

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 646**

51 Int. Cl.:

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2010 E 10007718 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 2415461**

54 Título: **Estabilización de la interleuquina-6 en soluciones de suero**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.03.2013

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

SCHNEIDER, CHRISTIAN, DR.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 398 646 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

Estabilización de la interleuquina-6 en soluciones de suero

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición que comprende interleuquina-6 (IL-6), una isoforma o un fragmento de la misma, un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-trimetilamonio, en el que el compuesto se encuentra saturado o insaturado y/o sustituido o no sustituido, o una sal del mismo, en el que la concentración del compuesto en la composición es de entre aproximadamente 0,15% y aproximadamente 0,4%, y un suero. Se proporciona además un compuesto para la estabilización de la interleuquina-6 para la determinación cuantitativa en inmunoensayos, en ensayos basados en receptores o en otros ensayos.

15 Antecedentes de la invención

La interleuquina-6 (IL-6) es una citoquina pleiotrópica con un amplio abanico de funciones. Fue descrita por primera vez como el factor de crecimiento de plasmacitoma interferón- β 2 y como factor estimulante de hepatocitos. Posteriormente se describió como factor estimulante de células B humanas (BSF2). En 1988 se propuso denominarlo IL-6, ya que estudios adicionales habían demostrado que la proteína también presenta actividades no sólo sobre las células B sino también sobre las células T, las células madre hematopoyéticas, los hepatocitos y las células cerebrales.

IL-6 es producida por un único gen codificante de un producto péptido de 212 aminoácidos con un peso molecular de entre 22 y 27 kDa. Además, se ha informado de la detección de complejos inmunorreactivos de entre 60 y 70 kDa en líquidos corporales humanos en pacientes con infecciones bacterianas agudas.

IL-6 pertenece a la familia de las citoquinas. Las citoquinas son moléculas pequeñas secretadas por una célula que señala a otras células mediante la unión a su receptor específico. Una interleuquina es generalmente una citoquina producida por leucocitos. Las citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6) son producidas predominantemente por células inmunológicas activadas que participan en la amplificación de las reacciones inflamatorias. Las citoquinas antiinflamatorias (antagonista de receptor de IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 e IL-12) actúan concertadamente con inhibidores de citoquina específicos y receptores de citoquina solubles para controlar la respuesta de las citoquinas proinflamatorias. IL-6 desempeña un papel crucial, además de ser el estimulador principal de las proteínas de fase aguda, por ejemplo CRP, además de controlar la respuesta de las citoquinas proinflamatorias. En condiciones homeostáticas, las concentraciones de IL-6 son bajas, mientras que bajo condiciones de estrés, se incrementan con rapidez el nivel de IL-6.

La producción de IL-6 es inducida rápidamente durante el curso de las reacciones inflamatorias agudas asociadas a lesiones, traumatismos, estrés, infección, muerte cerebral, neoplasia y en otras situaciones.

La determinación cuantitativa de IL-6 en suero y plasma puede llevarse a cabo mediante la utilización de inmunoensayos. La falta de estabilidad de la proteína IL-6 en la fase líquida es una desventaja importante de los ensayos actuales de detección de IL-6, y los métodos disponibles para la estabilización de proteínas no resultan adecuados para estabilizar la IL-6 (Chamani *et al.*).

Los métodos de estabilización de proteínas pueden dividirse en dos clases. En primer lugar, la estabilización se lleva a cabo para evitar o minimizar las modificaciones químicas de la proteína, por ejemplo la protección frente a las reacciones de oxidación. Las modificaciones químicas se basan en cambios en los enlaces atómicos covalentes. Más exactamente, las modificaciones químicas comprenden reacciones de desamidación, oxidaciones, hidrólisis y corte o formación de nuevos puentes disulfuro. La estabilización frente a modificaciones químicas de una proteína dada con frecuencia se consiguen mediante cambios del pH y de la composición del tampón. La formación de nuevos puentes disulfuro puede evitarse mediante la utilización de grupos de protección específicos para los tioles. Los grupos funcionales sensibles a la oxidación pueden protegerse mediante la utilización de reactivos secuestrantes. La protección se consigue mediante la oxidación preferente del secuestrante.

En segundo lugar, una proteína dada puede estabilizarse para evitar modificaciones físicas de la proteína, por ejemplo protección de la proteína frente a cambios conformacionales en la estructura de la proteína. Pueden utilizarse diferentes estrategias para evitar estos cambios conformacionales. Timasheff S.N. *et al.* describen la adición de determinados excipientes tales como azúcares, sales, polialcoholes, para estabilizar las proteínas en solución. En el caso de encontrarse presentes a alta concentraciones, estos excipientes protegen frente al deterioro de la actividad y mantienen las proteínas en un estado funcional.

Sin embargo, Kendrick B.S. *et al.* dan a conocer que, en presencia de sacarosa, los incrementos de área superficial de la proteína del antagonista de receptor de interleuquina-1 son termodinámicamente más desfavorables que en

agua. El equilibrio entre estados se desplaza hacia el que presenta la menor área superficial. Jensen W.A. *et al.* describen el efecto de concentraciones elevadas de varias sales sobre la estabilidad de PEPC en solución. Tsai *et al.* han encontrado que una amplia diversidad de polianiones estabilizan el factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF) mediante la elevación de la temperatura a la que se despliega la proteína. Campbell P.J. *et al.* describen métodos para conseguir estándares biológicos y preparaciones de referencia estables y fiables. El efecto de los carbohidratos añadidos sobre la composición química y actividad antigénica de, por ejemplo, la albúmina de suero bovina se proporciona en Tarelli E. *et al.* Además, Tarelli *et al.* demuestran que la albúmina humana recombinante puede utilizarse como estabilizante para materiales biológicos y para la preparación de reactivos de referencia internacional. Todd *et al.* afirman que la dimerización de proteínas sensibles, por ejemplo la VIH-1 proteasa, conduce a la estabilidad estructural de la proteína. Finalmente, Loughheed W.D. *et al.* afirman que la agregación de la insulina en polímeros de peso molecular elevado puede inhibirse mediante la reducción de la polaridad efectiva del solvente.

Sin embargo, el método conocido actualmente para estabilizar proteínas adolece de la desventaja de que no permite una suficiente estabilización de IL-6 y en particular de IL-6 en el suero. Las consecuencias de la estabilidad reducida de IL-6 son dificultades durante la producción de reactivos basados en IL-6, tales como restricciones en los tiempos máximos de procedimiento, tamaños de lote reducidos debido al corto tiempo de procedimiento disponible y la limitada vida media de IL-6. Para compensar la pérdida de IL-6 durante el procedimiento, debe añadirse IL-6 adicional durante el control interno del procedimiento, lo que resulta en un coste incrementado. Por la parte de los clientes, una menor estabilidad conduce a una estabilidad inconvenientemente reducida de los productos de IL-6, por ejemplo calibradores o materiales de control de calidad.

La patente EP nº 1882944 describe TTAB (bromuro de tetradecil-trimetilamonio) como agente desnaturizante para desenmascarar los epítomos responsables de la unión de anticuerpos a los oligómeros de péptido amiloide mediante eliminación de las proteínas unidas.

La patente US nº 2004/0157218 da a conocer un método de tratamiento de una muestra biológica para la extracción de los ácidos nucleicos. El DTAB (bromuro de dodecil-trimetil-amonio) y el CTAB (bromuro de cetil-trimetilamonio) se utilizan como detergentes para la desnaturización de las proteínas. La patente WO nº 2009/048962 da a conocer un medio de separación para la separación por electroforesis capilar según tamaño de las proteínas en presencia de un compuesto.

La patente EP nº 1.566.437 da a conocer un método para adsorber un ácido nucleico de una muestra biológica a una fase sólida. Se da a conocer CTAB como detergente en el tampón de lisis para la desnaturización de las proteínas. De esta manera, según los documentos anteriormente indicados, CTAB y DTAB se utilizan para desestabilizar las proteínas, y no para estabilizarlas.

