

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 137**

51 Int. Cl.:
G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07798696 .6**
- 96 Fecha de presentación: **18.06.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2037944**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.03.2009**

54 Título: **Patrón de tacrolímús y métodos de uso del mismo.**

30 Prioridad:
20.06.2006 US 455956

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.10.2012

73 Titular/es:
SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
1717 DEERFIELD ROAD
DEERFIELD, IL 60015, US

72 Inventor/es:
WEI, TIE, Q. y
HUDSON, DAVID, R.

74 Agente/Representante:
ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 389 137 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Patrón de tacrolimús y métodos de uso del mismo.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a patrones de tacrolimús. Más particularmente, la presente invención se refiere a patrones de tacrolimús que utilizan una proteína no específica para tacrolimús, y a métodos de preparación y uso de tales patrones.

10

Antecedentes de la invención

El tacrolimús (también conocido como FK506) es un macrólido neutro aislado del hongo *Streptomyces tsukubaensis*. El tacrolimús se ha usado clínicamente como inmunosupresor en el trasplante de órganos y para tratar enfermedades autoinmunitarias. Véase Wallemacq *et al.*, "FK 506 (Tacrolimús), a Novel Immunosuppressant in Organ Transplantation: Clinical, Biomedical, and Analytical Aspects," *Clinical Chemistry*, 39/11, 2219-2228 (1993). Como con muchos fármacos terapéuticos, es deseable poder monitorizar cuantitativamente las concentraciones en sangre de tacrolimús para garantizar la eficacia apropiada del fármaco y para proteger frente a una posible toxicidad durante el tratamiento.

15

20

Bakhtiar *et al.* 1995, *Rap Com Mass spectom*, 9, 240-244 da a conocer una composición que comprende una disolución que tiene una cantidad conocida de tacrolimús y albúmina sérica bovina. Sin embargo, la referencia no da a conocer ni sugiere que la razón de proteína con respecto a tacrolimús esté en el intervalo de 25.000:1 a 1.000:1 basado en el peso.

25

El documento US 6.338.946 da a conocer una composición que comprende BSA en disolución, Triton en un tampón tris-HCl y una cantidad conocida de tacrolimús (FK506). Sin embargo, esta referencia no da a conocer ni sugiere que la proteína esté libre en al menos el 95% de ácidos grasos ni que la razón de proteína con respecto a tacrolimús esté en el intervalo de 25.000:1 a 1.000:1 basado en el peso. No se menciona en esta referencia el uso de albúmina sérica bovina que está libre en al menos el 95% de ácidos grasos.

30

35

El documento US 5.736.401 da a conocer una composición que comprende una cantidad conocida de tacrolimús, FKBP, albúmina sérica bovina y Tween 20 en un tampón P/B/T. No da a conocer ni sugiere que la proteína esté libre en al menos el 95% de ácidos grasos. No se menciona en esta referencia el uso de albúmina sérica bovina, ni siquiera FKBP, que está libre de ácidos grasos.

40

El documento WO 93/25533 da a conocer una composición que comprende tacrolimús (FK506), BSA y Tween 20 en un tampón PBS. No da a conocer ni sugiere que la proteína esté libre en al menos el 95% de ácidos grasos ni que la razón de proteína con respecto a tacrolimús esté en el intervalo de 25.000:1 a 1.000:1 basado en el peso. No se menciona en esta referencia el uso de BSA, que está libre en al menos el 95% de ácidos grasos.

45

El documento US 5.338.684 da a conocer una composición acuosa que comprende una cantidad conocida de tacrolimús, un hemolizado de sangre y un disolvente orgánico tal como metanol. Sin embargo, no da a conocer ni sugiere que la proteína esté libre en al menos el 95% de ácidos grasos ni que la razón de proteína con respecto a tacrolimús esté en el intervalo de 25.000:1 a 1000:1 basado en el peso.

