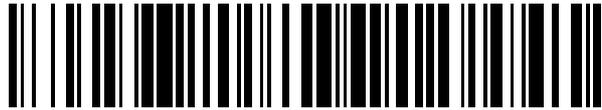


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 601**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/26**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2011 E 11779842 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2635296**

54 Título: **Nueva composición que comprende glucagón**

30 Prioridad:

**30.06.2011 US 201161503104 P**

**30.06.2011 US 201161503178 P**

**03.11.2010 US 409785 P**

**03.11.2010 US 409723 P**

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

**13.04.2015**

73 Titular/es:

**ARECOR LIMITED (100.0%)**

**2 Cambridge Science Park**

**Cambridge, Cambridgeshire CB4 0FE, GB**

72 Inventor/es:

**JEZEK, JAN y**

**DERHAM, BARRY KINGSTON**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 533 601 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

Nueva composición que comprende glucagón

Esta invención se refiere a formulaciones de glucagón y a su uso en terapia, en particular en la recuperación de una hipoglucemia.

5 **Antecedentes**

El glucagón es una hormona polipeptídica segregada por las células alfa de los islotes de Langerhans en el páncreas. En forma nativa es un polipéptido de cadena individual de 29 restos de aminoácidos, cuya secuencia se proporciona en Merck Index 10<sup>a</sup> edición (1983).

10 Fisiológicamente, el glucagón desempeña un importante papel en la regulación de los niveles de glucosa en la sangre y está implicado en los efectos glucogenolítico y gluconeogénico. Debido a su efecto glucogenolítico en el hígado, el glucagón se ha convertido en un tratamiento establecido de la hipoglucemia aguda, incluyendo la provocada por el tratamiento con exceso de insulina en los diabéticos. Además se sabe que el glucagón ejerce un efecto espasmolítico sobre los músculos lisos que también puede ser explotado para fines terapéuticos o de diagnóstico, por ejemplo en procedimientos de imagenología.

15 En la actualidad se comercializan composiciones de glucagón para inyección en forma de polvos liofilizados para reconstituir con un medio acuoso, a un pH de 2 - 3, poco antes de la administración. Sería mucho más conveniente en una situación de emergencia que el glucagón pudiera ser proporcionado en forma de preparado acuoso tal como una solución acuosa o un gel acuoso, listos para su administración inmediata. Desgraciadamente los intentos de desarrollar una formulación de este tipo han fracasado hasta ahora debido a la falta de solubilidad y a la inestabilidad de glucagón. Varios aspectos de la estabilidad afectan al glucagón en soluciones acuosas, incluyendo la agregación, la formación de fibrillas y la formación de geles. Además, el glucagón experimenta la desamidación de restos de glutamina, en particular a un pH 4 y por debajo del mismo y a un pH 7 y por encima del mismo. La solubilidad del glucagón mejora generalmente a muy bajo pH (pH < 3). Sin embargo, en tales composiciones ácidas los procesos hidrolíticos afectan a la estabilidad del glucagón y tales formulaciones también producen más dolor en la inyección.

Sin embargo se han propuesto en la técnica anterior diversas formulaciones acuosas de glucagón.

El documento GB1202607 reivindica una solución acuosa inyectable estable de glucagón que comprende glucagón en una cantidad de 0,1 a 5 mg por mL junto con una cantidad estabilizante y solubilizante de un agente tensioactivo. Los agentes tensioactivos aniónicos y catiónicos se describen como potencialmente adecuados, y entre los agentes tensioactivos catiónicos se prefieren las bases de amonio cuaternario en las que al menos un sustituyente es una cadena alifática que tiene al menos 6 átomos de carbono, preferiblemente de 12 a 20 átomos de carbono, especialmente la cetrimida (bromuro de cetiltrimetilamonio).

El documento WO99/47160 reivindica una solución acuosa de glucagón que comprende una cantidad estabilizante y solubilizante de un detergente que tiene al menos 2 cargas positivas, al menos 2 cargas negativas, o una combinación de al menos una carga positiva y una carga negativa, estando el péptido presente en una concentración de al menos aproximadamente 0,1 mg/mL, y con la condición de que el detergente no es dodecil fosfocolina.

El documento EP199992A1 (Eisai) describe el uso de cloruro de bencetonio y cloruro de benzalconio en composiciones de péptidos, para evitar la adsorción de los péptidos en el plástico o en el vidrio. Aunque el glucagón se menciona en este contexto en términos muy generales en la sección de descripción, no hay ningún ejemplo de trabajo con glucagón.

El documento WO2011049713A2 (Biodel) describe una formulación de glucagón estabilizada que contiene un agente tensioactivo, un mono o disacárido, en el que el agente tensioactivo y el sacárido están en una cantidad efectiva para estabilizar el glucagón, y en el que la osmolaridad es aproximadamente de 200 a 400 mOs y el pH está entre 2 y 8.

El documento WO99/24019A1(Orbon Corp.) se refiere a nuevos métodos para producir una formulación estable seca de productos farmacéuticos que puede ser reconstituida formando una solución líquida de concentración conocida con exactitud. En particular se refiere a métodos útiles en la estabilización y después la reconstitución de soluciones de fármacos para su aplicación en forma de colirio.

50 Steiner Solomon S. et al. (J. Diabetes Sci. Technol., 2010, 4, 1332–1337) describe un planteamiento para inmovilizar glucagón en solución que se realizó usando una combinación de un azúcar reductor, una lisolecitina y un alcohol para formar micelas y minimizar las interacciones glucagón-glucagón.

Los autores de la presente invención no tienen conocimiento de que ninguna de estas formulaciones haya llegado al mercado.

Los autores de la presente invención han inventado ahora una formulación de glucagón nueva con miras a eliminar o mitigar algunos o todos los inconvenientes de las formulaciones de la técnica anterior.

5 Un objetivo de la invención es proporcionar una formulación de glucagón que es adecuadamente estable a lo largo de un período de tiempo en almacenamiento o cuando la lleva el paciente en previsión de su uso en una emergencia. Otro objetivo de la invención es proporcionar una formulación de glucagón que es adecuadamente estable durante un período de tiempo en almacenamiento y se utiliza en la prevención de la hipoglucemia o de otra forma en el control efectivo de la diabetes cuando se administra a un paciente que también recibe tratamiento con insulina o un análogo de la insulina.