La patente EP nº 1.242.576 da a conocer una composición acuosa de reactivo para incrementar la estabilidad de los antígenos. La composición de reactivo dada a conocer comprende un tampón, un agente de bloqueo rico en proteínas que comprende una mezcla de proteínas y/o polipéptidos y que presenta una concentración total de proteínas de entre 1 y 50%g, un agente solubilizador, una sal, un agente quelante, un detergente y un conservante y que presenta un pH final de entre 7,5 y 8,5. El conservante puede ser el compuesto TTAB (bromuro de trimetiltetradecilamonio) a una concentración final de 0,01% p/v, preferentemente de entre 1% y 0,1%. Además, el agente de bloqueo rico en proteínas puede ser suero de feto bovino a una concentración de 5% p/p. Notablemente, el conservante TTAB se utiliza para evitar el crecimiento de microorganismos y no para estabilizar los antígenos.

Existen datos experimentales que demuestran que la mayor parte del intervalo de concentraciones de TTAB y la baja concentración sérica dada a conocer en la patente EP nº 1.242.576 no estabiliza la IL-6. Por el contrario, bajo estas condiciones, TTAB incluso conduce a una desestabilización incrementada de IL-6.

Sigue existiendo una necesidad de un método y medios para incrementar la estabilización de IL-6. Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es encontrar condiciones que conduzcan a una estabilidad mejorada de IL-6 utilizado para material de control de calidad, calibradores, ensayos basados en receptores u otros ensayos.

Descripción resumida de la invención

La invención resuelve el problema de la insuficiente estabilidad de IL-6 en el suero mediante la utilización de una composición como agente estabilizador según las reivindicaciones de la invención.

Inesperadamente, utilizando varios intervalos de concentración se puso de manifiesto que sólo una estrecha ventana de concentraciones de estos compuestos mejora la estabilidad de IL-6 en el suero. La invención proporciona una recuperación incrementada de IL-6 en comparación con las soluciones sin dichos compuestos.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende IL-6, una isoforma o un fragmento de las mismas, un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-trimetilamonio (I), en el que el compuesto se

encuentra saturado o insaturado y/o sustituido o no sustituido, o una sal del mismo, en el que la concentración del compuesto en la composición es de entre aproximadamente 0,15 y aproximadamente 0,4%, y un suero.

5 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un liofilizado adecuado para la reconstitución en una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende IL-6, una isoforma o un fragmento de las mismas, un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-trimetilamonio (I), en el que el compuesto se encuentra saturado o insaturado y/o sustituido o no sustituido, o una sal del mismo, y un suero.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende una composición o un liofilizado e instrucciones de utilización.

15 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para producir una composición, que comprende las etapas de mezclar IL-6, una isoforma o un fragmento de las mismas, un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-trimetilamonio (I), en el que el compuesto se encuentra saturado o insaturado y/o sustituido o no sustituido, o es una sal del mismo, en el que la concentración del compuesto en la composición es de entre aproximadamente 0,15% y aproximadamente 0,4%, y un suero, opcionalmente liofilizando la mezcla de la etapa A.

20 Un aspecto adicional de la presente invención es un método de estabilización de IL-6, una isoforma o un fragmento de la misma, que comprende las etapas de mezclar IL-6, una isoforma o un fragmento de las mismas, un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-alquiltrimetilamonio (I), en el que el compuesto se encuentra saturado o insaturado y/o sustituido o no sustituido, o una sal del mismo, en el que la concentración del compuesto en la composición es de entre aproximadamente 0,15% y aproximadamente 0,4%, y un suero.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-alquil-trimetilamonio (I), en el que el compuesto se encuentra saturado o insaturado y/o sustituido o no sustituido, o una sal del mismo, para la estabilización de IL-6, una isoforma o un fragmento de la misma.

Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 muestra los resultados de la recuperación de IL-6 dependiendo de la concentración de TTAB. Se modificó TTAB de 0,05% a 0,5%. Inesperadamente se observó un efecto de estabilización para la concentración de TTAB de 0,05% a un valor inferior a 0,5%, en particular de entre 0,15% y 0,25%. En contraste, una concentración de 0,5% de TTAB conduce a una desestabilización de IL-6. Se almacenaron muestras durante hasta 5 días a una temperatura de entre 2°C y 8°C. Las muestras se almacenaron durante hasta cinco días a una temperatura de entre 35 2°C y 8°C.

40 La figura 2 muestra los resultados de la recuperación de IL-6 a tres concentraciones de TTAB (0 como control negativo, 0,2% y 0,25%). Las muestras se almacenaron durante hasta 23 días a una temperatura de entre 2°C y 8°C. Se confirmaron los resultados mostrados en la figura 1. En comparación con el control negativo se consiguió un incremento de 20% y 17% en la recuperación de IL-6 en L1 y L2 (L1 indica un nivel bajo de IL-6, en el intervalo de 43,7 a 60,8 pg/ml, mientras que L2 indica un nivel elevado de IL-6, en el intervalo de 258,5 a 357,3 pg/ml).

45 Las figuras 3a y 3b muestran resultados de la recuperación de IL-6 en presencia de TTAB, DTAB o HTAB en una composición basada en suero humano (3a) y una composición basada en suero equino (3b) en comparación con la recuperación en suero humano o equino sin la adición de TTAB, DTAB o HTAB. Las muestras se almacenaron durante hasta 30 días a una temperatura de entre 2°C y 8°C.

50 La figura 4 muestra los resultados de recuperación de IL-6 en presencia de TTAB, DTAB o HTAB en un tampón acuoso que contenía 3% de proteína sérica, en comparación con la recuperación en el mismo tampón sin adición de TTAB, DTAB y HTAB. Las muestras se almacenaron durante hasta 30 días a una temperatura de entre 2°C y 8°C. Los resultados indican claramente el efecto perjudicial de TTAB, DTAB y HTAB sobre la estabilidad de IL-6 en un tampón acuoso que contenía 3% de proteína sérica, en contraste con los resultados observados en suero (figuras 1 a 3).

55 La figura 5 muestra los resultados de recuperación de IL-6 en presencia de TTAB al 0,225% en sueros tamponados con HEPES, pH 7 (suero equino, suero bovino, suero de oveja y suero de ratón). Las muestras se almacenaron durante 7 días a una temperatura de entre 2°C y 8°C. Estos resultados indican la estabilización de IL-6 en suero equino, suero de oveja y suero de ratón, pero no en suero bovino. En suero bovino, TTAB condujo a una menor estabilidad de IL-6.

60 Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto preferente, la presente invención se refiere a una composición que comprende IL-6, una isoforma o un fragmento de la misma, un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-trimetil-amonio, en el

que el compuesto se encuentra saturado o insaturado y/o sustituido o no sustituido, o una sal del mismo, en el que la concentración del compuesto en la composición es de entre aproximadamente 0,15% y aproximadamente 0,4%, y un suero.

