preferida no de 105° a 120°.

Cuando el ángulo de contacto se encuentra dentro del intervalo anterior, se puede obtener fácilmente un portador unido a la sonda, mediante el cual se puede lograr una alta relación S/N en el diagnóstico, la detección o similares. Cuando el ángulo de contacto está por debajo del límite inferior del intervalo anterior, la sensibilidad en el diagnóstico, la detección o similares con el uso del portador unido a la sonda obtenido podría disminuir.

Además, al utilizar un portador cuyo ángulo de contacto antes de la introducción de los grupos tosilo se encuentra dentro del intervalo anterior y cuyo ángulo de contacto después de la introducción de los grupos tosilo también se encuentra dentro del intervalo anterior, es posible inhibir la adsorción no específica de una sustancia biológicamente relevante al portador unido a la sonda, logrando así una alta sensibilidad en el diagnóstico, la detección o similares con el uso del portador unido a la sonda.

Un portador que tiene grupos tosilo para el que el ángulo de contacto se encuentra dentro del intervalo anterior puede ajustarse en función del grado de introducción de los grupos tosilo o similares.

<Sonda>

La sonda descrita anteriormente no está particularmente limitada, y puede ser una sustancia utilizada para el diagnóstico, la detección o similares. Sin embargo, la sonda es preferentemente una sustancia de unión específica. Específicamente, es preferentemente una proteína o un ácido nucleico, más preferentemente un antígeno, un anticuerpo o una avidina, y particularmente de manera preferida un antígeno o un anticuerpo.

Se pueden utilizar dos o más tipos de sondas en el paso 1. Sin embargo, se suele utilizar un tipo de sonda.

El antígeno o anticuerpo reacciona preferentemente con un componente que suele estar contenido en un objeto de prueba. Ejemplos de ello son: antígenos o anticuerpos para pruebas relacionadas con la coagulación/fibrinólisis, tales como un anticuerpo antiplasmina para la prueba de antiplasmina, un anticuerpo anti-dímero D para la prueba de dímero D, un anticuerpo antiFDP para la prueba de FDP, un anticuerpo anti tPA para la prueba de tPA, un anticuerpo anti-complejo TAT para la prueba de TAT, y un anticuerpo antiFPA para la prueba de FPA; antígenos o anticuerpos para pruebas relacionadas con tumores, como un anticuerpo antiBFP para la prueba BFP, un anticuerpo antiCEA para la prueba CEA, un anticuerpo antiAFP para la prueba AFP, un anticuerpo antiferritina para la prueba de ferritina y un anticuerpo antiCA19-9 para la prueba CA19-9; antígenos o anticuerpos para pruebas relacionadas con las proteínas séricas, tales como un anticuerpo antiapolipoproteína para la prueba de apolipoproteína, un anticuerpo antiβ2-microglobulina para la prueba de β2microglobulina, un anticuerpo antiα1-microglobulina para la prueba de α1-microglobulina, un anticuerpo antiinmunoglobulina para la prueba de inmunoglobulina y un anticuerpo antiPCR para la prueba de PCR; antígenos o anticuerpos para pruebas de función endocrina, tales como un anticuerpo antiHCG para la prueba de HCG; antígenos o anticuerpos para pruebas relacionadas con enfermedades infecciosas, tales como un anticuerpo antiHBs para la prueba de antígeno HBs, un antígeno HBs para la prueba de anticuerpos HBs, un antígeno VHC para la prueba de anticuerpos VHC, un antígeno VIH-1 para el anticuerpo VIH-1 un antígeno del VIH-2 para la prueba de anticuerpos del VIH-2, un antígeno del HTLV-1 para la prueba del HTLV-1, un antígeno del

5 micoplasma para la prueba de infección por micoplasma, un antígeno del toxoplasma para la prueba del toxoplasma y un antígeno de la estreptolisina O para la prueba del ASO; antígenos o anticuerpos para pruebas relacionadas con la autoinmunidad, tal como un antígeno de ADN para la prueba de anticuerpos anti ADN y una IgG humana desnaturalizada por calor para la prueba de FR; y antígenos o anticuerpos para el análisis de drogas, tales como un anticuerpo antidigoxina para la prueba de digoxina y un anticuerpo antilidocaína para la prueba de lidocaína.

El anticuerpo que se va a utilizar puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.

10 Los ejemplos de la sonda altamente hidrofílica descrita anteriormente incluyen una sonda que no se precipita al salar incluso en una solución acuosa o solución tampón que contiene la sonda al 1 % en masa y sulfato de amonio al 33 % en masa.

15 Es preferible utilizar sondas en el paso 1 en una cantidad en la que la proporción del área S1B que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador obtenido en el paso 1 con respecto al área S1A que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador que se va a utilizar (antes de ser unido a la sonda) en el paso 1 ($S1B/S1A \times 100\%$) cae dentro del intervalo descrito a continuación desde el punto de vista de que, por ejemplo, se puede conseguir una alta sensibilidad en el diagnóstico, la detección o similares con el uso del portador obtenido unido a la sonda.

20 Como se utiliza una partícula magnética como portador, la cantidad de sondas utilizadas en el paso 1 es preferentemente no menor que 0,5 partes en masa y más preferentemente no menor que 1 parte en masa con respecto a 100 partes en masa de partículas magnéticas desde el punto de vista de que, por ejemplo, se puede conseguir una alta sensibilidad en el diagnóstico, la detección o similares con el uso del portador unido a la sonda obtenido. Además, el límite superior del mismo es preferentemente no mayor que 200 partes en masa y más preferentemente no mayor que 100 partes en masa.

