



ESPAÑA

19 MAYO 1977

PATENTE DE INTRODUCCION

10 ES 11 21 22	45931	10 A3
FECHA DE PRESENTACION		



28 ABR 1977

47 FECHA DE PUBLICIDAD	61 CLASIFICACION INTERNACIONAL G01N
------------------------	--

64 TITULO DE LA INVENCIÓN "METODO PARA OBTENER UN CONTROL DE SUERO HIPOTIROIDEO"

66 PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION Patente norteamericana nº 3922145 concedida el 25.11.75

71 SOLICITANTE (S) WARNER-LAMBERT COMPANY
--

DOMICILIO DEL SOLICITANTE 201 Tabor Road - MORRIS PLAINS, NEW JERSEY (U.S.A.)
--

72 INVENTOR (ES)

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE D. FRANCISCO GARCIA CABRERIZO



"METODO PARA OBTENER UN CONTROL DE SUERO HIPOTIROIDEO"

5. Para diagnosticar la anormalidad funcional tiroidea y evaluar la terapia tiroidea, los médicos se basan en pruebas que miden el nivel de toma de triyodotironina (T_3) del suero de un paciente así como pruebas que determinan la concentración de tiroxina (T_4). Se determina los niveles de toma de T_3 en el suero usando pruebas de toma de T_3 (por ejemplo Trisorb); se determina los niveles de T_4 en el suero usando pruebas que miden la concentración de T_4 total en el suero (por ejemplo radioinmunoensayo de T_4 Tetrasorb). Las pruebas que miden el T_4 total del suero son dependientes de la concentración de hormona tiroidea real presente en el suero, mientras que las pruebas que miden la toma de T_3 dependen de la concentración de proteína de enlace de la tiroxina (TEP) en el suero así como de la concentración de hormona tiroidea. Ambas pruebas son importantes para conseguir una clara comprensión del estado tiroideo del paciente.

20. T_3 y T_4 en circulación están unidos a varios constituyentes de la sangre de los que la fracción de globulina de enlace de la tiroxina (TBG) contiene los principales puntos de enlace que son fijos en número. La unión de T_3 y T_4 sobre la molécula de TBG es una unión de proteína del tipo competitivo, es decir, que T_4 - sin ligar reemplazará a T_3 y T_4 ya presentes en la molécula.

25. Como sólo hay 1-2 mg. de TBG/100 ml. de suero normal, los puntos de enlace, equivalentes a aproximadamente 20 microgramos de T_4 por 100 ml. de suero normal, son saturados fácilmente por un pequeño incremento de la concentración de T_4 .

30. En el hipertiroidismo, los puntos de enlace en las moléculas de TBG casi están saturados con T_3 y T_4 ; en el hipotiroidismo, los puntos de enlace se encuentran altamente insaturados, lo que da como resultado una mayor capacidad de toma de T_3 por la molécula de TBG en el suero.



El ensayo Triosorb y otras pruebas similares para la toma de T_3 se basan en el principio de enlace de proteína de tipo competitivo. T_3 y T_4 de suero están unidos principalmente a los puntos de enlace en la molécula de TBG. El número de puntos de enlace sin ocupar es determinado por la adición de T_3 radiactivo (T_3^m) al suero en presencia de un agente adsorbente. Cuando se añade T_3^m al suero, todo exceso no ligado a los puntos de enlace de la molécula de TBG en el suero será adsorbido sobre el agente añadido. Los agentes adsorbentes en la prueba Triosorb consisten en esponjas de resina. Por ejemplo, en el hipertiroidismo, la mayor parte de los puntos de enlace de TBG están ocupados por T_3 y T_4 y de este modo el T_3^m añadido no será cogido por las moléculas de TBG endógenas, sino que será recogido por el adsorbente de la prueba. En el hipotiroidismo, ocurre lo contrario. Así pues, la cantidad de T_3 radiactivo ligado por el adsorbente refleja directamente el estado tiroideo del paciente.

El ensayo "tetrasorb" para T_4 se basa también en el principio de enlace de proteína del tipo competitivo. Para determinar la concentración de T_4 , se extrae el T_4 del suero liberándolo de su proteína de enlace, TBG. El extracto de suero es añadido después a una solución que contiene una cantidad limitada de TBG exógena con la que está unido T_4 radiactivo (T_4^m). Se produce una reacción de desplazamiento en la que el T_4 del extracto desplaza al T_4^m de la TBG exógena. Este T_4^m desplazado es adsorbido después sobre la esponja de resina usada como agente adsorbente. Al añadir más T_4 , se desplaza más T_4^m de la TBG. La cantidad de T_4^m desplazada de la TBG es por consiguiente directamente proporcional a la cantidad de T_4 presente en el extracto de suero. En el hipertiroidismo hay más T_4 disponible en el extracto de suero para desplazar el T_4^m de la TBG exógena que en el eutiroidismo o hipotiroidismo.