50

Se han desarrollado una variedad de métodos de medición para monitorizar las concentraciones en sangre de tacrolimús. Muchos de estos métodos requieren el uso de una curva de calibración para un analizador químico usando múltiples disoluciones de calibración o calibradores que se han preparado cuidadosamente con concentraciones de tacrolimús conocidas, predeterminadas. Estas disoluciones de calibración o patrón pueden someterse a ensayo una o más veces y las señales de reacción resultantes medias se representan gráficamente frente a sus concentraciones de tacrolimús conocidas respectivas. Puede producirse una curva de calibración continua usando cualquiera de las varias técnicas matemáticas elegidas para producir una reproducción precisa de la relación entre una señal de reacción y la concentración de tacrolimús. Para la mayor precisión, las curvas de calibración se establecen a intervalos regulares, para compensar las particularidades de los reactivos, y en analizadores individuales, para compensar el rendimiento del equipo.

55

60

Han surgido varios retos en la preparación de composiciones de calibración y patrón de tacrolimús. Por ejemplo, algunas disoluciones patrón para tacrolimús son inestables y están sometidas a una degradación rápida, lo que conduce a resultados de prueba imprecisos. Además, el tacrolimús es insoluble en agua, y algunas disoluciones patrón han incluido disolventes orgánicos que pueden dejar residuos o interferir de otro modo con el funcionamiento o la precisión del equipo de prueba tal como analizadores automáticos.

Por consiguiente, continúa habiendo una necesidad de composiciones patrón de tacrolimús mejoradas.

Sumario de la invención

La composición de la presente invención proporciona un patrón estable, mejorado para tacrolimús.

5 En un aspecto de la invención, una composición adecuada para su uso como patrón en un ensayo incluye una disolución que tiene una cantidad conocida de tacrolimús, y una proteína no específica para tacrolimús y que puede formar un complejo soluble con el tacrolimús, estando la proteína libre en al menos el 95% de ácidos grasos y estando la razón de proteína: tacrolimús en el intervalo de 25000:1 a 1000:1 basado en el peso.

10 En otro aspecto de la invención, una composición adecuada para su uso como patrón en un ensayo incluye una disolución que tiene una cantidad conocida de tacrolimús, y una proteína no específica para tacrolimús y que puede formar un complejo soluble con el tacrolimús, estando la disolución libre en al menos el 95% de disolventes orgánicos y proteínas específicas para tacrolimús y estando la razón de proteína: tacrolimús en el intervalo de 25000:1 a 1000:1 basado en el peso.

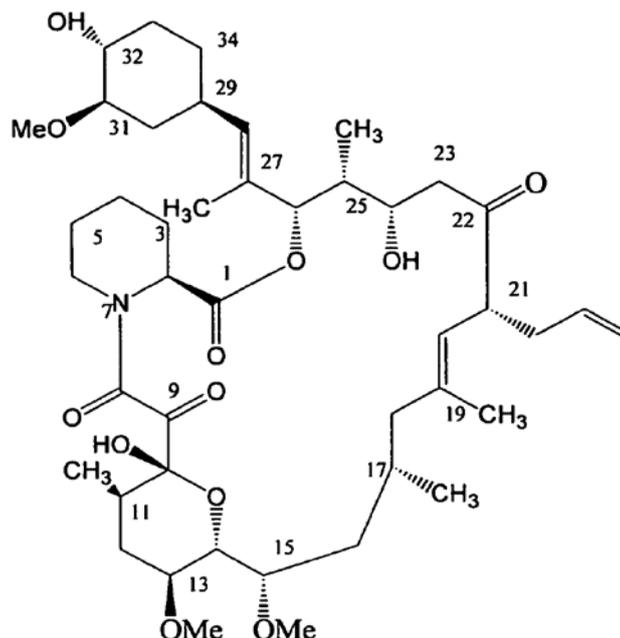
15 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para su uso en un ensayo para tacrolimús. El método incluye proporcionar una disolución patrón incluyendo una cantidad conocida de tacrolimús y una proteína que puede formar un complejo soluble en agua con el tacrolimús, estando la razón de proteína: tacrolimús en el intervalo de 25000:1 a 1000:1 basado en el peso, y realizar un ensayo con la disolución patrón para determinar una medida que corresponde a la cantidad conocida de tacrolimús.

