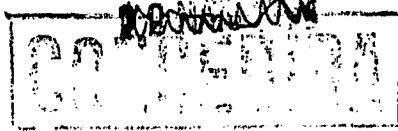




ESPAÑA



**PATENTE DE INTRODUCCION**

19	ES	11	NUMERO	10	A3
		21	<b>1451358</b>		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			8-9-76		

**20 JUL. 1978**

Se inscribe en el Registro de Patentes con el número que figura en el presente documento y en el contenido de la Memoria adjunta.

*R*

47	FECHA DE PUBLICIDAD	21	CLASIFICACION INTERNACIONAL
			A61K

54	TITULO DE LA INVENCIÓN
MEJORAS INTRODUCIDAS EN PREPARADOS INYECTABLES DE GLUCAGON.	

59	PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION
Novo Terapentisk Laboratorium A/S, firma de origen danés.	

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 se refiere a soluciones de  
glucagon estables neutras o casi neutras y a la preparación  
de las mismas. Así, la invención se refiere en particular a:  
soluciones acuosas de glucagon inyectables estables así como  
5           a un procedimiento para la preparación de tales soluciones  
de glucagon.

10           Las preparaciones de glucagon para inyección se dis-  
tribuyen comercialmente en general en forma de un envase que  
contiene el polvo de glucagon seco y otro envase que contie-  
ne un medio de inyección ácido adecuado. Debido a la débil  
estabilidad de las soluciones de glucagón ácido, los anterio-  
res polvo y medio no se mezclan hasta el momento inmediata-  
mente anterior a su uso. Al mezclar el polvo y el medio de  
inyección se obtiene una solución ácida que puede ser inyec-  
15           tada. Debido a que el glucagon, que posee un punto isoeléct-  
rico de aproximadamente pH 7, precipita en un intervalo al-  
rededor de ese valor del pH, es necesario que la solución  
de glucagon sea ácida.

20           Frecuentemente se considera necesario inyectar gluca-  
gon rápidamente y por eso no resulta práctico tener que mez-  
clar el polvo de glucagon y el medio de inyección antes de  
su uso. Además, la acidez de la solución da motivo a incre-  
mentar el dolor cuando se inyecta la solución.

25           De acuerdo con la presente invención se proporciona  
una solución acuosa inyectable de glucagon estable que com-  
prende glucagon en una cantidad de 0,1 a 5 mg por ml junto  
con una cantidad estabilizadora y solubilizante de un deter-  
gente.

30           Los detergentes que son capaces de proporcionar so-  
luciones estables y neutras o casi neutras de glucagon pue-

1 den caracterizarse en general como compuestos que se unen  
al glucagon a través de grupos hidrófobos y que tienen gru-  
pos hidrófilos en posiciones cercanas a las moléculas de agua  
que le rodean en la solución acuosa.

5 Hay muchos detergentes eficaces como aditivos para  
la preparación de soluciones de glucagon neutras o casi neu-  
tras, entre otros los compuestos de amonio cuaternario con  
propiedades detergentes, incluyendo los compuestos de amonio  
10 cuaternario en los cuales el átomo de nitrógeno es parte de  
una estructura cíclica. Los detergentes aniónicos y catióni-  
cos estabilizadores y solubilizadores se pueden caracterizar  
como compuestos que se unen al glucagon a través de grupos  
hidrófobos y que debido a su carga negativa o positiva, res-  
pectivamente, proporcionan el complejo formado con un pH  
15 isoelectrico inferior o superior, respectivamente, al del  
glucagon libre, con lo que el punto de solubilidad mínima  
del glucagon se desplaza desde el intervalo de pH neutro a  
un pH inferior o superior, respectivamente. Los detergentes  
neutro pueden caracterizarse como compuestos que se unen al  
20 glucagon a través de grupos hidrófobos y que debido a sus  
grupos hidrófilos hacen soluble al compuesto.