### Sumario de la invención

10 Así pues, y de acuerdo con la invención, se proporciona una composición acuosa que tiene un pH entre 4 y 7 que comprende (i) glucagón a una concentración de 0,05% a 0,5% p/v o más, y (ii) un agente tensioactivo catiónico elegido entre sales de benzalconio y sales de bencetonio como agente solubilizante en cantidad suficiente para disolver el glucagón en la solución, que comprende además un agente de modificación de la isotonicidad no cargado, y en donde la concentración global en la composición de las especies cargadas distintas de las que se originan del glucagón y el agente tensioactivo catiónico es menor que 150 mM.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Turbidez (405 nm) de composiciones acuosas producidas mezclando solución de glucagón/bencetonio con soluciones A - F. La concentración de cloruro de bencetonio fue 0,05% (p/v).

20 Figura 2. Turbidez (405 nm) de composiciones acuosas producidas mezclando solución de glucagón/ benzalconio con soluciones A - F. La concentración de cloruro de benzalconio fue 0,05% (p/v).

Figura 3. Turbidez (405 nm) de composiciones acuosas producidas mezclando solución de glucagón/bencetonio con soluciones A - F. La concentración de cloruro de bencetonio fue 0,025% (p/v).

Figura 4. Turbidez (405 nm) de composiciones acuosas producidas mezclando solución de glucagón / benzalconio con soluciones A - F. La concentración de cloruro de benzalconio fue 0,025% (p/v).

25 Figura 5. Turbidez (405 nm) de composiciones acuosas producidas mezclando solución de glucagón/bencetonio con soluciones A - F. La concentración de cloruro de bencetonio fue 0,01% (p/v).

Figura 6. Turbidez (405 nm) de composiciones acuosas producidas mezclando solución de glucagón /benzalconio con soluciones A - F. La concentración de cloruro de benzalconio fue 0,01% (p/v).

30 Figura 7. Turbidez (405 nm) de composiciones acuosas producidas mezclando solución de glucagón/bencetonio con soluciones A - F. La concentración de cloruro de bencetonio fue 0,005% (p/v).

Figura 8. Turbidez (405 nm) de composiciones acuosas producidas mezclando solución de glucagón/ benzalconio con soluciones A - F. La concentración de cloruro de benzalconio fue 0,005% (p/v).

Descripción detallada de la invención.

35 Como se usa en el presente documento, "glucagón" significa el polipéptido de 29 aminoácidos descrito en SEC ID N°: 1 o un polipéptido análogo o variante que tiene actividad de glucagón, concretamente la actividad anti-hipoglucémica. Las variantes específicas incluyen aquellos polipéptidos que tienen un pequeño número (por ejemplo 1, 2 o 3) de sustituciones de aminoácidos especialmente sustituciones conservadoras relativas a la secuencia de SEC ID No: 1. Los análogos incluyen también polipéptidos que comprenden la SEC ID N°: 1 o una secuencia variante antes mencionada. Por ejemplo los análogos incluyen polipéptidos que consisten en la SEC ID N°: 1 o una secuencia variante antes mencionada con una extensión N y/o C terminal, típicamente una extensión corta, por ejemplo de hasta 10 aminoácidos (por ejemplo hasta 5 aminoácidos) en los términos N y/o C. Los análogos incluyen también derivados de cualquiera de los polipéptidos anteriormente mencionados, tales como derivados diseñados para extender la duración de la acción o de la permanencia en la sangre tal como derivados que implican unión de uno o más restos de PEG al polipéptido (por ejemplo, en una o más de las posiciones de aminoácidos 21 y 24 del glucagón), o unión de restos de ácidos grasos (por ejemplo, ácidos grasos C4-C30) por acilación o alquilación de uno o más aminoácidos (por ejemplo, el aminoácido en la posición 10 del glucagón). Otros análogos pueden implicar la incorporación de aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos por ejemplo, ácido aminoisobutírico por ejemplo en una, dos, tres o cuatro de las posiciones 16, 20, 21 y 24 del glucagón.

50 Se describen ejemplos de análogos de glucagón en los documentos WO2010/ 011439, WO2009/155257, WO2009/ 155258, WO2009/099763, WO2009/058734, WO2009/058662, WO2008/101017, WO2008/086086 y WO2007/ 056362 .

En una realización, el glucagón empleado en la formulación tiene la secuencia de SEC ID No: 1.

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es el formado por la glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina, e histidina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas es aspartato y glutamato; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Las sustituciones dentro de estos grupos pueden ser consideradas como conservadoras. Son grupos de ejemplo de sustitución de aminoácidos conservadores: valina-leucina/isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato, y asparagina-glutamina.

El pH de la composición es adecuadamente de 4,5 a 6,5, por ejemplo, de 5 a 6 o de 4,5 a 5,5. Preferiblemente es aproximadamente pH 5,5. Una composición a tal pH normalmente no es dolorosa al inyectarla y tiene una estabilidad química del glucagón adecuada.

La concentración de glucagón está en el intervalo de 0,05 a 0,5% p/v (equivalente a 0,5 a 5 mg/mL). La concentración de glucagón puede estar adecuadamente en el intervalo de 0,1 a 0,5% p/v, por ejemplo de 0,1 a 0,2% p/v.

En una realización, el agente tensioactivo catiónico se elige entre las sales de bencetonio, por ejemplo, haluro de bencetonio, especialmente el cloruro. En otra realización, el agente tensioactivo catiónico se elige entre sales de benzalconio, por ejemplo, haluro de benzalconio, especialmente el cloruro.

Por ejemplo, la concentración de sal de benzalconio (basada en el cloruro de benzalconio, pero con una corrección correspondiente hecha para el uso de anión alternativo) puede ser de 0,001% a 0,05% p/v, por ejemplo de 0,01% a 0,05% p/v (por ejemplo de 0,01% a 0,03% p/v tal como de 0,01% a 0,025% p/v) o de 0,005 a 0,015% p/v. Otro intervalo de posible interés es de 0,05% a 0,20% p/v, por ejemplo de 0,10% a 0,20, particularmente de 0,10% a 0,15% p/v o (menos preferido) de 0,15% a 0,20%.

Por ejemplo, la concentración de sal de bencetonio (basada en cloruro de bencetonio, pero con una corrección correspondiente hecha para el uso de un anión alternativo) puede ser de 0,001% a 0,05% p/v, por ejemplo de 0,01% a 0,05% p/v (por ejemplo, de 0,01% a 0,03% p/v tal como de 0,01% a 0,025% p/v) o de 0,005 a 0,015% p/v. Otro intervalo de posible interés es de 0,05% a 0,20% p/v, por ejemplo de 0,10% a 0,15% p/v. Otra posibilidad es de 0,05% a 0,10% p/v o de 0,15 a 0,20% p/v.