20 Las realizaciones preferidas actualmente, junto con otros aspectos de la invención, se entenderán lo mejor mediante referencia a la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos.

Descripción detallada de realizaciones a modo de ejemplo de la invención

25 La presente invención se refiere generalmente a composiciones útiles para ensayos para tacrolimús, y a métodos de preparación y uso de las composiciones. Las composiciones de la presente invención incluyen una cantidad conocida de tacrolimús, y una cantidad suficiente de una proteína no específica para tacrolimús que puede formar un complejo con el tacrolimús.

30 El tacrolimús tiene la fórmula:



35 Las proteínas de unión no específicas útiles en la presente invención son cualquiera de aquéllas que pueden formar un complejo con tacrolimús, son lo suficientemente estables como para permitir la disolución del tacrolimús en disolución, y no se unen específicamente al tacrolimús.

40 En una realización de la invención, la proteína no específica es una proteína hidrófila con cavidades hidrófobas en la superficie molecular. El tacrolimús se compleja a las cavidades hidrófobas de la proteína no específica a través de los enlaces no covalentes, tal como a través de enlaces de hidrógeno. Las proteínas adecuadas incluyen albúmina y α_1 -glicoproteína ácida. En una realización de la invención, la albúmina es albúmina sérica bovina.

En una realización preferida de la invención, la proteína de unión no específica se trata para eliminar ácidos grasos de sus cavidades hidrófobas. La ausencia de los ácidos grasos permite un complejo más estable entre el tacrolímús y la cavidad hidrófoba. En realizaciones especialmente preferidas de la invención, la proteína es esencialmente α_1 -glicoproteína ácida o albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos. Esencialmente la albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos está disponible comercialmente, por ejemplo, de Sigma-Aldrich-Fluka de Saint Louis, Missouri.

Tal como se usa en el presente documento, "esencialmente libre de ácidos grasos" se refiere a proteínas que están libres de ácidos grasos así como a proteínas que están esencialmente libres de ácidos grasos pero que pueden tener pequeñas cantidades residuales de ácidos grasos que no interfieren sustancialmente con la unión de tacrolímús a la proteína. Las proteínas están esencialmente libres de ácidos grasos si están libres en al menos el 95% de ácidos grasos, más preferiblemente, libres en al menos el 97% de ácidos grasos, e incluso más preferiblemente, libres en al menos el 99% de ácidos grasos. Los ácidos grasos pueden eliminarse de la proteína no específica según métodos conocidos en la técnica. Un método de este tipo incluye la precipitación de los ácidos grasos con alcoholes fríos.

La proteína de unión no específica está presente en una cantidad suficiente como para permitir que el tacrolímús se disuelva en disolución. Esta razón de proteína con respecto a tacrolímús oscila entre 25.000:1 y 1.000:1 basado en el peso. En algunas realizaciones, la razón en peso de proteína con respecto a tacrolímús será de al menos aproximadamente 2.000:1, o de al menos aproximadamente 5.000:1, o de al menos aproximadamente 10.000:1.

En una realización de la invención, la composición incluye una disolución acuosa. Normalmente, el tacrolímús estará presente en una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10,0 mg por 100 ml de agua. Normalmente la proteína estará presente en una cantidad de aproximadamente 1 g a aproximadamente 25 g por 100 ml de agua.