Quando están presentes niveles normales de TBG en el suero,



estos tipos de pruebas de la función tiroidea reflejan el estado real del paciente. Cuando los niveles de TBG y T_4 son elevados, como en el embarazo o a consecuencia de la ingestión de estrógenos en forma de anticonceptivos orales, las pruebas de toma de T_3 indican que el paciente es hipotiroideo. No obstante, las pruebas que miden el total de T_4 indican una condición eutiroides o a veces hipertiroidea. Expuesto de forma más simple, el embarazo o la ingestión de estrógenos produce un incremento en el número de moléculas de TBG causando un incremento en los puntos de enlace de la hormona con una elevación concomitante en los niveles de hormona tiroidea. Las pruebas de función tiroidea llevadas a cabo con estos sueros en este momento muestran una toma de T_3 incrementada, indicativa de la función hipotiroidea y un nivel de T_4 incrementado indicativo de la función hipertiroidea. Es objeto de esta invención describir un suero de control preparado a partir de estos tipos de sueros y suero normal que sirva de suero de control hipotiroideo para las pruebas de T_4 así como para las pruebas de toma de T_3 . Por suero normal, los solicitantes entienden un suero que tenga valores de T_3 y T_4 normales y que puede ser suero humano, de buey, de oveja, de cabra u otros animales. Únicamente se ha comprobado que el suero de caballo no tiene utilidad.

Un suero es hipertiroideo por las pruebas "tetrascorb" y "triosorb" si el porcentaje de toma de T_3 es superior a 35, y la concentración de T_4 es superior a 14,5 mcg. por 100 ml. de suero. Un suero es eutiroides si el porcentaje de toma de T_3 está comprendido entre 25 y 35 y la concentración de T_4 es de 5,3-14,5 mcg. por 100 ml. de suero. El suero hipotiroideo tiene una toma de T_3 por debajo del 25% y menos de 5 mcg. de T_4 por 100 ml. de suero.

Al retirar el T_3 y T_4 del suero normal o suero que contiene elevados niveles de TBG, tal como por los métodos reseñados más abajo, resulta un suero juzgado como hipotiroideo por los métodos

28 ABR



que miden tanto la concentración de T₄ como la toma de T₃.

EJEMPLO 1

Ingredientes	Cantidad para 990 ml. (420 viales)
5. 1. Suero Normal, Fresco	2.700 ml.
2. Norit A, Carbón Decolorante Neutro, Calidad farmacéutica. (Amend Drug - Co. Irvington, N.J.)	480 g.
3. Agua, Purificada	560 ml.

10.

METODO.

1. Añadir el artículo nº 2 a 2.400 ml. del artículo nº 1 en un matraz Erlenmeyer de 4 litros (aproximadamente 20% de carbono en peso por volumen de suero).
15. 2. Remover lentamente a temperatura ambiente hasta que las partículas de carbón vegetal sean dispersadas en el líquido.
3. Disponer la mezcla a 4°C. Remover muy lentamente durante 24 horas aproximadamente.
4. Al final de las 24 horas, centrifugar la mezcla a alta velocidad en una centrifuga refrigerada (34.800 X g.).
20. 5. Decantar el material flotante y centrifugarlo nuevamente como en el paso 4.
6. Después de la segunda centrifugación, decantar nuevamente el material flotante y filtrarlo por vacío a través de un filtro "miliporo".
25. 7. Verter el filtrado (1.200 ml.) en una bandeja de vidrio apropiada para la liofilización y liofilizarlo.
8. Transferir el material liofilizado a un matraz Erlenmeyer de 2 litros y añadir el artículo nº 3.
30. 9. Dejar la mezcla en reposo durante 30 minutos, facilitando después al proceso de disolución removiéndola lentamente.



