

251452



251452

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a

la solicitud de

una PATENTE de INVENCION por VEINTE AÑOS en ESPAÑA, a favor de
ARMOUR AND COMPANY, Entidad norteamericana, residente en Union
Stock Yards - CHICAGO 9, Illinois (U.S.A.), por

"PROCESO PARA PREPARAR UN COMPUESTO DE CORTICOTROPIN DE ACCION
PROLONGADA"

INVENTOR: Robert Edward Thompson, de nacionalidad norteamericana.

PRIORIDADES: Patentes norteamericanas nº 755.139 del 15-8-58 y
nº 787.812 " 20-1-59

—oooOooo—

251452



20 AB

Esta invención se relaciona con un preparado de corticotropin de acción sostenida o prolongada y con procesos para producir dicho preparado.

5.- En la preparación de productos de corticotropin de acción prolongada o efecto sostenido, se han realizado esfuerzos para conseguir un preparado de corticotropin insoluble que, al ser introducido subcutánea o intramuscularmente, aporte eficazmente corticotropin al torrente circulatorio y desde allí a las glándulas suprarrenales. Una dificultad ofrecida por tales preparados es la de que son de persistencia relativamente corta, a menos que se empleen dosis no tolerables.

10.- Otra dificultad estriba en el hecho de que no aportan uniformemente el material corticotropínico al torrente sanguíneo. Además, tales preparados han venido careciendo de estabilidad segura.

15.- Las soluciones acuosas ordinarias de sólo sustancias hormonicas corticotropínicas tienen después de su inyección una acción de bastante corta duración, tendiendo el efecto a elevarse durante un período hasta un máximo y decreciendo luego hasta un punto inferior al nivel de valor deseado. Por ejemplo, muchos de los cambios hematológicos y metabólicos comúnmente estudiados, producidos por la hormona corticotropínica, alcanzan un máximo hacia la cuarta hora después de la administración, habiendo cedido completamente hacia la octava hora.

20.- A fin de mantener un nivel medio total del valor deseado, es necesario administrar una cantidad de la sustancia hormonal que produzca un efecto máximo a la cuarta hora y que en el momento en que se produce ese efecto máximo haya un valor superior al deseado. Aunque las sustancias hormonicas pueden tener efecto sobre un período de ocho horas, es necesario administrarlas a intervalos de seis horas o menos a fin de mantener el nivel completo, teniendo lugar en los momentos de máximo efecto un exceso de uso de la actividad y, por consiguiente, una pérdida de

25.- la valiosa sustancia. Existe la necesidad de preparados que reduzcan

30.-

251452



el efecto durante los denominados "períodos de máximo efecto", al tiempo que mantienen un nivel superior de dicho efecto durante todo el período de tratamiento.

- 5.- Un objeto de la presente invención es proporcionar un preparado de corticotropín que pueda ser introducido subcutánea o intramuscularmente para el aporte de corticotropín a la corriente sanguínea durante un período extremadamente prolongado. Otro objeto es ofrecer tal preparado en el que el corticotropín permanezca activo y sea administrado uniformemente durante un período prolongado.
- 10.- Otro objeto más es proporcionar un preparado tal que pueda graduarse de manera que introduzca la sustancia activa en la sangre durante períodos escogidos, que pueden ser un período moderado o un período muy extenso. Otra finalidad es ofrecer un método de preparación de un corticotropín en el que la duración del estímulo producido por el preparado pueda variarse.
- 15.- Otro objetivo es proporcionar una sustancia estimulante de las glándulas suprarrenales que permanezca estable bajo unas condiciones de prolongado almacenamiento. Otro objeto es ofrecer un complejo corticotropínico que ejerza una intensa y rápida acción al ser administrado, al tiempo que produce un estímulo relativamente uniforme de las glándulas suprarrenales durante un largo período de tiempo, mientras al mismo tiempo estimula más equilibradamente el aporte natural o secreción de la hormona por la pituitaria. A medida que avance esta descripción, quedarán patentizados otros objetos y ventajas específicos.
- 20.-
- 25.- En un aspecto de esta invención, se ofrece un preparado de corticotropín que demuestra una prolongada acción tras su administración subcutánea o intramuscular y que comprende una suspensión acuosa que incluye de 20 a 500 unidades subcutáneas de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) por ml de corticotropín, de 0,1 a 2,5 mg de tanato por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín y de 6 a 60
- 30.-

251452



20 AEU.

mg de gelatina parcialmente hidrolizada por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín. Además, por lo menos una porción de esta suspensión acuosa consiste en un complejo de cinc-corticotropín-gelatina-tanato.

- 5.- En otro aspecto de esta invención, se ofrece un preparado de corticotropín que demuestra también una prolongada acción tras su administración subcutánea o intramuscular y que comprende una suspensión acuosa que incluye de 20 a 500 unidades subcutáneas USP por ml. de corticotropín derivado de tejido pituitario bovino, de 0,1 a 2,5 mg. de tanato por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín y por lo menos 0,1 mg. de cinc por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín. Además, por lo menos una porción de esta suspensión acuosa consiste en un complejo de cinc-corticotropín-tanato.

- 15.- En los experimentos que condujeron a esta invención, se observó que el corticotropín derivado del tejido pituitario porcino, cuando se combina con una sal de cinc y ácido tánico, da lugar a la formación de un complejo de cinc-corticotropín-tanato que es prácticamente inactivo en su administración subcutánea o intramuscular, es decir, que su actividad es de tal duración prolongada que no se produce ningún efecto clínicamente apreciable. Sin embargo, dotando al complejo cinc-corticotropín-gelatina-tanato de hormona corticotropínica activa (ACTH) porcina, se salva este problema. Por otra parte, se ha descubierto que dotando al complejo cinc-corticotropín de ACTH bovina se obtiene un producto que demuestra ejercer una deseable acción prolongada y controlada tras su inyección subcutánea o intramuscular.

