

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

19 ES	11	NUMERO	469641	10 A1
	21	FECHA DE PRESENTACION	27 ABR. 1978	
	22			

5 DIC. 1978

PATENTE DE INVENCION

50 PRIORIDADES:			52 FECHA			53 PAIS		
51 NUMERO			8 Julio 1977			ALEMANIA Rep.Fed.		
P 27 31 028.7								
47 FECHA DE PUBLICIDAD			51 CLASIFICACION INTERNACIONAL			62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA		
			G01N					
64 TITULO DE LA INVENCION								
"PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE HORMONAS Y FARMACOS NO LIGADOS".								
71 SOLICITANTE (S)								
CHANDON INVESTMENT PLANNING LTD.								
DOMICILIO DEL SOLICITANTE								
GRAND CAYMAN, Isla Cayman (INDIAS OCCIDENTALES BRITANICAS) - West Wind Bldg. P.O.B. 1111.								
72 INVENTOR (ES)								
D. Hans A. THOMA.								
73 TITULAR (ES)								
74 REPRESENTANTE								
D. Alfonso Durán Olivella.								

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente Patente de invención se refiere a un procedimiento para la determinación de hormonas y fármacos no ligados.

Los esteroides se unen en el suero humano a las proteínas. En la analítica clínico-química de las hormonas, las determinaciones de hormonas se basan casi exclusivamente en el principio de deshacer el enlace de la proteína de transporte con las hormonas y medir la concentración total de la hormona. Como técnicas para la eliminación del enlace se pueden considerar diferentes procedimientos tales como extracción por disolventes, desnaturalización por calor, hidrólisis enzimática, o bien acción de medio alcalino.

El contenido de la proteína de enlace en el suero humano no siempre es igualmente grande. Es sabido que en pacientes sometidos a terapia antiovulatoria o bien en las últimas fases del embarazo se pueden medir valores elevados de, por ejemplo, globulina que se une al cortisol o bien globulina que se une a la tiroxina. Además, se han encontrado aumentos o disminuciones aislados del contenido de la proteína de unión o de enlace, cuya repetición familiar y transmisión sucesoria todavía es objeto de discusión.

Dichos niveles variados de proteínas de enlace, llevan en la determinación global de las hormonas a valores que indican un síndrome determinado, mientras que los pacientes no muestran el cuadro clínico del correspondien-

te síndrome, puesto que la regulación de las hormonas aparentemente tiene lugar solamente en la parte no unida a la proteína, mientras que la parte unida a la proteína es biológicamente inactiva.

5. Las técnicas conocidas para la determinación de hormonas unidas a las proteínas y hormonas libres son o bien del tipo en las que se mantiene un equilibrio entre las hormonas unidas o ligadas y libres durante la disgregación, tal como por ejemplo en la diálisis clásica de equilibrado o bien la ultrafiltración, o bien otras técnicas, en las cuales no se mantiene el equilibrio durante la disgregación, tal como por ejemplo la cromatografía de columnas o bien los métodos de absorción, que no obstante, son una medida o indicación de la verdadera proporción libre de la hormona. En estas técnicas el tiempo de reacción es un factor crítico, puesto que el enlace entre absorbente y esteroide es irreversible.

- Los procedimientos conocidos de disgregación son muy engorrosos y suministran solamente el porcentaje de hormona libre. El valor absoluto debe ser calculado mediante procesos adicionales de evaluación de la concentración global de la hormona. Mediante esta determinación indirecta la medición presenta inexactitudes, incluso prescindiendo de lo engorroso de las técnicas empleadas, que son necesarias para la determinación percentual.

Es una finalidad de la presente invención el proporcionar un procedimiento para la determinación de hormonas no ligadas o fármacos, que permitan la determi-

nación de la concentración absoluta de la hormona libre y no fundamentalmente el porcentaje. El procedimiento debe ser además sencillo y automatizable.

