

402130

P.- 50.707

File 2558-28 B

Int. Cl.: G01N, G12B//A61B



Memoria descriptiva

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE _____
SUBCLASE _____

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de BIO-RAD LABORATORIES

entidad / ~~de nacionalidad~~ norteamericana

con domicilio en 32nd and Griffin Avenue, Richmond, California, Estados Unidos de América

por: "UN METODO PARA DETERMINAR LA ABSORCION DE HORMONA TIROIDEA POR UN ABSORBENTE DE FIJACION COMPETIDOR PARA LA MISMA"

(Clase Internacional G01n, G12k)

402130

- 8 MAY 1972



Esta invención se refiere a la determinación clínica de la función tiroidea. Más particularmente, se refiere a la determinación de la hormona tiroidea por una sustancia captadora o absorbente secundaria, a partir de lo cual puede hacerse una estimación de la concentración de los puntos absorbentes de la hormona proteínica tiroidea disponibles en la sangre.

En breves palabras, la invención implica disponer en una columna un absorbente fijador competidor de la hormona tiroidea. A través de la columna se hace circular una muestra flúida que contiene hormona tiroidea fijada o absorbida por proteínas fijadoras de hormona tiroidea. Las dimensiones de la columna y el absorbente están seleccionados para fijar y retener de modo competidor aproximadamente 10-90 por ciento en peso de la hormona tiroidea fijada en la muestra flúida durante un sólo paso de la muestra a través de la columna. La cantidad de hormona tiroidea retenida en la columna, con relación a la hormona tiroidea presente en el efluente de la columna, es el valor que se mide después.

Como antecedentes, es sabido que la tiroxina (T-4) y la tri-yodotironina (T-3) en el plasma están unidas por enlaces dissociables a unas proteínas específicas del suero denominadas colectivamente proteínas

402130



fijadoras de la hormona tiroidea. El grado de saturación de las proteínas del suero por la hormona tiroidea varía en estados diferentes de la función tiroidea. En el hipertiroidismo, por ejemplo, las proteínas del suero están saturadas con hormonas tiroideas en mayor grado, y por tanto está disminuído el número de puntos fijadores disponibles sobre las proteínas del suero (capacidad no saturada de fijación de la hormona tiroidea). Lo contrario ocurre en el hipotiroidismo. Como la tiroxina está unida o fijada a las proteínas del suero más firmemente que la tri-yodotironina, el número de puntos de fijación disponibles sobre las proteínas del suero depende principalmente de la concentración de tiroxina en el plasma.

Hamolski y otros, J. Clin. Endocr. 17, 33 (1957) describieron la absorción de tri-yodotironina marcada con trazador de I-131 por los glóbulos rojos de una sangre entera, como método para estimar la saturación de las proteínas fijadoras de hormona tiroidea. Descubrieron que la tri-yodotironina marcada con I-131 incubada con plasma de pacientes hipertiroides mostraba un menor grado de absorción de la radiactividad sobre los eritrocitos en comparación con los pacientes eutiroides. Este método ha demostrado ser valioso en el diagnóstico de enfermedades de la tiroides,

402130



de anomalías de la proteína transportadora de la tiroxina, y en la evaluación de la terapéutica de la tiroides. Como la medida se efectúa empleando una hormona con trazador radiactivo, se minimizan las interferencias procedentes de los contaminantes de yodo orgánico.

5

En general, estos ensayos de absorción de T-3 son efectuados equilibrando trazas de T-3 marcada con trazadores radiactivos con una muestra del suero del paciente. Esta combinación es equilibrada después con un material fijador secundario, tal como glóbulos rojos de la sangre. El absorbente secundario tiene una cierta afinidad para la T-3, de modo que parte de la T-3 es absorbida por este material fijador secundario. Si el absorbente tiene una afinidad fijada para la T-3, la distribución de la T-3 radiactiva entre el absorbente y las proteínas del suero dependerá del número de puntos de fijación disponibles sobre las proteínas del suero.