5 En el contexto de la presente invención, el término "interleuquina-6 (IL-6)" preferentemente pretende comprender IL-6, tal como es conocido de la técnica. Preferentemente, IL-6 comprende interferón- γ (2), el factor de crecimiento de plasmacitoma, el factor estimulante de hepatocitos y el factor 2 estimulante de células B humanas (BSF2). IL-6 preferentemente es una proteína producida a partir de un único gen codificante de un producto de 212 aminoácidos, más preferentemente el péptido IL-6 de 184 aminoácidos que ha sido corta en el extremo N-terminal del péptido de 212 aminoácidos (Song M. *et al.*). Preferentemente, IL-6 comprende IL-6 libre que no se encuentra unido a su receptor IL-6R. Además, IL-6 también puede comprender IL-6 en el estado del complejo IL-6/IL-6R (Taga T. *et al.*, Drucker C. *et al.*). Preferentemente, IL-6 es la proteína IL-6 que puede encontrarse unida o que se encuentra unida al anticuerpo monoclonal anti-IL6 M-BE8 (definido en la patente EP nº 0430193, es decir, un anticuerpo producido por la línea celular BE-8, o en Klein B. *et al.*) o M-23C7. Preferentemente, IL-6 es el anticuerpo IL-6 que puede encontrarse unido o que se encuentra unido al anticuerpo del ensayo de IL-6 de Roche para la utilización en sistemas de inmunoensayo Elecsys y Cobas (Roche). El término IL-6 preferentemente comprende además una variante de la IL-6 anteriormente indicada, preferentemente la IL-6 humana. La variante comprende una proteína o péptido sustancialmente similar a la molécula de IL-6 específica de referencia, preferentemente a la IL-6 humana. La expresión "sustancialmente similar" resulta bien entendida por el experto en la materia. En particular, una variante de IL-6 puede ser una isoforma o alelo que muestre por lo menos un intercambio de aminoácidos (y preferentemente hasta aproximadamente 25, más preferentemente hasta aproximadamente 15, más preferentemente hasta aproximadamente 10, más preferentemente hasta aproximadamente 5, más preferentemente hasta aproximadamente 3 intercambios de aminoácidos) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la molécula IL-6 específica de referencia. Preferentemente, dicha variante de IL-6 presenta una identidad de secuencia respecto a la molécula IL-6 específica de referencia de por lo menos aproximadamente 80%, preferentemente de por lo menos aproximadamente 85%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 90%, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 95%, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 98%, preferentemente con respecto a la IL-6 humana, todavía más preferentemente en toda la longitud de la IL-6 humana. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante algoritmos bien conocidos de la técnica.

Preferentemente, el grado de identidad debe determinarse mediante comparación de dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de una ventana de comparación, en la que el fragmento de secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (por ejemplo huecos o extremos protuberantes) en comparación con la secuencia de referencia (la cual no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece el residuo aminoácido idéntico en ambas secuencias, rindiendo el número de posiciones correspondientes, dividiendo el número de posiciones correspondientes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede llevarse a cabo utilizando el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, utilizando el algoritmo de alineación de homologías de Needleman y Wunsch, mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG)) o mediante inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para la comparación, preferentemente se utilizan GAP y BESTFIT para determinar su alineación óptima y, de esta manera, el grado de identidad. Preferentemente se utilizan los valores por defecto de 5,00 para el peso de un hueco y 0,30 para el peso de la longitud de hueco. Las variantes indicadas anteriormente puede ser variantes alélicas u otros homólogos, parálogos u ortólogos específicos de cualquier otra especie. El término variante comprende además los productos de degradación, por ejemplo los productos de degradación proteolítica, que todavía resultan reconocidos por los medios diagnósticos o por ligandos dirigidos contra la proteína o péptido de longitud completa respectiva. El término "variantes" también pretende cubrir las variantes de procesamiento. El término "variante" se refiere además a un péptido modificado post-traduccionalmente, tal como un péptido glucosilado. Una "variante" también es un péptido que ha sido modificado tras la recolección de la muestra, por ejemplo mediante unión covalente o no covalente de un marcaje, particularmente un marcaje radioactivo o fluorescente, al péptido. Preferentemente, la variante de IL-6 presenta esencialmente las mismas propiedades inmunológicas y/o biológicas del péptido específico de referencia, preferentemente las mismas propiedades inmunológicas y/o biológicas que la IL-6 humana, más preferentemente las mismas propiedades biológicas y/o inmunológicas que la IL-6 humana. Preferentemente, la variante de IL-6 muestra por lo menos aproximadamente 70%, preferentemente por lo menos aproximadamente 80%, preferentemente por lo menos aproximadamente 90%, preferentemente por lo menos aproximadamente 95%, preferentemente por lo menos aproximadamente 98% de la actividad de la IL-6 humana. La actividad de IL-6 preferentemente es la actividad de unión de receptores de IL-6 (Taga *et al.*, Drucker C. *et al.*). Preferentemente, la variante de IL-6 muestra una actividad de unión de receptores de IL-6 humano de por lo menos aproximadamente 80%, preferentemente de por lo menos aproximadamente 90%, preferentemente de por lo menos aproximadamente 95% de la correspondiente a la IL-6 humana.

Un compuesto de la presente invención es un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-trimetil-amonio (I), más preferentemente de fórmula halogenuro de alquil-C₁₂-C₁₆-trimetil-amonio (II). El halogenuro del compuesto preferentemente se selecciona de entre flúor, cloro, bromo o yodo, más preferentemente bromo.

Preferentemente, los compuestos utilizados en la presente memoria se seleccionan de entre halogenuros de alquil C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇ ó C₁₈-trimetil-amonio, más preferentemente de entre halogenuros de alquil C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅ ó C₁₆-trimetil-amonio. Los números CAS de los compuestos de caso son 1119-97-7, 1119-94-4, 1112-00-5, 57-09-0, 19727-46-9, 4574-04-3, 73163-54-9, 112-02-7, 1885-15-0, 112-03-8, 77544-88-8, 879685-36-3, 1120-02-1, 21424-24-8, 57-09-0, 21424-22-6, 1119-97-7, 21424-24-8, 57-09-0, 21424-22-6, 1119-97-7, 21424-21-5, 1119-94-4, 2650-58-0, 67867-02-1, 19014-04-1, 205582-59-8, 15934-10-8, 7192-88-3 y 82539-37-5.

Preferentemente, dichos compuestos son TTAB (bromuro de tetradecil-trimetilamonio) o DTAB (bromuro de dodecil-trimetilamonio) o HTAB (bromuro de hexadeciltrimetil-amonio). TTAB se refiere al compuesto bromuro de tetradeciltrimetil-amonio, número CAS 1119-97-7. DTAB se refiere al compuesto bromuro de dodeciltrimetil-amonio, número CAS 1119-94-4. HTAB se refiere al compuesto bromuro de hexadeciltrimetil-amonio, número CAS 57-09-0.

El compuesto de la presente invención se encuentra saturado o insaturado. Preferentemente, el compuesto es un alcano, alqueno o alquino.

Además, el compuesto de la presente invención se encuentra sustituido o no sustituido. La expresión "compuesto sustituido" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un compuesto en el que por lo menos un átomo de hidrógeno ha sido sustituido por un residuo R. R es H, hidroxilo, tiol, un halogenuro seleccionado de entre fluoruro, cloruro, bromuro o yoduro, un compuesto C₁-C₄ seleccionado de entre los siguientes: alquilo lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, y alqueno lineal, ramificado o cíclico, en el que los sustituyentes opcionales se seleccionan de entre uno o más de entre alquenalquilo, alquinalquilo, cicloalquilo, cicloalquenalquilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenalquilo opcionalmente sustituido, arilcicloalquilo y arilheterocicloalquilo, cada uno de los cuales se encuentra opcionalmente sustituido, en los que los sustituyentes opcionales se seleccionan de entre uno o más de entre alquenalquilo, alquinalquilo, cicloalquilo, cicloalquenalquilo, arilalquilo, alquilarilo, heteroarilalquilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenalquilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquenalquilo, arilcicloalquilo y arilheterocicloalquilo, fenilo, ciano, hidroxilo, alquilo, arilo, cicloalquilo, ciano, alcoxi, alquiltio, amino, -NH(alquilo), -NH(cicloalquilo)₂, carboxi y -C(O)-alquilo.

El término "estabilización" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la conservación de la integridad estructural o por lo menos la actividad biológica de IL-6. Preferentemente, "IL-6 estabilizada" se refiere a una IL-6 que prolonga la vida útil de IL-6. Preferentemente, "IL-6 estabilizada" es una IL-6 que, al someterla a ensayo bajo condiciones definidas en los ejemplos, muestra un % de recuperación tras el almacenamiento de una composición de IL-6 de la invención durante 7 días a una temperatura de entre 2°C y 8°C de por lo menos aproximadamente 60%, preferentemente de por lo menos aproximadamente 80%.