Cuando se mezcla 1 ml de papillá de glucagon que  
contiene 2 mg de glucagon en solución de NaCl al 0,9% (pH =  
25 7,4) con 1ml de detergente en solución de NaCl al 0,9% (pH=  
7,4) se obtiene un efecto estabilizante y solubilizante cuan-  
do se usan detergentes aniónicos, por ejemplo arilsulfonato  
de alquilo G-3300 (Atlas), detergentes no iónicos, por ejem-  
plo el complejo polioxietilentalquileter urea Renex 35 (Atlas),  
y detergentes catiónicos, por ejemplo bromuro de cetiltrimet-  
30 tilamonio (cetrimida), cloruro de bencilcetildimetilamonio

1 (Rddalon) y cloruro de cetilpiridinio. Las palabras "Atlas"  
y "Renex" son Marcas Registradas.

5 Entre los anteriores agentes estabilizadores y solu-  
bilizantes, los detergentes iónicos son los más eficaces,  
particularmente aquellos que tienen un grupo alquilo supe-  
rior, por ejemplo un grupo cetilo como uno de los sustitui-  
yentes.

10 Así, según lo anterior, las soluciones acuosas de  
glucagon inyectables, estables, de la presente invención se  
caracterizan por comprender glucagon en una cantidad de 0,1  
a 5 mg por ml junto con una cantidad de un detergente esta-  
bilizante y solubilizante. En la práctica suele preferirse  
preparar y utilizar aquellas soluciones de glucagon que con-  
tienen de 1 a 2 mg de glucagon por ml.

15 Se ha visto que corrientemente es necesario emplear  
el detergente en una cantidad de al menos un quinto de la  
cantidad de glucagon. En muchos casos se ha visto que son  
útiles cantidades de detergentes de aproximadamente la mi-  
tad de la cantidad de glucagon pero pueden emplearse cantida-  
des mucho mayores de detergente, por ejemplo hasta aproxima-  
damente 100 veces la cantidad de glucagon.

20 Se ha visto que un detergente preferido es aquel en  
cuya molécula hay una o más cadenas laterales alifáticas ca-  
da una de las cuales tiene al menos 6 átomos de carbono, pre-  
feriblemente de 12 a 20 átomos de carbono.

25 Además entre los detergentes útiles se incluyen de-  
tergentes catiónicos, preferiblemente bases de amonio cuater-  
nario en los cuales al menos un sustituyente es una cadena  
alifática que tiene por lo menos 6 átomos de carbono, prefe-  
30 riblemente de 12 a 20 átomos de carbono. Entre los detergen-

1           tes catiónicos uno especialmente útil es la cetrimida (bro-  
muro de cetiltrimetilamonio) y así una solución de glucagon  
inyectable y estable útil puede comprender aproximadamente  
5           1 mg de glucagon por ml y aproximadamente 0,5 mg de cetrimi-  
da por ml.

Entre los detergentes aniónicos se prefieren especial-  
mente los alquilarilsulfónatos.

10           Las presentes soluciones acuosas estables de gluca-  
gon inyectables según la invención pueden prepararse reunien-  
do glucagon, agua y una cantidad estabilizante y solubilizan-  
te de un detergente, empleándose el glucagon en una canti-  
dad de 0,1 a 5 mg por ml.

15           En este proceso se prefieren emplear los tipos espe-  
cíficos de detergentes citados a continuación, particular-  
mente cetrimida, especialmente en la preparación de solucio-  
nes de glucagon que comprenden aproximadamente 1 mg de gluca-  
gon por ml y aproximadamente 0,5 mg de cetrimida por ml.

20           Dependiendo de la temperatura de almacenamiento y  
de la posibilidad de contacto entre las soluciones de glu-  
cagon almacenadas y los materiales que adsorben el detergen-  
te, por ejemplo materiales plásticos de ampollas o jeringas  
y pistones de goma en jeringas de vidrio, las presentes so-  
luciones de glucagon son estables y aún activas biológica-  
mente después de varios meses. Así, deberá ser evitado el  
25           almacenamiento de las soluciones en contacto con plásticos  
y materiales de caucho.

30           La investigación electroforética sobre papel muestra  
que la parte de glucagon en la solución se convierte en de-  
rivados con diferentes cargas eléctricas. Tales derivados se  
cree que son desamidoglucagones. Se ha visto que la desamida

1 ción se suprime a valores de pH ligeramente ácidos y los ex-  
perimentos con soluciones de glucagon que contienen cetrimi-  
da indican que tiene lugar un mínimo de desamidación a un  
pH entre 4 y 6.