10

15

20

25

A causa de varias dificultades inherentes al uso de glóbulos rojos, se ha empleado una gran variedad de otros absorbentes. Uno de estos absorbentes es un cambiador de aniones de base fuerte que ha sido empleado en forma de perlas o glóbulos de resina libre, resina embebida en una esponja, y en forma de membrana. Otro material que se ha usado es la hemoglobina absorbida

29.4.72.



sobre carbón vegetal. Estos materiales tienen capacidad para extraer la T-3 de las proteínas fijadoras.

5 En todos los procedimientos de fijación competidores de la técnica anterior, el absorbente y la muestra de suero se han puesto en contacto según un sistema discontinuo, contrariamente a la técnica de columna de esta invención. En estos procedimientos anteriores se ha buscado un estado de equilibrio o un estado próximo al equilibrio, porque se ha creído que sólo de esta manera podían alcanzarse resultados clínicamente reproducibles. Con este objeto, la muestra de suero y el absorbente eran constantemente mezclados y movidos, por ejemplo por agitación o rotación, durante un período de tiempo relativamente prolongado, variable desde 10 aproximadamente 30 minutos a aproximadamente una hora y media. Al final del período de mezclado era necesario una separación del absorbente y la fase líquida, con el fin de determinar el tanto por ciento de absorción por el absorbente. Era necesario tener cuidado 15 para obtener uniformidad en el tiempo de mezclado siendo las muestras sometidas a ensayo y usándose los controles para obtener valores conocidos útiles para el procedimiento de ensayo. 20

25 Según el procedimiento de la presente invención, se eliminan estas operaciones desventajosas y



5 estos largos períodos de tiempo. En general, el nuevo
procedimiento de columna permite un tiempo de permanen-
cia de contacto entre la muestra y el absorbente de no
más de aproximadamente 10 minutos, y lo más comúnmente
de no más de aproximadamente 5 minutos. En la realiza-
ción preferida, que se describirá más adelante, el tiem-
po de permanencia es de menos de aproximadamente tres
minutos. Al finalizar el período de permanencia, la fa-
se líquida es obtenida directamente en forma de efluen-
10 te de la columna separado del absorbente en fase sólida,
de modo que no hay necesidad de ninguna operación
de separación, como en la técnica discontinua anterior-
mente usada. A pesar del hecho de que el tiempo de per-
manencia es relativamente muy corto, se consiguen re-
15 sultados comparables o mejores que los obtenidos con
las técnicas anteriores. Esto es especialmente sorprenden-
te cuando se consideran los esfuerzos aplicados has-
ta ahora, traducidos en un continuo mezclado durante pe-
ríodos prolongados de tiempo, para obtener o aproximar-
20 se a un estado de equilibrio en el lote.

En la técnica de columna de la presente in-
vención no existe ninguna condición de equilibrio en-
tre el absorbente y la disolución. En lugar de ello,
se presenta una relación constantemente variable entre
25 el absorbente y la disolución a medida que la disolu-

402130

-8



ción se mueve a través del absorbente de la columna. En
cierto sentido, los resultados de la técnica de la pre
sente invención son generados por una serie de absorcio
nes iniciales de hormona tiroidea por porciones sucesi
5 vas de absorbente a medida que la disolución se mueve
a través de la columna. En el punto de cada absorción
inicial, la pendiente de una curva de absorción que pue
de trazarse cambia tan rápidamente que no se esperaría
un grado aceptable de reproductibilidad de resultados.
10 Sin embargo, se ha comprobado que la técnica de colum
na de la presente invención proporciona resultados com
parables a los de la técnica discontinua, o mejores.
Por ejemplo, se han tratado 17 porciones de la misma
muestra de suero en una columna según el método de la
15 presente invención, y el tanto por ciento de error fué
de 2,5%. Este tanto por ciento de error es mejor que
la mayoría de los métodos de la técnica anterior, y muy
aceptable para fines de diagnóstico clínico. Además, el
método de la presente invención ha sido comparado con
20 el método de la técnica anterior usando un procedimien
to de equilibrio discontinuo, y se obtuvo una correla
ción lineal recta entre los dos métodos. Sólo en el 2%
de los casos ensayados se obtuvo con el método de la
presante invención un resultado que difería del de la
25 técnica discontinua anterior.

