



19	ES	21	NUMERO	450728	10	A3
		22	FECHA DE PRESENTACION	14-8-76		

PATENTE DE INTRODUCCION

47	FECHA DE PUBLICIDAD	61	CLASIFICACION INTERNACIONAL	AGIK
----	---------------------	----	-----------------------------	------

54	TITULO DE LA INVENCIÓN	PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACION DE GLUCAGON DE EFECTO PROLONGADO.	
----	------------------------	---	--

66	PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION	ELI LILLY AND COMPANY, residente en Indianapolis - Indiana - U.S.A.	
----	---	---	--

71	SOLICITANTE (S)	LABORATORIOS LEO, S.A.	
----	-----------------	------------------------	--

	DOMICILIO DEL SOLICITANTE	Avda. Pio XII - 99 MADRID	
--	---------------------------	---------------------------	--

72	INVENTOR (ES)		
----	---------------	--	--

73	TITULAR (ES)		
----	--------------	--	--

74	REPRESENTANTE	D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU	
----	---------------	----------------------------	--

1 La presente invención trata de un procedi-
miento de prolongación del efecto biológico del glucagón.

5 Este se logra según indica la invención yo-
dando el glucagón para formar un glucagón químicamente
modificado, con un promedio de unos 5 átomo-gramos de
10 iodo por mol de glucagón.

 El procedimiento indicado en la invención
se caracteriza por lo que consta en la parte determinan-
te de la reivindicación Nº 1.

10 La molécula de glucagón contiene dos restos
de tirosina en su secuencia aminoácida. Se supone que es-
tos restos son los puntos donde preferentemente ocurre el
yodado. Se sabe que la tirosina misma reacciona rápidamen-
te con los medios yodantes convencionales, formando pri-
meramente 3-yodotirosina y luego 3,5-diyodotirosina, se
15 supone que ocurre una reacción similar en la molécula de
glucagón, de manera que el yodado modifica los grupos de
tirosina presentes. Pero cabe señalar que no es la inten-
ción limitar esta invención a ninguna teoría o mecanismo
de reacción especial, ni a ninguna estructura especial
20 de producto.

 El procedimiento por el cual se efectúa el
yodado no es crítico para la invención. Cualquier reac-
tivo apto que pueda efectuar una adición de yodo es satis-
25 factorio. El monocloruro de yodo, triyoduro de calio, una x

1 una combinación de un yoduro con cloramina T, etc. con
medios yodantes apropiados, siendo el preferido el mono-
cloruro de yodo. Bajo las circunstancias elegidas para la
reacción, el yodado será normalmente estoiquiométrico, ra-
5 zón por la cual en general se emplea solamente la cantidad
de medio yodante necesaria para provocar el grado de yoda-
do que se desea para la molécula de glucagón.

Tampoco son críticas la temperatura y la pre-
sión durante el proceso de yodado, aunque la temperatura
no debe ser tan alta que produzca la descomposición del
10 glucagón. Generalmente se trabaja a temperatura ambiente
o algo inferior, preferentemente entre -10 y $+10^{\circ}\text{C}$. En la
mayoría de los casos se efectúa el yodado a la presión de
una atmósfera, aunque también se puede utilizar una pre-
15 sión superatmosférica.

El medio de solución eventualmente empleado
tampoco es una parte crítica de la reacción yodante. Se
puede emplear cualquier medio de reacción que sea inerte
frente a los reactivos. Además la yodación puede efectuar-
20 se con la presencia en el medio de glucagón relativamente
insoluble en forma de suspensión.

Tampoco es crítico el pH del medio de reac-
ción. El yodado puede efectuarse en un medio ácido, neutro
o alcalino, pero es preferible trabajar con un medio leve-
25 mente alcalino, generalmente con un pH de 7,5 a 9,0.

1 El tiempo de reacción debe tener la duración suficiente como para asegurar el grado de yodado deseado, variando lógicamente mucho según las demás condiciones elegidas para la reacción.

5 Como esta invención tiene por objeto prolongar el efecto biológico del glucagón con una modificación química, la magnitud de la dosis de glucagón yodado se mide en cantidades proporcionales al glucagón natural. La dosis de glucagón yodado administrada oscilará por eso general-
10 mente entre 0,1 y 100 microgramos/kg.

Ademas la dosificación puede ser simple o acumulativa. Esta es la dosificación compuesta de varias dosis simples, cada una de las cuales es administrada antes de que la anterior haya dejado de actuar.

15 El glucagón yodado se administra generalmente siguiendo los métodos usuales para la administración de glucagón, que comprenden las formas parenterales acostumbradas, por ej. administración endovenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. Al comparar el efecto biológico del glucagón natural con el del glucagón yodado hay
20 que administrar ambas combinaciones por el mismo método, ya que la administración endovenosa generalmente produce un efecto más rápido de duración más corta, la intraperitoneal ocupa un lugar intermedio, mientras que la inyección
25 subcutánea e intramuscular tiene un efecto relativamente

1 más lento de mayor duración.