Área S1B Ocupada por un Grupo Tosilo en la Superficie del Portador Obtenido en el Paso 1

30 El área S1B que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador obtenido en el paso 1 no es menor que $10 \text{ \AA}^2/\text{grupo tosilo}$, preferentemente no menor que $25 \text{ \AA}^2/\text{grupo tosilo}$, y particularmente de manera preferida no menor que $40 \text{ \AA}^2/\text{grupo tosilo}$.

35 Cuando el área S1B se encuentra dentro del intervalo anterior, se puede obtener fácilmente un portador unido a la sonda, mediante el cual se puede lograr una alta relación S/N en el momento del diagnóstico, la detección o similares.

40 La proporción del área S1B que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador obtenido en el paso 1 con respecto al área S1A que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador utilizado en el paso 1 ($S1B/S1A \times 100\%$) no es menor que 110 %, preferentemente no es menor que 120 %, y particularmente preferentemente no es menor que 130 %.

45 Cuando la proporción del área cae dentro del intervalo anterior, se puede obtener fácilmente un portador unido a la sonda, mediante el cual se puede lograr una alta relación S/N en el momento del diagnóstico, la detección o similares.

<Paso 2>

50 El paso 2 descrito anteriormente no está particularmente limitado mientras sea un paso de reducción de la cantidad de grupos tosilo en la superficie de un portador, sin embargo, es preferentemente un paso para permitir que los grupos tosilo en la superficie de un portador sean liberados. El paso 2 se realiza después del paso 1.

55 Los grupos tosilos que quedan después del paso 1 son altamente hidrófobos, y, por lo tanto, tienden a causar una adsorción no específica de una sustancia biológicamente relevante. El uso de un portador que tenga grupos tosilos remanentes al momento del diagnóstico, la detección o similares, tiende a causar un aumento de ruido. Por lo tanto, es preferible reducir la cantidad de grupos tosilo en la superficie de un portador obtenido en el paso 1 y es particularmente preferible permitir que los grupos tosilo se liberen químicamente.

El procedimiento utilizado en el paso 2 es un procedimiento en el que se permite que los grupos tosilo reaccionen con un agente bloqueador para que se liberen.

60 Cuando se permite que el agente bloqueador reaccione con los grupos tosilo, no está particularmente limitado siempre que se mezcle un portador con un agente bloqueador. Sin embargo, es preferible emplear un procedimiento de mezcla de un portador y un agente de bloqueo en un líquido desde el punto de vista de que, por ejemplo, el portador y el agente de bloqueo se ponen fácilmente en contacto entre sí, obteniendo así convenientemente un portador unido a la sonda. Un líquido utilizado en este procedimiento es, por ejemplo, un líquido similar al líquido descrito para el paso 1 anterior. En el caso de que el paso 1 se realice en un líquido, el líquido utilizado en el paso 1 puede utilizarse directamente en el paso 2.

65

La forma de mezclar no está particularmente limitada. En el caso de que el portador se mezcle con el agente de bloqueo en un líquido, el líquido puede simplemente dejarse quieto o puede agitarse, por ejemplo.

5 El tiempo requerido para el mezclado (tiempo requerido para una reacción de un portador y un agente de bloqueo) o el tiempo requerido para una reacción de hidrólisis diferiría dependiendo de las condiciones tales como los tipos y las cantidades de un portador y un agente de bloqueo que se va a utilizar. Sin embargo, dicho tiempo es preferentemente no menor que 2 horas, más preferentemente no menor que 6 horas, y particularmente de manera preferida no menor que 8 horas desde el punto de vista de que, por ejemplo, el bloqueo se lleva a cabo en una medida suficiente, lo que permite obtener fácilmente un portador unido a la sonda para el que el área S2 cae dentro del intervalo descrito a
10 continuación. También es preferible que el tiempo no sea superior a 48 horas, más preferentemente no mayor que 36 horas, y particularmente preferible que no sea mayor que 24 horas desde el punto de vista de que, por ejemplo, se pueda producir eficazmente un portador unido a la sonda.

15 El paso 2 puede realizarse a temperatura ambiente o durante el calentamiento.

La temperatura de calentamiento puede seleccionarse adecuadamente dependiendo de condiciones tales como los tipos de portador y de agente de bloqueo que se vayan a utilizar. Sin embargo, la temperatura de calentamiento es preferentemente de 4 °C a 50 °C, más preferentemente de 20 °C a 45 °C, y particularmente de manera preferida de 35 °C a 40 °C desde el punto de vista de que, por ejemplo, se puede producir eficientemente un portador específico unido a la sonda.
20

El paso 2 se realiza normalmente en el aire. Sin embargo, puede llevarse a cabo en una atmósfera de gas específica, tal como una atmósfera de gas inerte, o en un contenedor o sistema específico, tal como una caja de cultivo, en función de un portador o un agente de bloqueo que se vaya a utilizar, por ejemplo.
25

<Agente de Bloqueo>

El agente de bloqueo es una sustancia que tiene un grupo funcional que es reactivo a un grupo tosilo. Sin embargo, es preferible una sustancia que tenga un grupo funcional hidrofílico capaz de evitar la adsorción no específica, por ejemplo, de una molécula biológica tal como una proteína, un lípido, un ácido nucleico o células en un objeto de prueba, una proteína, un sustrato luminescente o una sustancia que absorbe la luz, o similares en un reactivo de medición a la superficie de un portador.
30