402130



Aparte de su simplicidad y ahorro de tiempo, se cree que otra característica ofrecida por el método de la presente invención es que proporciona una medida relacionada con el grado de disociación de la T-3 de sus puntos de fijación de proteínas. En los procedimientos discontinuos de la técnica anterior, las condiciones se ajustaban de modo que se obtenía un estado de equilibrio o uno que se aproximase al equilibrio. Estos resultados de ensayo sólo proporcionan una medida de la capacidad de fijación en equilibrio de los puntos de fijación. Se cree que en el método de la presente invención, cuando se aplica a la absorción de T-3, los resultados están relacionados con el grado de absorción de la T-3 por el absorbente, la capacidad de fijación de T-3 por las proteínas, y la velocidad en que estas proteínas se disocian con la T-3. Como la velocidad de disociación de la T-3 de la proteína es la operación determinante de la velocidad, esta velocidad es la medida fundamentalmente por el método de la presente invención.

Al poner en práctica el método de la presente invención puede usarse cualquier absorbente adecuado, que en las condiciones del ensayo absorba aproximadamente 10-90 por ciento en peso de la hormona tiroidea en la muestra de ensayo. Preferiblemente, el absorbente

402130



y las demás condiciones de ensayo son seleccionadas de modo que se absorba aproximadamente 40-60 por ciento en peso de la hormona tiroidea de una muestra de suero de un paciente eutiroideo. Una clase preferida de absorbentes para su uso en la presente invención son las resinas cambiadoras de iones. Las resinas cambiadoras de aniones son particularmente deseables cuando se emplea una hormona tiroidea marcada con trazador radiactivo para determinar el tanto por ciento de absorción por el absorbente. La resina cambiadora de aniones sirve para extraer cualquier producto de descomposición radiactiva que de lo contrario podría interferir con los resultados del ensayo. Como se observará en los ejemplos más adelante, una resina de cambio de aniones fuertemente básica proporciona resultados particularmente deseables.

Se considera y estudia cualquier técnica para medir analíticamente el tanto por ciento de absorción de la hormona por el absorbente. Un procedimiento preferido para efectuar esto es incluir una cantidad previamente seleccionada de T-3 ó T-4 marcada con material radiactivo en la muestra de suero. Una vez conseguido el equilibrio, la muestra se hace pasar a través de la columna, y se mide por medio de técnicas convencionales la cantidad de T-3 ó T-4 marcada con material radiactivo.

vo que hay en el efluente. Como es sabido en la técnica, los valores obtenidos para la absorción de la hormona marcada con material radiactivo permite evaluar la función tiroidea, por referencia a valores de suero conocido tratado en condiciones semejantes. Puede obtenerse la información deseada midiendo la cantidad de radiactividad en el absorbente o en el efluente de la columna. Preferiblemente, las medidas se hacen en el efluente.

Para conseguir una retención por el absorbente del 10-90 por ciento en peso de la hormona que hay en la muestra hay que tener en cuenta varias variables implicadas. El absorbente, su tipo (es decir, si es o no una resina cambiadora de iones, incluyendo el grado de reticulación si es una resina), el volumen empleado, y el tamaño de partículas, afectan al tanto por ciento de retención. Además, en este resultado influirán las dimensiones de la columna, particularmente su diámetro. En general, se seleccionan las condiciones de modo que con el volumen de muestra flúida empleado se consiga el grado deseado de retención en el breve período de tiempo indicado. Como se verá en el ejemplo que sigue, puede conseguirse la retención deseada de hormona tiroidea en un breve período de tiempo usando 1,2 ml. (volumen de partículas) de una resina cambiadora de aniones fuertemente básica, que tiene un 8% de reticulación, un ta-

402130



maño de malla de 74 a 149 micras, y en un diámetro de columna de aproximadamente 0,75 centímetros. Usando esta columna, el tiempo de permanencia de la muestra en la columna es de no más de aproximadamente tres minutos.

5

La muestra flúida que se somete a ensayo contiene preferiblemente hasta aproximadamente 1 ml. de suero sanguíneo, y preferiblemente aproximadamente 0,5 ml. de suero sanguíneo. De acuerdo con la técnica anterior, la muestra es diluída convenientemente con una solución tampón, que preferiblemente tiene un pH de aproximadamente 5.

