



404772

Int. Cl.: A61B

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO IN VITRO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE
UNA SUSTANCIA FISIOLÓGICAMENTE ACTIVA EN UN FLUIDO COR
PORAL.

Solicitante: MALLINCKRODT CHEMICAL WORKS, entidad norteamericana,
residente en St. Louis, Missouri, EE.UU. de A.

La presente invención se relaciona con un mé-
todo in vitro para determinar la presencia de una sustan-
cia fisiológicamente activa en un fluido corporal siendo
capaz dicha sustancia activa de existir tanto en forma
5. combinada como en forma no combinada, cuyo método compren

404772



5. de mezclar una forma irradiada de dicha sustancia activa, una primera porción del fluido corporal que contiene la sustancia activa y de la cual se ha separado una proporción principal conocida del ligante para la sustancia activa, y una segunda porción del fluido corporal que contiene ligante insaturado para dicha sustancia activa, y medir a continuación la sustancia irradiada combinada con el ligante o la sustancia irradiada no combinada.

10. En adición, la presente invención se relaciona con un medio para determinar el estado tiroidal que comprende un reactivo T4.TBG irradiado, cuyo medio comprende una solución tamponada de tiroxina irradiada con yodo radioactivo, suero sanguíneo del cual se ha separado la mayor parte de la tiroxina y barbital; suero sanguíneo normal (liofilizado); y un absorbente para la tiroxina.

15. Más particularmente, la presente invención se relaciona con el método para determinar la proporción de tiroxina eficaz de una muestra de sangre como un índice del nivel relativo de tiroxina libre de la misma siendo la forma irradiada una solución de una hormona tiroidea irradiada seleccionada entre tiroxina y 3,3',5'-triyodotiroxina, siendo dicha primera porción una solución que contiene tiroxina procedente de la muestra sanguínea a ensayar y estando practicamente libre de globulina ligante de tiroxina y siendo la segunda porción una solución que contiene globulina ligante de tiroxina insaturada y sus hormonas tiroideas asociadas procedentes de una muestra sanguínea de la misma fuente; y midiéndose a continuación (1) la hormona tiroidea irradiada combinada con la globulina ligante de tiroxina o (2) la hormona tiroidea irradiada sin combinar.

20.

25.

30.

404772



Revistas valiosas de la técnica de este campo, con referencias extensivas a la literatura original, pueden encontrarse en Sección 1 -- "Protein-binding Studies and Radioassays" of Radioisotopes in Medicine, R.L. Hayes, F.A. Goswitz y B.E.P. Murphy, Editores, CONF 671111, U.S. Atomic Energy Commission, 1968.

5.

La glándula tiroides sintetiza dos hormonas, 3,3',5-triiodotironina (T3) y tiroxina (T4).

10.

Ciertas proteínas del suero ligan estas hormonas tiroideas en diversos grados. Estas proteínas son globulina (globulina ligante de tiroxina, TBG), prealbúmina (prealbúmina ligante de tiroxina, TBPA) y albúmina (albúmina de suero, SA). El término único, ligante de tiroxina, abarca la ligación de T3 y T4 con estas proteínas, puesto que cualquiera

15.

de T3 ó T4 pueden ser absorbidas por un punto ligante determinado. Las hormonas tiroideas se encuentran en equilibrio dinámico con las proteínas ligantes de tiroxina.

20.

El nivel de plasma sin combinar o "libre" de T4 se estima que es inferior al 0,1 % de la T4 ligada a proteínas, total, o aproximadamente de 2-5 milimicrogramos por ciento.

25.

La velocidad de síntesis y segregación de hormona tiroidea es influenciada por otra hormona, hormona estimulante del tiroides (TSH), segregada por la glándula pituitaria anterior. Se cree que la TSH regula el "atrapado" o la separación de yodo del plasma, y la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas. El nivel de T3 y T4 en circulación influencia a la velocidad de secreción, de TSH. Cuando los niveles de plasma de estas hormonas son inferiores a las concentraciones normales, la pituitaria es estimulada

30.

para sintetizar y segregar TSH. La TSH estimula la secreción

404772

- 4 -



de hormonas tiroideas, las cuales a su vez, mediante un proceso de realimentación negativa, reduce la secreción pituitaria de TSH.

5. Diversos ensayos clínicos in vitro generalmente utilizados, facilitan al médico la determinación o evaluación de la función tiroidea. Algunos de estos ensayos se explican a continuación de forma breve.

10. Los primeros índices utilizados fueron la velocidad metabólica basal (EMR) y el nivel de yodo ligado a proteínas (PBI).

15. Un ensayo de la función tiroidea que es extremadamente útil clínicamente consiste en el ensayo de absorción de T3. El ensayo de absorción de T3 mide la capacidad de ciertas proteínas del suero, principalmente TBG, para absorber o ligar T3 radioactivamente irradiada por puntos de ligación de tiroxina insaturados o vacantes; por consiguiente, este ensayo consiste principalmente en una medición de los puntos de ligación no rellenos. Los ensayos de absorción de T3 estiman la distribución de T3 irradiada entre los componentes del suero y otros agentes que tienen afinidad para T3.

20. Como otros agentes, se utilizan los siguientes, por ejemplo: células rojas de la sangre, carbón revestido con proteínas y resinas intercambiadoras de iones en forma granular, laminar, de esponja y en columna.