10. Añadir 300 ml. del artículo nº 1 a la mezcla de suero obtenida en el paso 9.

11. Echar 2,14 cc. en un vial que contendrá 2 ml. de relleno y liofilizarlo.

5. Los viales son reconstituídos con 2,0 ml. de agua destilada, desionizada. Se usa este suero en un control hipotiroideo en cooperación con todas las pruebas de la función tiroidea, es decir que el control de suero resultante debería tener un nivel de toma T_3 inferior al 25% por el método Triosorb y una concentración de T_4 de menos de 5,3 mg./100 ml. por el método Tetrasorb.

10. Evidentemente, es posible introducir modificaciones en el ejemplo 1. Puede eliminarse la centrifugación (pasos 4 y 5); el filtro "miliporo" (paso 6) puede ser, desde luego, un aparato Ertel; el suero puede ser humano o animal; la exigencia de envasar las mezclas (paso 11) puede ser, evidentemente modificada o suprimida totalmente; el tiempo de mezcla (paso 3) puede ser acortado o prolongado en una gama de 3-30 horas; el porcentaje de carbón añadido puede ser del 5-20%, siendo preferida una gama del 10 al 20% aproximadamente.

15. Este procedimiento retira por encima del 99% del T_3 y T_4 del suero de partida, produciendo efectivamente un suero libre de T_3 y T_4 , a la vez que no afecta sensiblemente a la concentración total de proteína, PH, o capacidad de enlace de T_4 del suero.

20. El ejemplo que sigue esboza el método usado para retirar el T_3 y T_4 del suero que contiene niveles elevados de TBG. Es posible también introducir modificaciones en este ejemplo similares a las esbozadas para el ejemplo 1 y las mismas están comprendidas dentro del marco de esta invención.

25. EJEMPLO 2.

30. . . . / . . .



Ingredientes	Cantidad para 900 ml. (420 viales)
1. Suero que contiene una alta concentración de globulina de enlace de la tiroxina	1.100 ml.
2. Carbón Decolorante Neutro, calidad farmacéutica	220 g.
3. Suero normal, fresco	300 ml.

10. METODO

1. Añadir el artículo 2 al artículo 1 en un matraz Erlenmeyer de 2 litros (aproximadamente 20% de carbono en peso por volumen de suero).

15. 2. Remover lentamente a temperatura ambiente durante 1 minuto con el fin de que las partículas de carbón vegetal sean dispersadas en el líquido.

3. Disponer la mezcla a 4°C y agitarla muy lentamente durante 24 horas aproximadamente.

20. 4. Al final de las 24 horas, centrifugar la mezcla a alta velocidad en una centrifuga refrigerada (34.800 Xg).

5. Decantar el material flotante y centrifugarlo nuevamente como en el paso 4.

25. 6. Después de la segunda centrifugación, decantar nuevamente el material flotante y filtrarlo por vacío a través de un filtro de vidrio sinterizado.

7. Añadir 300 ml. del artículo 3 a 600 ml. de suero obtenido en el paso 6. Remover lentamente para mezclar.

8. Echar 2,14 cc. en un vial que contendrá un relleno de 2 ml. y liofilizar.

30. Los viales son reconstituidos con 2,0 ml. de agua destilada, desionizada. Se usa este suero para un suero de control hipotético.



tiroideo en cooperación con todas las pruebas de la función tiroidea.

5. La solución de relleno, después de su reconstitución, contendrá aproximadamente 7% de proteína. El control de suero resultante debería tener un nivel de toma de T₃ de menos del 25% por el método Triosorb y una concentración de T₄ de menos de 5,3 µg. % por el método Tetrasorb. El suero usado en este ejemplo puede ser obtenido, por ejemplo, de mujeres embarazadas o mujeres bajo terapia estrógena.

10. Se llevó a cabo una serie de cuatro experimentos separados para mostrar el efecto sobre los sueros cuando fueron tratados como en los ejemplos 1 y 2. Los sueros resultantes fueron ensayados siguiendo los protocolos Triosorb y Tetrasorb que son ya bien conocidos. Los resultados de estos experimentos (Tabla I) muestran que el suero tratado de acuerdo con los métodos de esta invención, puede ser usado como suero de control hipotiroideo para las pruebas que son llevadas a cabo en los laboratorios clínicos.