10

Para ilustrar la invención, el procedimiento siguiente ha mostrado dar excelentes resultados.

15

EJEMPLO

0,5 ml. de suero de un paciente se mezclan con 2,5 ml. de tampón de acetato de sodio 0,4 N a pH 5, que contiene trazas de tri-yodotironina marcada con material radiactivo. Esta mezcla se deja reposar durante 20 minutos para asegurar una distribución al azar de la T-3 radiactiva entre el suero y la disolución. Esta mezcla se hace pasar después sobre una resina cam

20

25

402130



- 8 MAY 1972

biadora de aniones básica fuerte en una columna. La columna contiene 1,2 ml. de una resina cambiadora de aniones básica fuerte, en forma de cloruro, con un 8% de reticulación y un tamaño de malla de 74 a 149 micras de abertura. El diámetro interior de la columna es de aproximadamente 0,75 cm. El efluente de la columna es recogido en un tubo contador. Se mide la cantidad de radiactividad del contenido del tubo. Por comparación con un control, tal como suero normal combinado o suero comercial de control de valor conocido, puede hacerse una evaluación del grado de insaturación de los puntos fijadores de la proteína del suero.

La primera línea de la Tabla I siguiente indica los resultados obtenidos con los materiales descritos en el párrafo precedente. Los datos mostrados en las líneas 2-5 de la tabla se obtuvieron usando el mismo procedimiento pero diferentes resinas cambiadoras de iones y distintos volúmenes, según se indica.

TABLA I

Efecto del tipo de resina en el rendimiento

Resina	Volumen de resina	Caudal	Suero de control normal % eluido	Suero de control anormal; % eluido	TBI*
AGIX8, malla de 74 a 149 micras	1,2 ml	1,0 ml/min	43,4	30,0	0,69



continuación de la Tabla I

Efecto del tipo de resina en el rendimiento

5	Resina	Volumen de resina	Caudal	Suero de control normal, % elui- do	Suero de control anormal; % elui- do	TBI ²⁶
	AG1X4, malla de 74 a 149 micras	1,2 ml	1,0 ml/min	34,5	23,5	0,68
10	AG1X2, malla de 74 a 149 micras	1,2 ml	1,0 ml/min	36,0	24,4	0,68
	AG5OWX8, malla de 74 a 149 micras	2,0 ml	- - - -	40,0	23,4	0,59
	AG4OWX2, malla de 74 a 149 micras	2,0 ml	- - - -	36,7	24,4	0,67

15 ²⁶TBI- Indica de fijación de la tiroides

Se calculó que el valor del TBI para el suero anormal era de 0,68 a partir de resultados registrados gráficamente usando el método discontinuo de la técnica anterior. Las resinas AG son resinas cambiadoras de iones, obtenibles comercialmente de los Laboratorios Bio-Rad, Richmond, California.

20 Las resinas AG1 son resinas cambiadoras de aniones fuertemente básicas.

25 Las resinas AG5OW son resinas cambiadoras de cationes fuertemente ácidas.

402130



El número que sigue a la "X" indica el tanto por ciento en peso de reticulación de la resina.

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América, el 6 de Mayo de 1971, bajo el N^o 126.316, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

1.- Un método para determinar la absorción de hormona tiroidea por un absorbente de fijación competidor para la misma, a partir de una muestra líquida que contiene hormona tiroidea fijada por proteínas fijadoras de la hormona tiroidea, que comprende: disponer dicho absorbente en una columna, hacer fluir dicha muestra líquida a través de dicha columna, siendo seleccionadas las dimensiones de dicha columna y el absorbente para fijar competitivamente y retener aproximadamente 10-90 por ciento en peso de la hormona tiroidea fijada de dicha muestra líquida durante un sólo paso a tra

30.4.72.



vés de la misma, y medir la cantidad de hormona tiroidea retenida en dicha columna, con relación a la cantidad presente en el efluente que sale de la misma.

5 2.- Un método según la reivindicación 1, en el que las dimensiones de dicha columna, el tipo de absorbente, el volumen del mismo y su tamaño de malla, así como el volumen de dicha muestra fluída, son seleccionados para dar un tiempo de permanencia de la muestra de no más de aproximadamente diez minutos.