La composición puede contener una mezcla de una sal de bencetonio y una sal de benzalconio. La concentración combinada de los agentes tensioactivos puede, en tal caso, ser adecuadamente de 0,001% a 0,05% p/v, por ejemplo de 0,01% a 0,05% p/v o de 0,005% a 0,015% p/v. Otro intervalo de posible interés es de 0,05% a 0,20% p/v, por ejemplo de 0,10% a 0,15% p/v.

En el caso de una solución, parece que una concentración adecuada de sal de benzalconio o sal de bencetonio es de 0,05 a 0,20% p/v, por ejemplo de 0,15 a 0,20% p/v.

En el caso de un gel parece que una concentración adecuada de sal de benzalconio o sal de bencetonio es de 0,001% a 0,05% p/v, por ejemplo de 0,01% a 0,05% p/v, por ejemplo de 0,01 a 0,03% p/v.

Adecuadamente, la composición contiene dicho agente tensioactivo catiónico en una cantidad en la que la relación de la concentración de glucagón/agente tensioactivo expresada como relación p/v es mayor que 5/1, por ejemplo, mayor que 7/1 por ejemplo, mayor que 10/1 o mayor que 25/1 o mayor que 50/1.

La composición acuosa es una solución.

Adecuadamente, una composición acuosa de glucagón en presencia de sal de bencetonio o sal de benzalconio de acuerdo con la invención que es una solución permanece como solución clara durante el almacenamiento a 2 - 8 °C, por ejemplo 4 °C, durante al menos un año, preferiblemente durante al menos 2 años. Esto significa que no pueden observarse signos visibles de precipitación, formación de fibrillas o formación de gel durante el almacenamiento. Adecuadamente, la composición acuosa de glucagón en presencia de la sal de bencetonio o sal de benzalconio de acuerdo con la invención permanece como una solución clara durante el almacenamiento a 25 °C durante al menos tres meses, preferiblemente al menos seis meses, más preferiblemente durante al menos un año. Esto significa que no pueden observarse signos visibles de precipitación, formación de fibrillas o formación de gel durante el almacenamiento.

Por tanto, adecuadamente la solución es una solución clara con viscosidad baja (por ejemplo, una viscosidad dinámica de menos de 20 cP a 25 °C).

En otro aspecto de la descripción, la composición acuosa es un gel, especialmente un gel claro.

Adecuadamente, la formación de especies relacionadas químicamente, por ejemplo, especies desamidadas u oxidadas, en la composición acuosa de glucagón en presencia de la sal de bencetonio o sal de benzalconio según la invención, permanece por debajo de 25%, preferiblemente por debajo de 10%, más preferiblemente por debajo de 5% durante el almacenamiento a 2 - 8 °C, p. ej. 4°C durante al menos tres meses, preferiblemente durante al menos un año, más preferiblemente durante al menos dos años. Con el fin de minimizar la formación de especies desamidadas, puede ser preferible que la composición sea un gel.

Sin limitarse por ninguna teoría, la tasa de desamidación reducida que aparentemente es una característica de las composiciones de gel en comparación con las composiciones en solución de la invención, puede atribuirse a la reducción de la movilidad de las moléculas de glucagón en este estado físico reduciendo así su propensión a desamidarse por reacción de los restos glutamina y asparagina con las moléculas de agua circundantes.

Adecuadamente, la formación de especies relacionadas químicamente, por ejemplo, especies desamidadas u oxidadas, en la composición acuosa de glucagón en presencia de la sal de bencetonio o sal de benzalconio según la invención permanece por debajo de 25%, preferiblemente por debajo de 10%, más preferiblemente por debajo de 5% durante el almacenamiento a 25 °C durante al menos tres meses, preferiblemente durante al menos un año. Con el fin de minimizar la formación de especies desamidadas, puede ser preferible que la composición sea un gel.

Puede ser conveniente ensayar las composiciones realizando estudios acelerados de estabilidad a 40 °C. Adecuadamente, la formación de especies relacionadas químicamente, por ejemplo especies desamidadas u oxidadas, en la composición acuosa de glucagón en presencia de la sal de bencetonio o sal de benzalconio según la invención, permanece por debajo del 25%, preferiblemente por debajo del 10%, más preferiblemente por debajo del 5% durante el almacenamiento a 40 °C durante al menos dos meses, preferiblemente durante al menos seis meses.

Adecuadamente, la concentración global de especies cargadas en la composición es baja. En el contexto de esta invención, una especie cargada se define como una entidad química que lleva al menos una carga bajo las condiciones de la composición, por ejemplo, catión sodio ( $\text{Na}^+$ ), anión cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) o un aminoácido tal como la histidina. La concentración global de especies cargadas, distintas de las que se originan del glucagón y el agente tensioactivo catiónico, en la composición es menor que 150 mM, por ejemplo menor que 100 mM, por ejemplo menor que 50 mM, por ejemplo menor que 25 mM. En la experiencia de los inventores, esto permite una más baja concentración de tensioactivo catiónico a utilizar con el fin de solubilizar el glucagón, manteniendo al mismo tiempo o incluso mejorando su estabilidad en solución.

En una realización, la composición está sustancialmente libre de especies iónicas (aparte del glucagón) que tienen una carga de más de 1. Por ejemplo, la composición está sustancialmente libre de especies iónicas (aparte del glucagón) que tienen una carga de 2, 3, 4 o más.

Adecuadamente, la composición está sustancialmente libre de agentes tensioactivos no iónicos tales como Tween 80, Tween 20 y agentes tensioactivos Pluronic.

Adecuadamente, la composición está sustancialmente libre de agentes tensioactivos iónicos, incluyendo agentes tensioactivos aniónicos, catiónicos y zwitteriónicos, aparte de un agente tensioactivo catiónico elegido entre las sales de benzalconio y las sales de bencetonio. Por ejemplo, adecuadamente la composición está sustancialmente libre de agentes tensioactivos elegidos entre SDS, desoxicolato, colato, estearato, fosfatidilcolina, CHAPS y cetrimida.

En este contexto, "sustancialmente libre" significa que dichas especies iónicas o agente tensioactivo no iónico o iónico están presentes en una concentración de menos de 1 mM, por ejemplo menor que 0,1 mM, por ejemplo menor que 0,01 mM.