Resulta interesante que el solicitante ha encontrado que una concentración de entre aproximadamente 0,15% y aproximadamente 0,4% del compuesto de la presente invención en la composición (líquida) que contiene IL-6 conduce a una estabilización de IL-6. Más preferentemente, la concentración de dicho compuesto es de entre aproximadamente 0,15% y aproximadamente 0,25%. Además, una concentración superior a aproximadamente 0,5% de dicho compuesto y una concentración inferior a 0,05% de dicho compuesto conduce a la desestabilización de IL-6 (interleuquina-6) en el suero.

En particular, la presente invención muestra que la recuperación de IL-6 depende de la concentración de TTAB, que se modificó de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,5%. El efecto estabilizador más fuerte se observó para una concentración de TTAB de entre aproximadamente 0,2% y aproximadamente 0,25%. Una concentración de TTAB de aproximadamente 0,5% conduce a la desestabilización de IL-6. La recuperación de IL-6 también pudo confirmarse mediante la utilización de diferentes concentraciones de TTAB (0%, a modo de control negativo; 0,2% y 0,25%). En comparación con el control negativo, se consiguió un incremento de 20% y 17% en la recuperación de IL-6, a alta y baja concentración de IL-6, respectivamente, tras 27 días a una temperatura de entre 2°C y 8°C.

La provisión de IL-6 con una estabilidad elevada mejora la producción de reactivos inmunológicos, alivia las restricciones de los tiempos máximos de procesamiento e incrementa los tamaños de lote de IL-6.

Preferentemente, no resulta necesaria ninguna adición posterior de IL-6 durante el control interno del procedimiento para compensar por pérdida de IL-6 no estabilizado. De esta manera, se consigue un menor coste de los productos basados en IL-6 con la mayor estabilidad de IL-6. Desde el punto de vista del consumidor, la mayor estabilidad de IL-6 conduce a declaraciones de estabilidad más prolongada de los productos respectivos, por ejemplo calibradores o materiales para el control de la calidad.

5 El efecto estabilizador de IL-6 no se encuentra limitado sino que se extiende a los demás compuestos de la invención, Pudo demostrarse (figuras 3a y 3b), por ejemplo, que los compuestos TTAB, DTAB y HTAB a la concentración indicada en suero humano y equino estabilizan fuertemente IL-6 en comparación con la recuperación en suero humano o de caballo sin la adición de TTAB, DTAB o HTAB. Las muestras se habían almacenado durante hasta 30 días a una temperatura de entre 2°C y 8°C.

10 La recuperación de IL-6 resulta adicionalmente evidente en presencia de TTAB, DTAB y HTAB en un tampón acuoso que contiene 3% de proteínas, en comparación con la recuperación en el mismo tampón pero sin adición de TTAB, DTAB y HTAB. Las muestras se almacenaron durante hasta 30 días a una temperatura de entre 2°C y 8°C. Estos resultados indican claramente el efecto perjudicial de TTAB, DTAB y HTAB sobre la estabilidad de IL-6 en solución acuosa, en contraste con los resultados observados en el suero.

15 La recuperación de IL-6 en presencia de 0,225% de TTAB en suero tamponado Hepes (figura 5) indica que el efecto positivo de TTAB sobre la estabilidad de IL-6 no sólo se produce en suero equino, sino también en los sueros de oveja y de ratón. No se produjo efecto positivo de TTAB en el suero bovino, lo que podría trazarse a una diferente composición de las hormonas y/o de vitamina B12 en el suero equino a la del suero de otras especies.

20 El efecto estabilizador de IL-6 del compuesto de la invención no se encuentra limitado a un tipo de suero particular. Un aspecto adicional de la presente invención es que el suero utilizado en la presente memoria es un suero de mamífero, preferentemente seleccionado de entre los sueros humano, equino, bovino, ovino o de ratón. Preferentemente, el suero es un suero de mamífero que no es suero ovino, o no es suero ovino o bovino. El término "suero" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una solución basada en suero que contiene un tampón. La adición de sustancias tales como sales, tampones, azúcares, agentes quelantes, conservantes e inhibidores de proteasa al suero de la presente invención resulta preferente, aunque no necesario. La expresión "suero equino" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a suero obtenido de caballos. La expresión "suero bovino" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a suero obtenido de bovinos. La expresión "suero ovino" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a suero obtenido de ovejas. La expresión "suero de ratón" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a suero obtenido de ratones.

30 Preferentemente, la concentración de suero en la composición de la invención es de por lo menos aproximadamente 60%, más preferentemente de aproximadamente 70%, más preferentemente de aproximadamente 80%, mucho más preferentemente de aproximadamente 90% y todavía más preferentemente de aproximadamente 95%.

35 Puede añadirse un azúcar a la composición de la invención. El término "azúcar" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier monosacárido o disacárido. Preferentemente, "azúcar" se refiere a D-glucosa y/o D-manosa. El azúcar preferentemente es un poliol, más preferentemente mannit. El término "poliol" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier alcohol de azúcar. Preferentemente, "poliol" se refiere a D-manitol y/o manitol racémico, número CAS 69-65-8.

40 Puede añadirse un agente quelante a la composición de la invención. La expresión "agente quelante" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un ligando bidentado o multidentado. Preferentemente, "agente quelante" se refiere a EDTA (ácido etilendiamina-tetraacético) y/o EDDS (ácido etilendiamina-N,N'-disuccínico).

45 Puede añadirse un conservante a la composición de la invención. El término "conservante" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a compuestos utilizados para conservar reactivos diagnósticos tal como se describe en la patente EP nº 0467337. Preferentemente, el término "conservante" se refiere al compuesto 2-hidroxipiridín-N-óxido, disponible bajo el nombre comercial Oxy-Pyrrion (2-hidroxipiridín-N-óxido) de Pyrrion-Chemie.

50 Puede añadirse un inhibidor de proteasa a la composición de la invención. La expresión "inhibidor de proteasa" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un compuesto y/o mezcla de compuestos que impide la degradación proteolítica causada por quimiotripsina, termolisina, papaína, pronasa, extractos pancreáticos y tripsina. Preferentemente, "inhibidor de proteasa" se refiere a un producto disponible de Roche (cóctel completo de inhibidor de proteasa, nº de cat. 11697498001).

55 Preferentemente, se añade un tampón a la composición de la invención o al suero. El tampón preferentemente comprende por lo menos uno de los compuestos siguientes: fosfato (fosfato sódico o potásico), Hepes (ácido N-2-hidroxietilpiperazín-N-2-etanosulfónico), Mopso (ácido 3-N-morfolino-2-hidroxipropanosulfónico), Mops (ácido 3-morfolinopropanosulfónico), Bes (ácido N,N-bis-2-hidroxiethyl-2-aminoetanosulfónico), Tris (tris-hidroximetilaminoetano) o Tea (trietanolamina). Preferentemente, el tampón de la presente invención es Hepes.

60 En el suero de la presente invención, se añade IL-6 a Hepes tamponado 50 mM basado en suero equino, bovino, ovino, humano o de ratón. El pH final de la composición es de entre 6,5 y 7,5, más preferentemente el pH final de la composición es de 7,0.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un liofilizado adecuado para la reconstitución en una composición según la presente invención, que comprende IL-6, una isoforma o un fragmento de la misma, un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-trimetil-amonio (I), en el que el compuesto se encuentra saturado o insaturado y/o sustituido o no sustituido, o una sal del mismo, y un suero.

El término "liofilizado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una composición de la invención obtenida mediante un procedimiento de liofilizado. La concentración de los ingredientes en el liofilizado se fija de manera que éste, tras la reconstitución con un volumen definido de una composición líquida definida (por ejemplo agua destilada) resulta en una composición de la invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit que comprende una composición o un liofilizado según la presente invención e instrucciones de utilización.

