



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo  
con los datos que figuran en la pre-  
sente descripción y según el con-  
tenido de la Memoria adjunta.

10 ES	11	12	13
		48 1490	A1
		FECHA DE PRESENTACION	

**PATENTE DE INVENCION**

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
P 28 25 650.0	12 junio 1978	ALEMANIA

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N 33/16	

64 TITULO DE LA INVENCION

"Procedimiento para determinar el indice de fijación de tiroxina en el suero"

71 SOLICITANTE (S)

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Sandhofer Strasse 112-132, D-6800 Mannheim-Waldhof, (Alemania)

72 INVENTOR (ES)

Dr. Cerd Kleinhammer, Frl. Gerlinde Deutsch, Dr. Hans-Ralf Linke, Dr. Fritz Stähler, Dr. Wolfgang Gruber.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

Carlos Fernandez Candelas

La diagnosis de la glándula tiroides tiene importancia especial dentro del marco de la química clínica a causa de la amplia propagación de investigaciones sobre la glándula tiroides. La diagnosis de la glándula tiroides sobre una base "in vitro" abarca en tal caso la determinación de la totalidad de tiroxina ( $T_4$  total) presente en el suero así como la determinación de la concentración de la globulina fijadora de tiroxina (GFT), que se efectúa con ayuda de la llamada absorción de triyodotironina (absorción de  $T_3$ ) o del ensayo del índice de fijación de tiroxina (ensayo IFT).

Con el mencionado ensayo de absorción de  $T_3$  se determina la capacidad de fijación restante (CFR) de proteínas portadoras para hormonas de glándula tiroides en el suero. Estas proteínas consisten en la globulina fijadora de tiroxina (GFT), a la que está fijada aproximadamente 60% de toda la cantidad de  $T_4$  presente así como la prealbúmina fijadora de tiroxina (PAFT) y albúmina. Esta capacidad de fijación restante consiste en lo esencial, por lo tanto, en la fijación de la hormona de glándula tiroides a la GFT. Así, en el caso de una hipertireosis, por ejemplo con contenido acrecentado de  $T_4$  están ocupados mas lugares de fijación de las proteínas de portadoras con las hormonas de glándula tiroides  $T_4$  y  $T_3$ , y en el caso de la hipotireosis están ocupados menos de estos lugares de fijación.

En un procedimiento conocido para la determinación de IFT se mezcla una determinada cantidad de  $T_3$  radioactiva con la muestra de suero y con un intercambiador de aniones. Los lugares de fijación libres de la proteína portadora y del intercambiador de aniones compi

ten por la  $T_3$  radioactiva. Cuanto más lugares de fijación no ocupados  
están presentes en las proteínas portadoras, tanta más cantidad de  $T_3$   
radioactiva es fijada allí, y el resto pasa al intercambiador de iones.  
La evaluación se efectúa midiendo la radioactividad en el intercambia-  
5 dor de iones o en la solución. La proporción de la radioactividad en  
la solución, que corresponde a aquella cantidad de  $T_3$  radioactiva que  
está fijada a las proteínas portadoras del suero a investigar, a la -  
radioactividad en la solución de una muestra patrón, multiplicada por  
un factor específico para la muestra patrón, proporciona el denomina-  
10 do índice de fijación de tiroxina IFT.

Una desventaja de este procedimiento conocido estriba en la  
necesidad de utilizar sustancias radioactivas. De este modo, por un  
lado se necesitan caros y complicados dispositivos de medición y por  
otro lado la manipulación de los reactivos radioactivos es dificulta-  
15 da por las imposiciones legales a causa de la nocividad potencial pa-  
ra la salud que tienen estas sustancias.

Por consiguiente, el invento se basa en la misión de crear  
un procedimiento para la determinación del IFT, que no tenga estas -  
desventajas y permita, con aparatos de medición sencillos, existentes  
20 en cualquier laboratorio, realizar una determinación digna de confian-  
za del índice IFT para la diagnosis de la glándula tiroideas.