25. Un ensayo de absorción de T3 seguro y simple se describe en la patente francesa No. 2.047.211. La clave de este procedimiento consiste en el empleo de una resina intercambiadora de iones en forma de una matriz sólida, la cual no requiere un lavado o enjuagado para separar la T3 sin combinar y se separa fácilmente de la solución de reacción para

30.



permitir la medición directa de la capacidad ligante de T3 del suero.

5. Este ensayo de absorción de T3 mide directamente la capacidad ligante de TBG del suero para T3 irradiada. Ya es conocido que TEPA no tiene afinidad para T3. La afinidad de TBG para T3 es mucho más grande que la afinidad de albúmina para esta hormona, y la dilución de suero en el tampón durante el procedimiento reduce adicionalmente la ligación de T3 por la albúmina.
10. Cuando se añade suero a una solución tampón de T3 irradiada, los puntos de ligación de TBG desocupados absorben o ligan a la T3 irradiada. La T3 irradiada en exceso o sin combinar es entonces combinada con un ligante secundario; en este ensayo, la tira de resina intercambiadora de iones. Después de la separación de la tira de la solución tampón, se mide directamente la cantidad de TBG irradiada con T3 y los resultados se expresan como un índice de capacidad ligante de tiroxina (índice TBC), basado en el valor normal de T3 de 1,0.
15. En el caso de que la concentración de TBG (ligantes primarios) en el suero sea normal, el número de puntos de ligación disponibles o desocupados para la ligación de T3 irradiada está inversamente relacionado con el número de puntos de ligación ocupados por T4 y, en un grado menor, T3. Cuando la disponibilidad de T4 para la ligación de TBG se incrementa, tal como en el hipertiroidismo, estos puntos de ligación son ocupados de forma más completa por T4. Por consiguiente, existen menos puntos de ligación para ligar T3 irradiada. De este modo, la actividad de combinación con
20. TBG es menor que en el suero de control normal de T3, lo
- 25.
- 30.



404772

5. cual se traduce en un índice TBC disminuido. Cuando disminuye la disponibilidad de T4 para la ligación de TBG, tal como en el hipotiroidismo, son ocupados menos puntos de ligación por T4, dejando más puntos que los disponibles normalmente para la ligación de T3 irradiada. El resultado es un incremento en la cantidad de actividad de combinación con TBG y un incremento en el índice TBC.

10. Debe observarse que a pesar de que tradicionalmente se utiliza T3 irradiada para medir el índice TBC, es igualmente válido el empleo de T4 irradiada.

En base a la medición del índice TBC, puede determinarse una indicación del estado clínico del tiroides mediante una confrontación con las gamas de la Tabla 1.

15. Estas gamas están basadas en un muestreo representativo de pacientes en una amplia área geográfica.

Tabla 1

Gamas de índice TBC

<u>Hipertiroides</u>	<u>Eutiroides</u>	<u>Hipotiroides</u>
menos de 0,87	0,87 - 1,13	superior a 1,13

20. En 1960 se desarrolló un método para la determinación de tiroxina del suero por R.P. Ekins (Clin, Chim. Acta 5:453). Este señor llamó a la base para este ensayo como "análisis de saturación". Este método fué mejorado por B.E.F. Murphy y G.J. Pattee (J. Clin. Endocrinol 24:187--1964) los cuales introdujeron el término "análisis competitivo de ligación de proteínas". Este método se describe además en la patente USA de Murphy B.E.P. No. 3.414.383 (1968).

25.

30. El método de la patente de Murphy fué mejorado además por J.L. Brown cuyo método mejorado se describe también en la patente francesa No. 2.047.211.



- La teoría general del sistema de ensayo de T4 de Brown está basado en el hecho de que la TBG del suero tiene una afinidad relativamente elevada y específica para ligar T4. Cuando se añade T4 irradiada a una solución que contiene TBG (por ejemplo, sueros diluidos empollados), se combinará prácticamente toda la T4 con la TBG. Si a continuación se aña de T4 estable (por ejemplo, T4 de paciente) a esta solución de T4 irradiada/TBG, se desplazará una cantidad de T4 irradiada desde la TBG en proporción a la cantidad de T4 estable añadida. Cuando se añade a este sistema otro agente ligante de T4, tal como una resina intercambiadora de aniones, esta ligará a la T4 irradiada que ha sido desplazada desde la TBG. La cantidad de desplazamiento de T4 irradiada desde la TBG, puede determinarse entonces comparando la cantidad de radioactividad que permanece en el líquido sobrenadante con la cantidad original medida antes de añadir la resina.

20. Cuando se añaden cantidades incrementadas de T4 estable a soluciones de T4 irradiada/TBG, y se tratan como anteriormente, se observa que la actividad que permanece en el líquido sobrenadante disminuye con cada incremento sucesivo en la T4 estable añadida. De este modo, pueden determinarse cantidades desconocidas de T4 estable comparando la actividad del líquido sobrenadante en la solución desconocida con la de un líquido sobrenadante similar conocido.

25. Con el fin de adaptar este procedimiento a la determinación de T4 del suero, la T4 debe ser separada de las proteínas ligantes del paciente. Esto se consigue desnaturalizando y precipitando las proteínas con alcohol. Las proteínas desnaturalizadas liberan la mayor parte de su T4 combinada (aproximadamente el 80 %), la cual puede separarse en-

30.



tonces en el líquido sobrenadante alcohólico una vez centrifugada la mezcla.