En otro aspecto se proporciona un método para producir una composición de la presente invención o un liofilizado de la presente invención, que comprende las etapas de:

A) mezclar:

- i) IL-6, una isoforma o un fragmento de la misma,
- ii) un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-trimetil-amonio (I), en el que el compuesto se encuentra saturado o insaturado y/o sustituido o no sustituido, o una sal del mismo, en el que la concentración del compuesto en la composición es de entre aproximadamente 0,15% y aproximadamente 0,4%, y
- iii) un suero,

B) opcionalmente liofilizar la mezcla obtenida en la etapa A.

En otro aspecto se proporciona un método de estabilización de IL-6, una isoforma o un fragmento de la misma, que comprende las etapas de mezclar:

- i) IL-6, una isoforma o un fragmento de la misma,
- ii) un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-trimetil-amonio (I), en el que el compuesto se encuentra saturado o no saturado y/o sustituido o no sustituido, o una sal del mismo, en el que la concentración del compuesto en la composición es de entre aproximadamente 0,15% y aproximadamente 0,4%, y
- iii) un suero.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la utilización de un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-trimetil-amonio (I), en el que el compuesto se encuentra saturado o no saturado y/o sustituido o no sustituido, o una sal del mismo, para estabilizar IL-6, una isoforma o un fragmento de la misma. Preferentemente, el compuesto en la composición de IL-6 presenta una concentración de entre aproximadamente 0,15% y aproximadamente 0,4%, preferentemente de entre aproximadamente 0,15% y 0,25%. Preferentemente, la composición comprende además un suero, preferentemente un suero tamponado. Preferentemente, el compuesto es de fórmula halogenuro de alquil-C₁₂-C₁₆-trimetil-amonio (II), en el que el halogenuro se selecciona de entre fluoruro, cloruro, bromuro o yoduro.

Preferentemente, el compuesto se selecciona de entre bromuro de tetradecil-trimetil-amonio, bromuro de dodecil-trimetil-amonio o bromuro de hexadeciltrimetil-amonio.

Puede utilizarse IL-6 estabilizado de la presente invención como control de analito individual o multianalito y/o como calibrador de analito individual o multianalito.

El término "control" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un material de control de calidad que resulta esencial para la medición de un analito, por ejemplo IL-6. La expresión "control de analito individual" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un material de control de calidad que contiene un analito. La expresión "control multianalito" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un material de control de calidad que contiene uno o más analitos.

La mayoría de instrumentos y sensores están diseñados para cumplir determinadas especificaciones de precisión; el procedimiento de ajuste de un instrumento para cumplir estas especificaciones se denomina calibración. El dispositivo para calibrar otros instrumentos se conoce como calibrador. Los calibradores varía en su forma y función dependiendo de los instrumentos con los que se ha diseñado que funcionen. La expresión "calibrador multianalito" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un calibrador que contiene más de un analito.

El término "aproximadamente" tal como se utiliza en la presente memoria comprende un intervalo de $\pm 20\%$ del valor, cantidad, concentración, nivel, etc. específico; la indicación de un valor de "aproximadamente 100%" pretende

comprender un valor de un intervalo numérico de $100 \pm 20\%$, es decir, un intervalo de valores de entre 80 y 120. Preferentemente el término "aproximadamente" comprende un intervalo $\pm 10\%$ respecto a un valor, cantidad, concentración, nivel, etc. específico, más preferentemente un intervalo de $\pm 5\%$ respecto al valor, cantidad, concentración, nivel, etc. específico.

5

Ejemplos

Se muestran los resultados de cuatro experimentos en total. En primer lugar, dos bases de datos indican la estabilización de IL-6 en una composición basada en suero equino. IL-6 se somete a ensayo en todos los casos a las dos concentraciones, indicadas como baja (24 a 60 pg/ml) y alta (126 a 357 pg/ml). La tercera base de datos indica la estabilización en suero equino y en suero humano. La cuarta base de datos muestra el efecto negativo de los compuestos sobre la estabilidad de IL-6 en una composición de tipo acuoso que contiene 3% de proteínas séricas.

10

15 La composición contiene suero y Hepes (50 mM). Se midió IL-6 utilizando el inmunoensayo Elecsys de IL-6 de Roche (nº id. 0509442190). TTAB se refiere al compuesto bromuro de tetradeciltrimetilamonio, número CAS 1119-97-7. DTAB se refiere al compuesto bromuro de dodeciltrimetil-amonio, número CAS 1119-94-4. HTAB se refiere al compuesto bromuro de hexadeciltrimetil-amonio, número CAS 57-09-0.

20 Todas las mediciones se llevaron a cabo con el analizador Elecsys 2010 de Roche Diagnostics. El sistema de inmunoensayo Elecsys 2010 de Roche Diagnostics es un sistema controlado por software totalmente automático. Está diseñado para realizar determinaciones *in vitro* tanto cuantitativas como cualitativas utilizando una gran diversidad de ensayos para el análisis. El sistema de detección se basa en tecnología de electroluminiscencia utilizando un electrodo y anticuerpos marcados específicos de analito. El reactivo utilizado en todas las mediciones es el ensayo Elecsys de IL-6 de Roche, nº de cat. 05109442190. Este ensayo utiliza el denominado principio sándwich; se proporcionan más datos a continuación:

25

- primera incubación: se incubaron 30 μ l de anticuerpo con un anticuerpo monoclonal biotilado específico de IL-6.
- 30 • Segunda incubación: tras la adición de un anticuerpo monoclonal específico de IL-6 marcado con un complejo de rutenio y micropartículas recubiertas con estreptavidina, los anticuerpos forman con el antígeno de la muestra un complejo sándwich.
- La mezcla de reacción se aspiró al interior de la celda de medición, en la que las micropartículas de capturaron magnéticamente sobre la superficie del electrodo. A continuación, las sustancias no unidas se eliminaron con ProCell. La aplicación de un voltaje en el electrodo seguidamente induce emisión quimioluminiscente que se mide con un fotomultiplicador.
- 35 • Los resultados se determinan mediante una curva de calibración que es generada específicamente por el instrumento mediante una calibración de 2 puntos y una curva patrón proporcionada mediante el código de barras del reactivo. Todos los valores de concentración se calcularon a partir de la señal no procesada utilizando la curva de calibración. Se fijó el valor de referencia a 100% para la primera medición (día 0). El analizador calcula automáticamente la concentración de analito de cada muestra en pg/ml. Todos los demás cálculos se realizaron utilizando Excel 2003 de Microsoft.

40

Ejemplo 1

45

- Se prepararon dos concentraciones de IL-6 (24,4 a 42,9 pg/ml y 126,8 a 234,2 pg/ml) en una composición basada en suero equino.
- De cada concentración de IL-6, se prepararon 6 alícuotas. A la primera alícuota se añadió 0,05% de TTAB; a la segunda alícuota se añadió 0,1% de TTAB; a la tercera alícuota se añadió 0,15% de TTAB; a la cuarta alícuota se añadió 0,2% de TTAB, a la quinta alícuota se añadió 0,25% de TTAB y a la sexta alícuota se añadió 0,5% de TTAB.
- 50 • Se midió la concentración de IL-6 utilizando el inmunoensayo Elecsys de IL-6 en la totalidad de las 12 alícuotas; las mediciones se llevaron a cabo dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la IL-6. Estas mediciones de IL-6 sirvieron de referencia en el presente experimento. El día 0, al realizar la primera medición, el valor de referencia se fijó en 100%.

55

La totalidad de las 12 alícuotas se almacenó durante hasta 5 días a una temperatura de entre 2°C y 8°C. Se obtuvieron las muestras y se midieron para IL-6 tras 1, 4 y 5 días. Tras 5 días, la recuperación de IL-6 todavía era de entre 88% y 94% utilizando una concentración de TTAB de entre 0,15% y 0,25%, mientras que la recuperación era de sólo 72% para una concentración de TTAB de 0,5% y de 82% para una concentración de TTAB de 0,05% utilizando una concentración baja de IL-6 (24,4 a 42,9 pg/ml). Utilizando una concentración alta de IL-6 (126,8 A 234,2 pg/ml), la recuperación era de entre 90% y 94% para una concentración de TTAB de entre 0,15% y 0,25%.