- 20.- La terminología "unidades subcutáneas USP" se refiere al ensayo corticotropínico subcutáneo y al sistema de unidades del mismo establecido en la Farmacopea de los Estados Unidos, XV.

- 25.- Este preparado corticotropínico es adecuado para su administración a animales y seres humanos mediante cualquier vía, pero ha

- 30.-

251452



de tenerse en cuenta que, puesto que la base para una prolongada acción del mismo es la formación de un depósito en los tejidos, es preferible que la administración de dicho preparado sea parentéricamente por cualquier vía que no sea la intravenosa. Puede obtenerse una acción corticotrópica prolongada especialmente deseable cuando este

5.- preparado se administra subcutánea o intramuscularmente.

El corticotropín que puede emplearse en este preparado incluye sustancias tanto de elevada como de baja potencia y el proceso que aquí se describe es aplicable a las sustancias extraídas de glándulas pituitarias de animales y a preparados sintéticos de tales sustancias activas, a cuyas dos formas se hace referencia aquí por el término

10.- "corticotropín". Sin embargo, pueden obtenerse mejores resultados cuando el corticotropín incluido en este preparado es de elevada pureza, con una potencia de por lo menos 20 unidades subcutáneas USP por

15.- mg. Pueden lograrse unos resultados especialmente deseables con un corticotropín que tenga una potencia de por lo menos 40 unidades subcutáneas USP por mg. Igualmente, aunque el corticotropín utilizado en la práctica de esta invención puede ser derivado de las glándulas pituitarias de cualquier especie animal, pueden obtenerse unos mejores

20.- resultados con el corticotropín derivado del tejido pituitario bovino y porcino, siendo especialmente deseable el corticotropín derivado de las glándulas pituitarias porcinas.

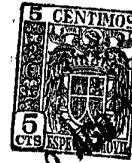
Como ejemplo del corticotropín puede incluirse en este preparado uno tal como el descrito en la patente estadounidense núm.

25.- 2.739.099 de L.J. Walaszek.

Igualmente, puede obtenerse un deseable preparado de corticotropín mediante el bien conocido procedimiento de purificación de oxixelulosa según la forma sugerida en la patente estadounidense núm. 2.669.536 de L.M. Bunding, en la que la purificación se lleva a cabo mediante adsorción y elución sobre materiales celulósicos.

30.-

251452



Aunque el corticotropín puede incluirse en esta suspensión acuosa a una concentración de 20 a 500 unidades subcutáneas USP por cm^3 , a efectos prácticos es preferible emplearlo a una concentración de 40 a 100 unidades subcutáneas USP por cm^3 .

- 5.- El constituyente tanato de este preparado de corticotropín puede ser derivado del ácido tánico de grado farmacéutico. Aunque el tanato puede ser incluido en este preparado a una concentración de 0,1 a 2,5 mg. por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín, pueden obtenerse mejores resultados a una concentración del mismo de 0,2 a 1,0 mg. por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín, obteniéndose unos resultados especialmente deseables empleando una concentración aproximada de ácido tánico de 0,4 mg. por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín.

- 10.-
- 15.- El constituyente cinc de este preparado de corticotropín puede ser derivado de cualquier sal de cinc, pero es preferible, naturalmente, emplear una sal de cinc soluble en agua, tal como el acetato de cinc. Aunque el cinc puede ser incluido en esa suspensión acuosa a una concentración de por lo menos 0,25 mg. por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín, a efectos prácticos es preferible emplearlo a una concentración de 0,5 a 2,0 mg. por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín.

- 20.-
- 25.- En los experimentos que condujeron a esta invención, se determinó en pruebas de tolerancia con animales que un complejo de cinc-corticotropín-tanato parece ser susceptible de inactivación por los tejidos. Este efecto de inactivación por los tejidos impide la absorción del corticotropín en el torrente sanguíneo desde un depósito formado en los tejidos. En consecuencia, se obtiene un reducido grado de introducción de corticotropín en la corriente sanguínea, pudiendo producirse un nivel sanguíneo inferior a aquél en que la glándula suprarrenal responde al corticotropín exógeno. Además, en muchos casos pue-
- 30.-

251452



20

1952

- 5.- de no haber ningún efecto ostensible, por el corticotropín administrado, sobre la glándula suprarrenal, pudiendo producirse una evidente pérdida de actividad del corticotropín. En consecuencia, se ha descubierto que la inclusión en este complejo de una gelatina parcialmente hidrolizada contrarresta este fenómeno de inactivación del tejido. Además, la cantidad de gelatina incluida en este complejo puede regularse variando el grado con que se introduce el corticotropín en el torrente circulatorio, pudiéndose graduar por consiguiente, dentro de ciertos límites la duración de la acción del preparado de corticotropín. Al mismo tiempo, mediante la inclusión en este complejo de gelatina se consigue una mejorada actividad del corticotropín sin ningún efecto evidente sobre la duración de la acción de la composición. Además, este componente gelatinico sirve para mejorar la estabilidad no sólo de la composición sino especialmente del constituyente tanato. Además, el constituyente gelatinico sirve para reducir cualquier irritación local que de otro modo podría observarse con el complejo.
- 10.-
- 15.-

- 20.- El constituyente gelatinico de este preparado corticotropínico debe ser de grado farmacéutico y no antígeno. La hidrolisis parcial de la gelatina puede obtenerse sometiendo al autoclave una adecuada solución gelatinica a una presión aproximada de 15 lpc. durante un período de unas 8 horas.