Los ejemplos del grupo funcional que es reactivo a un grupo tosilo incluyen grupos nucleófilos tal como un grupo amino y un grupo mercapto.
35

Los ejemplos del grupo funcional hidrofílico incluyen un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, un grupo ácido sulfónico, un grupo ácido fosfórico, un grupo que contiene azúcar, un grupo que contiene iones zwitter y un grupo que contiene polietilenglicol.
40

El agente de bloqueo es preferentemente soluble en agua desde el punto de vista de que, por ejemplo, la adsorción no específica a un portador unido a la sonda puede ser más inhibida. El término "soluble en agua" utilizado en el presente documento se refiere a la característica de mezclarse con agua en una relación arbitraria o de disolverse en una cantidad no menor que 10 mg en 1 g de agua a 25 °C.
45

El agente de bloqueo es al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en un compuesto de bajo peso molecular, un polímero biológico tal como un péptido o una proteína, y un polímero sintético. Sin embargo, es preferible un polímero biológico o un polímero sintético porque es muy eficaz para inhibir la adsorción no específica debido al impedimento estérico. Un polímero sintético es más preferible en el sentido de que no se introduce una sustancia de origen biológico en un sistema de medición.
50

Ejemplos de un compuesto de bajo peso molecular que funciona como agente de bloqueo incluyen tris(hidroximetil)aminometano y etanolamina. El Tris(hidroximetil)aminometano es preferible porque la adsorción no específica puede ser particularmente inhibida.
55

Los ejemplos de un polímero biológico que funciona como agente de bloqueo incluyen albúmina de suero bovino (BSA), caseína y gelatina. La BSA es preferible porque, por ejemplo, se puede inhibir especialmente la adsorción no específica.

60 Los ejemplos de un polímero sintético conocido públicamente que funciona como agente de bloqueo incluyen un copolímero de monómeros de vinilo que tiene un polímero hidrofílico tal como polioxietileno como una cadena lateral, un copolímero en bloque de un polímero hidrofílico tal como polioxietileno y un polímero diferente, y un polímero hidrofílico tal como polioxietileno que tiene un grupo funcional en un extremo del mismo. En particular, un polímero sintético que tiene una estructura en la que un extremo de polioxietileno tiene una poliamina divulgada en el documento JP 2008-170417 A se utiliza preferentemente en la presente invención porque tiene un efecto de mejora de la reactividad al alinear la orientación de una sonda tal como un anticuerpo, además de un efecto de inhibición de
65

la adsorción no específica a la superficie de un portador. Ejemplos de dicho agente de bloqueo incluyen Blockmaster CE510 o CE210 fabricados por JSR Life Sciences Corporation.

En el caso de utilizar el agente de bloqueo descrito anteriormente, es preferible utilizar el agente de bloqueo en una cantidad en la que una proporción del área S2 que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador obtenido en el paso 2 con respecto al área S1B que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador obtenido en el paso 1 ($S2/S1B \times 100\%$) cae dentro del intervalo descrito a continuación desde el punto de vista de que, por ejemplo, se puede lograr una alta sensibilidad en el diagnóstico, la detección o similares con el uso del portador obtenido.

Como se utiliza una partícula magnética como portador, la cantidad del agente de bloqueo utilizado en el paso 2 es preferentemente no menor que 1 parte en masa y más preferentemente no menor que 2 partes en masa con respecto a 100 partes en masa de partículas magnéticas desde el punto de vista de que, por ejemplo, se puede lograr una alta sensibilidad en el diagnóstico, la detección o similares con el uso del portador obtenido unido a la sonda. Además, el límite superior del mismo es preferentemente no mayor que 200 partes en masa y más preferentemente no mayor que 100 partes en masa.

Área Ocupada por Un Grupo Tosilo en la Superficie del Portador Unido a la Sonda

El área ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador unido a la sonda (cada una de las áreas S2 ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador obtenido en el paso 2 y el área S2' ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador unido a la sonda) es preferentemente no menor que $15 \text{ \AA}^2/\text{grupo tosilo}$.

Como resultado de estudios intensivos, los presentes inventores encontraron que un portador unido a la sonda que tiene tal área es poco probable que cause adsorción no específica y tiene una alta actividad de la sonda.

Además, cada una de las áreas S2 y S2' es preferentemente no inferior a $30 \text{ \AA}^2/\text{grupo tosilo}$, más preferentemente no menor que $40 \text{ \AA}^2/\text{grupo tosilo}$, y particularmente de manera preferida no menor que $45 \text{ \AA}^2/\text{grupo tosilo}$ desde el punto de vista de que, por ejemplo, se reduce la adsorción no específica y se mejora la actividad de la sonda. Los grupos tosilo restantes tienden a causar una adsorción no específica de una sustancia biológicamente relevante. El uso de un portador que tenga grupos tosilos remanentes al momento del diagnóstico, la detección o similares, tiende a causar un aumento de ruido. Por lo tanto, los grupos tosilo pueden no estar presentes en la superficie de un portador unido a la sonda.

La proporción del área S2 que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador obtenido en el paso 2 con respecto al área S1A que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador utilizado en el paso 1 ($S2/S1A \times 100\%$) y la proporción del área S2' que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador unido a la sonda con respecto al área S1A' que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador al que aún no se ha unido la sonda ($S2'/S1A' \times 100\%$) son, cada una, no menos del 140 % con respecto al área S1A' que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador al que aún no está unida la sonda ($S2'/S1A' \times 100\%$), son, cada una, no menos del 140 %, preferentemente del 150 % al 250 %, más preferentemente del 160 % al 220 %, y particularmente de manera preferida del 170 % al 190 %.