60

mientras que la recuperación de IL-6 era de sólo 77% para una concentración de TTAB de 0,5% y de 85% para una concentración de TTAB de 0,05%.

5 Se muestran los resultados detallados en la figura 1. El presente experimento indica claramente el efecto de estabilización dependiente de la concentración de TTAB hacia IL-6 según se determina mediante medición del % de recuperación. La mejor estabilización se observó con 0,2% y 0,25% de TTAB. En contraste, 0,5% de TTAB condujo a una reducción de la estabilidad.

10 Ejemplo 2

- Se prepararon dos concentraciones de IL-6 (43,7 a 60,8 pg/ml y 258,5 a 347,5 pg/ml) en una composición basada en suero equino.
- De cada concentración de IL-6 se prepararon 3 alícuotas. La primera alícuota se utilizó a modo de control negativo y se dejó sin modificar; a la segunda alícuota se añadió 0,2% de TTAB; a la tercera alícuota se añadió 0,2% de TTAB; a la tercera alícuota se añadió 0,25% de TTAB.
- 15 • Se midió la concentración de IL-6 utilizando el inmunoensayo Elecsys de IL-6 en la totalidad de las 6 alícuotas; las mediciones se llevaron a cabo dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la IL-6. Estas mediciones de IL-6 sirvieron como referencia para las muestras almacenadas durante 23 días a una temperatura de entre 2°C y 8°C en el presente experimento.
- 20 • La totalidad de las 6 alícuotas se almacenó durante hasta 23 días a una temperatura de entre 2°C y 8°C. Se obtuvieron y midieron las muestras para IL-6 tras 1, 3, 4 y 23 días. Se fijó la recuperación de los valores de referencia en 100% tras obtener las primeras muestras de la totalidad de las 6 alícuotas (día 0).
- Tras 23 días de almacenamiento de las muestras, los valores de recuperación todavía se encontraban entre 93% para 0,2% de TTAB y 94% para 0,25% de TTAB a baja concentración de IL-6 (43,7 a 60,8 pg/ml). En el caso de que no se utilizase TTAB en las alícuotas, el valor de recuperación se reducía a 74% tras 23 días de almacenamiento de las muestras.
- 25 • Utilizando una concentración alta de IL-6 (258,5 a 347,5 pg/ml), los valores de recuperación todavía se encontraban entre 95% para 0,2% de TTAB y 96% para 0,25% de TTAB. En el caso de que no se utilizase TTAB en las alícuotas, el valor de recuperación se reducía a 78% tras 23 días de almacenamiento de las muestras.
- 30

Se muestran los resultados detallados en la figura 2. El presente experimento confirma claramente el efecto de estabilización observado con 0,2% y 0,25% de TTAB sobre el % de recuperación de IL-6. El control negativo, sin TTAB, mostró una estabilidad reducida.

35 Ejemplo 3a

- Se prepararon dos concentraciones de IL-6 (29,1 a 44,1 pg/ml y 169,1 a 241,8 pg/ml) en una composición basada en suero humano.
- De cada concentración de IL-6 se prepararon 4 alícuotas. La primera alícuota se utilizó a modo de control negativo y se dejó sin modificar; a la segunda alícuota se añadió 0,2% de TTAB; a la tercera alícuota se añadió 0,2% de DTAB y a la cuarta alícuota se añadió 0,2% de HTAB.
- 40 • Se midió la concentración de IL-6 utilizando el inmunoensayo Elecsys de IL-6 en la totalidad de 8 alícuotas; las mediciones se llevaron a cabo dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la IL-6. Estas mediciones de IL-6 sirvieron de referencia en el presente experimento.
- 45 • La totalidad de las 8 alícuotas se almacenó durante hasta 30 días a una temperatura de entre 2°C y 8°C. Las muestras se obtuvieron y midieron para IL-6 tras 1, 2, 3, 7, 16 y 30 días. Se fijó la recuperación de los valores de referencia para las alícuotas en 100% (día 0) en el momento de llevar a cabo las primeras mediciones. Todavía se observaba un efecto positivo de la adición de un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-trimetil-amonio (I) tras 30 días de almacenamiento de los líquidos. Aunque el control negativo mostraba un valor de recuperación de 28% para una concentración baja de IL-6, los valores de recuperación para alícuotas con 0,2% de TTAB, 0,2% de DTAB ó 0,2% de HTAB todavía se encontraba entre 40% y 52%. El mismo efecto era visible para una concentración alta de IL-6; el control negativo mostraba un valor de recuperación de 27% para una concentración baja de IL-6; los valores de recuperación para las alícuotas con 0,2% de TTAB, 0,2% de DTAB ó 0,2% de HTAB era de entre 39% y 48%.
- 50
- 55

Se muestran los resultados detallados en la figura 3a. El presente experimento muestra claramente el efecto de estabilización observado con 0,2% de TTAB o con 0,2% de DTAB o con 0,2% de HTAB en una composición basada en suero humano. El control negativo, sin compuesto, mostró una estabilidad reducida.

60 Ejemplo 3b

- Se prepararon dos concentraciones de IL-6 (33,6 a 44,1 pg/ml y 187,2 a 268,3 pg/ml) en una composición basada en suero equino.

- De cada concentración de IL-6 se prepararon 4 alícuotas. La primera alícuota se utilizó a modo de control negativo y se dejó sin modificar; a la segunda alícuota se añadió 0,2% de TTAB; a la tercera alícuota se añadió 0,2% de DTAB y a la cuarta alícuota se añadió 0,2% de HTAB.

5 • Se midió IL-6 utilizando el inmunoensayo Elecsys de IL-6 en la totalidad de las 8 alícuotas; las mediciones se llevaron a cabo dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la IL-6. Las mediciones de IL-6 sirvieron de referencia en el presente experimento.

- La totalidad de las 8 alícuotas se almacenó durante hasta 30 días a una temperatura de entre 2°C y 8°C. Las muestras se obtuvieron y midieron para IL-6 tras 1, 2, 3, 7, 16 y 30 días.

10 • La recuperación de los valores de referencia para las alícuotas se fijó en 100% (día 0) en el momento de llevar a cabo las primeras mediciones. Todavía se observaba un efecto positivo de la adición de un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-trimetil-amonio (I) tras 30 días de almacenamiento de las alícuotas. Mientras que el control negativo mostraba un valor de recuperación de 79% para una concentración baja de IL-6, los valores de recuperación para las alícuotas con 0,2% de TTAB, 0,2% de DTAB ó 0,2% de HTAB todavía se encontraba entre 93% y 95%. El mismo efecto era visible para una concentración alta de IL-6; el control negativo mostraba un valor de recuperación del 80% para una concentración baja de IL-6; los valores de recuperación para alícuotas con 0,2% de TTAB, 0,2% de DTAB ó 0,2% de HTAB era de entre 89% y 93%.

15 Se muestran los resultados detallados en la figura 3b. El presente experimento demuestra claramente el efecto de estabilización observado con 0,2% de TTAB ó 0,2% de DTAB ó 0,2% de HTAB en una composición basada en suero equino. El control negativo, sin compuesto, mostraba una estabilidad reducida.

20

Ejemplo 4

25 • Se prepararon dos concentraciones de IL-6 (41,4 a 53,1 pg/ml y 237,7 a 285,0 pg/ml) en una solución de tipo acuoso que contenía 3% de proteínas séricas, disponible comercialmente de Roche (diluyente universal, nº de cat. 03183971122).

- De cada concentración de IL-6 se prepararon 4 alícuotas. La primera alícuota se utilizó a modo de control negativo y se dejó sin modificar; a la segunda alícuota se añadió 0,2% de TTAB; a la tercera alícuota se añadió 0,2% de DTAB y a la cuarta alícuota se añadió 0,2% de HTAB.