- Es una finalidad de la presente invención un
5. procedimiento para la determinación de hormonas o fármacos no unidos o ligados mediante la reacción de la hormona o del fármaco con un anticuerpo y valoración radioinmuno-
lógica, que se caracteriza porque una hormona no ligada, una hormona ligada o unida a una proteína de enlace y una
 10. solución que contiene una proteína de enlace, es suministrada a un anticuerpo inmovilizado, dejando reaccionar la hormona no ligada con el anticuerpo, procediendo a la elusión de la hormona unida a la proteína de enlace y de la proteína de enlace con una solución que contiene hormo-
na marcada, y procediendo de forma que la hormona marcada
 15. se deja reaccionar con el anticuerpo, procediendo a la elusión de la hormona marcada no unida con el anticuerpo, y procediendo a la determinación de la hormona marcada.

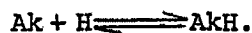
- La presente invención consigue la determinación
20. de la concentración absoluta de hormonas no unidas o enlazadas o de fármacos, en un proceso. Este método de determinación es extraordinariamente sencillo, rápido y automatizable.

- El procedimiento objeto de la Patente descansa
25. sobre el presente principio. En el suero o plasma se encuentra la hormona o el fármaco (H) en equilibrio termodinámico con la proteína de transporte (B) de forma correspondiente a la ley de masas:



- Si el suero es suministrado a un polvo de anticuerpo seco, la matriz empieza a hincharse de forma acentuada. Este proceso de hinchado, que tiene lugar muy
5. rápidamente, lleva a la separación de la hormona libre, difusible y del complejo hormona/proteína de enlace, puesto que durante el proceso de hinchamiento, a causa de la pequeña dimensión de los poros de la matriz, solamente pueden penetrar en ésta moléculas relativamente pequeñas.
 10. Las hormonas libres de pequeñas dimensiones serán transportadas con el fluido en el interior V_i del gel, mientras que las proteínas y las hormonas unidas a proteínas, a causa de las pequeñas dimensiones de los poros del gel solamente podrán utilizar el volumen externo V_a que rodea
 15. la partícula de gel. Con el proceso de hinchado se conseguirá prácticamente una completa disgregación extraordinariamente rápida de las hormonas libres y unidas.

- Puesto que el anticuerpo se encuentra en el volumen comprendido por las partículas de gel V_i que
20. representa aproximadamente de 80 a 90% del volumen total del gel, tiene lugar allí la reacción del anticuerpo con la hormona que penetra:



- En una segunda fase tiene lugar la elusión
25. solamente en lo necesario para que tenga lugar la elusión del volumen exterior V_a . En V_a se encuentran entre otros también la proteína de enlace y el complejo hormona/proteína de unión.

La hormona difusible se encuentra después del proceso de hinchado principalmente en el volumen interno del gel V_i . Durante el proceso de hinchado se ha mezclado el anticuerpo con la hormona. Además el volumen V_i es

5. sensiblemente más grande que V_a . A causa de esto, mediante una elusión, que interesa solamente el volumen externo V_a , será eliminada por elusión solamente una pequeña cantidad de la hormona difusible, hacia afuera del gel.

En caso que la elusión de la hormona/complejo de

10. proteína de enlace sea llevada a cabo con una solución, que contiene hormona marcada, se puede interesar en una segunda reacción por la hormona marcada, el anticuerpo que no ha formado complejo todavía por la hormona no marcada.

Puesto que las reacciones de la hormona no

15. marcada y de la hormona marcada con el anticuerpo tienen lugar una después de la otra, no se puede esperar en la incubación con la hormona marcada la formación de equilibrio. Después de un cierto tiempo puede tener lugar la disgregación de las hormonas unidas al anticuerpo y de

20. las hormonas no unidas, mediante elusión con solución equilibradora.