Los grupos tosilo se reducen en un portador unido a la sonda que tiene la proporción de área que cae dentro del intervalo anterior, de tal manera que la adsorción no específica de una sustancia biológicamente relevante tal como una proteína o un ácido nucleico puede ser suficientemente inhibida. El uso del portador permite conseguir un bajo nivel de ruido y una alta relación S/N en el diagnóstico, la detección o similares y, especialmente, en los inmunoensayos como CLIA o CLEIA.

En un caso en el que la proporción de área está por debajo del límite inferior del intervalo anterior, se tiende a promover la adsorción no específica de una sustancia biológicamente relevante. En un caso en el que la proporción de área supera el límite superior del intervalo anterior, tiende a no obtenerse un portador unido a la sonda al que se une una cantidad suficiente de sondas. En tal caso, es posible que no se obtengan señales elevadas en el diagnóstico, la detección o similares con el uso del portador.

La proporción del área S2 que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador obtenido en el paso 2 con respecto al área S1B que está ocupada por un grupo tosilo en la superficie de un portador obtenido en el paso 1 ($S2/S1B \times 100\%$) no es menor que 110 %, preferentemente del 115 % al 160 %, más preferentemente del 120 % al 150 %, y de manera particular preferentemente del 125 % al 140 %.

Los grupos tosilo se reducen en un portador unido a la sonda que tiene la proporción de área que cae dentro del intervalo anterior, de tal manera que la adsorción no específica de una sustancia biológicamente relevante tal como una proteína o un ácido nucleico puede ser suficientemente inhibida. El uso del portador permite conseguir un bajo nivel de ruido y una alta relación S/N en el diagnóstico, la detección o similares y, especialmente, en los inmunoensayos como CLIA o CLEIA.

En un caso en el que la proporción de área está por debajo del límite inferior del intervalo anterior, se tiende a promover

la adsorción no específica de una sustancia biológicamente relevante. En un caso en el que la proporción de área supera el límite superior del intervalo anterior, tiende a no obtenerse un portador unido a la sonda al que se une una cantidad suficiente de sondas. En tal caso, es posible que no se obtengan señales elevadas en el diagnóstico, la detección o similares con el uso del portador.

5

<Uso Previsto>

Un portador unido a la sonda obtenido en el presente procedimiento y un portador unido a la sonda en una realización de la presente invención pueden utilizarse preferentemente para el diagnóstico o la detección de una sustancia objetivo y especialmente para el inmunoensayo tal como CLIA o CLEIA. Así, pueden utilizarse preferentemente para un agente de diagnóstico *in vitro* o para la detección de una sustancia biológicamente relevante. Por lo tanto, el portador unido a la sonda también puede considerarse un agente de diagnóstico *in vitro* o un agente de detección de sustancias biológicamente relevantes que contiene el portador unido a la sonda. Específicamente, el portador unido a la sonda puede utilizarse como un portador de afinidad, tal como una partícula portadora de compuestos en el campo de la bioquímica y una partícula portadora de unión química utilizada para un agente de diagnóstico. El portador unido a la sonda se utiliza preferentemente para el inmunodiagnóstico o la detección de ácidos nucleicos y, en particular, se utiliza preferentemente como una partícula unida a la sonda para el inmunoensayo, a la que se une una sonda tal como un antígeno o un anticuerpo.

La sustancia objetivo descrita anteriormente no está particularmente limitada. Sin embargo, es preferible que sea una sustancia que se une específicamente a la sonda. Ejemplos específicos de las mismas son un reactivo de inmunoensayo y una sustancia biológicamente relevante o una sustancia química contenida en una muestra de inspección.

La sustancia biológicamente relevante es cualquier sustancia biológicamente relevante. Algunos ejemplos de ello son una sustancia *in vivo*, una sustancia inducida a partir de una sustancia *in vivo* y una sustancia que puede utilizarse *in vivo*. La sustancia biológicamente relevante no está particularmente limitada. Sin embargo, algunos ejemplos incluyen proteínas (por ejemplo, enzimas, anticuerpos, aptámeros y receptores), péptidos (por ejemplo, glutatona), ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN y ARN), azúcares, lípidos y otras células o sustancias (por ejemplo, sustancias derivadas de la sangre, incluyendo diversas células sanguíneas tales como plaquetas, eritrocitos y leucocitos y diversas células flotantes).

<Procedimiento de Detección o Separación de la Sustancia Objetivo>

El portador unido a la sonda se utiliza en un procedimiento de detección o separación de una sustancia objetivo en una realización de la presente invención (en lo sucesivo también denominado "el presente procedimiento de detección").

En el presente procedimiento de detección, ya que se utiliza el portador unido a la sonda, es posible detectar una sustancia objetivo para la detección con una sensibilidad notablemente alta.

En un ejemplo del procedimiento de detección, el portador unido a la sonda se pone en contacto con una sustancia objetivo en un objeto de prueba, permitiendo así que la sustancia objetivo quede atrapada a través de una sonda contenida en el portador unido a la sonda en el portador y que luego reaccione con una sonda secundaria. En ese momento, es posible detectar la sustancia objetivo mediante una reacción fluorescente o enzimática con el uso de un fósforo, un isótopo o una sonda etiquetada con una enzima o similares como sonda secundaria, y si es necesario, un reactivo luminiscente o similares.