10 3.- Un método según la reivindicación 1, en el que dicho absorbente es una resina cambiadora de iones.

15 4.- Un método según la reivindicación 3, en el que dicha resina cambiadora de iones es una resina cambiadora de aniones reticulada.

20 5.- Un método mejorado para evaluar la función tiroidea poniendo en contacto suero sanguíneo con un absorbente fijador competidor de la hormona tiroidea por medio de un mezclado y movimiento constante de dichos suero y absorbente en una disolución tamponadora, durante un período de tiempo relativamente prolongado, en el que el análisis de la fijación competitiva de la hormona tiroidea entre las proteínas fijadoras de la hormona tiroidea del suero y dicho absorbente proporciona información para la estimación de la concentra-

25



ción de los puntos fijadores disponibles de la hormona tiroidea en dicho suero sanguíneo, caracterizado porque la mejora comprende realizar dicho contacto haciendo pasar de modo relativamente rápido el suero sanguíneo y la disolución tamponadora a través de una columna estacionaria de dicho absorbente de fijación competidor.

5
10
15
20
25
6.- Un método clínico mejorado para evaluar el estado de la tiroides, que comprende: equilibrar una muestra que contiene suero sanguíneo con una cantidad previamente seleccionada de hormona tiroidea marcada con material radiactivo, disponer una columna de resina cambiadora de iones adaptada para absorber aproximadamente 10-90 por ciento en peso de la hormona tiroidea fijada al suero de dicha muestra, hacer pasar dicha muestra a través de dicha columna en no más de aproximadamente cinco minutos, medir la radiactividad de dicha columna y/o del efluente de la misma, y determinar el tanto por ciento de hormona tiroidea absorbida por dicha columna y/o que queda en dicho efluente, a partir de dicha medida de radiactividad.

7.- Un método mejorado según la reivindicación 6, en el que dicha hormona tiroidea marcada con material radiactivo es tri-yodotironina marcada con material radiactivo.

8.- Un método mejorado según la reivindicación 6, en el que dicha hormona tiroidea marcada con material radiactivo es tri-yodotironina marcada con material radiactivo.

402130 - 8 MAY 1972



ción 6, en el que dicha hormona tiroidea marcada con material radiactivo es tiroxina marcada con material radiactivo.

5 9.- Un método mejorado según la reivindicación 6, en el que dicha muestra contiene un diluyente tamponador.


10.- Un método mejorado según la reivindicación 6, en el que dicha resina cambiadora de iones es una resina cambiadora de aniones fuertemente básica.

10 11.- Un método mejorado según la reivindicación 10, en el que dicha resina cambiadora de aniones contiene aproximadamente un 8% de reticulación.

15 12.- Un método mejorado según la reivindicación 6, en el que dicha columna de resina cambiadora de iones está adaptada para absorber aproximadamente 40-60 por ciento en peso de hormona tiroidea de una muestra de suero de un paciente eutiroides.

20 13.- Un método mejorado según la reivindicación 11, en el que dicha resina cambiadora de iones tiene un tamaño de malla de 74-149 micras de abertura, proporciona un volumen de lecho de aproximadamente 1,2 ml. y un diámetro de columna de aproximadamente 0,75 centímetros, y el tiempo de permanencia de la muestra en la columna es de no más de aproximadamente tres minutos.

25


30.4.72.

402130

- 8



14.- Un método mejorado según la reivindicación 13, en el que dicha muestra contiene hasta aproximadamente 1 ml. de suero sanguíneo.

5 15.- Un método mejorado según la reivindicación 14, en el que dicha muestra contiene aproximadamente 0,5 ml. de suero sanguíneo.

16.- Un método para determinar la absorción de hormona tiroidea por un absorbente de fijación competidor para la misma.

10 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

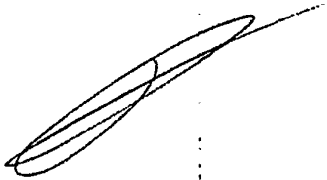
Esta Memoria consta de dieciocho hojas escritas a máquina por una sola cara.

- 8 MAYO 1972

Madrid,

P.A.


Alberto de Izaburu
Por Poder.


30.4.72.
MJP/.