5. La indicación del estado químico del tiroides, tal como se refleja en el nivel de tiroxina del suero, puede establecerse haciendo referencia a las gamas sugeridas mostradas en la Tabla 2. Estas gamas están basadas en un muestreo representativo de pacientes de una amplia gama geográfica.

Tabla 2

Gamas de tiroxina total en suero

	<u>Hipertiroides</u>	<u>Eutiroides</u>	<u>Hipertiroides</u>
10.	Menos de 5,0 $\mu\text{g}\%$	5,0 - 13,7 $\mu\text{g}\%$	superior a 13,7 $\mu\text{g}\%$

- La tendencia hacia la obtención de resultados erróneos bajo ciertas circunstancias, atribuida a la descomposición catalítica de una fracción de la T4 irradiada en la solución T4/TBG, fué remediada por Brown y F.P. Hallett, los cuales añadieron un agente de quelación a la solución. Esta modificación del reactivo no produce cambio alguno en la teoría y operación fundamentales del método (denominado de aquí en adelante método Brown).
- 15.

20. Aproximadamente un 99,95 % de la tiroxina en circulación se combina con las proteínas del plasma, estando un 0,05 % en estado libre sin combinar. Corrientemente se sostiene la teoría de que el nivel de tiroxina libre o sin combinar en el plasma es directamente responsable de la regulación del

25. metabolismo celular y de la secreción de tirotrópina de la pituitaria (TSH). De este modo, la medición directa de la tiroxina libre reflejaría el estado metabólico de un individuo de forma más segura que cualquier otro ensayo simple de la función tiroidea. Hasta el presente, los métodos disponibles
30. para medir la tiroxina libre consistían en la diálisis de



equilibrio, ultra-filtración o filtración con gel, en combinación con una determinación total de la tiroxina del suero. Estos métodos de determinación de la tiroxina libre son complejos y tediosos y no han sido adaptados para su empleo clínico normal.

5.

Basicamente, el nivel de tiroxina libre es regulado por la concentración de tiroxina en circulación (combinada) y por el nivel de TBG. Sin embargo, la interacción de estos dos factores para mantener niveles normales de hormona tiroidea libre es considerablemente más compleja que la sugerida por dicha exposición simple.

10.

Bajo condiciones eutiroides, el mantenimiento de un nivel normal de tiroxina libre se realiza por mecanismos reguladores que estimulan cambios en el nivel de tiroxina total para compensar los cambios en el nivel de TBG.

15.

Un incremento en el nivel de estrógenos afecta al sistema regulatorio tiroidal, conduciendo a una situación que produce resultados falseados con los ensayos de absorción de T3 y de T4 del suero. Dichos niveles incrementados de estrógenos se presentan normalmente durante el embarazo o durante la medicación de estrógenos, por ejemplo, durante la medicación con un preparado antiovulatorio que contiene un estrógeno.

20.

La siguiente secuencia de circunstancias se produce como resultado de un incremento en el nivel de estrógenos.

25.

1. Los niveles elevados de estrógenos causan la formación incrementada de TBG.

2. El número incrementado resultante de puntos insaturados de ligación de tiroxina (TBG) ligados con tiroxina libre, provoca una disminución del nivel de tiroxina libre.

30.



404772

3. La pituitaria es estimulada por la disminución del nivel de tiroxina libre, para segregar hormona tirotrópica (TSH).
5. La glándula tiroides, a su vez, es estimulada por la TSH para segregar tiroxina.
5. La tiroxina se liga con TBG a un nivel compensado, provocando que la tiroxina libre vuelva a una concentración normal.
10. Cuando se presenta una elevación del nivel de estrógenos, tal como durante el embarazo o durante una medicación de estrógenos, la evaluación clínica de la actividad tiroidal obtenida a partir de las determinaciones de absorción de T3 deberían indicar un incremento en los puntos insaturados de ligación de TBG y, por lo tanto, hipotiroidismo. Al contrario,
15. las determinaciones de T4 deberían indicar hipertiroidismo. Sin embargo, el estado clínico verdadero bajo estas condiciones, eutiroidismo, es evidenciado por el nivel normal de tiroxina libre. De este modo, en este caso ninguno de los ensayos de absorción de T3 y de T4 del suero resultan adecuados para la evaluación clínica correcta, incluso aunque cada uno de los resultados de los ensayos reflejen de forma segura el valor de la variable medida.
20. En 1965 F. Clark y D.B. Horn, (J. Clin. Endocrinol 25:39-45) introdujeron un método para la estimación de un índice que es proporcional a la concentración de T4 libre. Este método está basado en la determinación de PBI y de la absorción de T3.
25.
$$\text{PBI} \times \text{Relación de absorción de T3 por resina} = \text{"Índice de tiroxina libre"}$$
30. Existe una relación directa entre el nivel de PBI,



tal como lo utilizan Clark y Horn, y el nivel de T4 del suero, determinado de acuerdo con el método de Brown indicado anteriormente.

5. Por otra parte, el índice TBC, calculado de acuerdo con la descripción de la patente francesa No. 2.047.211, guarda una relación inversa con la relación de absorción de T3 de Clark y Horn.

10. Como consecuencia de estas relaciones es posible calcular un "índice de T4 libre" a partir del índice TBC y de los datos obtenidos por el ensayo de Brown, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de T4 libre} = \frac{\text{Nivel de T4 en suero (ug\%)}}{\text{Índice TBC}}$$

15. A pesar de que este "índice de T4 libre" es numéricamente diferente al "índice de tiroxina libre" de Clark y Horn, es igualmente válido.