- 25.- Aunque la gelatina puede incluirse en esta composición a una concentración de 2 a 60 mg. por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín, se obtienen mejores resultados a una concentración de la misma de 6 a 20 mg. por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín, lográndose unos resultados especialmente deseables con unos 15 mg. de gelatina por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín.

- 30.- Es posible variar en grado considerable la duración de la acción obtenida con este preparado de corticotropín, graduando las concentraciones de los componentes de cinc y tanato en el complejo,

251452



así como mediante la citada variación del componente gelatínico.

Es conveniente que el preparado corticotropínico de este invento posea un pH de 4 a 8, siendo preferible que la suspensión acuosa tenga un pH de 5 aproximadamente.

- 5.- Antes se ha indicado que por lo menos una porción de los cuatro principales ingredientes incluidos en esta suspensión acuosa, concretamente el cinc, el corticotropín, el tanato y la gelatina, deben ser en forma de un complejo insoluble en agua. Por "suspensión acuosa" se entiende que este preparado corticotropínico incluye una
- 10.- fase sólida y una líquida (acuosa), en las que la primera es dispersable en la segunda. Además, se entiende por la expresión "complejo insoluble en agua" que la fase sólida incluye por lo menos una porción de los cuatro principales ingredientes en combinación física o química, de tal manera que el complejo sea separable como cuerpo independiente
- 15.- de la fase líquida. Se comprende igualmente que puede incluirse una porción de cualquiera de los principales ingredientes en este preparado corticotropínico como constituyente de la fase líquida y en algunos casos puede resultar conveniente proporcionar corticotropín en esta composición tanto en forma soluble como insoluble, de tal manera que se
- 20.- produzca un efecto del corticotropín inmediato y prolongado.

- Es evidente que la formación de este preparado de corticotropín, y especialmente la producción de este complejo insoluble en agua, supone generalmente una mezcla de los principales ingredientes en un medio acuoso hasta que se haya obtenido la combinación de por lo
- 25.- menos una porción de tales ingredientes. En consecuencia, puede comprenderse que el material inicial sea ordinariamente una solución acuosa que contenga la deseada concentración de corticotropín. Sin embargo, se ha observado que el orden en que se combinan los restantes ingredientes con esta solución acuosa de corticotropín puede variarse para
- 30.- alterar las características del producto resultante. Por una parte, si esta

251452



solución acuosa de corticotropín es combinada primeramente con ácido tánico, la subsiguiente adición a la misma del constituyente de cinc puede efectuarse dentro de una variedad de pH relativamente amplia.

5.- Por otra parte, cuando la solución acuosa de corticotropín es combinada primeramente con la sal de cinc, la subsiguiente adición a la misma del ácido tánico debe obtenerse con un pH alcalino de 7,4 aproximadamente.

10.- Es conveniente añadir el constituyente gelatinico al final, si bien puede mezclarse primeramente con el corticotropín. Las cantidades de cinc y ácido tánico añadidas pueden variar según sea el orden de adición de la ACTH, la gelatina y otros estabilizadores o preservadores.

15.- En este preparado de corticotropín pueden incluirse otros ingredientes determinados, especialmente con el fin de mejorar la estabilidad y duración de almacenamiento del mismo. Por ejemplo, la cisteína sirve para estabilizar todos los principales ingredientes de esta composición. En primer lugar, mediante dicho elemento se logra una insolubilización de cualquier cinc soluble presente en el preparado, reduciendo así la irritación local que puede producir el ión de

20.- cinc. Además, la cisteína parece retardar los cambios químicos en el ácido tánico, ACTH y gelatina de esta composición. Igualmente, la cisteína se combina evidentemente con este complejo insoluble en agua, permaneciendo en el lugar de la inyección y pudiendo ejercer sus efectos antioxidantes sobre los tejidos. La cisteína puede incluirse en esta suspensión acuosa a una concentración de 0,2 a 2,0 mg. por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín. Sin embargo, pueden lograrse unos resultados mejores con una concentración de cisteína de 1 mg. aproximadamente por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín.

25.- Además, pueden combinarse con este preparado de corticotropín, especialmente cuando se pretende un producto de múltiple inyec-

30.-

251452



5.- oión, tales agentes antibacterianos como los paraminobenzoatos de metilo y propilo. Se han logrado satisfactorios resultados empleando el paraminobenzoato de metilo a una concentración aproximada de 0,1 a 0,2% (peso/volumen), en tanto que el paraminobenzoato de propilo puede incluirse en esta suspensión acuosa a una concentración aproximada de 0,01 a 0,02% (peso/volumen). También puede usarse el fenol.

La invención puede ilustrarse más aún mediante los siguientes ejemplos específicos.

EJEMPLO I

10.- Se mezclaron 500 mg. de sustancia corticotropínica bovina purificada con oxicel, con 50 ml. de agua. Se añadió un 1,0% de tiourea y se graduó el pH a 6,5 con una solución de hidróxido sódico al 20%. Se puso la mezcla en una botella de vidrio y se selló. Se metieron el recipiente con su contenido en un horno de aire caliente a 100

15.- \pm 5°C. durante seis horas. Después de sacarse del horno, se enfrió el líquido a unos 30 C. y se pasó a través de un filtro de vidrio aglutinado con un medio. Se lavó el precipitado con agua hasta llevar el volumen del filtrado a 50 ml. A esos 50 ml. de la solución corticotropínica se añadieron 12 ml. de una solución al 5,0% de acetato de cinc

20.- cristalino. Se ajustó el pH a 7,5 con una solución al 3% de hidróxido sódico y se dejó reposar la mezcla durante media hora. Se centrifugó la mezcla y se separó el material sobrenadante. Se volvió a suspender el precipitado que contenía el corticotropín en 50 ml. de agua conteniendo 2,0 g. de gelatina parcialmente hidrolizada. A la suspensión

25.- resultante se añadieron 24 ml. de una solución al 1% de ácido tánico. Luego se reajustó el pH de la solución a 6,0 con una solución al 3% de hidróxido sódico. Se añadieron 24 ml. de cisteína al 1,0% y se reajustó el pH a 6,0. Se agregaron 2 ml. de glicerina, 0,6 g. de fenol y agua hasta formar 120 ml. con un pH de 6,1. Se mezcló bien la suspensión

30.- y se llenaron 2,2 ml. por ampolla. El aire de las ampollas fué

251452



desplazado con nitrógeno y se taponaron y sellaron aqueállas. La esterilización se efectuó mediante autoclave a 116-121°C. durante 15 minutos.