En otra realización de la invención, la composición está libre o sustancialmente libre de disolventes orgánicos. En una realización preferida, la composición está libre o sustancialmente libre de disolventes de alcohol, tales como metanol, etanol, propanol, etc. La eliminación de disolventes orgánicos de la composición proporciona el beneficio de que se deja menos residuo orgánico en cualquier equipo tal como un analizador que usa la composición, haciendo de ese modo que sea más fácil mantener la precisión del equipo con el tiempo.

En otra realización de la invención, las composiciones estarán esencialmente libres de proteínas que se unen específicamente a tacrolímús. La eliminación de proteínas de unión específica reduce el coste y da como resultado una disolución que tiene menos compuestos interferentes.

En otras realizaciones de la invención, la composición puede incluir otros componentes o aditivos. En una realización particular de la invención, se añade un emulsionante a la disolución. El emulsionante es particularmente útil en una disolución acuosa para ayudar en la disolución del tacrolímús. Los emulsionantes adecuados incluyen emulsionantes no iónicos tales como aceites de ricino polioxilados. Un emulsionante de este tipo se vende por BASF con la marca registrada "Cremophor® EL" y se usa preferiblemente en composición en el intervalo del 0,01% al 0,5% en peso. Otros emulsionantes adecuados incluyen, sin limitación, saponina, dodecilsulfato de sodio y dodecilsulfato de litio.

En otra realización de la invención, una composición útil para un patrón de tacrolímús incluye una cantidad conocida de tacrolímús y un emulsionante que puede solubilizar el tacrolímús en disolución tal como se describió anteriormente.

En otra realización de la invención, la composición puede almacenarse como disolución madre para su dilución posterior. En una realización, la disolución madre se diluye con una base de hemolizado. Por ejemplo, las disoluciones madre pueden diluirse en aproximadamente de 1:10 a 1:1000, más normalmente de 1:50 a aproximadamente de 1:500 antes de su uso. Normalmente, el hemolizado se prepara a partir de sangre completa conservada en EDTA y que se ha expuesto a ciclos repetidos de congelación y descongelación. En otras realizaciones, el hemolizado puede prepararse a partir de uno o más componentes sanguíneos.

Según otro aspecto de la presente invención, las composiciones descritas anteriormente pueden usarse en métodos de detección de la presencia o cantidad de tacrolímús en una muestra. Las técnicas de ensayo adecuadas incluyen técnicas de inmunoensayos conocidas generalmente en la técnica.

Las composiciones de la presente invención incluyen una cantidad conocida de tacrolímús. Por consiguiente, los ensayos para tacrolímús pueden realizarse con las composiciones con el fin de establecer una curva de calibración para la respuesta de una técnica particular. En una realización, pueden someterse a ensayo múltiples composiciones que tienen concentraciones variables de tacrolímús con el fin de proporcionar múltiples puntos para el establecimiento de una curva de calibración.

EJEMPLO 1

Preparación de una disolución patrón de tacrolimús

5 Se mezclaron 14 gramos de albúmina sérica bovina, libre de ácidos grasos, (de Sigma-Aldrich-Fluka) con 100 ml de agua purificada para formar una disolución. Como control, se preparó una disolución al 50/50% en peso de metanol y agua. A cada disolución, se le añadió 1,00 mg de tacrolimús y se permitió que se agitase a temperatura ambiente durante 24 horas. Se añadieron 250 µl de Cremophor® EL, (número CAS 61791-12-6) a cada disolución para actuar como emulsionante. Luego se diluyó cada disolución 1:25 en agua, y luego se diluyó adicionalmente 1:10, de nuevo en agua, para una razón de dilución final de 1:250. Se sometió a prueba cada muestra en el analizador químico integrado Dimension® RxL Max® usando un ensayo inmunométrico mediado por columna de afinidad. En primer lugar, se calibró el analizador usando una combinación madre de tacrolimús suministrada por Bioresources de Fort Lauderdale, Florida. La disolución de suero bovino y la disolución control produjeron resultados sustancialmente equivalentes (6150 ng/ml y 5985 ng/ml, respectivamente).