T A B L A I

20.	Experimento	Sueros	% de toma de T ₃	T ₄ mcg. %
	I	Suero Humano Normal Encharcado (NBS).	27,1	7,4
		Suero Humano Normal Encharcado después del tratamiento del ejemplo 1 - (HCS) ²	15,1	0,8
25.	II	Suero Humano Normal Encharcado (NBS)	31,9	3,6
		Suero Humano Normal Encharcado después del tratamiento del ejemplo 1 (HCS) ²	18,3	0,5
		2 HCS : 1 NBS ²	21,2	3,3
	III	Suero de Buey Normal Encharcado (NBS)	29,3	11,4
30.		Suero de Buey Normal Encharcado después del tratamiento del ejemplo 1 (HBS)	17,8	0,4
		2 HBS : 1 NBS ²	19,3	2,4



Experimento	Sueros	% de toma de T ₃ T ₄ mcg.%	
5.	IV Suero Encharcado de Mujeres Embarazadas	17,6	13,0
	Suero Encharcado de Mujeres Embarazadas después del tratamiento del ejemplo 2	13,6	0,3

* Es el suero obtenido después del paso 9 del ejemplo 1.

** Es el suero obtenido después del paso 10 del ejemplo 1.

10. Los resultados del experimento I muestran que el suero normal encharcado era eutiroidico en ambas pruebas. Después del tratamiento, el suero era hipotiroideo tanto para la toma de T₃ como en la concentración de T₄.

15. Los resultados del experimento II muestran que los valores hipotiroideos pueden ser alterados hacia arriba cuando se entremezcla los sueros antes y después del tratamiento, como en este experimento en una proporción de 2 a 1.

20. Se llevó a cabo el experimento III con sueros de buey como representativos de los sueros animales que han demostrado tener utilidad. Según muestran los resultados, el suero de buey normal, encharcado, muestra una toma de T₃ y una concentración de T₄ dentro de la gama eutiroidica. Después del tratamiento, estos sueros se comportan similarmente a los sueros humanos y están comprendidos dentro de la gama hipotiroidea en toma de T₃ y concentración de T₄. Al igual que el suero humano, puede incrementarse los valores de T₃ y T₄ mezclando diversas proporciones de suero de buey normal y el suero de buey hipotiroideo preparado.

30. El experimento IV muestra la toma de T₃ hipotiroideo y la concentración de T₄ eutiroidico esperadas para el suero encharcado recogido de mujeres embarazadas. No obstante, después del tratamiento esbozado en el ejemplo 2, el suero se vuelve hipotiroideo tanto para la toma de T₃ como para la concentración de T₄.



N O T A

La Patente de Introducción que se solicita por diez años, para España, de acuerdo con la vigente Legislación deberá recaer sobre: "METODO PARA OBTENER UN CONTROL DE SUERO HIPOTIROIDEO", citándose como Fuente de Procedencia Patente norteamericana nº 3922145 concedida el 25.11.75, según las características esenciales de las siguientes:

R E I V I N D I C A C I O N E S

10. 1ª.- Método para obtener un control de suero hipotiroideo que comprende los pasos siguientes:
- I. - Añadir carbón decolorante, neutro al suero de la sangre en una cantidad de aproximadamente 5-20% basado en el peso de carbón por volumen de suero;
 - II.- Mezclar la mezcla antes citada durante 24 horas aproximadamente a una temperatura de 42°C aproximadamente;
 - 15. III.-Centrifugar dos veces la pasta resultante a 34.800 xg y a una temperatura de aproximadamente 42°C;
 - IV.- Filtrar el material flotante resultante;
 - V.- Liofilizar el material flotante así obtenido.
20. 2ª.- El método de la reivindicación 1ª, que incluye la adición de suero normal no tratado en una cantidad de aproximadamente 10 a 35% del volumen de suero del paso (I) al material flotante, filtrado del paso (IV).
25. 3ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que el suero es suero de sangre animal.
- 4ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que el suero es suero de sangre humana.
- 5ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que el suero es suero de sangre de buey.
30. 6ª.- El método de la reivindicación 4ª, en el que el suero es T₄- eutiroides, hipotiroideo, o hipertiroideo y T₃ - eutiroides



o hipotiroideo.

7.- EL método de la reivindicación 6ª, en el que el suero es T₃⁻ hipotiroideo.

8.- EL método de la reivindicación 6ª, en el que el suero es T₄⁻ eutiroides y T₃⁻ eutiroides.

9.- "METODO PARA OBTENER UN CONTROL DE SUERO HIPOTIROIDEO".

Según queda sustancialmente descrito en la presente Memoria que consta de once hojas, escritas a máquina por una sola cara.

10.

Madrid, 22 1977

WARNER-LAMBERT COMPANY

P.P. FRANCISCO GARCIA CABRERIZO
P.P.

Firmado: M.^a Dolores Jorquera