Un ejemplo de dicho procedimiento de separación es un procedimiento en el que se permite que el portador unido a la sonda reaccione con una sustancia objetivo y, a continuación, el portador y la sustancia se recogen y se lavan magnéticamente, separando y eliminando así los componentes distintos de la sustancia objetivo.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describe en detalle con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos Ejemplos.

[Medición del Tamaño de las Partículas]

El tamaño de cada partícula magnética se midió con el Multisizer4e (fabricado por Beckman Coulter Inc.). Se añadieron a 100 ml de una solución electrolítica (ISOTON II fabricada por Beckman Coulter Inc.), partículas magnéticas al 1% en masa dispersas en una solución acuosa de Tween 20 al 0,1% en masa hasta que el valor indicado por un sensor de concentración alcanzó un nivel del 4 % al 10 %. Se midieron los tamaños de las partículas de 50.000 partículas y se calculó su valor promedio, determinando así el tamaño promedio de las partículas en volumen.

65

[Determinación Cuantitativa de los Grupos Tosilo]

Las partículas magnéticas en una cantidad de 100 mg (partículas magnéticas obtenidas en el Ejemplo de Síntesis 1 o partículas magnéticas después de cada paso) dispersadas en 1 ml de agua se recogieron en un microtubo, y se añadieron 100 µl de etilendiamina, permitiendo así una reacción a 40 °C durante 15 horas. Tras la reacción, el microtubo se colocó en un soporte magnético, recuperando así el sobrenadante. Se analizó el sobrenadante en una cantidad de 20 µl por cromatografía iónica (sistema: ICS2000 fabricado por DIONEX Corporation; columna: AS18; detección: conductividad eléctrica; caudal: 1,0 ml/minuto; tiempo de medición: 30 minutos; eluyente: solución acuosa de hidróxido de potasio 50 mM), y se determinó el área de un pico que apareció en el punto de tiempo de retención de unos 23 minutos. Por separado, se calculó la cantidad de grupos tosilo superficiales por cada 100 mg de partículas magnéticas con base en una curva de calibración obtenida mediante el análisis de p-toluenesulfonato de sodio por cromatografía iónica.

[Cálculo del Área Ocupada por un Grupo Tosilo en la Superficie de una Partícula Magnética]

El área ocupada por un grupo tosilo en la superficie de una partícula magnética se determina mediante la siguiente fórmula

$$\text{Área ocupada por un grupo tosilo en la superficie de una partícula magnética} = \text{un área superficial de una partícula magnética} / \text{el número de grupos tosilo de superficie}$$

En concreto, el área se calculó mediante la siguiente fórmula

$$\text{Área ocupada por un grupo tosilo en la superficie de una partícula magnética} [\text{Å}^2/\text{grupo tosilo}] = 1 / (1,004 \times \text{gravedad específica de partícula magnética} [\text{g/cm}^3] \times \text{tamaño de partícula} [\mu\text{m}] \times \text{la cantidad de grupos tosilo} [\text{mmol/g}])$$

La gravedad específica de la partícula magnética utilizada en los Ejemplos se obtuvo de la siguiente manera.

Se colocó un polvo de partículas magnéticas en una cantidad de 30 mg en un analizador termogravimétrico simultáneo (STA7300 fabricado por Hitachi High-Tech Science Corporation), seguido de una medición en las siguientes condiciones: tasa de aumento de temperatura: 10 °C/minuto; temperatura límite: 500 °C; tiempo de mantenimiento: 20 minutos; tiempo de muestreo: 1,0 segundos; especie de gas: nitrógeno; caudal de gas: 200 ml/minuto. Así, se obtuvo el porcentaje en masa (% en masa) de óxido de hierro y el de una resina contenida en partículas magnéticas. La gravedad específica de la partícula magnética se calculó con base en cada porcentaje en masa (% en masa) obtenido anteriormente con una gravedad específica del óxido de hierro de 5,2 [g/cm³] y una gravedad específica de la resina de 1,1 [g/cm³].

[Determinación Cuantitativa de la Cantidad de Anticuerpos de Unión]

Los anticuerpos unidos a las partículas magnéticas se determinaron cuantitativamente utilizando un kit de ensayo de proteínas BCA (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc.).

Al principio, cada uno de los 50 µl de soluciones tampón MES (0,1 mol/l), en las que se disolvieron 0 µg, 5 µg, 10 µg o 15 µg de anticuerpos, se dispensó en un microtubo, y se añadió a cada microtubo 1 ml de un reactivo de trabajo preparado mezclando un reactivo A y un reactivo B incluidos en el kit al 50/1 (v/v). Tras la incubación a 37 °C durante 30 minutos, cada microtubo se colocó en un soporte magnético, recuperando así el sobrenadante. A continuación, se midió OD 562 y se creó así una curva de calibración.

Posteriormente, se recogió en cada microtubo 1 mg de partículas magnéticas unidas a anticuerpos antiPSA dispersadas en 50 µl de una solución tampón MES (0,1 mol/l). El reactivo de trabajo se añadió en una cantidad de 1 ml. Tras la incubación a 37 °C durante 30 minutos, cada microtubo se colocó en un soporte magnético, recuperando así el sobrenadante. A continuación, se midió OD 562. La cantidad de anticuerpos de unión se calculó con base en una curva de calibración.

[Inmunoensayo Enzimático de Quimioluminiscencia (CLEIA)]

A cada uno de los pocillos 1 y 2 de una placa blanca de 96 pocillos, se añadieron 15 µg de partículas magnéticas unidas a anticuerpos antiPSA, que se dispersaron en 50 µl de una solución tampón TBS-T (137 mmol/l de cloruro de sodio, 2,7 mmol/l de cloruro de potasio, 25 mmol/l de clorhidrato de tris(hidroximetil) aminometano (en lo sucesivo también denominado "Tris-HCl"), 0,1 % en masa de Tween 20, pH 7,4).