- 5.- Las pruebas del producto terminado revelaron su esterilidad mediante el método de la USP (Farmacopea de los EE.UU.) y la potencia se determinó mediante el método de ensayo subcutáneo USP, con un resultado de 104,0⁸,4 unidades por ml., indicando la ausencia de toda pérdida de potencia después de la aplicación del autoclave. Su carácter físico era excelente. Se demostró que este producto creaba un estímulo en las glándulas suprarrenales durante un período superior a 96 horas después de una sola inyección.

EJEMPLO II

- 15.- Se mezclaron 500 mg. de sustancia corticotrópica bovina purificada con oxicel, con 25 ml. de agua. Se añadió un 0,25% de hidrocloreuro de piridoxina y se ajustó el pH a 4,7 con hidróxido sódico. Se calentó esta mezcla a 95-100°C. durante 4-1/4 horas y luego se enfrió y diluyó a 70 ml. con agua. Se ajustó el pH a 6,5 con hidróxido sódico y luego se filtró el preparado para eliminar el material insoluble de pH 6,5. Se agregaron 560 mg. de acetato de cinc cristalino al filtrado y se ajustó el pH a 7,5 con una solución de hidróxido sódico al 3%. Se centrifugó la mezcla y se separó el material sobrenadante. El precipitado de cinc-corticotropín fué vuelto a suspender en 70 ml. de agua conteniendo 2,5 g. de gelatina parcialmente hidrolizada. Se añadieron 11,2 ml. de una solución al 0,5% de ácido tánico, seguido de
- 20.- 14 ml. de una solución al 2,0% de L-cisteína y 30 ml. de agua conteniendo 0,7 g. de fenol y 2,5 ml. de glicerina. Se ajustó el pH a 6,0 con hidróxido sódico. Se llenaron ampollas con la suspensión a razón de 2,3 ml. cada una, taponándose y sellándose y pasándose luego por el autoclave con vapor a 15 lpc (libras por pulgada cuadrada) y a 116-121°C. durante 15 minutos.
- 25.-
- 30.-

251452



Las pruebas del producto terminado revelaron su esterilidad. La potencia, ensayada mediante el procedimiento subcutáneo USP, reveló un valor de $97,5 \pm 9,2$ unidades por ml. Este producto determinó un fuerte estímulo en las glándulas suprarrenales aproximadamente durante 48 horas después de una sola inyección de 0,1 ml., efectuada subcutáneamente en ratas, o después de dosis de 100 y 200 unidades en seres humanos.

EJEMPLO III

Se preparó ACTH cruda mediante el procedimiento de extracción con ácido clorhídrico-acetona de glándulas pituitarias porcinas. La ACTH cruda fué sometida al proceso de adsorción con oxichel. Se mezclaron 400 mg. de la ACTH purificada con oxichel, con agua e hidrocloreuro de piridoxina de un pH de 4,7, calentándose a $95-100^{\circ}\text{C}$. durante 5 horas. Después de enfriarse a unos 50°C ., se filtró para separar el material inactivo e insoluble. Se lavó el precipitado con agua para llevar el volumen total del filtrado a 40 ml. Este fué filtrado estérilmente a través de un sebo de vela Selas O2. Al filtrado se añadió, a través del sebo de vela, 128 mg. de ácido tánico en 25 ml. de agua. Luego se añadieron separadamente 1.056 g. de acetato de cinc cristalino y 9,6 g. de gelatina parcialmente hidrolizada, cada uno de ellos en 25 ml. de agua, también a través del sebo de vela esterilizante. Luego se agregaron mediante filtración estéril 200 ml. de agua templada conteniendo 640 mg. de cisteína, 600 mg. de metilparabén y 60 mg. de propilparabén. Después de cada citada filtración se añadieron 10 ml. de agua para lavar los ingredientes previos del sebo de vela. El volumen final de la suspensión estéril era de 320 ml. Se llenaron asépticamente ampollas de boca ancha de 6 ml. con 2,5 ml. cada una, taponándose asépticamente dichas ampollas. Luego se congelaron y secaron al vacío y seguidamente se sellaron asépticamente con cierres comunes de aluminio.

251452



5.- Se probó la esterilidad del producto terminado. La adición de 1,0 a 5,0 ml. de agua o salina produjo una excelente y uniforme suspensión del complejo ACTH insoluble. El ensayo de su potencia reveló un valor de 234 ± 19 unidades por ampolla mediante el procedimiento subcutáneo USP. El producto terminado reconstituido con salina demostró producir un continuo estímulo de las glándulas suprarrenales durante 48 a 72 horas después de una sola inyección. La tolerancia local fué excelente.

EJEMPLO IV

10.- Se preparó el producto como en el Ejemplo III. En el momento de añadir la cisteína y el metil y propilparabén, se agregó también gelatina, 6,25 ml. de una solución acuosa de gelatina al 32%, previamente sometida al autoclave a 120°C . durante 4 a 8 horas. Esta cantidad de gelatina proporcionó aproximadamente 6 mg. de gelatina parcialmente hidrolizada por ml. en el producto terminado.