5 El efecto estabilizante y solubilizante de los deter-  
gentes específicamente mencionados antes está ilustrado en  
los siguientes Ejemplos de los cuales el primer Ejemplo mues-  
tra por vía de comparación los resultados obtenidos cuando  
las soluciones de glucagon neutras de diferentes concentra-  
10 ciones se dejan a la temperatura ambiente sin adiciones es-  
tabilizantes y solubilizantes:

Ejemplo I

15 Se disuelve el glucagon en solución de NaCl al 0,9%  
a pH 9. La solución de NaCl 0,9% se utiliza para la dilución  
a varias concentraciones, y en cada caso se ajusta después  
el pH a 7,6. Se observa cada solución mantenida a la tempe-  
ratura ambiente:

Concentración de glucagon en mg por ml	Observaciones
1,00	} se forman cristales inmediatamente después del ajuste de pH
0,75	
0,50	
0,25	

Ejemplo II

30 Efecto de la adición de detergentes catiónicos a las papillas de glucagon. Concentración final 1 mg de glucagon por ml en solución de NaCl al 0,9% a pH 7,4. Las soluciones se almacenan a 20°C y a 4°C.

1

Concentración de detergente		Bromuro de cetiltrimetilamonio (cetrimida)		Cloruro de bencilcetil dimetilamonio (Rodalon)		Cloruro de cetilpiridinio	
		20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C
0,1	M	Solución	Soluc.	Soluc.	Soluc.	Soluc.	Detergente Insoluble
0,01	M	Solución	Soluc.	Soluc.	Soluc.	Soluc.	
0,002	M	Solución	Soluc.	Soluc.	Floculación	Soluc.	Soluc.
0,001	M	Solución	Cristales	Floculación	Floculación	Soluc.	Soluc.
0,0001	M	Cristales	Cristales	Cristales	Cristales	Cristales	Cristales

5

10

Ejemplo III

Variaciones en las concentraciones de glucagon y cetrimida

solución NaCl 0,9 ; pH = 7,4

Soluciones almacenadas a 20°C y 4°C

15

20

Conc. de glucagon	1mg/ml		0,5 mg/ml		0,2mg/ml		0,1 mg/ml	
	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C
2%/00	Solución	Solución	Solución	Solución	Solución	Solución	Solución	Solución
1%/00	Solución	Solución	Solución	Solución	Solución	Solución	Solución	Solución
0,5%/00	Solución	Solución	Solución	Solución	Solución	Solución	Solución	Solución
0,2%/00	Cristales	Pocos cristales Solución	Solución	Solución	Solución	Solución	Solución	Solución
0,1%/00	Cristales	Cristales	Solución	Solución	Solución	Solución	Solución	Solución

25

Ejemplo IV

Efecto de adición de detergentes aniónicos a solucio

30

1 nes de glucagon que contienen 1 mg de glucagon por ml en solución de NaCl al 0,9% a pH 7,4. Soluciones almacenadas a 20°C y 4°C

5

Concentración	laurilsulfato sódico	Concentración	Alquilsulfonato de alquilo G-3300 (Atlas)
			20°C                      4°C
0,1 M	Detergente insoluble	1%	Detergente insoluble
0,01 M	Solución turbia	0,5%	Solución              Solución
0,002 M	Cristales	0,2%	Solución              Solución
0,001 M	Cristales	0,1%	Solución              Solución
0,0001 M	Cristales	0,5 <sup>o</sup> /100	Cristales              Cristales
		0,2 <sup>o</sup> /100	Cristales              Cristales
		0,1 <sup>o</sup> /100	Cristales              Cristales

10

15

Se añade el detergente no iónico Renex 35 a una papilla de glucagon a pH 7,4 para conseguir una concentración de glucagon de 1 mg/ml y 1% de detergente. Se obtienen soluciones claras cuando se almacena a 20°C y a 4°C.