EJEMPLO 2

Efecto de la proteína y el emulsionante sobre la recuperación de tacrolimús

20 Se repitió el procedimiento de prueba del ejemplo 1 con las muestras identificadas en la tabla 1 con el fin de estudiar el efecto de la proteína y el emulsionante sobre la recuperación de tacrolimús. Se disolvieron cada una de las muestras en 100 ml de agua, y luego se diluyeron con 1:500 con agua. Los resultados demuestran que tanto la BSA libre de ácidos grasos como el emulsionante contribuyen a la recuperación de tacrolimús.

TABLA 1

Muestra	Descripción	Recuperación de tacrolimús
1	10 mg de tacrolimús	0%
2	10 mg de tacrolimús 14 g de FAF-BSA (BSA libre de ácidos grasos)	35%
3	10 mg de tacrolimús 250 µl de Cremophor®EL	30%
4	10 mg de tacrolimús 14 g de FAF-BSA 250 µl de Cremophor®EL	60%

EJEMPLO 3

Efecto de la eliminación de ácidos grasos de la proteína sobre la recuperación de tacrolimús

30 Se repitió el procedimiento de prueba del ejemplo 1 con las muestras identificadas en la tabla 2 con el fin de estudiar el efecto de la eliminación de ácidos grasos de la proteína sobre la recuperación de tacrolimús. Se disolvieron cada una de las muestras en 100 ml de agua, y luego se diluyeron con 1:500 con agua. Los resultados demuestran que haciendo que la BSA esté libre de ácidos grasos aumenta significativamente la recuperación de tacrolimús.

TABLA 2

Muestra	Descripción	Recuperación de tacrolimús
5	10 mg de tacrolimús 6 g de BSA (con ácidos grasos) 250 µl de Cremophor®EL	32%
6	10 mg de tacrolimús 6 g de FAF-BSA 250 µl de Cremophor®EL	51%

EJEMPLO 4

Comparación de concentraciones de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos en la recuperación de tacrolimús

40 Se repitió el procedimiento de prueba del ejemplo 1 con las muestras identificadas en la tabla 3 con el fin de estudiar el efecto de la concentración de la proteína sobre la recuperación de tacrolimús. Se disolvieron cada una de las muestras en 100 ml de agua, y luego se diluyeron con 1:500 con agua. Los resultados demuestran que la recuperación de tacrolimús es una función de la concentración de BSA.

TABLA 3

Muestra	Descripción	Recuperación de tacrolimús
7	10 mg de tacrolimús 6 g de FAF-BSA 250 µl de Cremophor®EL	32%
8	10 mg de tacrolimús 8 g de FAF-BSA 250 µl de Cremophor®EL	42%
9	10 mg de tacrolimús 11 g de FAF-BSA 250 µl de Cremophor®EL	45%
10	10 mg de tacrolimús 14 g de FAF-BSA 250 µl de Cremophor®EL	54%

5 Debe entenderse rápidamente por los expertos en la técnica que la presente invención es susceptible de una amplia utilidad y aplicación. Muchas realizaciones y adaptaciones de la presente invención distintas de las descritas en el presente documento, así como muchas variaciones, modificaciones y disposiciones equivalentes resultarán evidentes a partir de o se sugerirán razonablemente por la presente invención y la descripción anterior de la misma, sin apartarse de la sustancia o el alcance de la presente invención.

10 Por consiguiente, aunque la presente invención se ha descrito en el presente documento en detalle en relación a realizaciones específicas, ha de entenderse que esta descripción es sólo ilustrativa y a modo de ejemplo de la presente invención y se realiza simplemente para los fines de proporcionar una descripción completa y que permite la reproducción de la invención. La descripción anterior no pretende ser ni ha de interpretarse como limitativa de la presente invención ni que excluya de otro modo ninguna de tales otras realizaciones, adaptaciones, variaciones, modificaciones y disposiciones equivalentes, estando limitada la presente invención sólo por las reivindicaciones
15 adjuntas al presente documento y los equivalentes de la misma.