Adecuadamente, la composición es aproximadamente isotónica. Por "aproximadamente isotónica" se entiende una tonicidad equivalente a la de aproximadamente NaCl 130 - 170 mM, especialmente aproximadamente NaCl 150 mM. La tonicidad de la composición se mantiene por la inclusión de un agente modificador de la tonicidad no cargado. Los ejemplos de agentes modificadores de la tonicidad no cargados incluyen polioles incluyendo azúcares y sacroalcoholes, por ejemplo elegidos entre 1,2-propanodiol, glicerol, manitol, sorbitol, xilitol, lactitol, sacarosa rafinosa y trehalosa, especialmente 1, 2-propanodiol o manitol. Otro ejemplo adecuado es trehalosa. Es deseable, pero no esencial, que la osmolaridad de la composición esté en el intervalo entre 150 y 500 mOsm/L, preferiblemente entre 250 y 350 mOsm/l. Los agentes de modificación de la tonicidad se añaden típicamente a una concentración de 50 a 500 mM, tal como de 100 a 300 mM, por ejemplo de 150 a 300 mM. Por ejemplo el 1,2-propanodiol o el manitol pueden añadirse en una concentración de aproximadamente 50 a 300 mM, tal como de 100 a 300 mM, por ejemplo de 150 a 300 mM. En otro ejemplo se puede añadir trehalosa en una concentración de aproximadamente 50-500 mM, tal como 100-300 mM, p.ej. 150-300 mM. Preferiblemente, el agente de modificación de la tonicidad no cargado es manitol o trehalosa (o una mezcla de los mismos), especialmente manitol.

Adecuadamente, las composiciones (es decir, soluciones, geles) de la invención comprenden un tampón para estabilizar el pH de la composición.

El tampón se puede elegir también para mejorar la estabilidad de las proteínas. En una realización, se elige un tampón que tenga un pKa próximo al pH de la composición; por ejemplo el acetato se emplea adecuadamente como

tampón cuando el pH de la composición está en el intervalo de 4,5 a 5,5, por ejemplo a una concentración de 1 a 20 mM, tal como de 2 a 10 mM, por ejemplo a una concentración de aproximadamente 5 mM.

Alternativamente, en otra realización, la composición de la invención se estabiliza aún más como se expone en el documento WO2008/084237, que describe una composición que comprende una proteína y uno o más aditivos, caracterizada porque el sistema está sustancialmente libre de un tampón convencional, es decir, un compuesto con un  $pK_a$  dentro de 1 unidad del pH de la composición en el intervalo de temperatura de almacenamiento de la composición pretendido. En esta realización, el pH de la composición se ajusta a un valor en el que la composición tiene una estabilidad máxima medible con respecto al pH; el uno o más aditivos (tampones desplazados) son capaces de intercambiar protones con la proteína y tienen valores de  $pK_a$  de al menos 1 unidad más o menos que el pH de la composición en el intervalo pretendido de la temperatura de almacenamiento de la composición. Manteniendo la proteína a un pH adecuado, en el valor, o próximo a él, en el que la estabilidad medible es máxima, en ausencia de un tampón convencional, puede aumentarse sustancialmente la estabilidad de almacenamiento de la proteína. En ciertas realizaciones, la estabilidad de almacenamiento, puede generalmente mejorarse aún más, posiblemente de forma sustancial, mediante el uso de aditivos que tienen un  $pK_a$  entre 1 y 5 unidades de pH, preferiblemente entre 1 y 3 unidades de pH, más preferiblemente de 1,5 a 2,5 unidades de pH, del pH de la composición acuosa en el intervalo de temperatura de almacenamiento de la composición pretendido, por ejemplo a 25 °C o a 2 - 8 °C, por ejemplo 4 °C.

Sin embargo, adecuadamente la concentración de cualquier tampón es tal que la concentración de especies iónicas cargadas en la composición se mantiene baja, y lo más adecuadamente dentro de los intervalos dados anteriormente.

Las composiciones (es decir, soluciones) de la invención pueden comprender también un antioxidante para reducir al mínimo la formación de especies oxidadas derivadas del glucagón. Por ejemplo, el antioxidante es metionina o glutatión, por ejemplo, utilizados en una concentración de hasta 5 mM, por ejemplo de 0,01 a 5 mM. En otro ejemplo, se puede utilizar hidroxitolueno butilado, por ejemplo en una concentración de hasta 5 mM, por ejemplo de 0,01 a 5 mM.

Las soluciones de la invención pueden comprender fenol con el fin de contribuir aún más al mantenimiento de la solubilización de glucagón. La cantidad de fenol puede ser de hasta 50 mM, por ejemplo de 1 a 50 mM, tal como de 5 a 30 mM, por ejemplo 5 mM o 15 mM o 30 mM.

Una realización específica que puede preverse es una composición de acuerdo con la invención con un pH de alrededor de 5,5, que comprende glucagón, cloruro de bencetonio como agente tensioactivo catiónico, manitol como agente de modificación de la tonicidad y acetato como tampón. También se proporciona una composición tal que comprende adicionalmente metionina como antioxidante y/o fenol.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona el uso de un agente tensioactivo catiónico elegido entre sales de benzalconio y sales de bencetonio como agente de solubilización para el glucagón en una composición como se describe en el presente texto.

También se proporciona un método de tratamiento de la hipoglucemia, que comprende administrar a un sujeto que la padece una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición como se describe en el presente texto. También se proporciona una composición como se describe en el presente documento para su uso como producto farmacéutico, especialmente para su uso en el tratamiento de la hipoglucemia. Por ejemplo, dicho tratamiento de la hipoglucemia es el tratamiento en una situación de emergencia. Alternativamente, la composición tal como se describe en el presente texto se utiliza en la prevención de la hipoglucemia o si no en el control efectivo de la diabetes cuando se administra a un paciente que también recibe tratamiento con insulina o un análogo de la insulina, por ejemplo como se describe en los documentos WO2004/060837A1 (Diobex) y WO2006 /004696A2 (Diobex).

Una cantidad de glucagón que es adecuada para la administración como dosis individual para el tratamiento de la hipoglucemia es 1 mg para adultos y 0,5 mg para menores. Un volumen correspondiente de la composición tal como se describe en el presente documento que es adecuado para la administración como una dosis individual para el tratamiento de la hipoglucemia es 1 mL para adultos y 0,5 mL para menores. Para un volumen menor, también pueden ser adecuadas dosis de mayor concentración, por ejemplo, 0,5 mL de una solución de 2 mg/mL. La invención no debe considerarse limitada a ninguna de estas cantidades y se pueden formular otras dosis de acuerdo con la invención, en caso adecuado.