Los siguientes ejemplos ilustran el procedimiento indicado en la invención, demostrando el efecto biológico prolongado del glucagón yodado en comparación con el glucagón natural.

5 EJEMPLO I

350 Mg. (100 micromol) glucagón cristalínico se disolvieron a 0°C en una concentración de 5 mg./mililitro en 0,2 M solución tampón de HCl de glicina a un pH de 3,0. Durante el transcurso de unos 5 minutos se incorporo a la solución de glucagón gota a gota y agitando una solución de 0,2 M de 0,8 milimol monoclóruo de yodo (ICl). Transcurridos 3 minutos más se destruyó el excedente de I₂ agregando 50 microlitos de mercaptoetanol.

15 De inmediato se hizo pasar a la solución por un tubo de "Sephadex G-10" de 5 x 60 cm. en 1 M ácido acético. La primera fracción del efluente absorbente de rayos ultravioleta que quedó libre de electrólitos fué liofilizada, dando 280 mg. (un rendimiento de 80%) de glucagón yodado blanco, con un contenido de 3,96 átomo-gramos de yodo por mol.

20 EJEMPLO II

Una cantidad de 20 micromol de glucagón fué suspendida en 4 ml. solución tampón de 0,05 M citratofosfato a 0°C y un pH de 6,0. A esta suspensión agitada se incorporaron 80 micromol ICl, agitándose dicha suspen-

1 sión a 4°C hasta que desapareció el color amarillo pálido
del yodo. La mezcla de reacción fué dializada durante
24 horas con 2 veces volumen 1000 0,01 M acetato de amonio
a un pH de 5,0. El sedimento blanco formado dentro del
5 depósito del dializador fué recogido por centrifugado, disuelto
en 1M ácido acético y hecho pasar por un tubo "Sephadex G-10"
de 2,5 x 60 cm. La fracción de proteína fué liofilizada,
formándose glucagón yodado con un rendimiento de 90% y un
contenido de yodo de 3,5 átomo-gramos por mol.

10 EJEMPLO III

 Se disolvió una cantidad de 5 milimol de glucagón
cristalínico en 5 M HCl de guanidina a 0°C. El pH de la
solución se fijó en 8,5 añadiendo 0,2 M de solución tampón
de glicina. Se incorporó a la solución de glucagón una
15 solución de 20 milimol ICl en cantidades cada vez mayores,
aunque pequeñas, de una microbureta en un período correspondiente
a un equivalente de yodo cada 5 minutos. No se observó ningún
excedente de I₂ en la prueba de almidón. Durante la reacción se
mantuvo el valor pH de la solución en 8,0-8,5 con la incorporación
20 de una solución tampón. Se dializó de inmediato la mezcla de
reacción durante 16 horas frente a un volumen 1,000 de 0,1 M
solución tampón de acetato a un pH de 5,0. Transcurridos 30 minutos
se formó un sedimento blanco dentro de la membrana. El
25 contenido del depósito del dializador fué liofilizado y el
polvo seco disuelto en 1 M ácido acético y pasado por

1 un tubo "Sephadex G-10" de 2,5 x 60 cm. La fracción de
proteína fué liofilizado, formandose glucagón yodado
con un contenido de unos 4 átomo-gramos de yodo por mol.

5 COMPARACION DE LOS EFECTOS BIOLOGICOS DEL GLUCAGON YO-
DADO CON LOS DEL GLUCAGON NATURAL.

A. Efecto contráctil sobre el corazón y sus latidos.

10 El efecto biológico del glucagón yodado fué
comparado con el del glucagón natural en cuanto al efecto
contráctil sobre el corazón y sus latidos.

Se emplearon cuatro perros para el experimen-
to. Fueron anestesiados con fenobarbital, vagotomizados y
dotados de aparatos medidores de latidos y de la fuerza
15 contráctil del corazón. Se obtuvo una respuesta a las
dosis acumulativas, midiéndose los parámetros a diversos
intervalos durante tres horas después de la administración
de la última dosis del preparado glucagónico. En la dosi-
ficación acumulativa no se espera la respuesta completa a
20 la dosis anterior, sino que se administra una nueva dosis
ni bien la respuesta a la dosis inmediata anterior
haya alcanzado una "meseta" (plateau), continuándose así
hasta que el animal haya recibido la cantidad acumulativa.
El experimento fué realizado en dos etapas. En la primera,
25 dos perros fueron tratados con glucagón natural; otros dos,

1 con glucagón yodado. La segunda etapa fué una repetición del mismo procedimiento, pero invirtiendo los perros.