Esta misión se resuelve por medio de un procedimiento para  
la determinación del índice de fijación de tiroxina en el suero, que  
está caracterizado porque la muestra de suero a investigar es mezcla-  
25 da con una cantidad determinada de tiroxina y con una cantidad deter-

minada de una enzima determinable, fijada covalentemente a la tiroxina, porque se pone en contacto la solución obtenida con anticuerpos - antitiroxina presentes en fase sólida, porque se separa la fase líquida respecto de la fase sólida, y porque se mide la actividad de la enzima determinable empleada en una de las fases.

El invento parte de la consideración de que un substitutivo del marcado radioactivo en el conocido ensayo de absorción de  $T_3$  podría resolver la misión establecida mediante un marcado con enzima, - con utilización de una enzima fácilmente determinable como marcador.

Los ensayos realizados mostraron, sin embargo, que no es posible, en el conocido ensayo de absorción de  $T_3$ , reemplazar  $T_3$  marcada radioactivamente ( $T_3$ -I<sub>125</sub>) por  $T_3$  ó  $T_4$  marcada con enzima (que sería de preferir). Se comprobó, en efecto, que  $T_3$  ó  $T_4$  marcada con enzima no es fijada por los lugares capaces de fijación de las seroproteínas. Hay - que suponer que esto ha de ser atribuido al voluminoso radical de enzima, que impide estéricamente la fijación.

Sorprendentemente se comprobó sin embargo que una  $T_4$  marcada con enzima es capaz de competir con  $T_4$  no marcada con enzima por anticuerpos anti- $T_4$  que están presentes en la fase sólida. Por lo tanto, en el procedimiento conforme al invento, por un lado los lugares de las seroproteínas capaces de fijación y los lugares de los anticuerpos anti- $T_4$  insolubles compiten por la  $T_4$ , fijándose tanta más - cantidad de  $T_4$  a los anticuerpos anti- $T_4$  cuanto menos lugares de fijación libres están presentes en el suero. Simultaneamente,  $T_4$  marcada con enzima compite con  $T_4$  no marcada por los anticuerpos anti- $T_4$ . Por

lo tanto se fija a la fase sólida tanta más cantidad de  $T_4$  marcada -  
con enzima cuanto mayor es la capacidad de fijación de tiroxina del  
suero y por consiguiente cuanto mayor es el índice de fijación de ti-  
roxina IFT. La actividad de enzima medida en la fase sólida constitu-  
5 ye por consiguiente una medida directa de la magnitud de la IFT. No -  
obstante, la actividad puede ser determinada también en la fase líquida.

Como enzima marcadora se puede utilizar dentro del marco -  
del procedimiento conforme al invento cualquier enzima que se pueda -  
10 determinar sin más, la cual pueda ser fijada a tiroxina sin pérdida -  
de su actividad enzimática. Dentro del marco del invento se utilizan  
preferentemente las enzimas marcadoras, cuya actividad puede ser de-  
terminada con facilidad mediante un ensayo óptico, especialmente me-  
diante una reacción colorimétrica en luz visible o por modificación -  
15 de la concentración de NADH. Ejemplos típicos de enzimas marcadoras -  
apropiadas son peroxidasa, glucosa oxidasa,  $\alpha$ - y  $\beta$ -galactosidasa, -  
glucoamilasa, invertasa y fosfatasa alcalina.