30 • Se midió la concentración de IL-6 utilizando el inmunoensayo Elecsys de IL-6 en la totalidad de las 8 alícuotas; las mediciones se llevaron a cabo dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la IL-6. Estas mediciones de IL-6 sirvieron de referencia en el presente experimento.

- La totalidad de las 8 alícuotas se almacenó durante hasta 30 días a una temperatura de entre 2°C y 8°C. Las muestras se obtuvieron y se midieron para IL-6 tras 7, 16 y 30 días.

35 • La recuperación de los valores de referencia para las alícuotas se fijó en 100% (día 0) al llevar a cabo las primeras mediciones. Ya se observó un efecto negativo de la adición de un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-trimetil-amonio (I) tras 7 días de almacenamiento de las alícuotas. Aunque el control negativo mostraba un valor de recuperación del 98% a una concentración baja de IL-6, los valores de recuperación para las alícuotas con 0,2% de TTAB, 0,2% de DTAB ó 0,2% de HTAB sólo era de entre 60% y 81%. El mismo efecto era visible para una concentración alta de IL-6; el control negativo mostraba un valor de recuperación de 96%; los valores de recuperación para las alícuotas con 0,2% de TTAB, 0,2% de DTAB ó 0,2% de HTAB sólo era de entre 59% y 81%.

40

45 Se muestran los resultados detallados en la figura 4. El presente experimento indica claramente el efecto negativo de TTAB o DTAB o HTAB sobre la estabilidad de IL-6 en una solución de tipo acuoso.

Ejemplo 5

50 • Se añadió IL-6 a una solución basada en suero equino, bovino o de ratón (203,1 a 254,2 pg/ml) y cuatro tampones Hepes.

- De cada preparación de IL-2 se prepararon 2 alícuotas. La primera alícuota se utilizó a modo de control negativo y se dejó sin modificar; a la segunda alícuota se añadió 0,225% de TTAB.

55 • Se midió IL-6 utilizando el inmunoensayo Elecsys de IL-6 en la totalidad de las 6 alícuotas; las mediciones se llevaron a cabo dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de IL-6. Estas mediciones de IL-6 sirvieron de referencia en el presente experimento.

- La totalidad de las 6 alícuotas se almacenó durante 7 días a una temperatura de entre 2°C y 8°C. Se obtuvieron y midieron muestras para IL-6 tras 7 días.

60 Se muestran los resultados detallados en la figura 5. El presente experimento indica claramente el efecto positivo de TTAB sobre la estabilidad de IL-6 en una composición basada en suero equino, bovino y de ratón. También indica el efecto negativo de TTABA sobre la estabilidad de IL-6 en suero bovino.

Referencias citadas en la descripción

Documentos de patente citados en la descripción

- 5
- EP 1566437
 - EP 1882944
 - US 20040157218
 - WO 2009048962
 - EP 1242576
- 10
- EP 0467337

Literatura no de patentes citada en la descripción

- 15
- Chamani, A.A. *et al.*, J. Colloid Interface Sci. 297 (2006) 561.
 - Campell PJ. *Et al.*, II. Procedures used for the production of biological standards and reference preparations. J Biol Stand 2 (1974) 259-267.
 - Drucker C, Gewiese J, Malchow S, Scheller J, Rose-John S. Impact of Interleukin-6 Classic- and Transsignaling on Liver Damage and Regeneration. J Autoimm 2009, en prensa.
- 20
- Helfgott DC, Tatter SB, Santhanam U, Clarick RH, Bhardwaj N, May LT, Sehgal PB, Multiple Forms of IFN- β /IL-6 in Serum and Body Fluids during acute bacterial infection. J Immunolog 1989; 142:948-953.
 - Jensen W. A., Stability studies on maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: The effect of salts. Biochemistry 34 (1995) 472-480.
 - Kendrick B. S., Preferential exclusion of sucrose from recombinant interleukin-1 receptor antagonist: Role in restricted conformational mobility and compaction of native state. PNAS USA 94 (1997) 11917-11922.
- 25
- Klein, B., *et al.* 1991, Murine anti-interleukin 6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia, Blood 78, 1198-1204).
 - Loughheed W.D. *et al.*, Use of neutral surfactants: Physical stability of insulin formulations. Diabetes (1983) 34:424.
 - Moosavi-Movahedi A.A., *et al.*, Colloids Surf. B: Biointerfaces 9 (1997) 123.
 - Moosavi-Movahedi A.A., *et al.*, J. Colloid Interface Sci. 161 (1993) 53.
- 30
- Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad Sci. (USA) 85:2444 (1988),
 - Smith and Waterman Add. APL. Math. 2:482 (1981), by the homology alignment algorithm of Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970),
 - Song M, Kellum JA. Interleukin-6. Crit Care Med 2005; 33 (Suppl 12) : 463-465.
 - Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the Interleukin-6 Family of Cytokines. Annu. Rev. Immunol. 1997; 15:797-819.
- 35
- Timasheff S. N., Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents. Adv. Protein Chem. 91 (1998) 355-432.
 - Tsai P.K. Use of specific ligands, e.g. use of Heparin for stabilization of aFGF Formulation design of acidic fibroblast growth factor. Pharm Res 10 (1993) 649-659.
- 40
- Tarelli E, *et al.*, Additives to biological substances. I. Effect of added carbohydrates on bovine serum albumin. J Biol Stand; 9 (1981) 1216130.
 - Tarelli E, *et al.*, Recombinant human albumin as a stabilizer for biological materials and for the preparation of international reference reagents. Biologicals [1045-1056] (1998) vol:26 iss:4 pg:331
 - Todd M.J. *et al.*, Dimerization of sensitive proteins the structural stability of the HIV-1 protease. J Mol boil 283 (1998) 475-488.
- 45

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende:

- 5 i) IL-6, una isoforma o un fragmento de la misma,
 ii) un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-trimetil-amonio (I),
 en la que el compuesto se encuentra saturado o insaturado y/o sustituido o no sustituido, o una sal del mismo,
 en el que la concentración del compuesto en la composición es de entre aproximadamente 0,15% y
 10 aproximadamente 0,4%, y
 iii) un suero.

2. Composición según la reivindicación 1, en la que el compuesto estabiliza IL-6.

3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que el compuesto es de fórmula halogenuro de alquil-C₁₂-C₁₆-
 15 trimetil-amonio.

4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el halogenuro se selecciona de entre
 fluoruro, cloruro, bromuro o yoduro.

20 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el compuesto se encuentra insaturado.

6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el compuesto no se encuentra sustituido.

7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el compuesto se selecciona de entre
 25 bromuro de tetradecil-trimetil-amonio, bromuro de dodecil-trimetil-amonio o bromuro de hexadecil-trimetil-amonio.

8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la concentración del compuesto en la
 composición es de entre aproximadamente 0,15% y aproximadamente 0,25%.

30 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el suero es un suero de mamífero,
 preferentemente seleccionado de entre suero humano, equino, bovino, ovino o de ratón.

10. Liofilizado adecuado para la reconstitución en una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,
 35 que comprende:

- i) IL-6, una isoforma o un fragmento de la misma,
 ii) un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-trimetil-amonio (I), en el que el compuesto se encuentra
 saturado o insaturado y/o sustituido o no sustituido, o una sal del mismo, y
 40 iii) un suero.

11. Kit que comprende:

- A) una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,
 o un liofilizado según la reivindicación 10, y
 45 B) instrucciones de utilización.

12. Método para producir una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende las etapas
 de:

A) mezclar:

- 50 i) IL-6, una isoforma o un fragmento de la misma,
 ii) un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-trimetil-amonio (I), en el que el compuesto se encuentra
 saturado o insaturado y/o sustituido o no sustituido, o una sal del mismo, en el que la concentración del compuesto
 en la composición es de entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 0,4%, y
 55 iii) un suero,
 B) opcionalmente liofilizar la mezcla obtenida en la etapa A.