La medición de la concentración de la hormona marcada puede tener lugar en el eluido o bien en el gel de forma conocida por radiología. La determinación radioin-

25. munológica de las hormonas no marcadas es igualmente conocida. Una descripción de los ensayos radioinmunológicos se encuentra por ejemplo en Clinical Chemistry, Vol. 9, No 2, 1973, pág. 145. En caso necesario, se pueden

considerar también métodos de determinación alternativos, tales como la determinación fluoroinmunológica o bien la determinación por medio de marcado enzimático.

- El proceso objeto de la invención es apropiado
5. para la determinación de diferentes hormonas y fármacos que se encuentran en el suero o en el plasma unidos parcialmente a proteínas de enlace específicas o no específicas. Se pueden considerar en este caso las hormonas de la tiroides, especialmente la tiroxina y triyodtironina, las
 10. hormonas esteroides tales como cortisol, testosterona, progesterona, ostrona, ostradiol y ostriol así como los glicósidos del corazón tal como digitoxina y digoxina. Además se pueden determinar las vitaminas, especialmente la vitamina B12 y el ácido fólico, así como fármacos con
 15. enlaces proteínicos más fuertes, tal como por ejemplo anticoagulantes, dicumarol, analgésicos y salicilato.

- Los anticuerpos se pueden inmovilizar por medio de diferentes matrices. Como ejemplo de matrices se pueden citar la agarosa, celulosa, partículas de vidrio, poliamidas,
20. poliacrilamidas y copolimerizados de la acrilamida. Estas últimas son preferibles. Las ventajas de los anticuerpos comprendidos en una matriz residen en la exclusión de moléculas perturbadoras de alto peso molecular, en el ahorro de pipetado y fases de centrifugado así como en la
 25. larga estabilidad de los anticuerpos inmovilizados a temperatura ambiente.

Por la copolimerización de la acrilamida con enlaces copolimerizables con la misma, se puede influir en el

microentorno de la matriz de polímero. Este efecto actúa fundamentalmente en cuanto a hidrofobia e hidrofilia así como efectos electrostáticos.

5. Por la variación de la matriz de polímero por medio de copolimerización es posible una sustancial elevación del carácter específico de enlace del anticuerpo y una disminución de la reactividad de polimerización no deseada.

10. Son preferibles en especial los copolimerizados de acrilamida y uno o más de los enlaces: ácido acrílico, ácido metacrílico, metacrilamida, sus derivados y sales del ácido acrílico o del ácido metacrílico.

15. La proporción de acrilamida en el copolimerizado puede variar preferentemente entre 1 y 99 mol %, preferentemente entre 5 y 95 mol % y especialmente de 20 a 80 mol %.

20. Son especialmente apropiados los copolimerizados de acrilamida y ácido metacrílico y especialmente aquellos en los cuales la parte de ácido metacrílico constituye de 20 a 60 mol %.

25. Por la utilización de copolimerizados, que contienen ácido acrílico o ácido metacrílico o bien las sales de éstos, se puede alcanzar además un efecto de neutralización o un efecto de equilibrado de los ácidos o bien de las soluciones alcalinas. Como sales son preferentes las alcalinas y/o sales alcalinotérreas.

La fabricación de las matrices de polímero con anticuerpos inmovilizados puede tener lugar por ejemplo de

manera tal que se añade una solución del anticuerpo a la mezcla de monómero. La añadidura se polimeriza por ejemplo de modo total y el polimerizado contenido es triturado, lavado y secado.

5. Para conseguir una dimensión apropiada de los poros de la matriz de polímero se varía la concentración de monómero. Una concentración de monómero aproximadamente de 20% lleva a unas dimensiones de los poros de 7 a 10 Å.

10. En la figura se muestra una disposición para la realización automatizada del procedimiento según la invención.

15. El anticuerpo inmovilizado se encuentra en pequeños tubos o columnas -5- estos se encuentran fijados en una placa de adaptación -4-. Por debajo quedan dispuestos receptáculos de suministro y recogida, que pueden quedar unidos en un conjunto -6-. Los tubos o columnas -5- quedan unidos mediante tuberías de salida -7- con las bombas -1- y -2-. La disposición es controlada mediante un dispositivo de control electrónico -3-.