REIVINDICACIONES

1. Composición adecuada para su uso como patrón en un ensayo, que comprende:
 - 5 una disolución que tiene una cantidad conocida de tacrolimús y una proteína no específica para tacrolimús y que puede formar un complejo soluble con el tacrolimús, estando la proteína libre en al menos el 95% de ácidos grasos y estando la razón de proteína: tacrolimús en el intervalo de 25000:1 a 1000:1 basado en el peso.
- 10 2. Composición adecuada para su uso como patrón en un ensayo, que comprende:
 - 15 una disolución que tiene una cantidad conocida de tacrolimús y una proteína no específica para tacrolimús y que puede formar un complejo soluble con el tacrolimús, en la que la proteína está libre en al menos el 95% de ácidos grasos y la razón de proteína: tacrolimús está en el intervalo de 25000:1 a 1000:1 basado en el peso, estando la disolución libre de proteínas específicas para tacrolimús y libre de disolventes orgánicos.
- 20 3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que la disolución comprende una disolución acuosa y el complejo es soluble en agua.
4. Composición según la reivindicación 1, en la que la disolución está libre de disolventes orgánicos, preferiblemente disolventes de alcohol.
- 25 5. Composición según la reivindicación 2, en la que los disolventes orgánicos son disolventes de alcohol, preferiblemente metanol.
6. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que la disolución está libre de proteínas que pueden unirse específicamente a tacrolimús.
- 30 7. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que la proteína comprende albúmina, preferiblemente albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos.
8. Composición según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además al menos un elemento del grupo que
 - 35 - un hemolizado
 - un emulsionante, y
 - 40 - un marcador que puede formar un complejo con un anticuerpo y adecuado para producir una señal detectable.
9. Método para su uso en un ensayo para tacrolimús, que comprende:
 - 45 proporcionar una disolución patrón que incluye una cantidad conocida de tacrolimús y una proteína que puede formar un complejo soluble en agua con el tacrolimús, estando la proteína libre en al menos el 95% de ácidos grasos y estando la razón de proteína: tacrolimús en el intervalo de 25000:1 a 1000:1 basado en el peso; y
 - 50 realizar un ensayo con la disolución patrón para determinar una medida que corresponde a la cantidad conocida de tacrolimús.
10. Método para su uso en un ensayo para tacrolimús, que comprende:
 - 55 proporcionar una disolución patrón que incluye una cantidad conocida de tacrolimús y una proteína que puede formar un complejo soluble en agua con el tacrolimús, en la que la proteína está libre en al menos el 95% de ácidos grasos y la razón de proteína: tacrolimús está en el intervalo de 25.000:1 a 1000:1 basado en el peso, estando la disolución libre de proteínas específicas para tacrolimús y libre de disolventes orgánicos;
 - 60 realizar un ensayo con la disolución patrón para determinar una medida que corresponde a la cantidad conocida de tacrolimús.
11. Método según la reivindicación 9 ó 10, en el que la disolución patrón incluye además un emulsionante y/o
 - 65 un hemolizado.

12. Método según la reivindicación 9 ó 10, en el que la proteína comprende albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos.
- 5 13. Método según la reivindicación 10, en el que los disolventes orgánicos son disolventes de alcohol.
14. Composición o método según la reivindicación 1, 2, 9 ó 10, en la/el que la razón de proteína no específica con respecto a tacrolimús es de al menos 2000:1 basado en el peso.
- 10 15. Composición o método según la reivindicación 1, 2, 9 ó 10, en la/el que la razón de proteína no específica con respecto a tacrolimús es de al menos 5000:1 basado en el peso.
16. Composición o método según la reivindicación 1, 2, 9 ó 10, en la/el que la razón de proteína no específica con respecto a tacrolimús es de al menos 10000:1 basado en el peso.