20

Se llevan a cabo experimentos con soluciones de glucagon que contienen cetrimida como sigue y con los resultados siguientes:

A. Se prepara una solución de glucagon neutra de 300 ml que tiene la siguiente composición:

25

Glucagon	1 mg por ml
NaCl	0,9%
Cetrimida	0,05%
pH	7,1

30

Se introduce esta solución en viales de 2 ml cubiertos (1 ml de solución por vial) que se cierran con membranas

1 de goma natural azul y se dejan a 4°C, 15°C, 25°C, 37°C y  
45°C. Estos viales se dejan derechos sin contacto entre so-  
luciones y tapas de goma.

5 B. Se prepara una solución de glucagon neutra de 300  
ml que tiene la siguiente composición:

Glucagon	1 mg por ml
ClNa	0,8%
acetato de Na	0,01 M
Cetrimida	0,05%
10 pH	7,2

Esta solución se introduce en jeringas de plástico  
disponibles y jeringas de vidrio disponibles con pistones de  
goma de butilo. Ambos grupos de jeringas se dejan a la ante-  
rior temperatura.

15 Las anteriores soluciones se investigan empleando  
los métodos siguientes:

1. El contenido en cetrimida de cada solución de glu-  
cagon se mide por medio de un método espectro fotométrico  
(A.V. Few & R.H. Ottewill, J. Colloid Science, 11, 34 (1956)).  
20 Los ensayos con glucagon y cetrimida a diversas concentracio-  
nes conocidas han mostrado que la presencia de glucagon no  
interfiere con la determinación de cetrimida.

2. Se determina el aspecto de las soluciones visual-  
mente (precipitación, aumento de la viscosidad).  
25

3. Se determina la absorción -UV a 276 nm y pH 2 so-  
bre la solución en viales después de diluir 10 veces.

4. Se mide el pH de las soluciones.

5. Se determina la actividad biológica de las solu-  
ciones sobre conejos.  
30

1

6. Se examinan las soluciones almacenadas en viales por electroforesis sobre papel empleando un aparato de electroforesis tipo LKB 3276-50 que se puede comprar de LKB A/B, de S 161,25 Bromma 1, Suecia, y un tampón (pH 6,0) que contiene fosfato de sodio 0,13 M y urea 7 M. La electroforesis y las operaciones siguientes se llevan a cabo en principio como ha sugerido F Sundby, J. Biol. Chem. 237, 3406 (1962) pero se evita la desnaturalización por el calor de las tiras de electroforesis.

5

10

Procediendo de esta manera se han encontrado bandas de proteínas relativamente claras (glucagon + derivados) con una distancia mutua de aproximadamente 3,0 cm (350 voltios, 22 horas). Debido a la interferencia de detergentes catiónicos se aísla primero el glucagon por precipitación con acetona.

15

20

Se investiga la capacidad de cristalización por un método que supone la cristalización del glucagon en un medio que comprenda 0,08% de glucagon y 2% de urea y con un pH de 6,8. De aquí el glucagon normalmente cristaliza en forma de cristales rombododecaédricos de un tamaño de aproximadamente 10 M.

25

Ya que la presencia de cetrimida previene la cristalización del glucagon es necesario primero aislar este último. El glucagon se aísla, pues, por precipitación con acetona. Se obtienen los siguientes resultados:

1 Concentración de cetrimida

30

1

Viales:

5

Temperatura de almacenamiento en °C	Contenido de ceftriaxona mg/ml		
	2 meses	4 meses	6 meses
4	0,40	0,38	0,39
15	0,40	0,39	0,37
25	0,40	0,41	0,38
37	0,39	0,41	0,40
45	0,41	0,41	0,37

10

Jeringas de vidrio

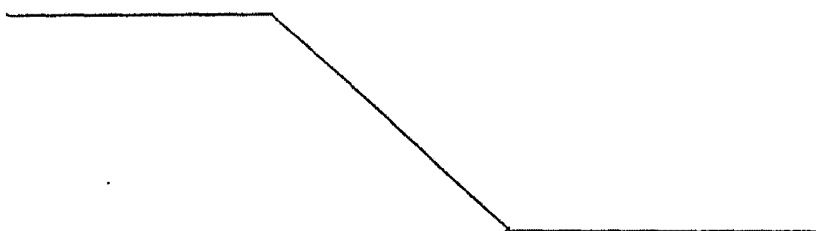
15

Temperatura de almacenamiento en °C	Contenido de ceftriaxona mg/ml				
	3 semanas	1,5 meses	3 meses	4 meses	6 meses
4	0,50	0,48	0,51	0,48	0,47
15	0,50	0,48	0,53	0,47	0,45
25	0,51	0,47	0,51	0,44	0,38
37	0,51	0,44	0,38	0,20	0,16
45	0,50	0,33	0,25	0,05	0,08