20. La indicación del estado clínico tiroidal, tal como se refleja por el índice de T4 libre, puede establecerse haciendo referencia a las gamas mostradas en la Tabla 3, las cuales están basadas en un muestreo representativo de pacientes de una amplia área geográfica.

Tabla 3

Gamas de Índice de T4 libre

<u>Hipotiroides</u>	<u>Eutiroides</u>	<u>Hipertiroides</u>
Menos de 4,4	4,4 - 15,7	Más de 15,7

25. Al igual que en la medición real de la T4 libre, el "índice de T4 libre" es insensible a la administración de estrógenos, andrógenos, salicilatos, difenilhidantoina, condiciones de embarazo o nefrosis y a otros factores que
30. provocan resultados anómalos debidos a variaciones en el nivel



de TBG o a la interferencia con su ligación normal.

La medición de una sola variable no es suficiente normalmente para proporcionar una diagnóstico segura del estado tiroidal. Con anterioridad a la presente invención, el valor de T4 libre experimentalmente determinado o el índice de T4 libre calculado se acercaban más hacia la provisión de la información más fiable con el número más pequeño de ensayos para evaluar la función tiroidal.

Los efectos de diversas condiciones fisiológicas y medicamentos sobre los ensayos de T4 y T3 y sobre el índice de T4 libre, pueden resumirse como sigue:

Tabla 4

	<u>T4</u>	<u>T3</u>	<u>Indice de T4 libre</u>	<u>Valor normal</u>
Indice TBC de T3				0,87-1,13
T4 ug%				5,0 -13,7
Indice de T4 libre				4,4 -15,7
Medicación de estrógenos en el embarazo	Incrementado	Incrementado	Normal	
Hipo-embarazo	Disminuido	Incrementado	Disminuido	
Hiper-embarazo	Incrementado	Disminuido	Incrementado	
Nefrosis	Disminuido	Disminuido	Normal	
Medicación de andrógenos	Disminuido	Disminuido	Normal	
Difenilhidantoina	Disminuido	Disminuido	Normal	
HIPOTIROIDISMO - tratado				
Medicación T3 adecuada	Ningún efecto	Ningún efecto	Ningún efecto	
Tiroides disecado adecuado	Normal	Incrementado	Alto-normal	
L-Tiroxina adecuada	Alto-normal	Incrementado	Alto-normal	
HIPERTIROIDISMO - tratado				
Con control adecuado	Normal	Normal	Normal	
Acromegalia	Disminuido	Disminuido	Normal	

Constituye un objeto de la presente invención proporcionar una mejora en los ensayos in vitro para determinar hormonas, antígenos, esteroides, etc, en fluidos corporales. Constituye otro objeto proporcionar dicha mejora con respecto particularmente al ensayo de la función tiroidea que tiene en



- cuenta simultaneamente tanto al nivel de tiroxina del suero como el nivel de saturación de globulina ligante de tiroxina. Constituye otro objeto más proporcionar un método para la determinación directa de la relación de tiroxina eficaz que es un índice de tiroxina libre y para hacer posible la evaluación exacta del estado de la función tiroidea, mediante un solo ensayo simple, en presencia de influencias perturbadoras, tales como elevados niveles de estrógenos. Otros objetos serán en parte evidentes y en parte se indicarán más adelante.
- 5.
10. La presente invención se dirige por lo tanto a un método mejorado para utilizarse en ensayos clínicos competitivos-ligantes, y, en una versión, se dirige a un método para determinar la relación de tiroxina eficaz de una muestra sanguínea como un índice del nivel de tiroxina libre relativo de la misma, que comprende las etapas de mezclar, con un reactivo irradiado, una primera solución que contiene tiroxina procedente de la muestra sanguínea a ensayar y que está prácticamente libre de globulina ligante de tiroxina, y una segunda solución que contiene globulina ligante de tiroxina insaturada y sus hormonas tiroideas asociadas, procedente de una muestra sanguínea de la misma fuente, siendo el reactivo irradiado una solución de una hormona tiroidea irradiada seleccionada del grupo consistente en tiroxina y e,3',5'-triyodotironina, con lo cual una porción de la hormona tiroidea irradiada se combina con la globulina ligante de tiroxina insaturada procedente de la segunda solución y medir a continuación (1) la hormona tiroidea irradiada combinada con la globulina ligante de tiroxina o (2) la hormona tiroidea irradiada sin combinar. En la versión preferida, el reactivo irradiado es una solución de tiroxina irradiada combinada con glo
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

404772



bulina ligante de tiroxina.

Descripción de las versiones preferidas

De acuerdo con la invención, los anteriores y otros objetos se llevan a cabo modificando los métodos de ensayo de ligación-competitiva conocidos. Por ejemplo, en una versión de la invención, la proporción efectiva de tiroxina de la sangre se estima mediante una modificación del método de Brown antes mencionado para la tiroxina del suero, en el cual se añaden al reactivo T4.TBG irradiado dos soluciones derivadas de la sangre a ensayar. La primera de dichas soluciones es, tal y como describe Brown (Patente francesa No. 2.047.211), una solución que contiene aproximadamente 80 % de la T4 de una muestra de suero, libre de las proteínas sanguíneas.