5 A continuación, para la medición del ruido, se añadieron 10 µl de una solución tampón BSA/TBS (1 % en masa de BSA, 137 mmol/l de cloruro de sodio, 2,7 mmol/l de cloruro de potasio, 25 mmol/l de Tris-HCl, pH 7,4) al pocillo 1, y para la medición de la señal, se añadieron 10 µg de un antígeno PSA que se disolvió en 10 µl de una solución tampón BSA/TBS (que contenía 1 % en masa de BSA) al pocillo 2, permitiendo así que se produjera una reacción a 37 °C durante 10 minutos. A continuación, se recogieron magnéticamente las partículas unidas a anticuerpos, se eliminó el sobrenadante y se lavaron las partículas con una solución tampón TBS-T. Esta operación de recogida y lavado magnético de las partículas se repitió cinco veces en total. A continuación, se añadieron 50 µl de anticuerpos antiPSA marcados con fosfatasa alcalina, lo que permitió que se produjera una reacción a 37 °C durante 10 minutos. Después de la reacción, se llevó a cabo una operación de recogida y lavado magnético de las partículas magnéticas cinco veces utilizando una solución tampón TBS-T de la manera descrita anteriormente, y se añadieron 50 µl de un sustrato luminiscente (una solución de sustrato LUMIPULSE de la serie Class III fabricada por FUJIREBIO Inc. Las intensidades de luminiscencia de los ruidos y las señales se midieron con un luminómetro 5 minutos después de la adición de un sustrato luminiscente.

[Ejemplo 1 de Síntesis]

Se añadió acetona a un fluido magnético aceitoso ("EXP series EMG" fabricado por Ferrotec Holdings Corporation), permitiendo así que las partículas se precipitaran y se depositaran. Las partículas se secaron. Así, se obtuvieron las partículas de cuerpo magnético de ferrita (óxido de hierro) hidrofobizadas en superficie (tamaño promedio de las partículas primarias: 0,01 µm).

A continuación, se mezclaron suficientemente 30 g de partículas de poliestireno (tamaño promedio de las partículas en volumen: 1,5 µm) y 15 g de las partículas del cuerpo magnético hidrofobizado mediante un mezclador, y la mezcla se trató utilizando un sistema de hibridación del tipo NHS-0 (fabricado por Nara Machinery Co., Ltd.) a una velocidad circunferencial de una cuchilla (cuchilla agitadora) de 100 m/segundo (16.200 rpm) durante 5 minutos. Así, se obtuvieron las partículas base (tamaño de partícula: 2,0 µm) que tienen una capa de cuerpo magnético que consiste en partículas de cuerpo magnético en su superficie.

Posteriormente, se introdujeron 375 g de una solución acuosa que contenía dodecil sulfato de sodio a una concentración del 0,50 % en masa en un matraz separable de 1 l. A continuación, se añadieron 15 g de las partículas base que tenían una capa de cuerpo magnético y se dispersaron mediante un homogeneizador, tras lo cual se calentaron a 60 °C.

Una preemulsión preparada añadiendo 27 g de metacrilato de metilo (en lo sucesivo denominado "MMA"), 3 g de trimetacrilato de trimetilol propano (en lo sucesivo denominado "TMP"), y 0,6 g de peróxido de di (3,5,5-trimetilhexanoil) (PEROYL 355 fabricado por NOF Corporation (en lo sucesivo denominado "PEROYL 355")) a 150 g de una solución acuosa que contenía dodecilsulfato de sodio a una concentración del 0,50 % en masa y dispersando la mezcla se añadió gota a gota al matraz separable de 1l controlado a 60 °C durante 2 horas. Tras la adición gota a gota, la temperatura se mantuvo a 60 °C, y se agitó durante 1 hora. A continuación, una preemulsión preparada añadiendo 13,5 g de metacrilato de glicidilo (en lo sucesivo denominado "GMA"), 1,5 g de TMP y 0,3 g de PEROYL 355 a 75 g de una solución acuosa que contenía dodecilsulfato de sodio se añadió a una concentración del 0,50 % en masa y dispersando la mezcla gota a gota al matraz separable de 1l controlado a 60 °C durante 1 hora y 30 minutos. A continuación, se aumentó la temperatura a 75 °C y se dejó que la polimerización continuara durante 2 horas, completando así la reacción.

Posteriormente, se añadieron 60 ml de ácido sulfúrico 1 mol/l al matraz separable de 1l y se agitó a 60 °C durante 6 horas. A continuación, las partículas del matraz separable se separaron magnéticamente y se lavaron repetidamente con agua destilada. En consecuencia, se obtuvieron partículas magnéticas (A) que comprendían grupos hidroxilos.

A continuación, las partículas magnéticas (A) se liofilizaron, y 1,0 g de las partículas magnéticas liofilizadas (A) se dispersaron en 8 ml de piridina. A continuación, se añadieron 0,2 g de cloruro de p-toluenosulfonilo, y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la reacción, las partículas se separaron magnéticamente y se lavaron con acetona 4 veces y luego con agua destilada 4 veces, obteniendo así partículas magnéticas con grupos tosilo (B). El tamaño de las partículas era de 3,0 µm.