Para todas las enzimas antes mencionadas se conocen métodos  
sencillos y rápidos de determinación, para lo cual se remite por ejem-  
20 plo a H. U. Bergmeyer "Methoden der enzymatischen Analyse", Verlag -  
Chemie, 3ª edición, 1974. El anticuerpo anti- $T_4$  presente en fase sólida  
puede presentarse exento de portador, por ejemplo hecho insoluble  
por reticulación con reactivos polifuncionales, tales como dialdehi-  
dos, dióxidos y similares. Sin embargo, el anticuerpo está fijado pre-  
feriblemente a un material portador sólido. El portador sólido para -  
25

los anticuerpos anti-T<sub>4</sub> puede consistir en cualquier material inerte frente a las substancias que se utilizan en el ensayo, al cual puede ser fijado al anticuerpo mencionado. Se encontró que en el caso de numerosos materiales puede ser fijado el anticuerpo anti-T<sub>4</sub>, mediante 5 fuerzas de adsorción, de modo suficientemente fuerte a la superficie del material portador. A elección, sin embargo, también es posible fijar el anticuerpo según los métodos usuales de la fijación de proteínas biológicamente activas a materiales portadores sólidos, por ejemplo mediante enlaces covalentes. Ejemplos típicos de ello son la 10 activación de la superficie portadora según el método de bromo-cianógeno, mediante copolimerización de proteínas, reticulación superficial del anticuerpo sobre el portador mediante agentes de reticulación polifuncionales, tales como glutarodialdehído y similares. Estos métodos son conocidos para el experto en la materia.

15 Preferiblemente, dentro del marco del invento, se utilizan recipientes tales como tubitos de ensayo, cuya pared interior está recubierta con el anticuerpo. Ejemplos típicos de materiales apropiados para el recipiente son poliestireno, copolímeros de estireno y acrilonitrilo así como otros materiales sintéticos y vidrio. En el caso de 20 los materiales sintéticos a base de estireno es suficiente, para obtener un recubrimiento suficiente, conservar solamente una solución de anticuerpos durante algún tiempo dentro del recipiente.

Las exposiciones anteriores son válidas de modo análogo para 25 ra materiales portadores, que no se presentan en forma de recipientes, sino que consisten por ejemplo en partículas, las cuales son - -

apropiadas para rellenos de columnas.

Los anticuerpos anti-T<sub>4</sub> son preparados según los métodos usuales de la obtención de anticuerpos contra hormonas. Se prefiere la utilización de un conjugado de T<sub>4</sub> con una proteína portadora apropiada en calidad de inmunógeno. Se manifestó como especialmente apropiada, de entre el gran número de las proteínas portadoras habituales para el experto en la materia, la albúmina de suero de vacuno (ASV). Las proteínas portadoras son acopladas o copuladas químicamente con la T<sub>4</sub>, por ejemplo con glutarodialdehído en un medio débilmente alcalino, y subsiguientemente por reducción con borohidruro de sodio. Otro apropiado método de copulación es la reacción con morfolino-diciclohexil-carbodiimida. Animales de ensayo apropiados para la aplicación del inmunógeno de T<sub>4</sub> obtenido de este modo son, por ejemplo, conejos o corderos. También son apropiadas otras especies de animales.

La preparación de la T<sub>4</sub> marcada con peroxidasa (POD), que se prefiere dentro del marco del invento, se efectúa convenientemente por reacción de *ter*-butiloxi-carbonil-tiroxina-N-hidroxisuccinimida con POD y por purificación por cromatografía del producto obtenido. De igual modo se pueden fijar también la mayor parte de las otras enzimas que entran en consideración, con utilización incluso de otros procedimientos conocidos de la química de las proteínas.

Tal como se menciona, dentro del marco del invento se añade una determinada cantidad de T<sub>4</sub>. Se encontró que esta cantidad está convenientemente entre 100 y 500 ng de T<sub>4</sub>/ml de suero. No obstante, se pueden utilizar también cantidades mayores o menores. El margen

cuantitativo antes mencionado abarca sin embargo todas las composiciones de suero que se presentan en la práctica y es suficiente de igual modo para sueros hipertiroidicos como para sueros hipotiroidicos. La cantidad de la  $T_4$  marcada con enzima añadida depende del tipo de la enzima en cada caso utilizada, especialmente de la actividad específica de esta enzima, que todavía puede ser determinada con facilidad. En el caso del preferido marcado con POD se emplea convenientemente una cantidad tal que en la mezcla de ensayo propiamente dicha se encuentran de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 200 mU de POD/ml.