La segunda solución, de acuerdo con la presente invención, contiene una cantidad predeterminada del suero a ensayar. Según la técnica anterior, la ligación de T4 por la albúmina se reduce grandemente por dilución y la ligación por prealbúmina se inhibe mediante tampón de barbital, con lo cual se proporciona una solución en la cual la única proteína ligante de T4 eficaz es TBG insaturada procedente del suero a ensayar.

Basicamente, el nuevo método para determinar la proporción de tiroxina eficaz es una combinación de los métodos de ensayo de absorción de T3 y de T4 del suero clásicos, pero que puede ser realizado en un solo recipiente. El concepto anterior será más fácilmente comprensible a partir de lo siguiente.

Debe recalcar que en el ensayo de absorción de T3 los puntos de proteína ligante de tiroxina no ocupados por T3 ó T4 absorberán T3 irradiada. En el método de T4 del suero,



- la T4 del suero total es extractada y se hace que desplace a la T4 irradiada de la T4.TBG irradiada. La T4 irradiada desplazada se separa y la T4.TBG irradiada restante se recuenta. La Tabla 6 indica, en términos relativos, el estado de los componentes pertinentes del suero y los resultados del ensayo de absorción de T3 y de T4 del suero en diversas condiciones clínicas.
- 5.

Tabla 6

<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>
Situación clínica	Nivel de proteínas ligantes de T4	Nivel de T4 combinada	Nivel de T4 libre	Ensayo de absorción de T3 (cpm)	Ensayo de T4 del suero (cpm)	Índice de T4 libre (cpm) (5 + 6)
Eutiroides	Normal	Normal	Normal	Moderado (10.000)	Moderado (10.000)	20.000
Hipotiroides	Normal	Bajo	Bajo	Alto (15.000)	Alto (15.000)	30.000
Hipertiroides	Normal	Alto	Alto	Bajo (5.000)	Bajo (5.000)	10.000
Nivel elevado de estrógenos	Alto	Alto	Normal	Alto (15.000)	Bajo (5.000)	20.000

cpm. = recuentos por minuto.

10. A partir de la tabla se observará que en presencia de enfermedad tiroidea no complicada el régimen de recuento en ambos ensayos de absorción de T3 y de T4 del suero se desvía de la normal en la misma dirección, es decir, el suero hipotiroidea proporciona elevados recuentos en ambos ensayos y el suero hipertiroideo proporciona bajos recuentos en ambos ensayos. De este modo, los recuentos combinados en los dos ensayos realzan la existencia de una situación anormal con respecto a la función tiroidea.

15. Por otro lado, la influencia distorsionante de elevados niveles de estrógenos hace que los regímenes de recuento
- 20.

404772



en los dos ensayos se desvian del normal en direcciones opuestas. Sus desviaciones de los valores normales tienden a equilibrarse entre sí, indicando su suma, por lo tanto, una situación normal con respecto a la función tiroidea.

5. El índice de tiroxina libre calculado, creado por Clark y Horn, y variantes del mismo, está basado en el mismo concepto. Solamente difiere la aritmética.

10. La presente invención permite la determinación de la proporción de tiroxina eficaz, como un índice del nivel de tiroxina libre relativo de una muestra de suero sanguíneo (o plasma) en un solo ensayo in vitro realizado en un solo vial no compartimentado. Esto será más fácilmente evidente a partir de la siguiente descripción.

15. En la primera etapa del presente método, la T4 (aproximadamente 80 %) se extrae de una muestra de suero y se añade una parte alícuota del extracto a una solución de reactivo T4.TBG irradiado. La T del extracto desplaza parcialmente a la T4 irradiada del reactivo T4.TBG irradiado, siendo proporcional el grado de desplazamiento al nivel de T4 en la muestra de suero.

20. En la segunda etapa, se añade al mismo vial una parte alícuota del mismo suero. La T4 irradiada desplazada de la etapa 1 es ahora parcialmente absorbida por la TBG insaturada presente en la parte alícuota de suero añadida en la etapa 2, siendo dependiente de dos factores el grado de absorción de T4 irradiada: (1) de la cantidad de T4 irradiada disponible (de la etapa 1); (2) de la cantidad de TBG insaturada presente en la parte alícuota de suero añadida (en la etapa 2).

25. Debe entenderse que el orden o secuencia de estas etapas no es crítico y que la invención puede realizarse in-

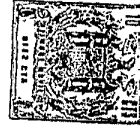
30.

404772



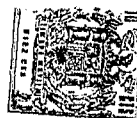
5. vertiendo las etapas o el orden de adición del extracto de T4 y de suero de paciente que contiene la TBG insaturada. Igualmente, el reactivo irradiado empleado puede ser una solución tamponada con barbital de T4 irradiada con practicamente nada de TBG o puede contener T3 irradiada en lugar de T4 irradiada.
- Con anterioridad, se ha indicado que la T3 irradiada ha sido utilizada tradicionalmente para determinar la capacidad de ligación insaturada de proteínas de suero por las hormonas tiroideas pero que dicha T4 irradiada puede ser sustituida con una validez idéntica. En el presente procedimiento, se efectúa esta sustitución, siendo proporcionada la T4 irradiada por desplazamiento de la T4.TBG irradiada en la etapa 1.
10. Será evidente que las cantidades relativas de T4 del suero y de proteínas de suero insaturado proporcionadas en las dos etapas del método de ensayo de la invención, serán dependientes de los volúmenes relativos de suero representados por las dos partes alicuotas empleadas. Se obtienen resultados significativos empleando cualquier proporción fija de partes alicuotas de suero dentro de una gama bastante amplia.
15. Sin embargo, experimentalmente se ha encontrado que se obtiene un sistema de utilidad óptima cuando se emplea una relación fija A/B de 2:1 aproximadamente, en donde A es el volumen de suero representado por la parte alicuota que suministra la T4 y B es el volumen de suero representado por la parte alicuota que suministra la TBG insaturada. Como antes se ha dicho, esta relación puede variar ampliamente y de hecho oscila, por ejemplo, entre 10:1 y 30:1 aproximadamente.
20. Debe entenderse que los términos "T4 irradiada" y "T3 irradiada" tal como se emplean aquí, intentan designar cualquiera de estas hormonas en una forma en la cual se han
- 25.
- 30.