También se proporciona un recipiente que contiene una dosis unitaria de la composición tal como se describe en el presente texto.

También se proporciona un inyector de un solo uso para la administración intramuscular, subcutánea o parenteral, que comprende un aparato de inyección y un recipiente que contiene una dosis unitaria de la composición como se describe en el presente texto, para ser inyectada.

Por ejemplo, la composición líquida de glucagón se puede introducir en una jeringa (por ejemplo, jeringa de 1 mL) compuesta de una aguja fijada, tapón de caucho inerte y émbolo (por ejemplo émbolo de polipropileno). La jeringa

que contiene el producto puede opcionalmente ser albergada en un autoinyector (montado alrededor de la jeringa) listo para el suministro automático de la dosis requerida.

5 También se proporciona un dispositivo de bombeo tal como una bomba de parche o una bomba de infusión que comprende un recipiente en comunicación fluida con una aguja, que contiene una dosis unitaria de la composición como se describe aquí para ser inyectada o infundida, y por lo tanto adaptado para inyectar o infundir dicha composición en un sujeto a una velocidad controlada.

Es de esperar que las composiciones según la invención tengan las ventajas de

- obviar la necesidad de reconstitución y preparación de la dosis requerida;
- facilitar la administración rápida de la dosis requerida que es esencial para una situación de emergencia;
- 10 • reducir la incidencia de una administración de una dosis equivocada por el cuidador debida a problemas con el uso de una jeringa o reconstitución de la dosis totalmente;
- en algunas realizaciones, prevenir lesiones por pinchazo de aguja debido a que la aguja está totalmente cubierta con el autoinyector; y
- 15 • mejorar la facilidad con la que el producto puede ser transportado y/o utilizado por el paciente diabético o por el cuidador de un paciente diabético.

Es de esperar que las composiciones según la invención tengan buena estabilidad física y química como se describe en el presente texto.

**Ejemplos.**

20 **Ejemplo 1: Efecto de los agentes tensioactivos sobre la solubilidad del glucagón.**

**Finalidad del experimento.**

Se sabe que el glucagón es soluble en soluciones acuosas a pH < 3 y pH > 9. La solubilidad a pH entre 3 y 9 es extraordinariamente baja. La finalidad de este experimento fue evaluar el efecto de diversos excipientes, en particular agentes tensioactivos, sobre la solubilidad de glucagón a un pH alrededor de 6. Los excipientes se ensayaron a una concentración seleccionada como se indica y no se llevaron a cabo experimentos en esta etapa para explorar el efecto de la concentración de los excipientes sobre la solubilidad de glucagón. La concentración de excipientes ensayada era superior a la de glucagón.

**Procedimiento experimental.**

30 Se pesaron aproximadamente 2 mg de glucagón en un vial de vidrio y se añadió la solución de excipientes para dar una concentración de glucagón final de 1 mg/mL. Se hicieron observaciones visuales durante un máximo de 1 hora. Todos los excipientes, excepto el desoxicolato sódico, contenían tampón 10 mM de histidina (pH 6). El desoxicolato sódico se formuló en TRIS 10 mM (pH 7,5) ya que el propio desoxicolato forma un gel a pH < 7.

**Resultados.**

La solubilidad de glucagón se indica en la tabla que sigue.

Excipiente	Concentración	Solubilidad del glucagón
Cetrimida	0,125% (p/v)	Disuelto completamente
Cloruro de bencetonio	0,2% (p/v)	Disuelto completamente
cloruro de benzalconio	0,2% (p/v)	Disuelto completamente
Benzoato de potasio	20 mM	No disuelto
CHAPS	10 mM	Disuelto completamente
Tween 20	2% (p/v)	Disuelto completamente
Tween 80	2% (p/v)	No disuelto
Tween 40	2% (p/v)	Parcialmente, pero no completamente disuelto
Tween 80	2% (p/v)	No disuelto
P-65 Pluronic	2% (p/v)	No disuelto
P-68 Pluronic	2% (p/v)	No disuelto

P-127 Pluronic**	2% (p/v)	No disuelto
Triptófano**	10 mM	No disuelto
Metionina**	50 mM	No disuelto
Colato sódico	10 mM	No disuelto
Desoxicolato sódico	10 mM	Disuelto completamente*
Fosfatidilcolina**	10 mM	Se encontró que la propia fosfatidilcolina forma una solución muy opaca, por lo que no ha sido evaluada con glucagón
Estearato sódico**	10 mM	Se encontró que el estearato sódico era muy escasamente soluble en sí, por lo que no ha sido evaluado con glucagón
Monopalmitato de sorbitán**	5 mM	No disuelto
20 SPAN**	5 mM	Solución opaca en presencia de glucagón

\* Ensayado a pH 7,5 (con tampón Tris 10 mM) ya que el propio desoxicolato forma gel a pH < 7.

\*\* excipientes de referencia.

5 De la tabla anterior, cabe observar que hay varios excipientes capaces de disolver el glucagón a pH casi neutro. Estos son:

- Cetrimida (agente tensioactivo catiónico)
- Cloruro de bencetonio (agente tensioactivo catiónico)
- Cloruro de benzalconio (agente tensioactivo catiónico)
- CHAPS (agente tensioactivo zwitteriónico o de ion híbrido)
- Tween 20 (agente tensioactivo no iónico)
- Desoxicolato sódico (agente tensioactivo aniónico), sólo a pH > 7,5.

15 La estabilidad del glucagón en estos agentes tensioactivos se evaluó mediante RP-HPLC. Se mostró que no se observaron cambios significativos en la forma nativa del glucagón en presencia de los agentes tensioactivos catiónicos (cetrimida, bencetonio, de benzalconio) ni en presencia de desoxicolato después de la incubación a temperatura ambiente durante 5 días. En cambio, el tamaño del pico nativo disminuyó en el caso de CHAPS (a < 10%) y en el caso de Tween 20 (a aproximadamente 60%).

También se mostró que el glucagón disuelto en desoxicolato tenía tendencia a formar geles después de la incubación a temperatura ambiente, incluso aunque la muestra era líquida inmediatamente después de la preparación a pH 7,5. La formulación a pH > 8 redujo al mínimo la formación de gel.

20 Basándose en esta información, los inventores seleccionaron las sales de benzalconio y bencetonio para una evaluación más detenida.