[Ejemplo 1]

Las partículas magnéticas (B) obtenidas en el Ejemplo de Síntesis 1 en una cantidad de 10 mg se dispersaron en 1,5 ml de una solución tampón de ácido bórico (sulfato de amonio: 0,5 mol/L; ácido bórico: 0,1 mol/L; pH 9,5) en el que se disolvió sulfato de amonio. Se añadió un anticuerpo contra un antígeno específico de la próstata (PSA) (en lo sucesivo denominado "anticuerpo antiPSA") en una cantidad de 100 µg al líquido de dispersión de partículas magnéticas, lo

que permitió que se produjera una reacción a 37 °C durante 8 horas. A continuación, se añadieron 50 µl de CE510 (2,0 % en masa, fabricado por JSR Corporation) como agente de bloqueo, permitiendo así que se produjera una reacción a 37 °C durante 15 horas. Después de la reacción, las partículas se separaron magnéticamente utilizando un soporte magnético y se lavaron con un líquido de lavado (25 mmol/L de Tris-HCl conteniendo 0,01 % en masa de Tween 20, pH 7,4) repetidamente, obteniendo así partículas magnéticas unidas a anticuerpos antiPSA (C-1).

[Ejemplo 2]

Las partículas magnéticas unidas a anticuerpos antiPSA (C-2) se obtuvieron realizando la misma operación que en el Ejemplo 1, excepto que el tiempo de reacción de bloqueo se fijó en 6 horas.

[Ejemplo 3]

Se obtuvieron partículas magnéticas unidas a anticuerpos antiPSA (C-3) realizando la misma operación que en el Ejemplo 1, excepto que se utilizó BSA como agente de bloqueo.

[Ejemplo 4]

Las partículas magnéticas (B) obtenidas en el Ejemplo de Síntesis 1 se dispersaron en una cantidad de 10 mg en 1,0 ml de una solución tampón de ácido bórico (0,1 mol/l, pH 9,5), y se añadieron 100 µg de un anticuerpo antiPSA. Posteriormente, se añadieron 0,5 ml de una solución tampón de ácido bórico (sulfato de amonio: 1,5 mol/l; ácido bórico: 0,1 mol/l; pH 9,5), en la que se disolvió el sulfato de amonio, permitiendo así que se produjera una reacción a 37 °C durante 8 horas. A continuación, se añadieron 50 µl de CE510 (2,0 % en masa, fabricado por JSR Corporation) como agente de bloqueo, permitiendo así que la reacción se desarrollara a 37° C durante 15 horas. Después de la reacción, las partículas se separaron magnéticamente utilizando un soporte magnético, se lavaron con un líquido de lavado (25 mmol/l Tris-HCl que contenía 0,01 % en masa de Tween 20, pH 7,4) repetidamente, y se diluyó con el líquido de lavado de forma que la concentración de partículas se ajustara a 0,03 % en masa. Así, se obtuvieron partículas magnéticas unidas a anticuerpos antiPSA (C-4).

[Ejemplo 5]

Se obtuvieron las partículas magnéticas unidas a anticuerpos antiPSA (C-5) realizando la misma operación que en el Ejemplo 1, excepto que la concentración de sulfato de amonio de la solución tampón de ácido bórico en la que se disolvió el sulfato de amonio se fijó en 1,0 mol/l.

[Ejemplo 6]

Se obtuvieron las partículas magnéticas unidas a anticuerpos antiPSA (C-6) realizando la misma operación que en el Ejemplo 2, excepto que se utilizaron como partículas Dynabeads M-280 Tosylactivated (fabricadas por Thermo Fisher Scientific Inc.).

[Ejemplo 7]

Se obtuvieron las partículas magnéticas unidas a anticuerpos antiPSA (C-7) realizando la misma operación que en el Ejemplo 1, excepto que la concentración de sulfato de amonio de la solución tampón de ácido bórico en la que se disolvió el sulfato de amonio se fijó en 3,0 mol/l.

[Ejemplo 1 comparativo]

Se obtuvieron partículas magnéticas unidas a anticuerpos antiPSA (D-1) realizando la misma operación que en el Ejemplo 1, excepto que se utilizaron partículas magnéticas (A) como partículas magnéticas, en lugar de partículas magnéticas (B).

[Ejemplo 2 comparativo]

Se obtuvieron las partículas magnéticas unidas a anticuerpos antiPSA (D-2) realizando la misma operación que en el Ejemplo 1, excepto que no se realizó el bloqueo.

[Ejemplo 3 comparativo]

Se obtuvieron las partículas magnéticas unidas a anticuerpos antiPSA (D-3) realizando la misma operación que en el Ejemplo 1, excepto que el tiempo de reacción de bloqueo se fijó en 1 hora.

[Ejemplo 4 comparativo]

Se obtuvieron las partículas magnéticas unidas a anticuerpos antiPSA (D-4) realizando la misma operación que en el

Ejemplo 6, excepto que no se realizó el bloqueo.

[Ejemplo 5 comparativo]

- 5 Se obtuvieron las partículas magnéticas unidas a anticuerpos antPSA (D-5) realizando la misma operación que en el Ejemplo 6, excepto que el tiempo de reacción de bloqueo se fijó en 1 hora.