15.-

Después de su liofilización, este producto se reconstituyó excelentemente y demostró ejercer un estímulo más intenso de las glándulas suprarrenales después de su inyección que el producto preparado según el Ejemplo III. No hubo ningún cambio visible en la duración de la efectividad.

20.-

EJEMPLO V

25.- Se preparó ACTH cruda mediante el procedimiento de extracción con ácido clorhídrico-acetona de glándulas pituitarias porcinas. La ACTH cruda fué sometida al proceso de adsorción con oxichel. 400 mg. de la ACTH purificada con oxichel fueron mezclados con agua e hidrocloreuro de piridoxina con un pH de 4,7, calentándose a $95-100^{\circ}\text{C}$. durante 5 horas. Después de enfriarse a unos 50 C., se filtró para separar el material inactivo e insoluble. El precipitado fué lavado con agua para llevar el volumen total del filtrado a 40 ml. Este fué filtrado estéril

30.- mente a través de un sebo de vela Selas O2. Se añadió al filtrado, a

251452



- través del sebo de vela, 256 mg. de ácido tánico en 25 ml. de agua para proporcionar 0,8 mg. de ácido tánico por ml. de producto final. Luego se añadieron separadamente 1,056 g. de acetato de cinc cristallino y 9,6 g. de gelatina parcialmente hidrolizada, cada uno de ellos
- 5.- en 25 ml. de agua, también a través del sebo de vela estéril. Luego se añadió mediante filtración estéril 200 ml. de agua templada conteniendo 640 mg. de cisteína, 600 mg. de metilparabén y 60 mg. de propilparabén. Después de cada una de las citadas filtraciones se añadió 10 ml. de agua para lavar los ingredientes previos del sebo de
- 10.- vela. El volumen final de la suspensión estéril fué de 320 ml. Se introdujo la suspensión asépticamente en cantidad de 2,5 ml. en ampollas de boca ancha de 6 ml. taponándose asépticamente aquéllas, que seguidamente fueron congeladas y secadas al vacío y luego selladas asépticamente con cierres comunes de aluminio.
- 15.- Este producto resultó producir estímulo en las glándulas suprarrenales durante más de 96 horas después de la administración subcutánea de una sola dosis.
- EJEMPLO VI
- 20.- Se preparó ACTH cruda mediante el procedimiento de extracción con ácido clorhídrico-acetona de glándulas pituitarias porcinas. La ACTH cruda fué sometida al proceso de adsorción con oxixel. 400 mg. de la ACTH purificada con oxixel fueron mezclados con agua e hidrocloreuro de piridoxina con pH de 4,7, calentándose a 95-100°C. durante 5 horas. Después de su enfriado a unos 50°C. se filtró para separar el material inactivo e insoluble. Se lavó el precipitado con
- 25.- agua para llevar el volumen total del filtrado a 40 ml. Este fué filtrado estérilmente a través de un sebo de vela Selas O2. Al filtrado se añadió, a través del sebo de vela, 128 mg. de ácido tánico en 25 ml. de agua. Luego se añadieron 0,528 g. de acetato de cinc cristallino y 9,6 g. de gelatina parcialmente hidrolizada, cada uno en 25 ml.
- 30.-



251452

- 5.- de agua, también a través del sebo de vela estéril. Esto proporcionó 0,5 mg. de cinc por ml. de producto final. Luego se agregó mediante filtración estéril 200 ml. de agua templada conteniendo 640 mg. de cisteína, 600 mg. de metilparabén y 60 mg. de propilparabén. Se añadieron 10 ml. de agua después de cada filtración citada para lavar los ingredientes previos del sebo de vela. El volumen final de la suspensión estéril fué de 320 ml. Esta suspensión se introdujo asépticamente en cantidad de 2,5 ml. en ampollas de boca ancha de 6 ml. que fueron taponadas asépticamente. Luego se congelaron y secaron al vacío, sellándose seguidamente de modo aséptico con cierres ordinarios de aluminio.
- 10.-

Se comprobó la actuación de este producto durante unas 48 horas con igual o superior intensidad de efecto que el producto conteniendo 1,0 mg. de cinc por ml. de producto final según se preparó en el Ejemplo III.

15.-

EJEMPLO VII

- 20.- Se preparó ACTH cruda mediante el procedimiento de extracción con ácido clorhídrico-acetona de glándulas pituitarias porcinas. La ACTH cruda fué sometida al proceso de adsorción con oxichel. Se mezclaron 400 mg. de la ACTH purificada con oxichel, con agua e hidrocioruro de piridoxina a un pH de 4,7, calentándose a 95-100°C. durante 5 horas. Después de enfriarse a unos 50°C., se filtró para separar el material inactivo e insoluble. Se lavó el precipitado con agua para llevar el volumen total del filtrado a 40 ml. Este fué filtrado estérilmente a través de un sebo de vela Selas 02. Al filtrado se añadió, a través del sebo de vela, 128 mg. de ácido tánico en 25 ml. de agua. Luego se agregó una cantidad de cloruro de aluminio para formar 1,0 mg. de ión aluminio por ml. de producto terminado. Igualmente, se añadió gelatina parcialmente hidrolizada en una cantidad tal que se obtuvieron en la suspensión resultante 8 mg. de gelatina por 100 uni-
- 25.-
- 30.-

251452



5.- dades subcutáneas USP de corticotropín. Se ajustó el pH a 5,0 con hidróxido sódico. Luego se añadieron mediante filtración estéril 200 ml. de agua templada conteniendo 640 mg. de cisteína, 600 mg. de metilparabén y 60 mg. de propilparabén. Después de cada citada filtración se añadió 10 ml. de agua para lavar los ingredientes previos del sebo de vela. El volumen final de la suspensión estéril fué de 320 ml. Se llenó asépticamente con la suspensión, en cantidades de 2,5 ml. ampollas de boca ancha de 6 ml. que se taponaron asépticamente. Luego se congelaron y secaron al vacío y seguidamente fueron selladas asépticamente con cierres ordinarios de aluminio.