**Ejemplo 2: Un planteamiento de matriz para investigar el efecto de varios parámetros sobre la solubilidad del glucagón y el aspecto del glucagón disuelto.**

**Finalidad del experimento.**

25 En este experimento se investigó el efecto combinado de los parámetros que siguen, sobre la solubilidad y el aspecto:

- Naturaleza del agente tensioactivo (sal de bencetonio, sal de benzalconio)
- Concentración de agente tensioactivo
- pH
- Concentración de las especies iónicas

**Procedimiento experimental.**

35 Se prepararon cuarenta soluciones que contienen una concentración dada de glucagón y una concentración dada de un agente tensioactivo catiónico. Todas las soluciones contenían acetato 2 mM y se ajustaron a pH 5. No estaba presente ningún excipiente adicional. Las concentraciones de glucagón y agente tensioactivo catiónico se muestran

en la Tabla que sigue, junto con la indicación de la solubilidad del glucagón después de la incubación durante 24 horas:

Agente tensioactivo	Concentración glucagón				
	1 mg/mL	2 mg/mL	3 mg/mL	4 mg/mL	5 mg/mL
Cloruro de bencetonio (0,05% p/v)	disuelto	disuelto	disuelto	disuelto	disuelto
Cloruro de bencetonio (0,025% p/v)	disuelto	disuelto	disuelto	disuelto	disuelto
Cloruro de bencetonio (0,01% p/v)	disuelto	disuelto	disuelto	disuelto	disuelto
Cloruro de bencetonio (0,005% p/v)	disuelto	disuelto	disuelto	disuelto	disuelto
Cloruro de benzalconio (0,05% p/v)	disuelto	disuelto	disuelto	disuelto	disuelto
Cloruro de benzalconio (0,025% p/v)	disuelto	disuelto	disuelto	disuelto	disuelto
Cloruro de benzalconio (0,01% p/v)	disuelto	disuelto	disuelto	disuelto	disuelto
Cloruro de benzalconio (0,005% p/v)	disuelto	disuelto	disuelto	disuelto	disuelto

5 Además, se prepararon las seis siguientes soluciones acuosas:

Identificador de la solución	Composición
A	Acetato 50 mM + NaCl 500 mM (pH 4)
B	Acetato 50 mM + NaCl 500 mM (pH 6)
C	Fosfato 50 mM + NaCl 500 mM (pH 7,4)
D	Acetato 50 mM + 1,2-propanodiol 1000 mM (pH 4)
E	Acetato 50 mM + 1,2-propanodiol 1000 mM (pH 6)
F	Fosfato 50 mM + 1,2-propanodiol 1000 mM (pH 7,4)

10 Cada una de las soluciones A a F se añadió por pasos a cada una de las soluciones de glucagón/agente tensioactivo de la forma siguiente: se pusieron 80 µl de la solución de glucagón/agente tensioactivo en un pocillo en una placa de 96 pocillos y la solución seleccionada entre A - F se añadió en cinco partes alícuotas de 5 µl separadas (es decir, un total de 25 µl añadidos). La solución resultante de cada adición de 5 µl se mezcló y se dejó equilibrar durante 10 minutos. A continuación, se hizo una evaluación visual y se midió la turbidez a 405 nm.

15 Así, después de cada adición de 5 µl de la solución seleccionada entre A - F a la solución de glucagón/agente tensioactivo, se generó una composición de un pH y una concentración de diversas especies en particular. Las observaciones hechas muestran por tanto la solubilidad y el aspecto visual de glucagón en un gran número de composiciones acuosas que contienen una gama de concentraciones de agente tensioactivo, de pH y de concentración de especies iónicas. Después de la última adición de 5 µl las composiciones eran aproximadamente isotónicas. Las concentraciones de los componentes de la solución después de cada adición de 5 µl se muestran en la Tabla que sigue:

Volumen añadido (µl)	0	5	10	15	20	25
Volumen total (µl)	80	85	90	95	100	105
Tampón, es decir, acetato o fosfato (mM)	0	2,9	5,6	7,9	10,0	11,9
NaCl (mM)	0	29,4	55,6	78,9	100,0	119,0

1,2-Propanodiol (mM)	0	58,8	111,1	157,9	200,0	238,1
Glucagón (mg/mL)	1	0,94	0,98	0,84	0,80	0,76
	2	1,88	1,78	1,68	1,60	1,52
	3	2,82	2,67	2,53	2,40	2,29
	4	3,76	3,56	3,37	3,20	3,05
	5	4,71	4,44	4,21	4,00	3,81
Agente tensioactivo (% p/v)	0,05	0,047	0,044	0,042	0,040	0,038
	0,025	0,024	0,022	0,021	0,020	0,019
	0,01	0,0094	0,0089	0,0084	0,0080	0,0076
	0,005	0,0047	0,0044	0,0042	0,0040	0,0038

**Resultados.**

5 Todas las soluciones originales de glucagón/agente tensioactivo se disolvieron completamente y no mostraron signos de formación de gel. Después de las adiciones por pasos de las soluciones A - F, algunas composiciones mostraron signos de precipitación y/o formación de gel. Los resultados se muestran en las Tablas 1 - 8 y en las Figuras 1 - 8.

Las tablas que se presentan a continuación muestran los resultados de las evaluaciones visuales:

10 Tabla 1. Evaluación visual de composiciones acuosas producidas mezclando solución de glucagón/ bencetonio con soluciones A - F. La concentración de cloruro de bencetonio era 0,05% (p/v). La magnitud de la precipitación visible se clasificó en una escala de 1 a 3; 1 = solución clara; 3 = precipitación significativa; = formación de gel.