404772



- hecho identificables mediante la asociación con las mismas o mediante incorporación en ellas, de una cantidad de átomos distintivos. Los átomos distintivos pueden ser, por ejemplo, átomos de un radionuclido, identificable y medible a través
5. de su radioactividad; los átomos de un nuclido estable de peso atómico distintivo no están presentes normalmente, tales como C-13, identificable por espectroscopía de masas, etc; o átomos de un elemento diferente que sea químicamente similar a un elemento presente normalmente en la hormona.
10. Mediante la práctica de la presente invención, es ahora posible hacer una determinación directa de la relación de tiroxina eficaz, una evaluación exacta del estado de la función tiroidea, en presencia de una influencia perturbadora, tal como los niveles elevados de estrógeno. A este respecto,
15. el método de ensayo de la invención proporciona resultados exactos y fiables cuando se realiza sobre muestras sanguíneas procedentes de pacientes muy enfermos y de pacientes que no tienen TBG en su sangre, mientras que los ensayos convencionales de T3 y T4 producen resultados engañosos en tales casos.
20. El método de ensayo de la invención proporciona los mismos resultados que los ensayos de la técnica anterior, sin embargo, en el caso de pacientes que sufren de tirotoxicosis de T3 (hipertiroidismo tóxico debido a niveles elevados de T3), es decir, todos los ensayos demuestran que tales pacientes son eutiroideos.
25. El método de ensayo de la invención es también útil para la determinación de otros ligandos o sustancias fisiológicamente activas en fluidos corporales, tales como esteroides, antígenos, anticuerpos y hierro, los cuales son capaces de
30. existir tanto en forma combinada como sin combinar. El ligante

404772



- en dichos sistemas es una sustancia, normalmente una proteina, que tiene una afinidad como mínimo para uno de dichos ligandos o sustancias fisiologicamente activas y que, por lo tanto, conduce a la formación de un complejo ligando-ligante. Por ejemplo, el presente método de ensayo puede aplicarse para la determinación de esteroides tales como cortisol del plasma o para la determinación de hierro del plasma. Así, el cortisol corticoesteroideo, una de las hormonas esteroidales más importantes, segregada por la corteza adrenal, se combina con una globulina ligante de corticoesteroides (CBG) portador de proteínas, o con transcortina. Similarmente, el hierro del plasma es transportado mediante transferencia (globulina ligante de hierro) la cual se comporta como una beta-globulina. Durante el embarazo, por ejemplo, pueden incrementar los niveles de globulina y transferrina ligante de corticoesteroides.
5.
10.
15.

La invención se ilustra adicionalmente por lo siguiente.

Reactivo T4.TBG irradiado

- Este reactivo es una dilución tamponada de suero normal empollado que contiene barbital y tiroxina irradiada con I-125. Su preparación la describe J.L. Brown y F.P. Halllett, en la forma siguiente:
20.

- A 78 ml de suero se añaden 1.850 ml de una solución tamponada de barbital a pH 8,6 que contiene 2,39 % de barbital sódico y 0,7 % de azida sódica (preservativo microbiológico), pH ajustado con ácido clorhídrico. Se añade también una pequeña cantidad de T-4 radioactivo (aproximadamente 0,13 mc) para que sirva como una traza para determinar la eficacia de la extracción.
25.

- Se prepara una columna de extracción añadiendo una
30.



- cantidad suficiente de una resina intercambiadora de iones a una columna de cristal adecuada, para proporcionar un volumen de lecho de 1.000 ml y una velocidad de flujo de aproximadamente 10 ml por minuto. Para esta finalidad, resulta adecuada una resina de tipo amonio cuaternario fuertemente básica.
5. Por ejemplo, resulta satisfactoria una resina comercialmente disponible con el nombre comercial AMBERLITE IRA-400 (fabricada por Rohm and Hass Company), pero pueden utilizarse en su lugar otras resinas anión-selectivas o catión-selectivas.
10. La resina se añade a la columna como una lechada acuosa y se mantiene siempre sobre la resina una capa de agua. La columna se conecta a un recipiente que contiene la solución de suero que ha de ser extractada y se comienza el flujo de suero a través de la columna. Periodicamente, se saca 1 ml de muestra del eluado y se recuenta su radioactividad al objeto de medir la eficacia de la extracción. La radioactividad del eluado deberá ser de un 10 % o menos de la radioactividad de la solución almacenada.
15. A 8 ml aproximadamente del tampón de barbital anterior se añade suficiente EDTA de disodio (0,215 g de EDTA- Na_2) para proporcionar una concentración de 0,1 mg de EDTA de disodio por ml de eluado de la columna (solución de suero extractada). La disolución del EDTA se efectúa con la ayuda de bajo calor. Después de enfriar a temperatura ambiente, esta solución se añade al eluado de la columna (solución de suero extractada). A continuación, se añade al eluado más tiroxina radioactiva (aproximadamente 0,27 mc). La solución de suero extractada se pasa entonces preferiblemente a través de un filtro 0,22.
20. En este momento, se mide un volumen (11.580 ml) de
- 25.
- 30.