La mezcla de reacción de suero, tampón,  $T_4$ , y  $T_4$  marcada con enzima es puesta en contacto durante tiempo suficientemente largo con el anticuerpo anti- $T_4$  insoluble, especialmente fijado a un portador, con el fin de obtener un grado de fijación constante de la  $T_4$  marcada en el anticuerpo. La duración depende en cierta extensión de las condiciones con relación al valor de pH, la temperatura y las concentraciones. En general, es suficiente un tiempo de acción de aproximadamente 1/2 hora hasta aproximadamente 2 horas. Una vez terminada la incubación, la solución es separada del portador, por ejemplo por vertido desde el recipiente, el portador es lavado con agua y a continuación se lleva a cabo la determinación de la actividad de enzima fijada al portador. En el caso de la forma de realización preferida, con utilización de un portador en forma de recipiente y de POD como enzima marcadora se añade por ejemplo  $H_2O_2$  y ABTS<sup>®</sup> (2,2'-azino-di[3-etilbenzotiazolinsulfonato (6)]) en solución tampón y se determina la diferencia de extinciones con una longitud de onda de medición de - -

405 nm.

Otro objeto del invento es un equipo de ensayo para la realización del procedimiento conforme al invento. Este consiste en lo esencial en tiroxina, tiroxina marcada con enzima, anticuerpos anti-tiroxina como substancia sólida insoluble, substancia tampón y un reactivo para la determinación de la actividad enzimática. Tampones apropiados son aquellos con los cuales se puede ajustar un margen de valores de pH dentro del intervalo de 7,5 hasta aproximadamente 9,3. Se prefiere un valor de pH entre 8,0 y 9,0. Ejemplos típicos de tampones utilizables en el margen indicado son tampones de fosfato, tampón-Tris [ = tris (hidroximetil) aminometano ], tampón de borax y tampón de barbital.

Se prefiere un tampón barbital 0,05 a 0,5 M.

El equipo de ensayo conforme al invento puede contener adicionalmente también agentes estabilizadores usuales, tales como albúmina de susro de vacuno, hidratos de carbono y glicerina.

Preferiblemente, el equipo de ensayo conforme al invento contiene, en calidad de  $T_4$  marcada con enzima, tiroxina-peroxidasa. El reactivo para la determinación de la actividad enzimática puede consistir en este caso preferido en  $H_2O_2$  o en un compuesto que proporcione  $H_2O_2$  tal como perborato de sodio o perhidrita, así como 2,2'-azino-di[3-etilbenzotiazolinsulfonato(6)], usualmente designado como ABTS<sup>®</sup>, así como un tampón apropiado para ello. Un ejemplo típico de un tampón apropiado es tampón de fosfato-citrato, de pH 4,5 hasta 6,0. Otro reactivo apropiado para esta forma de realización consistente en tam-

pón de fosfato, de pH 7,0 , guayacol y peróxido de hidrógeno.

En una forma especial de realización del equipo de ensayo -  
preferido del invento, éste contiene:

	Tiroxina	100-400 ng/ml
5	Tiroxina-POD	5-100 mU/ml
	Tampón de barbitol	0,1-0,2 M, pH 8,6
	Albúmina de suero de vacuno	0,2 %
	Anticuerpos antitiroxina (calculado sin portador)	1-0,05 µg/ml
10	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,5-5 mM/l
	ABTS	5-50 mM/l
	Tampón de fosfato-citrato, pH 5,0	0,1 - 0,2 M

Para la preparación de la tiroxina marcada con enzima se -  
parte preferiblemente de ter-butiloxycarbonil-tiroxin-N-hidroxisucci-  
15 nimida y la reacción se efectúa en una solución l*il* de tampón/dimetil  
formamida. Como tampón se utiliza el tampón mejor apropiado para la  
enzima que en cada caso se utilice. Para el fin de purificar los con-  
jugados, se ha acreditado la fenilbutilamino-Sefarosa.