13. Método de estabilización de IL-6, una isoforma o un fragmento de la misma, que comprende las etapas de
 mezclar:

- 60 i) IL-6, una isoforma o un fragmento de la misma,
 ii) un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-trimetil-amonio (I), en el que el compuesto se encuentra
 saturado o insaturado y/o sustituido o no sustituido, o una sal del mismo, en el que la concentración del compuesto
 en la composición es de entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 0,4%, y
 iii) un suero.

14. Utilización de un compuesto de fórmula halogenuro de alquil-C₁₀-C₁₈-trimetil-amonio, en el que el compuesto se encuentra saturado o insaturado y/o sustituido o no sustituido, o una sal del mismo, para estabilizar IL-6, una isoforma o un fragmento de la misma.

- 5
15. Utilización según la reivindicación 14, en la que el compuesto estabiliza IL-6, una isoforma o un fragmento de la misma, en la que IL-6, una isoforma o un fragmento de la misma se encuentra contenido en una composición que comprende además:
- 10
- i) el compuesto en la composición de entre aproximadamente 0,15% y aproximadamente 0,4%, y
 - ii) un suero.

Figura 1

	C (TTAB) %	referencia		1 día, 2-8°C		4 días, 2-8°C		5 días, 2-8°C	
		C (pg/ml)	recuperación (%)	C (pg/ml)	recuperación (%)	C (pg/ml)	recuperación (%)	C (pg/ml)	recuperación (%)
concentración baja de IL-6	0,05	34,9	100	32,4	93	30,1	86	28,6	82
	0,1	37,7	100	34,7	92	32,4	86	31,6	84
	0,15	40,9	100	39,9	98	37,0	91	36,2	88
	0,2	42,9	100	43,6	102	40,7	95	39,8	93
	0,25	40,7	100	39,0	96	39,2	96	38,4	94
	0,5	24,4	100	21,9	90	19,4	79	17,6	72
concentración alta de IL-6	0,05	192,4	100	181,5	94	168,7	88	163,7	85
	0,1	209,8	100	199,6	95	174,6	83	173,8	83
	0,15	226,3	100	220,4	97	207,8	92	202,6	90
	0,2	234,2	100	228,4	98	221,7	95	219,9	94
	0,25	247,2	100	226,8	92	229,2	93	225,7	91
	0,5	126,8	100	120,1	95	101,6	80	97,5	77

Figura 2

	C (TTAB) %	referencia		1 día, 2-8°C		3 días, 2-8°C		4 días, 2-8°C		23 días, 2-8°C	
		C (pg/ml)	recuperación (%)	C (pg/ml)	recuperación (%)	C (pg/ml)	recuperación (%)	C (pg/ml)	recuperación (%)	C (pg/ml)	recuperación (%)
concentración baja de IL-6	no TTAB	43,7	100	40,9	94	37,9	87	38,1	87	32,4	74
	0,2	59,3	100	57,7	97	57,0	96	57,6	97	55,4	93
	0,25	60,8	100	60,1	99	58,8	97	60,5	100	57,0	94
concentración alta de IL-6	no TTAB	258,5	100	241,0	93	223,3	86	226,5	88	201,8	78
	0,2	347,5	100	338,2	97	336,2	97	340,5	98	329,2	95
	0,25	357,3	100	351,6	98	346,2	97	351,7	98	341,2	96

Figura 3

composición basada en suero humano	C (compuesto) %	referencia		1 día, 2-8°C		2 días, 2-8°C		3 días, 2-8°C		7 días, 2-8°C		16 días, 2-8°C		30 días, 2-8°C	
		C (pp/ml)	recuperación (%)	C (pp/ml)	recuperación (%)	C (pp/ml)	recuperación (%)	C (pp/ml)	recuperación (%)	C (pp/ml)	recuperación (%)	C (pp/ml)	recuperación (%)	C (pp/ml)	recuperación (%)
concentración baja de IL-6	sin compuesto	29,1	100	22,4	77	18,9	65	17,7	61	13,5	46	9,6	33	8,0	28
	0,2% TTAB	41,0	100	34,8	85	32,5	79	29,9	73	24,6	60	19,0	46	16,6	40
	0,2% DTAB	44,1	100	38,9	88	36,7	83	34,9	79	31,4	71	25,4	57	23,1	52
	0,2% HTAB	39,0	100	33,3	85	30,2	77	28,7	74	24,4	63	19,7	50	17,0	44
concentración alta de IL-6	sin compuesto	169,1	100	122,1	72	105,9	63	92,1	54	72,4	43	53,8	32	45,8	27
	0,2% TTAB	225,5	100	185,2	82	169,5	75	156,8	70	127,5	57	105,4	47	88,6	39
	0,2% DTAB	241,8	100	208,2	86	198,3	82	184,4	76	159,2	66	134,6	56	117,1	48
	0,2% HTAB	220,6	100	183,7	83	172,4	78	158,9	72	134,6	61	111,2	50	95,6	43

Figura 3b composición basada en suero equino	C (compuesto) %	referencia		1 día, 2-8°C		2 días, 2-8°C		3 días, 2-8°C		7 días, 2-8°C		16 días, 2-8°C		30 días, 2-8°C	
		C (ng/ml)	recuperación (%)	C (ng/ml)	recuperación (%)	C (ng/ml)	recuperación (%)	C (ng/ml)	recuperación (%)	C (ng/ml)	recuperación (%)	C (ng/ml)	recuperación (%)	C (ng/ml)	recuperación (%)
concentración baja de IL-6	sin compuesto	33,6	100	31,7	95	31,1	93	29,8	89	28,7	85	26,3	78	26,5	79
	0,2% TTAB	44,1	100	44,5	101	43,4	98	43,4	98	43,1	98	42,4	96	41,7	95
	0,2% DTAB	44,1	100	44,7	101	44,0	100	43,7	99	42,5	96	43,1	98	42,1	95
	0,2% HTAB	41,0	100	40,5	99	39,6	96	39,3	96	38,4	94	38,3	93	38,0	93
concentración alta de IL-6	sin compuesto	187,2	100	178,7	95	178,8	96	171,4	92	161,1	86	157,0	84	149,9	80
	0,2% TTAB	250,9	100	250,5	100	257,3	103	248,5	99	241,5	96	244,1	97	232,6	93
	0,2% DTAB	268,3	100	266,3	99	269,8	101	267,9	100	252,9	94	254,7	95	246,8	92
	0,2% HTAB	247,1	100	244,5	99	245,5	99	238,4	96	230,6	93	233,2	94	220,1	89

Figura 4

composición basada en una solución acuosa	C (compuesto) %	referencia		7 día, 2-8°C		16 días, 2-8°C		30 días, 2-8°C	
		C (pg/ml)	recuperación (%)	C (pg/ml)	recuperación (%)	C (pg/ml)	recuperación (%)	C (pg/ml)	recuperación (%)
Concentraciones bajas de IL-6	sin compuesto	41,8	100	41,1	98	41,3	99	40,2	96
	0,2% TTAB	45,5	100	33,2	73	24,7	54	21,2	47
	0,2% DTAB	53,1	100	43,1	81	36,2	68	32,0	60
	0,2% HTAB	41,4	100	25,0	60	17,6	42	13,9	34
Concentraciones altas de IL-6	sin compuesto	239,6	100	231,0	96	235,7	98	231,3	97
	0,2% TTAB	252,3	100	178,2	71	135,6	54	108,2	43
	0,2% DTAB	285,0	100	229,5	81	193,5	68	164,6	58
	0,2% HTAB	237,7	100	140,8	59	96,5	41	73,9	31

Figura 5

	referencia		7 días, 2-8°C c(pg/mL)		7 días, 2-8°C recuperación (%)	
	sin TTAB	0,225% TTAB	sin TTAB	0,225% TTAB	sin TTAB	0,225% TTAB
suero equino	234,7	279,0	187,4	254,2	80	91
suero bovino	254,2	272,4	175,4	167,0	69	61
suero de ratón	246,2	272,4	180,7	231,3	73	85