[Tabla 1]

	Partículas		Paso 1		Paso 2			S2/S1A × 100 %	S2/S1B × 100 %	Cantidad de sondas unidas [µg/mg de perlas]	CLEIA		
	Tipo	S1A [Å ²]	Concentración de sulfato de amonio [mol/l]	S1B [Å ²]	Tipo	Tiempo de reacción [hora]	S2 [Å ²]				Señal	Ruido	Señal/ruido
Ejemplo 1	Partícula (B)	32	0,5	43	CE510	15	55	172%	128%	8	1.187.420	165	7.196
Ejemplo 2	Partícula (B)	32	0,5	43	CE510	6	50	156%	116%	8	1.206.538	196	6.156
Ejemplo 3	Partícula (B)	32	0,5	43	BSA	15	49	153%	114%	8	1.194.769	214	5.583
Ejemplo 4	Partícula (B)	32	0,5	43	CE510	15	57	178%	133%	8	1.145.724	368	3.113
Ejemplo 5	Partícula (B)	32	1	43	CE510	15	50	156%	116%	8	1.002.391	312	3.213
Ejemplo 6	Dynabeads M-280 Tosylactivated	10	0,5	12	CE510	6	15	150%	125%	9	923.932	309	2.990
Ejemplo 7	Partícula (B)	32	3	44	CE510	15	56	175%	127%	8	912.547	343	2.660
Ejemplo comparativo 1	Partícula (A)	0	0,5	0	CE510	15	0	-	-	0	8.493	160	53
Ejemplo comparativo 2	Partícula (B)	32	0,5	43	Ninguno	-	43	134%	100%	8	912.456	1.254	728
Ejemplo comparativo 3	Partícula (B)	32	0,5	43	CE510	1	44	138%	102%	8	925.436	1.004	922
Ejemplo comparativo 4	Dynabeads M-280 Tosylactivated	10	0,5	12	Ninguno	-	12	120%	100%	8	798.120	1.565	510
Ejemplo comparativo 5	Dynabeads M-280 Tosylactivated	10	0,5	12	CE510	1	13	130%	108%	8	767.893	1.398	549

5 Esta invención se refiere a un procedimiento de producción de un portador unido a la sonda, y a un procedimiento de detección o separación de una sustancia objetivo. El procedimiento de producción de un portador unido a la sonda es como se define en la reivindicación 1 e incluye: el paso 1 de mezclar un portador que tiene grupos tosilo y una sonda; y el paso 2 de reducir la cantidad de grupos tosilo en una superficie de un portador, en el que una proporción del área S2 que está ocupada por un grupo tosilo en una superficie del portador obtenida en el paso 2 con respecto al área S1A que está ocupada por un grupo tosilo en una superficie del portador utilizado en el paso 1 ($S2/S1A \times 100 \%$) no es menor que 140 %.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de un portador unido a la sonda, que comprende:

- 5 paso 1 de mezcla de un portador con grupos tosilo y una sonda; y
 paso 2 de reducir la cantidad de grupos tosilo en una superficie de un portador,
 en el que $S2/S1A \times 100 \%$ no es menor que 140 %, en el que S2 es un área ocupada por un grupo tosilo en
 una superficie del portador obtenido en el paso 2 y S1A es un área ocupada por un grupo tosilo en una
 10 superficie del portador utilizado en el paso 1
 en el que el paso 1 comprende:
- paso 1a de mezcla un portador que tiene grupos tosilo con sulfato de amonio; y
 paso 1b de mezcla en una sonda después del paso 1a,
 en el que el paso 2 es un paso de mezcla de los portadores obtenidos en el paso 1 con un agente
 15 bloqueador
 en el que el agente bloqueador es una sustancia que tiene un grupo funcional reactivo a un grupo tosilo
 y el agente bloqueador es al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en
 tris(hidroximetil)aminometano, etanolamina, caseína, gelatina y un polímero sintético,
 en el que el portador es una partícula magnética,
 20 en el que el área S1A no es menor que 20 Å²/grupo tosilo,
 en el que un área S1B ocupada por un grupo tosilo en una superficie del portador obtenido en el paso 1
 no es menor que 10 Å²/grupo tosilo,
 en el que $S2/S1B \times 100 \%$ no es menor que 110 %, y
 en el que el área ocupada por un grupo tosilo en la superficie de una partícula magnética se determina
 25 mediante la siguiente fórmula

$$\text{Área ocupada por un grupo tosilo en la superficie de una partícula magnética} [\text{Å}^2/\text{grupo tosilo}] = 1 / (1,004 \times \text{gravedad específica de partícula magnética} [\text{g/cm}^3] \times \text{tamaño de partícula} [\mu\text{m}] \times \text{la cantidad de grupos tosilo} [\text{mmol/g}])$$

- 30 2. El procedimiento de producción de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el grupo funcional que es reactivo a un grupo tosilo incluye un grupo amino.
3. El procedimiento de producción de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente de bloqueo es un polímero sintético que tiene una estructura en la que un extremo de polioxietileno tiene una poliamina.
- 35 4. El procedimiento de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el paso 1 es un paso de mezcla de los portadores y las sondas en un líquido que contiene sulfato de amonio, y una concentración de sulfato de amonio en el líquido no es mayor que 2,0 mol/l cuando los portadores se ponen en contacto con las sondas.
- 40 5. El procedimiento de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el paso 1 es un paso de mezcla de los portadores y las sondas en un líquido, y el pH del líquido es de 6 a 12.
6. El procedimiento de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el área S1A que está ocupada por un grupo tosilo en una superficie del soporte utilizado en el paso 1 no es menor que 5 Å²/grupo tosilo.
 45
7. El procedimiento de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la sonda es una proteína o un ácido nucleico.
- 50 8. El procedimiento de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el tiempo de mezcla no es menor que 2 horas.
9. Un procedimiento de detección o separación de una sustancia objetivo, que comprende producir un portador unido a la sonda por el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y detectar o separar una
 55 sustancia objetivo.