Por medio del invento se proporciona un procedimiento senc*il*  
20 llo, y realizable con aparatos de laboratorio usuales, para la deter-  
minación del índice de fijación de tiroxina del suero, cuya exactitud  
corresponde al método conocido que utiliza un marcado radioactivo, pe-  
ro no posee las desventajas de éste.

Los siguientes ejemplos explican adicionalmente el invento.

25 Ejemplo 1

A. Preparación de anticuerpos antitiroxina

Se copula tiroxina en solución acuosa de pH 10, por adición de 1,9 % en peso de glutarodialdehído, con albúmina de suero de vacuno. Luego se reduce con borohidruro de sodio en exceso el enlace con base de Schiff y el inmunógeno de T<sub>4</sub> se purifica por cromatografía. El producto obtenido es dializado y luego es aplicado a los animales ensayados.

#### B. Preparación de POD-T<sub>4</sub>

Se hace reaccionar POD con un exceso molar 10 veces mayor de ter-butiloxicarbonil-tiroxin-N-hidroxisuccinimida en dimetilformamida/tampón de fosfato, pH 8,5, 1:1. Luego se separa por diálisis la dimetilformamida y se añade la solución acuosa sobre fenilbutilamino-sefarosa. La columna es lavada con tampón Tris-NaCl y luego es eluida con mezcla 1:1 de etilenglicol/agua que contiene NaCl 1 M. El eluato es agitado durante 2 horas con hidroxilamina 0,5 M, y a continuación es dializado frente a tampón de fosfato. La solución obtenida es mezclada con albúmina de suero de vacuno y liofilizada.

#### C. Preparación de anticuerpos anti-T<sub>4</sub> fijados a un portador.

A partir de los animales de ensayo inmunizados se obtiene de modo conocido antisuero anti-T<sub>4</sub> y se precipita mediante sulfato de amonio. El precipitado es recogido con tampón de fosfato 0,04 M 1:6.000. 1,5 ml de la solución obtenida de este modo son dejados reposar durante la noche en tubitos de ensayo a base de copolímero de estireno-acrilonitrilo (Luran), luego son retirados por aspiración, y lavados con solución fisiológica de sal común que contiene 1 % de ASV, y después de ello son secados.

D. Realización de la determinación

En los tubitos de ensayo recubiertos con anticuerpos anti- $T_4$ , obtenidos según C, se introducen con pipeta 10  $\mu$ l de suero y a continuación 1 ml de un reactivo, que contiene 280 ng de  $T_4$ /ml y 10 -  
5 mU/ml de  $T_4$ -POD en tampón de barbital 0,12 M, pH 8,6 y 0,2 % de albúmina de suero de vacuno. Luego se deja reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de ello los tubitos de ensayo son vaciados mediante aspiración y se introduce el reactivo-POD. Este último -  
constaba de 1,47 mM/l de  $H_2O_2$  y 14 mM/l de ABTS en tampón de fosfato-  
10 citrato 0,2 M, pH 5,0. La variación de color que apareció fue medida a 405 nm.

La evaluación se lleva a cabo con 2 patrones con diversa capacidad de fijación de  $T_4$ , que son tratados de igual modo que las - -  
muestras, se establece una recta de calibrado, aplicando los valores  
15 recíprocos de las extinciones medidas para estos patrones frente a -  
las cantidades de  $T_4$  fijadas por los patrones o directamente frente a  
los valores de IFT de estos patrones a determinar de antemano.

E. Aplicación del método a la investigación de sueros humanos.

83 muestras de sueros humanos fueron investigadas comparativamente con el procedimiento conforme al invento y con un -  
20 procedimiento que emplea  $T_3$ -I<sub>125</sub>, que ya se encuentra en el comercio. Se clasifican los sueros investigados en base a los -  
valores IFT en cada caso obtenidos con ayuda del margen normal válido para el pertinente método, en aquellos que tienen una capacidad de fijación de  $T_4$  reducida, normal y elevada, se manifiesta que entre los  
25

dos métodos resulta una coincidencia satisfactoria (véase Tabla 1).