20. La muestra que se desea determinar es suministrada a un vaso de reacción y dispuesta debajo de un tubo con anticuerpo. A continuación el dispositivo de control pondrá en marcha el siguiente programa:

25. Una o ambas bombas funcionan durante un cierto tiempo hacia atrás, con lo que la muestra es aspirada en el gel seco del anticuerpo.

A continuación tiene lugar un corto intervalo de pausa. Durante este tiempo tiene lugar el proceso de

hinchado del gel y la disgregación de las hormonas libres y unidas a proteínas. Esta fase de hinchado dura aproximadamente 1 min.

- En las fases siguientes funcionan ambas bombas,
5. con lo que la bomba -1- suministra fluido de elusión, por ejemplo una solución equilibradora o agua y la bomba -2- suministra fluido de elusión con hormona marcada (trazadora), o bien solamente la bomba -2- hacia delante. De esta manera se eluye la fracción de proteína simultáneamente
10. con el suministro de producto trazador.

- Por lo tanto el producto trazador no se mezcla antes del suministro en el gel con la solución equilibradora, es decir no se disuelve, se suministra la solución equilibradora y la solución trazadora por canales separados, que terminan en el gel.
- 15.

Esta elusión y suministro de producto trazador debe realizarse lo más rápidamente posible, de manera que la hormona no tenga tiempo de difundirse hacia afuera del gel.

20. La necesaria exactitud de la determinación se alcanzará o bien por la añadidura de la hormona marcada en dosado exacto o bien se trabaja en la zona de saturación del anticuerpo.

- A continuación tiene lugar otro intervalo de
25. pausa, durante el cual la hormona marcada reacciona con los lugares de enlace todavía libres del anticuerpo inmovilizado. Este intervalo de pausa se encuentra normalmente alrededor de los 10 min. Finalmente tiene lugar la elusión

con una solución equilibradora pura, en la cual la bomba -1- funciona hacia delante. Con esta elusión se consigue la disgregación de las hormonas marcadas unidas al anticuerpo y no unidas.

5. La radioactividad que permanece en los tubos, es decir, en el eluido, constituye una medida para la concentración de las sustancias a determinar.

Se formará una curva de graduación en la que concentraciones conocidas de hormonas sin proteínas, estén sometidas a iguales fases.

10.

Una comparación de la determinación de tipo conocido por medio de diálisis y absorción en carbón ha mostrado que con el procedimiento objeto de la invención verdaderamente se miden solamente las hormonas libres difusibles.

15.

El sistema mostrado en el dibujo es un sistema de canales múltiples que permite la determinación en paralelo de numerosas muestras.

En la realización práctica se ha mostrado que el control termostático a 0 Ω C para la disminución de la disociación no es necesario puesto que incluso a 22 Ω C las mediciones llevadas a cabo dieron valores idénticos.

20.

La presente invención se describirá a continuación en base a un ejemplo que muestra la determinación del cortisol difundible en el suero.

25.

La fabricación del polímero con el anticuerpo inmovilizado se llevó a cabo del modo siguiente. Para cada añadidura de polímero se preparó una concentración tal que la concentración total de monómero ascendía a 3,13 mol/l.

Para una añadidura se disolvieron por ejemplo 5 gr. de acrilamida, 1,25 gr. de N,N'-metilenbisacrilamida en un vaso de precipitación con 24 ml de fosfato equilibrador (pH 7,2). En la fabricación del copolimerizado se cambió

5. acrilamida equimolar por acrílderivados. Después de la añadidura del antisuero en 1 ml de fosfato equilibrador, se inició la reacción con 0,15 mg de riboflavina y 0,10 ml de N,N,N',N'-tetrametiletildiamina y se sometió a radiación ultravioleta. Durante el tiempo de radiación de
10. unos 45 min la temperatura se mantuvo a 50°C. El residuo se trituró a continuación con agua destilada, se lavó y se secó.