10.-

EJEMPLO VIII

15.- Se filtró una solución acuosa de ACTH porcina, en cantidad de 40 cm³ y conteniendo 640 unidades por cm³ de ACTH, a través de sebo de vela Selas en un recipiente estéril. Luego se filtró en dicho recipiente estéril una solución acuosa de 25 cm³ conteniendo 120 mg. de ácido tánico.

Seguidamente se filtraron en el recipiente estéril 1,056 g. de acetato de cinc en 25 cm³ de agua. El sebo Selas fué lavado después de cada filtración con 10 cm³ de agua.

20.- Luego se filtró una solución acuosa de la siguiente composición a través del sebo Selas en el recipiente estéril:

Cisteína	320 mg.
Metilparabén	600 mg.
Propilparabén	60 mg.

25.- Una solución acuosa conteniendo un 32% de gelatina hidrolizada mediante autoclave durante un período de 8 horas 6,25 cm³

Agua 95 cm³

30.- Se filtró agua en el recipiente estéril en cantidad para formar un volumen final en aquél de 320 cm³

251452



20

La resultante suspensión líquida se introdujo en ampollas de 6 cm³ en cantidad de 2,5 ml. por ampolla. Estas fueron sometidas luego a liofilización.

5.- Mediante análisis se determinó la existencia de 233 unidades de ACTH por ampolla. Este producto demostró una mayor actividad de la ACTH clínicamente, que un producto comparable sin gelatina.

Igualmente, el producto demostró una duración de acción de unas 48 horas.

10.- Clínicamente, demostró este producto una duración de acción de unas 72 horas.

EJEMPLO IX

15.- El producto se obtuvo mediante el método del Ejemplo II, con la excepción de introducirse una ACTH de una potencia de 150 unidades por mg. en lugar del dotado de una potencia de unas 75 unidades por mg. descrito en aquel ejemplo. En consecuencia, el resultante producto contenía una actividad de la ACTH doble a la del que se describe en el Ejemplo citado.

20.- Se ha comprobado que las cantidades relativas de cinc, ácido tánico y ACTH de las fórmulas precedentes pueden variar^{se} para obtener un control de adsorción por períodos de 1 día a 6 ó más.

EJEMPLO X

Se empleó el siguiente método para acentuar la potencia de la administración subcutánea de ACTH derivada de tejido pituitario bovino.

25.- La ACTH bovina purificada mediante tratamiento con oxigelulosa de acuerdo con el procedimiento descrito en la aludida patente de Bunding, fué mezclada en cantidad de 1 g. con 100 ml. de agua destilada. A la resultante solución se añadió 1 g. de tiourea, ajustándose tal solución a un pH de 6,5 con una solución de hidróxido sódico al 20%.

30.-

251452



20

5.- Esta mezcla fué calentada a una temperatura de 100°C. durante un período de 6 horas, enfriándose seguidamente y filtrándose a través de un filtro de vidrio aglutinado con algún medio. El precipitado así obtenido fué lavado con agua en cantidad tal que se aumentase el volumen de filtrado a 100 ml. El precipitado, que era relativamente inactivo con relación a la actividad de la ACTH, fué eliminado.

10.- A 50 ml. del anterior filtrado se añadieron 12 ml. de una solución acuosa al 5% de acetato de cinc conteniendo 2 moléculas-gramo de agua de hidración. La solución resultante se ajustó a un pH de 7,5 con una solución de hidróxido sódico al 3%. El precipitado así formado (cinc-ACTH) fué separado del líquido sobrenadante por filtración. El precipitado separado fué suspendido en 5 ml. de agua y la mezcla resultante fué ajustada a un pH de 5 con ácido acético helado.

15.- EJEMPLO XI

Se empleó el siguiente método para la preparación de una suspensión acuosa de cinc-ACTH-tanato adecuada para administración parentérica.

20.- A 50 ml. de una mezcla de cinc-ACTH preparada de acuerdo con el método del Ejemplo X, se añadieron 24 ml. de una solución acuosa al 1% de ácido tánico. La mezcla resultante fué ajustada a un pH de 6 con una solución de hidróxido sódico al 3%.

25.- A esta mezcla se añadieron 24 ml. de una solución acuosa de cisteína al 1%, ajustándose la mezcla resultante a un pH de 6. Seguidamente se agregaron 2 ml. de glicerina y 0,6 g. de fenol a la mezcla, juntamente con una cantidad de agua suficiente para formar un volumen total de 120 ml.

30.- La resultante suspensión fué introducida en ampollas de 2 ml. cubiertas con nitrógeno, selladas y sometidas al autoclave a una presión de 15 lpc durante un período de 15 minutos para esterili-

251452



zar.

El preparado ya completado fué analizado para la determinación de la actividad de la ACTH mediante el procedimiento de ensayo subcutáneo USP. Los resultados indicaron que el preparado de las ampollas contenía 76,1±5,8 unidades USP por ml.

5.-

Prácticamente, toda la actividad de la ACTH estaba contenida en el complejo insoluble, según lo evidencia un resultado analítico de menos de 2 unidades USP de ACTH en el flúido sobrenadante filtrado.