20

25

30



1

Jeringas de plástico

Temperatura de almacenamiento en °C	Contenido de ceftriaxona mg/ml				
	3 semanas	1,5 meses	3 meses	4 meses	6 meses
4	0,47	0,50	0,49	0,45	0,47
15	0,50	0,52	0,48	0,46	0,48
25	0,50	0,50	0,51	0,39	0,31
37	0,52	0,44	0,06	0,11	0,08
45	0,50	0,11	0,08	0,06	0,09

5

10

2. Aspecto de las soluciones de glucagon

Viales: Después de 9 meses las soluciones están claras, incoloras y fluidas a todas las temperaturas empleadas (4, 15, 25, 37 y 45°C)

15

Jeringas de vidrio

Temperatura de almacenamiento en °C	2 meses	6 meses	8 meses
4	solución clara	solución clara	solución clara
15	solución clara	solución clara	solución clara
25	solución clara	solución clara	solución clara ligeramente amarillenta
37	solución clara	solución clara amarillenta	solución amarillenta y ligera precipitación
45	solución clara	decoloración amarillenta y precipitados amarillos a los lados de la jeringa	

20

25

30

1

Jeringas de plástico

Temperatura de almacenamiento en °C	2 meses	6 meses	8 meses
4	Solución clara	solución clara	solución clara
15	solución clara	solución clara	solución clara
25	solución clara	solución clara	precipitación a los lados de la jeringa
37	solución clara	precipitación a los lados de la jeringa	precipitación a los lados de la jeringa
45	precipitación a los lados de la jeringa	precipitación a los lados de la jeringa	precipitación a los lados de la jeringa

5

10

15

20

25

30

Con objeto de poder evaluar la estabilidad de las soluciones de glucagon bajo condiciones extremas, se coloca un vial sobre una mesa de sacudidas a la temperatura ambiente y otro vial se somete a rotación continua a la misma temperatura, es decir, de forma que la solución se ponga en contacto repetido con el tapón de goma del vial.

Después de sacudir durante 6 días, la mayoría del glucagon ha precipitado y se ve que la concentración de cetrimida es de 0,19 mg/ml. Después de 35 días de rotación estacionaria se ve que hay un precipitado muy pequeño sobre un punto único y se ve que el contenido de cetrimida es 0,39 mg/ml.

### 3. Absorción UV

Los valores de extinción señalados a continuación son valores a 276 nm y pH = 2, obtenidos con una dilución de 10 veces la solución de glucagon:

---

1

Viales:

5

Temperatura de almacenamiento en °C	4 meses	7,5 meses
4	0,187	0,203
15	0,191	0,208
25	0,192	0,208
37	0,203	0,223
45	0,210	-

10

4. pH de las soluciones de glucagon

Viales:

15

Temperatura de almacenamiento en °C	pH		
	En cuanto se prepara	4 meses	9 meses
4	7,10	7,18	7,12
15		6,92	7,29
25		7,06	7,21
37		7,15	7,01
45		7,00	-

20

Jeringas de vidrio

25

Temperatura de almacenamiento en °C	pH		
	En cuanto se prepara	6 meses	8 meses
4	7,23	7,10	7,23
15		7,13	7,08
25		7,24	7,23
37		7,01	7,30
45		6,94	6,83

30

1

Jeringas de plástico

5

Temperatura de almacenamiento	p H		
	En cuanto se prepara	6 meses	8 meses
4	7,23	6,87	6,86
15		7,01	6,95
25		7,01	6,96
37		7,08	6,74
45		6,75	6,53