- En la determinación de cortisoles difusibles se utilizaron dos bombas de émbolo con velocidades de suministro de 0,68 ml/min (bomba 1) y 0,5 ml/min (bomba 2),
15. que pueden actuar hacia adelante o bien hacia atrás. 60 mg de gel de anticuerpo anticortisol se dosificaron en un pequeño tubo con filtro. De un vaso de reacción se aspiraron con las bombas 320 µl de solución incubadora en los
 20. tubos, cuya solución contenía la siguientes sustancias disueltas en solución de fosfato equilibrador (pH 7,2): para la curva de efectividad de la dosis, cortisol no marcado en concentración ascendente (de 0,56 hasta 17,66 pMol), para la determinación del suero, suero diluido (1 :
 25. 12). La temperatura de reacción se mantuvo constantemente a 0°C ± 0,5°C. Con las bombas tuvo lugar después de 4 min de tiempo de hinchado la elución de proteínas de los tubos con 630 µl ³H-solución de cortisol en un vaso de

- centelleo. Después de 10 min de tiempo de incubación con ^3H -cortisol, se disgregó el cortisol libre, unido al anticuerpo, mediante elusión con la bomba -2- que suministra solución equilibradora de fosfato (pH 7,2). El
5. eluido (1 ml para 3 min de duración de elusión) se sometió a un receptáculo de centelleo, cambiándose con 15 ml de solución de centelleo y se midió la radioactividad en el dispositivo de centelleo del líquido. De los impulsos por minuto (cpm), se calculó la concentración del hapteno
10. indicador libre ^3H -cortisol. De la curva de dosificación se leyó entonces el contenido de cortisol difusible.

- Se investigaron matrices anticuerpo que comprendían los siguientes acrílderivados: 100% de acrilamida; 60 % acrilamida y 40 % ester del ácido metacrílico así como
15. 60 % de acrilamida y 40 % de ácido metacrílico. La concentración de monómero ascendió de modo correspondiente a 3,13 Mol/l, de manera que se alcanzó unas dimensiones de poros aproximadamente de 0,8 a 1,0 nm. El tamaño del gránulo del gel ascendió como valor medio a 400 μm . Para
20. una velocidad de alimentación de 0,5 ml/min se han eluido después de 4 min el 92 % de los haptenos libres.

La determinación de cortisol difusible en $\mu\text{g}/100$ ml facilitó bajo circunstancias distintas, los siguientes valores:

25. Normal 1,5 hasta 2,5; prueba de estimulación ACTH 4,5 a 10, 8; en la supresión mediante dexametasonal, 0,15 a 1,0 y en el embarazo 3,0 hasta 7,8. Estos valores corresponden los valores calculados por métodos habituales,

tales como la diálisis por equilibrado.

- El procedimiento objeto de la Patente se utilizó también para la determinación de testosterona. La forma de trabajo correspondió de modo esencial a la determinación anteriormente explicada del cortisol. Se utilizaron no obstante 160 mg de gel de anticuerpo, 1 ml de solución de incubación se aspiró en los tubos así como 1580 μ l de ^3H -solución de testosterona con una concentración de 270 pg/100 μ l que se suministraron a la elución de proteína.
- 5.
 10. Se dió una sensibilidad formal de 10 pg/ml.

Todo cuanto no afecte, altere, cambie o modifique la esencia del procedimiento descrito, será variable a los efectos de la actual Patente.

N O T A


Se reivindica como objeto de esta Patente de invención:

- 1.- Procedimiento para la determinación de
5. hormonas y fármacos no ligados, por reacción de las hormonas o de los fármacos con un anticuerpo y por valoración radioinmunológica, caracterizado porque una hormona no unida, una hormona unida a una proteína de enlace y una solución que contiene proteína de enlace, se suministran a
10. un anticuerpo inmovilizado dejando reaccionar la hormona circundante con el anticuerpo, procediéndose al eluido de las hormonas unidas a proteínas de enlace y las proteínas de enlace con una solución que comprende hormona marcada y que la hormona marcada se dejará reaccionar con el anti-
15. cuerpo y que se procederá a la elusión de la hormona marcada no unida con el anticuerpo y finalmente se determinará la hormona marcada.