10.-

La fórmula del anterior preparado de ACTH, sobre la base de la cantidad de ingrediente por ml. de suspensión, era como sigue:

<u>Ingrediente</u>	<u>Concentración (por ml.)</u>
ACTH	76 unidades USP
Cinc	1,3 mg. (por ensayo)
Acido tánico	2 mg.
Cisteína	2 mg.
Glicerina	1,6%
Fenol	0,5%

15.-

EJEMPLO XII

20.-

También puede emplearse el siguiente método en la preparación de una suspensión acuosa de cinc-ACTH-tanato.

Se ajustó a un pH de 7,5 ACTH bovina preparada de acuerdo con el método del Ejemplo XI, en cantidad de 10 ml. A esta suspensión se añadieron 12 mg. de ácido tánico en 0,5 ml. de agua. Seguidamente se agregó a la mezcla 1 ml. de una solución conteniendo un 20% de glicerina y un 6% de fenol, juntamente con 0,5 ml. de una solución de cisteína al 4,8%. La fórmula de la preparación acabada era como sigue:

25.-

<u>Ingrediente</u>	<u>Concentración (por ml.)</u>
ACTH	80 unidades USP

30.-



20 AGO

251452

Cinc	2 mg.
Acido tánico	1 mg.
Cisteína	2 mg.
Glicerina	1,6%
Fenol	0,5%

5.-

EJEMPLO XIII

Se empleó el siguiente método en la preparación de una suspensión acuosa de cinc-ACTH-tanato.

10.-

Se mezcló con 25 ml. de agua destilada ACTH bovina preparada mediante tratamiento con oxixelulosa de acuerdo con el método de la citada patente de Bunding, en cantidad de 0,5 g. A esta solución se añadió un 0,25% de hidrocloreuro de piridoxina, ajustándose tal solución a un pH de 4,7. Esta mezcla fue calentada durante un período de 4-1/4 horas a una temperatura de 100°C. Seguidamente, se enfrió la mezcla y se diluyó a un volumen de 70 ml. con agua. La mezcla diluida fue ajustada a un pH de 6,5 con una solución acuosa de hidróxido sódico, separándose el precipitado así formado del líquido sobrenadante y eliminándose.

15.-

20.-

A los 70 ml. de filtrado se agregaron 560 mg. de acetato de cinc conteniendo 2 moléculas-gramo de agua de hidratación. La solución resultante fue ajustada a un pH de 7,5 con hidróxido sódico. Se centrifugó la suspensión y se eliminó el líquido sobrenadante producido. El precipitado separado fue suspendido en 70 ml. de agua.

25.-

A los restantes 67 ml. de la anterior suspensión se añadieron 11,2 ml. de una solución al 0,5% de ácido tánico, 14 ml. de una solución acuosa de cisteína al 2% y 30 ml. de una solución que contenía 0,7 g. de fenol y 2,5 ml. de glicerina. La mezcla resultante fue ajustada a un pH de 6 con una solución acuosa de hidróxido sódico al 3%.

30.-

Con esta mezcla se llenaron ampollas de 2 ml. que fueron

251452



selladas y sometidas al autoclave durante un período de 15 minutos a una presión de 15 lpc para su esterilización.

La fórmula de este preparado era como sigue:

	<u>Inгредиente</u>	<u>Concentración (por ml.)</u>
5.-	ACTH bovina	97,5 ± 9,2 unidades USP
	Cinc	1,1 mg. (por ensayo)
	Acido tánico	0,5 mg.
	Cisteína	2,3 mg.
	Glicerina	2%
10.-	Fenol	0,5%

La evaluación clínica en seres humanos demostró que este preparado ofrecía una duración de su actividad de unas 48 horas y una excelente eficacia, medida por excreción esteroide urinaria.

EJEMPLO XIV

15.- Lo siguiente representa una comparación de los preparados de cinc-ACTH-tanato descritos en los Ejemplos XI, XII y XIII.

20.- Sesenta ratas con la hipófisis extirpada fueron agrupadas al azar en tres partes de 20 ratas cada una. Cada uno de los grupos fué sometido a la administración subcutánea de 0,1 ml. de los preparados de ensayo. A intervalos adecuados, hasta 96 horas después de la inyección, fueron sacrificados grupos de cuatro ratas cada uno. En las ratas sacrificadas fueron medidos el ácido ascórbico adrenal, el peso de la glándula timo y el peso de las cápsulas suprarrenales.

25.- En la siguiente tabla se indican los resultados, en cuya tabla se identifican los preparados de acuerdo con el Ejemplo que describe el método de preparación de los mismos.

Promedio de ácido ascórbico adrenal - mcg/mgm.

<u>Preparado</u>	<u>7 horas</u>	<u>24 horas</u>	<u>48 horas</u>	<u>72 horas</u>	<u>96 horas</u>
X	4.03	2.59	2.20	2.93	2.04
XI	1.86	1.87	1.46	2.51	2.19
31.e XII	1.44	1.32	1.24	1.86	2.04

251452
251452



251452 1952

Peso medio del timo - mgn.

<u>Preparado</u>	<u>7 horas</u>	<u>24 horas</u>	<u>48 horas</u>	<u>72 horas</u>	<u>96 horas</u>
X	341	285	149	105	40
XI	294	283	90	62	39
5.- XII	300	174	80	38	34

Peso medio de las cápsulas suprarrenales - mgn.

<u>Preparado</u>	<u>7 horas</u>	<u>24 horas</u>	<u>48 horas</u>	<u>72 horas</u>	<u>96 horas</u>
X	24.7	27.8	37.9	33.1	42.4
XI	27.2	32.9	39.9	37.1	45.4
10.- XII	27.1	36.5	47.4	42.3	48.1

Aunque en la descripción anterior se han presentado varias formas de esta invención con bastante detalle a efectos ilustrativos, es evidente para los técnicos en la materia que esta invención es susceptible de otras formas y que muchos de aquellos detalles pueden variarse sin apartarse del concepto básico y esencia de la invención.