5. solución tampón de barbital que contiene 0,1 mg de EDTA de disodio por ml igual a 6 veces el volumen del eluado. Esta solución se añade entonces al eluado proporcionando una dilución de 6 veces del eluado. El reactivo resultante tiene un pH de aproximadamente 8,6 y una concentración de EDTA de disodio de 0,1 mg/ml.

Solución de T4 del suero

10. Se extraen aproximadamente 10 ml de la sangre a ensayar y se deja coagular. El suero se extrae y se añade, gota a gota, una porción de 1 ml del suero a 2 ml de etanol al 95% en un tubo de centrifuga. El contenido se mezcla bien en un mezclador de alta velocidad al objeto de desnaturalizar las proteínas del suero. Esta mezcla alcohólica se centrifuga entonces hasta que la proteína precipitada se empaca en el fondo del tubo (2.000-2.500 rpm durante 4-5 minutos). La solución alcohólica sobrenadante, libre de proteínas, resultante contiene aproximadamente 80 % del contenido total de tiroxina de la muestra.

Solución de TBG del suero

20. Una porción del suero a ensayar (0,20 ml) se añade a 4 ml de tampón de barbital de pH 8,6 (preparado como se ha descrito en el apartado del reactivo T4.TBG irradiado). Esta solución suministra TBG insaturada a partir del suero bajo ensayo. Puede utilizarse una solución acuosa simple en lugar de una solución tamponada y pueden utilizarse cantidades menores de suero, tal como 5 ó 10 μ .

Ensayo

30. Nota: Para cada serie de sueros de ensayo, se procesa un suero de control de la misma forma exactamente que los sueros del ensayo, incluyendo la preparación de solucio-

404772

- 22 -



nes de T4 del suero (control) y TBG del suero. El suero de control es un suero normal empollado comercialmente disponible que contiene niveles normales de T4 y TBG.

5. Se añade una parte alícuota de solución de T4 del suero (0,30 ml) a 4 ml del reactivo T4.TBG irradiado, en un vial. El vial se tapona y las soluciones se mezclan bien. A continuación, se añade una parte alícuota (0,10 ml) de solución de TBG del suero a la mezcla reactivo/solución de T4.

10. Se añade una tira de membrana de resina intercambiadora de iones al vial que contiene la mezcla de las tres soluciones. Una membrana de resina preferida es la resina anión-selectiva designada por "AR-111", fabricada por Ionics, Inc., Watertown, Massachusetts.

15. Después de la adición de las tiras de resina, los viales que contienen las mezclas y sueros de control son tapados y se hacen girar durante 1 hora exactamente a temperatura ambiente. Puede utilizarse convenientemente un aparato rotativo comercial idóneo para esta finalidad. Puesto que la absorción de resina de tiroxina radioactiva es una función del tiempo de rotación, es esencial que este último sea idéntico para las muestras de ensayo y de control. Al término del tiempo de rotación de 1 hora, se extrae la tira de resina con pinzas y se desecha.

25. La concentración de tiroxina irradiada se determina entonces por medio de un contador. Se recogen para cada vial un mínimo de 10.000 recuentos. A continuación, se calcula un índice el cual se designa por relación de tiroxina eficaz, en la forma siguiente:

30.
$$\frac{\text{Recuentos/min. para suero de control - efecto de fondo}}{\text{Recuentos/min. para suero de ensayo - efecto de fondo}} = \text{Relación de tiroxina eficaz}$$

404772



Resultados

5. El estado de la hormona tiroidea de muestras de suero de 209 pacientes fué evaluado por medio de los ensayos de absorción de T3 de Bettinger et al y de T4 del suero de Brown, anteriormente descritos, así como mediante el método de la relación de tiroxina eficaz anteriormente descrito. Se calculó también un índice de T4 libre a partir de los resultados de los ensayos convencionales. En adición, fué evaluado clínicamente el estado de la función tiroidea de cada paciente.

10. El número total de pacientes empleados en el estudio se dividió en 5 subgrupos en la base de la historia, observación clínica y resultados del ensayo:

1. Eutiroides sin complicar (128)
2. Hipotiroides sin complicar (9)
15. 3. Hipertiroides sin complicar (14)
4. Eutiroides del embarazo (37)
5. Eutiroides recibiendo medicación de estrógenos (21)

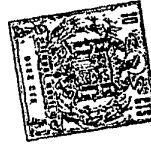
Total 209

20. Los resultados pueden resumirse en la forma siguiente:

25. En el grupo de 128 pacientes eutiroides no complicados, la totalidad de los ensayos y el índice de T4 libre demostraron que los pacientes eran eutiroides con la excepción de 4 pacientes que eran hipotiroides mediante el ensayo de T4 del suero y de 2 pacientes que eran hipotiroides por el índice de T4 libre.

30. En el grupo de 9 pacientes hipotiroides no complicados, la totalidad de los ensayos y el índice de T4 libre demostraron que los pacientes eran hipotiroides con la excepción de un paciente que era eutirotideo por el ensayo de absor-

404772



ción de T3.