El glucagón yodado empleado en el experimento contenía unos 4 átomo-gramos de yodo por molécula.

5 Las tablas I y II indican los resultados obtenidos. La tabla I refleja el efecto biológico del glucagón yodado comparado con el glucagón normal. La tabla II ilustra el marcado prolongamiento del efecto biológico del glucagón modificado con yodo.

10

TABLA I

Fuerza relativa del glucagón natural y del glucagón yodado

15	Dosis acumulada microgramo/kg	Δ latido/minuto		Δ fuerza contráctil mm	
		C ^a	IG ^b	G	IG
	0,5	+ 2	+ 2	0,0	0,0
	1	+ 5	+ 5	+0,2	0,0
20	2	+10	+10	+0,5	+0,4
	4	+30	+32	+2,0	+2,0
	8	+55	+60	+3,3	+4,3
	16	+70	+85	+4,1	+5,7
	32	+82	+100	+4,6	+6,3

a - glucagón natural

25 b - glucagón yodado

1

TABLA II

5

Efecto prolongado del glucagón yodado comparado con el
glucagón natural con 32 microgramos/kg. de dosis acumulada

10

Tiempo min	Latidos, % de máximo ^a		Fuerza contráctil, % de máximo ^a	
	G ^b	IG ^c	G	IG
5	95	98	85	98
10	91	100	43	92
20	72	97	- 8	68
30	45	90	-13	50
40	25	85	-17	38
50	10	80	-18	28
60	3	73	-15	23
90	2	62	-22	10
120	4	60	-20	7
180	3	52	-12	0

15

20

a - respuesta máxima de la tabla I

b - glucagón natural

c - glucagón yodado

25

La tabla III muestra el efecto - en conejos -
del glucagón natural y del glucagón I, I₂, I₃, I₄ e I₅ so-
bre la cantidad de glucagón presente después de intervalos

1 variados hasta 4 horas después de la inyección del glucagón
o del glucagón modificado con yodo. Todos los conejos reci-
bieron tratamiento previo de cortisona, tras lo cual se les
inyectó en forma subcutánea 8 microgramos/kg. glucagón o
5 glucagón modificado. Los resultados de la tabla III indican
asimismo que el prolongamiento del efecto hiperglicémico es
directamente proporcional el grado de yodado.

TABLA III

10

Efecto hiperglicémico

15	Tiempo horas des- pués de la inyección	Aumento promedio de glucosa sanguínea, mg/100 ml. *					
		G	IG	I ₂ G	I ₃ G	I ₄ G	I ₅ G
	0,5	124(104)	129(16)	143(32)	137(48)	146(80)	136(64)
	1	147	185	212	220	220	224
	2	55	114	190	248	255	264
	4	-10	6	23	60	94	159

20

G: glucagón, IG: glucagón monoyódico, I₂G: glucagón diyódico, I₃G:
glucagón triyódico, I₄G: glucagón tetrayódico, I₅G: glucagón pen-
tayódico.

*

Las cifras entre parétesis se refieren a la canti-
25 dad de conejos estudiados.

1 C. Reducción del contenido aminoácido sanguíneo.

Otro método para la comparación de la duración del efecto de diversos preparados glucagónicos se basa en la
5 reducción del contenido aminoácido sanguíneo, Bromer y Chance, Diabetes 18, 748 (1969). La tabla IV ilustra el resultado de la comparación del efecto del glucagón y del glucagón tetrayódico administrados en forma subcutánea, a conejos, 50 microgramos/kg. También aquí es evidente el efecto del yodado sobre la
10 acción biológica del glucagón.