10

5. Actividad biológica

Los valores mostrados en la siguiente tabla son los radios de actividad determinados. Los límites de error (en %) se dan entre paréntesis. Como patrón se emplea glucagon Lot AB 66

15

Temperatura de Almacenamiento en °C	Periodo de almacenamiento				
	1 mes	4 meses	5 meses	6 meses	9 meses
4	0,88 (76-101)		0,88 (66-117)		
15		0,81 (68-97)			0,79 (60-104)
25		0,63 (52-77)			
37		0,32 (25-41)			
45				aproximadamente 0,05	

30

6. Electroforesis sobre papel

1 Los resultados dados en la siguiente tabla se estable-  
 cen en tantos por ciento del total de proteínas eluidas, de-  
 terminadas por medida espectrofotométrica ( $E_{625nm}$ ) de proteí-  
 na eluida color verde de cromo cresol (nm significa nanóme-  
 5 tros)

Viales:

Tiempo de al- macenamiento	Temperatura en °C	Banda 0 Glucagon	Banda 1	Banda 2	Banda 3
10  5 meses	4	94%	6%		
	15	91%	9%		
	25	85%	15%		
	37	49%	44%	5%	2%
	45	16%	63%	17%	4%
15  9 meses	4	85%	14%	1%	
	15	81%	17%	2%	
	25	68%	30%	2%	
	37	23%	64%	13%	
20  Solución fresca de Glucagon Lot AB 66		93,6%	6,4%		

En resumen, la Patente de Introducción que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

1.- MEJORAS INTRODUCIDAS EN PREPARADOS INYECTABLES DE GLUCAGON, obtenidas a partir de una solución acuosa inyectable de glucagon estable caracterizadas porque tal solución comprende glucagon en una cantidad de 0,1 a 5 mg por ml junto con una cantidad estabilizadora y solubilizadora de un detergente, en una cantidad de al menos 1/5 de la

*pey*

1 cantidad de glucagón, cuya molécula del detergente contiene una o más  
cadenas laterales alifáticas que tienen al menos 6 átomos de carbono  
y cuya cadena o cada cadena alifática tiene preferentemente de 12 a  
5 20 átomos de carbono, habiéndose previsto que el detergente sea ca-  
tiónico, constituido por una base de amonio cuaternario en el cual  
al menos un sustituyente es una cadena alifática que tiene al menos  
6 átomos de carbono y preferentemente de 12 a 20 átomos de carbono.

10 2.- MEJORAS INTRODUCIDAS EN PREPARADOS INYECTABLES DE GLU-  
CAGON, según la reivindicación 1 caracterizadas porque dicha solución  
comprende cetrimida (bromuro de cetiltrimetilamonio) como detergente  
en una proporción de aproximadamente 1 mg de glucagón por ml y apro-  
ximadamente 0,5 mg de cetrimida por ml.

15 3.- MEJORAS INTRODUCIDAS EN PREPARADOS INYECTABLES DE GLU-  
CAGON, según la reivindicación 1 caracterizadas porque el detergente  
es aniónico a base de un arilsulfonato de alquilo.

20 4.- MEJORAS INTRODUCIDAS EN PREPARADOS INYECTABLES DE GLU-  
CAGON, según reivindicaciones anteriores caracterizadas porque compren-  
de la reunión de glucagón, agua y una cantidad estabilizante y solubi-  
lizante de un detergente, empleándose el glucagón en una cantidad de  
0,1 a 5 mg por ml.

25 5.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha  
de recaer la Patente de Introducción que se solicita por: MEJORAS  
INTRODUCIDAS EN PREPARADOS INYECTABLES DE GLUCAGON.

---

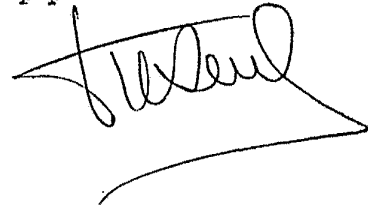
  
30

1                   . Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presen  
te memoria descriptiva, que consta de dieciocho páginas mecanografía  
das.

5                   Madrid, 8 Septiembre de 1.976

BERNARDO UNGRIA

D.P.



10

15

20

25



30