Volumen añadido	Glucagón	A	B	C	D	E	F
5 µl	5 mg/mL	1	1	2*	1	1	2*
	4 mg/mL	1	1	2*	1	1	2*
	3 mg/mL	1	1	1	1	1	1
	2 mg/mL	1	1	1	1	1	1
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
10 µl	5 mg/mL	1	1,5	2*	1	1	2*
	4 mg/mL	1	1	2*	1	1	2*
	3 mg/mL	1	1	2*	1	1	2*
	2 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
15 µl	5 mg/mL	1	1,5	2,5*	1	1	3*
	4 mg/mL	1	1,5	2*	1	1	2*

Volumen añadido	Glucagón	A	B	C	D	E	F
	3 mg/mL	1	1	2*	1	1	2*
	2 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1
20 µl	5 mg/mL	1,5	2*	3*	1	1	3*
	4 mg/mL	1,5	1,5	2*	1	1	2,5*
	3 mg/mL	1,5	1,5	2*	1	1	2*
	2 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1
25 µl	5 mg/mL	1,5	2*	3*	1	1	3*
	4 mg/mL	1,5	1,5	3*	1	1	3*
	3 mg/mL	1,5	1,5	2*	1	1	2*
	2 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1

5 Conclusiones del experimento descrito en la Tabla 1: Las observaciones visuales mostradas en la Tabla 1 demuestran que la solubilidad del glucagón en presencia de cloruro de bencetonio (0,038 a 0,050% p/v de concentración cubierto durante el experimento) se compromete a pH 7,4. Esta observación se hizo en composiciones de fuerza iónica tanto alta como baja, mostrando una mayor tendencia a precipitar las composiciones de fuerza iónica más alta. Las composiciones a pH 6 y particularmente a pH 4 mostraron una tendencia a precipitar mucho menor. Sin embargo, las mejores composiciones contenían un componente no cargado como modificador de tonicidad clave y éstas se mantuvieron claras en todos los márgenes de concentración investigados en este experimento. Las composiciones correspondientes con NaCl como modificador de la tonicidad clave mostraron una 10 tendencia a precipitar mucho más alta, especialmente en presencia de una mayor concentración de glucagón. La precipitación de glucagón vino típicamente acompañada por un incremento aparente de la viscosidad de las muestras (formación de gel), en particular en las composiciones de fuerza iónica más alta.

15 Tabla 2. Evaluación visual de composiciones acuosas producidas mediante la mezcla de solución de glucagón/ benzalconio con soluciones A - F. La concentración de cloruro de benzalconio fue 0,05% (p/v). La cuantía de la precipitación visible fue clasificada en una escala de 1 a 3; 1 = solución clara; 3 = precipitación significativa; \* = formación de gel.

Volumen añadido	Glucagón	A	B	C	D	E	F
5 µl	5 mg/mL	1	1,5*	1,5*	1	1	1
	4 mg/mL	1	1,5	1,5	1	1	1
	3 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1
	2 mg/mL	1	1	1	1	1	1
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1

Volumen añadido	Glucagón	A	B	C	D	E	F
10 µl	5 mg/mL	1,5	2*	2*	1	1	1,5*
	4 mg/mL	1,5	1,5	1,5*	1	1	1,5*
	3 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1,5
	2 mg/mL	1	1	1	1	1	1
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
15 µl	5 mg/mL	1,5	2*	2,5*	1	1	2*
	4 mg/mL	1,5	1,5*	2*	1	1	2*
	3 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1,5
	2 mg/mL	1	1	1	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
20 µl	5 mg/mL	1,5*	2*	3*	1	1	2*
	4 mg/mL	1,5*	2*	2,5*	1	1	2*
	3 mg/mL	1,5	1,5	2	1	1	1,5
	2 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
25 µl	5 mg/mL	1,5*	2,5*	3*	1	1	2,5*
	4 mg/mL	1,5*	2*	2,5*	1	1	2,5*
	3 mg/mL	1,5	1,5	2	1	1	2
	2 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1

Conclusiones del experimento descrito en la Tabla 2: Las conclusiones que pueden sacarse de la Tabla 2 (usando benzalconio) son muy similares a las realizadas anteriormente para composiciones similares que contienen la misma concentración de bencetonio. Pudieron prepararse composiciones de glucagón claras, no viscosas, en un amplio margen de concentración a pH 4 y pH 6 y las mejores composiciones utilizaron un modificador de la tonicidad no cargado. El aumento del pH y la fuerza iónica que menoscaba la solubilidad de glucagón en composiciones basadas en benzalconio. La formación de gel también se pudo observar en muchas de las muestras precipitadas.

5

Tabla 3. Evaluación visual de composiciones acuosas producidas mediante el mezclado de solución de glucagón/ bencetonio con soluciones A - F. La concentración de cloruro de bencetonio era 0,025% (p/v). La cuantía de la

ES 2 533 601 T3

precipitación visible se clasificó en una escala de 1 a 3; 1 = solución clara; 3 = precipitación significativa; \* = formación de gel.

Volumen añadido	Glucagón	A	B	C	D	E	F
5 µl	5 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1,5
	4 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1,5
	3 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1,5
	2 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
10 µl	5 mg/mL	1,5	1,5*	2*	1	1	2*
	4 mg/mL	1,5*	1,5*	2*	1	1	2*
	3 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1	1,5*
	2 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
15 µl	5 mg/mL	2*	2,5*	3*	1	1	3*
	4 mg/mL	1,5*	2*	3*	1	1	3*
	3 mg/mL	1,5*	2*	2*	1	1	2*
	2 mg/mL	1	1,5	1,5	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
20 µl	5 mg/mL	2*	3*	3*	1	1	3*
	4 mg/mL	2*	3*	3*	1	1	3*
	3 mg/mL	1,5*	2*	3*	1	1	2*
	2 mg/mL	1	1,5	1,5	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
25 µl	5 mg/mL	2*	3*	3*	1	1	3*
	4 mg/mL	2*	3*	3*	1	1	3*
	3 mg/mL	1,5*	2*	3*	1	1	2*
	2 mg/mL	1	1,5	1,5	1	1	1,5

Volumen añadido	Glucagón	A	B	C	D	E	F
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1

Tabla 4. Evaluación visual de composiciones acuosas producidas mediante la mezcla de solución de glucagón/benzalconio con soluciones A - F. La concentración de cloruro de benzalconio era 0,025% (p/v). La cuantía de la precipitación visible se clasificó en una escala de 1 a 3; 1 = solución clara; 3 = precipitación significativa; \* = formación de gel.