N O T A

En resumen: la Patente de Invención cuyo registro se solicita, recaerá sobre las siguientes reivindicaciones:

20.- 1. Proceso para preparar un compuesto de corticotropín de acción prolongada, caracterizado porque comprende la fase de combinar en una solución acuosa corticotropín, ácido tánico, una sal de cinc y gelatina parcialmente hidrolizada para producir en la suspensión acuosa resultante un complejo de cinc-corticotropín-gelatinato, insoluble en agua.

25.- 2. Proceso para preparar un compuesto de corticotropín de acción prolongada, caracterizado porque comprende la fase de combinar en una solución acuosa de 20 a 500 unidades subcutáneas USP (Farmacopea de los EE.UU.) por ml. de corticotropín, de 0,1 a 2,5 mg. de ácido tánico por 100 unidades subcutáneas USP de corticotro-

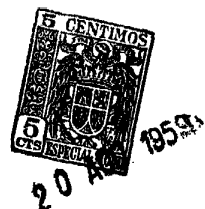
30.-

251452



- 5.- pín, una sal de cinc equivalente a por lo menos, 0,25 mg. de cinc por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín y de 6 a 60 mg. de gelatina parcialmente hidrolizada por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín, para producir en la resultante suspensión acuosa un complejo de cinc-corticotropín-gelatina-tanato, insoluble en agua.
- 10.- 3. Proceso para preparar un compuesto de corticotropín de acción prolongada, caracterizado porque comprende la fase de combinar una solución acuosa que contiene corticotropín y gelatina parcialmente hidrolizada con ácido tánico para obtener una suspensión acuosa de los mismos, combinando con dicha suspensión acuosa una sal de cinc soluble en agua para producir en la resultante suspensión acuosa un complejo de cinc-corticotropín-gelatina-tanato, insoluble en agua.
- 15.- 4. Proceso para preparar un compuesto de corticotropín de acción prolongada, caracterizado porque comprende la fase de combinar una solución acuosa que contiene corticotropín y gelatina parcialmente hidrolizada con una sal de cinc soluble en agua, ajustar la resultante suspensión a un pH alcalino y combinar con la suspensión ajustada ácido tánico para obtener en la resultante suspensión acuosa un complejo de cinc-corticotropín-gelatina-tanato, insoluble en agua.
- 20.- 5. Proceso para preparar un compuesto de corticotropín de acción prolongada, caracterizado porque comprende la fase de combinar en una solución acuosa de 20 a 500 unidades subcutáneas USP por ml. de corticotropín, de 0,1 a 2,5 mg. de ácido tánico por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín, una sal de cinc soluble en agua equivalente a 0,5 - 2,0 mg. de cinc por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín, de 6 a 60 mg. de gelatina parcialmente hidrolizada por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín y de 0,2 a 2,0 mg. de cisteína por 100 unidades subcutáneas USP ^{de} corticotropín, para obtener en la resultante suspensión acuosa por lo menos una porción de tales corticotropín, cinc, gelatina y tanato en forma de un complejo
- 30.-

251452



de cinc-corticotropín-gelatina-tanato, insoluble en agua.

- 5.- 6. Proceso para preparar un compuesto de corticotropín de acción prolongada, caracterizado porque comprende la fase de combinar en una solución acuosa corticotropín bovino, ácido tánico y una sal de cinc para producir en la resultante suspensión acuosa un complejo de cinc-corticotropín-bovino-tanato, insoluble en agua.
- 10.- 7. Proceso para preparar un compuesto de corticotropín de acción prolongada, caracterizado porque comprende la fase de combinar en una solución acuosa de 20 a 500 unidades subcutáneas USP por ml. de corticotropín derivado de tejido pituitario bovino, de 0,1 a 2,5 mg. de ácido tánico por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín y una sal de cinc equivalente a por lo menos 0,1 mg. de cinc por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín, para producir en la resultante suspensión acuosa un complejo de cinc-corticotropín bovino-tanato, insoluble en agua.
- 15.- 8. Proceso para preparar un compuesto de corticotropín de acción prolongada, caracterizado porque comprende la fase de combinar en una solución acuosa de 20 a 500 unidades subcutáneas USP por ml. de corticotropín derivado de tejido pituitario bovino, de 0,1 a 2,5 mg. de ácido tánico por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín y una sal de cinc soluble en agua equivalente a 0,5 - 2,0 mg. de cinc por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín para producir en la resultante suspensión acuosa un complejo de cinc-corticotropín-tanato, insoluble en agua.
- 20.- 9. Proceso para preparar un compuesto de corticotropín de acción prolongada, caracterizado porque comprende la fase de combinar en una solución acuosa de 20 a 500 unidades subcutáneas USP por ml. de corticotropín derivado de tejido pituitario bovino, de 0,1 a 2,5 mg. de ácido tánico por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín y una sal de cinc soluble en agua, equivalente a 0,5 - 2,0 mg. de cinc
- 25.-
- 30.-

251452



por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín, y de 0,2 a 2,0 mg. de cisteína por 100 unidades subcutáneas USP de corticotropín, para producir en la resultante suspensión acuosa un complejo de cinco-corticotropín-gelatina-tanato, insoluble en agua.

5.- 10. Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "PROCESO PARA PREPARAR UN COMPUESTO DE CORTICOTROPIN DE ACCION PROLONGADA".

Todo conforme queda descrito en la presente memoria, que consta de veinticinco páginas escritas a máquina, por una sola cara.

Madrid, 14 de agosto de 1959

ALFONSO UNGRIA