- 2.- Procedimiento para la determinación de hormonas y fármacos no ligados, según la reivindicación 1,
20. caracterizado por la utilización de un anticuerpo comprendido en un gel de polímero.

- 3.- Procedimiento para la determinación de hormonas y fármacos no ligados, según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque se utilizará un anticuerpo
25. comprendido en un polímero de acrilamida o en un copolímero de acrilamida.

Sean cuales fueren las circunstancias que concurran en la esencialidad de la Patente de invención,



definida en las anteriores reivindicaciones, cuyo objeto es:

4.- "PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE HORMONAS Y FÁRMACOS NO LIGADOS".

5. Consta la presente memoria de dieciséis hojas foliadas, mecanografiadas por una sola cara y de los dibujos unidos a la misma.

Barcelona, 27 ABR. 1978

P.Á. de CHANDON INVESTMENT PLANNING LTD.

ALFONSO DURÁN

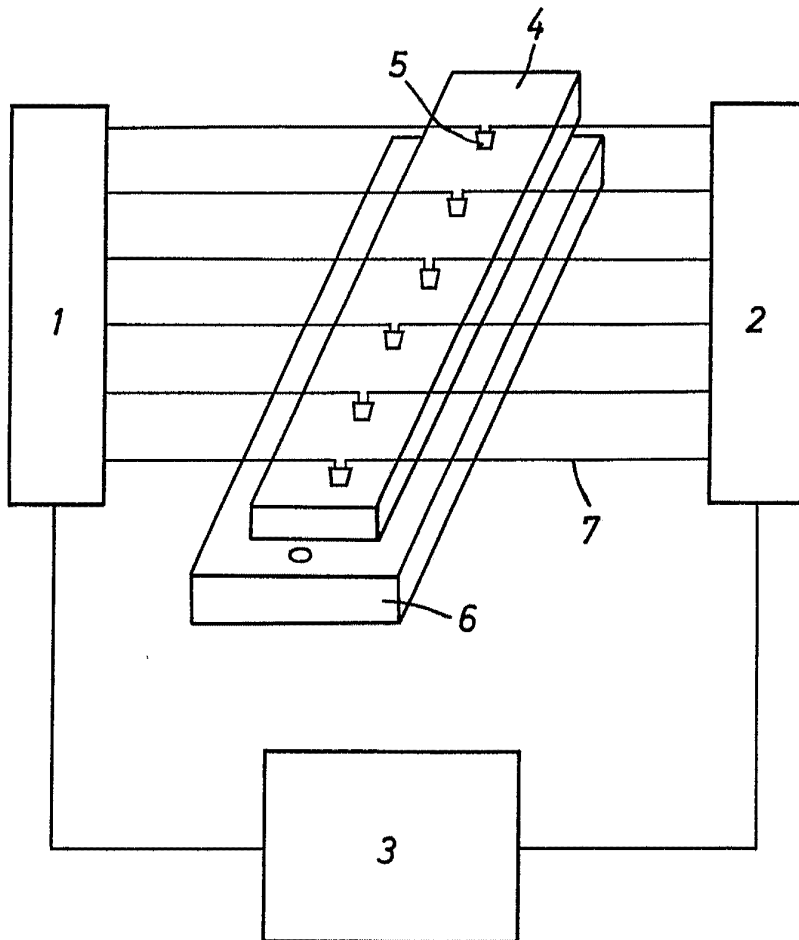
p. p.

~~Luis Alfonso Durán Méy~~

Fdo. Luis A. Durán Méy

JR/mp

[Handwritten signature]



BARCELONA, 27 ABR. 1978
P. A.

ALFONSO DURÁN
p. p.

Fdo.: Luis A. Durán Moya

ESCALA VARIABLE