TABLA IV

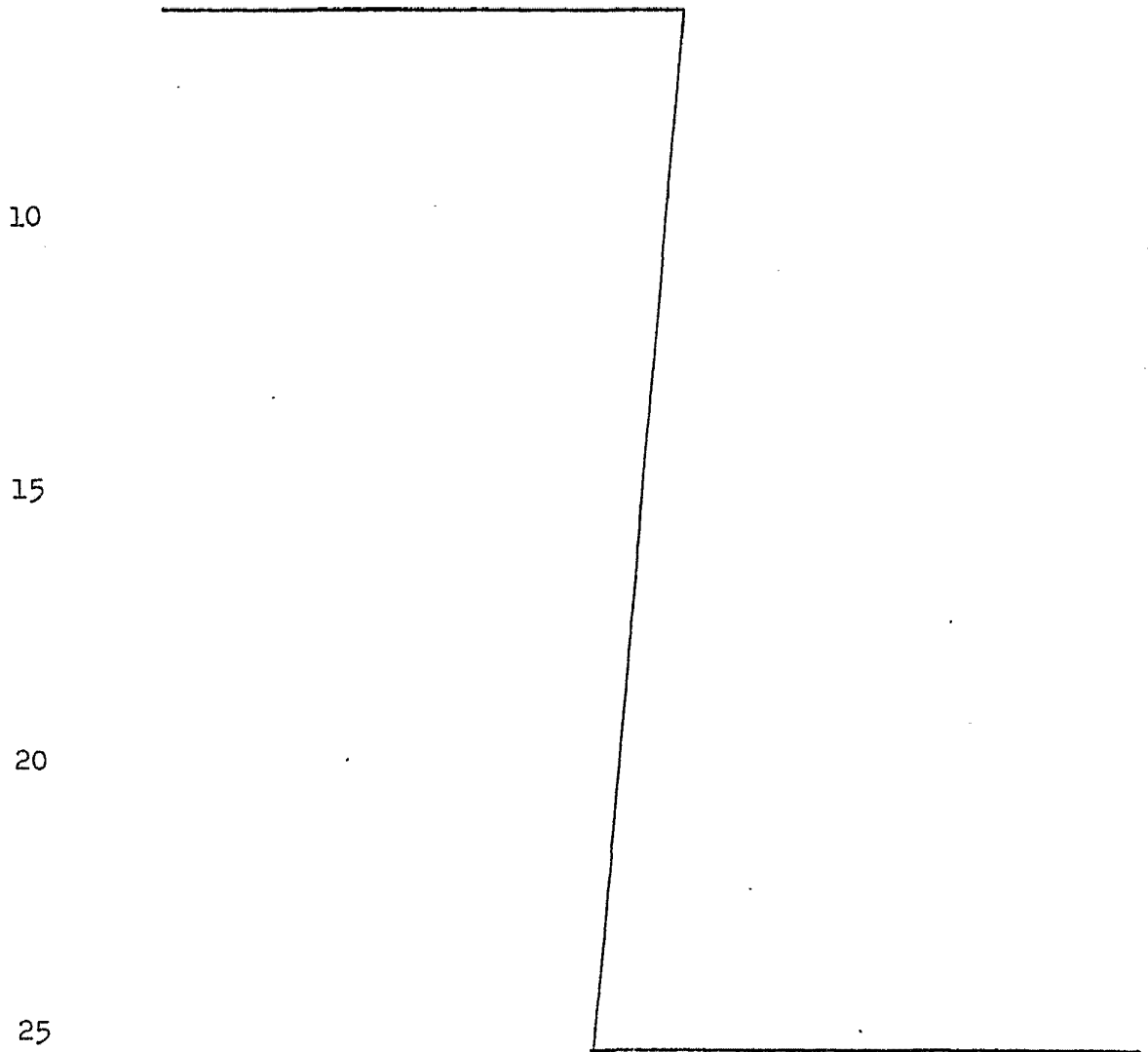
Reducción del contenido aminoácido sanguíneo

15

Tiempo horas des- pués de la inyección	<u>% aminoácido sanguíneo en comparación con la concen- tración inicial *</u>		
	NaCl (16)	Glucagón (10)	Glucagón I ₄ (10)
0	100	100	100
20	93	57	47
3	90	68	41
5	85	87	47

* Las cifras entre paréntesis indican la cantidad
25 de conejos estudiados.

1 De los resultados que preceden se desprende
que el efecto biológico del glucagón se mejora considera-
blemente con la modificación química de la estructura glu-
cagónica con la incorporación de hasta 5 átomo-gramos de yo-
do.
5 do.



1 REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de fabricación de glucagón de efecto prolongado, caracterizado por que se yoda el glucagón con una cantidad suficiente de un medio yodante para la formación de un glucagón químicamente modificado con una cantidad promedio de yodo de hasta 5 átomo-gramos, preferentemente 2-4 átomo-gramos de yodo por molécula de glucagón.

2. Procedimiento indicado en la reivindicación 1, caracterizado por que el yodado se efectúa en un medio alcalino.

3. Procedimiento indicado en la reivindicación 2, caracterizado por que el yodado se efectúa a un pH alrededor de 7,5 - 9,0.

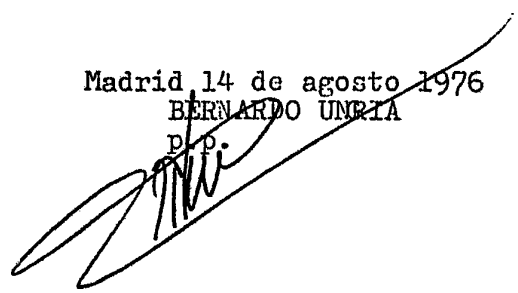
4. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Introducción que se solicita: PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACION DE GLUCAGON DE EFECTO PROLONGADO.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de trece páginas mecanografiadas.

Madrid 14 de agosto 1976

BERNARDO UNBIA

D. P.



25

ME