Tabla 1

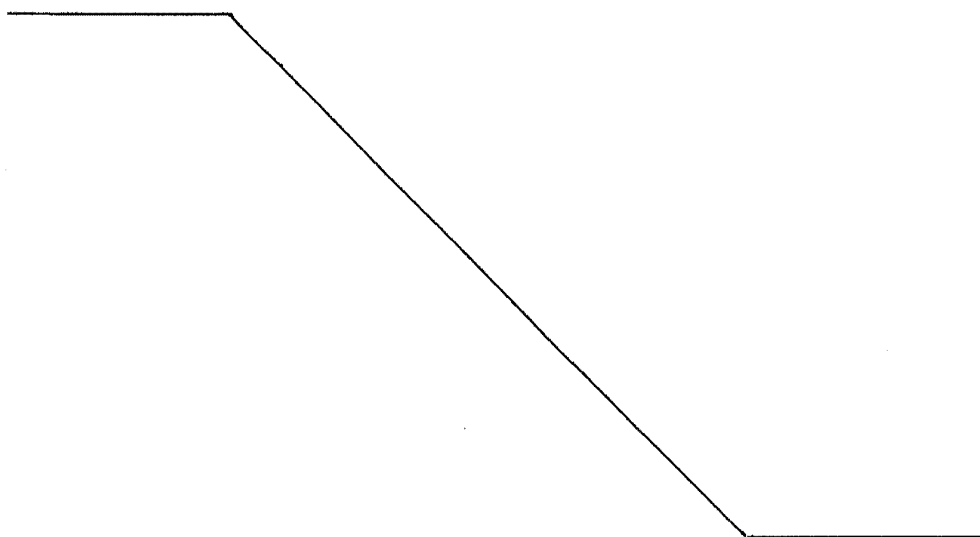
A \ B	1	2	3
1	28	1	
2	1	28	
3		3	22

1) reducida

Capacidad de fijación de  $T_4$  2) Normal

3) elevada

10 Tabla 1: Comparación del procedimiento conforme al invento para la de terminación del IFT (A) con un radioensayo de IFT (B) usual utilizando muestras de sueros humanos (n = 83).



REIVINDICACIONES

1a.- Procedimiento para determinar el índice de fijación de tiroxina en el suero, caracterizado porque la muestra de suero a investigar es mezclada con una cantidad determinada de tiroxina y con una cantidad determinada de una enzima determinable fijada covalentemente a tiroxina, la solución obtenida se pone en contacto con anticuerpos antitiroxina presentes en fase sólida, se separa la fase líquida respecto de la fase sólida, y se mide la actividad de la enzima determinable empleada en una de las fases.

2a.- Procedimiento según la reivindicación 1a, caracterizado porque como enzima determinable se utiliza peroxidasa.

3a.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, - caracterizado porque el anticuerpo antitiroxina es utilizado en forma fijada a un portador.

4a.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, - caracterizado porque como portador sólido se utiliza un recipiente cuya pared interior está recubierta con el anticuerpo.

5a.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, - caracterizado porque se emplean 100 a 500 ng de tiroxina/ml de suero.

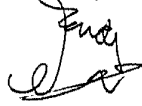
6a.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, - caracterizado porque se emplean 1 a 10 mU/ml de peroxidasa fijada a tiroxina.

7a.- "PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR EL INDICE DE FIJACION DE TIROXINA EN EL SUERO".

Tal como se describe y reivindica en la presente Memoria -

Descriptiva, que consta de catorce hojas escritas a máquina por una -  
sola cara.

Madrid, 12 JUN. 1979

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Judy' or similar, written in a cursive style.