5. En el grupo de 14 pacientes hipertiroideos no complicados, todos los ensayos y el índice de T4 libre demostraron que los pacientes eran hipertiroideos con la excepción de un paciente que era eutiroides por el ensayo de absorción de T3, 2 pacientes eran eutiroides por el ensayo de T4 y 2 pacientes eran eutiroides por el índice de T4 libre.

10. En el grupo de 37 pacientes eutiroides del embarazo, solamente un paciente era eutiroides por el ensayo de absorción de T3 mientras que la totalidad de los restantes pacientes eran hipotiroideos por este ensayo. 4 de los 37 pacientes eran hipertiroideos por el ensayo de T4 mientras que los niveles de T4 del suero de los restantes 33 pacientes eran elevados en la mayor parte de los casos pero dentro de la gama eutiroides del ensayo. Todos los 37 pacientes eran eutiroides por el índice de T4 libre y por la relación de tiroxina eficaz de esta invención.

15. En el grupo de 21 pacientes eutiroides que recibieron medicación de estrógenos, solamente 3 eran eutiroides por el ensayo de absorción de T3 mientras que los restantes 18 eran hipotiroideos por este ensayo. 3 de los 21 pacientes eran hipertiroideos por el ensayo de T4 mientras que los niveles de T4 del suero de los restantes 18 pacientes eran elevados en la mayor parte de los casos pero dentro de la gama eutiroides para el ensayo. Todos los 21 pacientes eran eutiroides por el índice de T4 libre y por la relación de tiroxina eficaz de esta invención.

20. De acuerdo con la invención, la indicación del estado clínico del tiroides, tal como se refleja por la relación de tiroxina eficaz, puede establecerse haciendo referencia a

25.

30.



las gamas mostradas en la Tabla 7.

Tabla 7

Gamas de relación de tiroxina eficaz

	<u>Hipertiroides</u>	<u>Eutiroides</u>	<u>Hipotiroides</u>
5.	Menos de 0,85	0,85 - 1,15	Más de 1,15

A la vista de lo anterior, podrá observarse que se consiguen los diversos objetos de la invención así como otros resultados ventajosos.

N O T A

=====

10. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento

15. corresponde a una solicitud de patente presentada en Norteamérica con la Ser. No. 161.882 de 12 de julio de 1971, acciéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento por lo que se solicita Patente de

20. Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO IN VITRO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE UNA SUSTANCIA FISIOLÓGICAMENTE ACTIVA EN UN FLUIDO CORPORAL; caracterizándose por lo siguiente:

25. 1.- Procedimiento in vitro para determinar la presencia de una sustancia fisiológicamente activa en un fluido corporal, siendo capaz dicha sustancia activa de existir en forma combinada y sin combinar; caracterizado porque comprende mezclar una forma irradiada de dicha sustancia activa, una porción del fluido corporal que contiene la sustancia activa

30. y a partir de la cual se ha separado una proporción principal



404772

conocida del ligante para la sustancia activa, y una segunda porción del fluido corporal que contiene ligante no saturado para dicha sustancia activa; y medir a continuación la sustancia irradiada combinada con el ligante o la sustancia irradiada sin combinar.

5.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el ligante es un ligante endógeno, de origen natural, para la sustancia fisiológicamente activa.

10.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque para determinar la relación de tiroxina eficaz de una muestra sanguínea como un índice del nivel relativo de tiroxina libre de la misma, la forma irradiada es una solución de una hormona tiroidea irradiada seleccionada entre tiroxina y 3,3',5'-triyodotironina, dicha primera porción es una

15.

solución que contiene tiroxina procedente de la muestra de sangre a ensayar y estando sustancialmente libre de globulina ligante de tiroxina, y la segunda porción es una solución que contiene globulina insaturada ligante de tiroxina y sus hormonas tiroideas asociadas procedentes de una muestra de sangre

20.

de la misma fuente; midiéndose a continuación (1) la hormona tiroidea irradiada combinada con la globulina ligante de tiroxina o (2) la hormona tiroidea irradiada sin combinar.

25.

4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque dicho reactivo irradiado comprende una solución de tiroxina irradiada combinada con la globulina ligante de tiroxina.

30.

5.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque dicho reactivo irradiado comprende una solución tamponada de tiroxina radioactiva y suero sanguíneo del cual ha sido extractado la mayor parte de la tiroxina de ori-



404772

gen natural.

5. 6.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado porque la hormona tiroidea en dicho reactivo irradiado, contiene yodo radioactivo seleccionado del grupo consistente en yodo-125 y yodo-131.

10. 7.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, caracterizado porque la mezcla de dicho reactivo irradiado y las citadas primera y segunda soluciones, se mantienen en contacto con una resina intercambiadora de iones durante un periodo de tiempo predeterminado antes de proceder a la citada etapa de medida.

15. 8.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, caracterizado porque la proporción del volumen de suero sanguíneo representado por dicha primera solución y el volumen de suero sanguíneo representado por dicha segunda solución, está predeterminada.

20. 9.- Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque dicha proporción está comprendida entre 10:1 y 30:1 aproximadamente.

20. 10.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque dicha proporción es de 21:1 aproximadamente.

25. 11.- Procedimiento in vitro para determinar la presencia de una sustancia fisiológicamente activa en un fluido corporal, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 27 hojas escritas a máquina por una sola cara.

28 ENE. 1975

Madrid,

MALLINCRODT CHEMICAL WORKS, S.A. MADRID

P. P. Firmador: L. Ceala Fernández