5

Volumen añadido	Glucagón	A	B	C	D	E	F
5 µl	5 mg/mL	1,5	1,5*	1,5*	1	1	1,5
	4 mg/mL	1,5	1,5*	1,5*	1	1	1,5
	3 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1
	2 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
10 µl	5 mg/mL	1,5	1,5*	2*	1	1	1,5*
	4 mg/mL	1,5	2*	2*	1	1	1,5*
	3 mg/mL	1,5	1,5*	1,5*	1	1	1,5*
	2 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
15 µl	5 mg/mL	1,5*	2*	2*	1	1	2*
	4 mg/mL	1,5*	2*	2,5*	1	1	2*
	3 mg/mL	1,5*	1,5*	2*	1	1	1,5*
	2 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1,5*
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
20 µl	5 mg/mL	2*	2,5*	3*	1	1	2,5*
	4 mg/mL	2*	2,5*	3*	1	1	2,5*
	3 mg/mL	1,5*	1,5*	2*	1	1	1,5*
	2 mg/mL	1,5	1,5	1,5	1	1	1,5*
	1 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1,5

Volumen añadido	Glucagón	A	B	C	D	E	F
25 µl	5 mg/mL	2,5*	3*	3*	1	1,5	2,5*
	4 mg/mL	2*	2,5*	3*	1	1	2,5*
	3 mg/mL	1,5*	1,5*	2*	1	1	1,5*
	2 mg/mL	1,5	1,5	2	1	1	1,5*
	1 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1,5

Tabla 5. Evaluación visual de composiciones acuosas producidas mediante la mezcla de solución de glucagón/bencetonio con soluciones A - F. La concentración de cloruro de bencetonio era 0,01% (p/v). La cuantía de la precipitación visible se clasificó en una escala de 1 a 3; 1 = solución clara; 3 = precipitación significativa; \* = formación de gel.

5

Volumen añadido	Glucagón	A	B	C	D	E	F
5 µl	5 mg/mL	1*	1,5*	1,5*	1	1	1,5*
	4 mg/mL	1*	1,5*	1,5*	1	1	
	3 mg/mL	1	1	1	1	1	1
	2 mg/mL	1	1	1	1	1	1
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
10 µl	5 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1	1,5*
	4 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1	1,5*
	3 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1	1,5*
	2 mg/mL	1,5	1,5	1,5	1	1	1
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
15 µl	5 mg/mL	2*	2*	2*	1	1	2*
	4 mg/mL	1,5*	2*	2*	1	1	2*
	3 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1	1,5*
	2 mg/mL	1,5	1,5	1,5	1	1	1,5*
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
20 µl	5 mg/mL	2*	2*	2*	1	1,5*	2*

Volumen añadido	Glucagón	A	B	C	D	E	F
	4 mg/mL	2*	2*	2*	1	1,5*	2*
	3 mg/mL	1,5*	1,5*	2*	1	1,5*	1,5*
	2 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
25 µl	5 mg/mL	2*	2,5*	2,5*	1	1,5*	2,5*
	4 mg/mL	2*	2*	2*	1	1,5*	1,5*
	3 mg/mL	1,5*	1,5*	2*	1	1,5	2*
	2 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1

Tabla 6. Evaluación visual de composiciones acuosas producidas mediante la mezcla de solución de glucagón/benzalconio con soluciones A - F. La concentración de cloruro de benzalconio era 0,01% (p/v). La cuantía de la precipitación visible se clasificó en una escala de 1 a 3; 1 = solución clara; 3 = precipitación significativa; \* = formación de gel.

5

Volumen añadido	Glucagón	A	B	C	D	E	F
5 µl	5 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1	1,5*
	4 mg/mL	1,5	1,5*	1,5*	1	1	1,5
	3 mg/mL	1,5	1,5	1,5*	1	1	1,5
	2 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
10 µl	5 mg/mL	2*	2*	2*	1	1	1,5*
	4 mg/mL	1,5*	2*	2*	1	1	1,5*
	3 mg/mL	1,5	1,5*	1,5*	1	1	1,5*
	2 mg/mL	1,5	1,5	1,5	1	1	1,5
	1 mg/mL	1,5	1,5	1,5	1	1	1,5
15 µl	5 mg/mL	2*	2,5*	2,5*	1	1,5	2*
	4 mg/mL	2*	2*	2,5*	1	1	2*
	3 mg/mL	1,5	1,5*	2*	1	1	2*

Volumen añadido	Glucagón	A	B	C	D	E	F
	2 mg/mL	1,5	1,5	1,5	1	1	1,5
	1 mg/mL	1,5	1,5	1,5	1	1	1,5
20 µl	5 mg/mL	2*	2,5*	2,5*	1	1,5	2*
	4 mg/mL	2*	2*	2,5*	1	1	2*
	3 mg/mL	1,5	1,5*	2*	1	1	2*
	2 mg/mL	1,5	1,5	1,5	1	1	1,5
	1 mg/mL	1,5	1,5	1,5	1	1	1,5
25 µl	5 mg/mL	2,5*	2,5*	3*	1	1,5	2,5*
	4 mg/mL	2*	2,5*	3*	1	1	2,5*
	3 mg/mL	1,5	2*	2,5*	1	1	2,5
	2 mg/mL	1,5	1,5	2	1	1	2
	1 mg/mL	1,5	1,5	1,5	1	1	1,5

Tabla 7. Evaluación visual de composiciones acuosas producidas mediante la mezcla de solución de glucagón/bencetonio con soluciones A - F. La concentración de cloruro de bencetonio era 0,005% (p/v). La cuantía de la precipitación visible se clasificó en una escala de 1 a 3; 1 = solución clara; 3 = precipitación significativa; \* = formación de gel.

5

Volumen añadido	Glucagón	A	B	C	D	E	F
5 µl	5 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1	1
	4 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1	1
	3 mg/mL	1,5	1,5	1,5	1	1	1
	2 mg/mL	1	1	1	1	1	1
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
10 µl	5 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1	1,5*
	4 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1	1,5*
	3 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1	1,5*
	2 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1

Volumen añadido	Glucagón	A	B	C	D	E	F
15 µl	5 mg/mL	1,5*	2*	2*	1	1,5*	2*
	4 mg/mL	1,5*	2*	2*	1	1,5*	2*
	3 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1	1,5*
	2 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
20 µl	5 mg/mL	1,5*	2*	2*	1	1,5*	2*
	4 mg/mL	1,5*	2*	2*	1	1,5*	2*
	3 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1,5*	1,5*
	2 mg/mL	1,5	1,5	1,5	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
25 µl	5 mg/mL	2*	2*	2*	1	1,5*	2*
	4 mg/mL	1,5*	2*	2*	1	1,5*	2*
	3 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1,5*	1,5*
	2 mg/mL	1,5	1,5	1,5	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1

Tabla 8. Evaluación visual de composiciones acuosas producidas mediante la mezcla de solución de glucagón/benzalconio con soluciones A - F. La concentración de cloruro de benzalconio era 0,005% (p/v). La cuantía de la precipitación visible se clasificó en una escala de 1 a 3; 1 = solución clara; 3 = precipitación significativa; \* = formación de gel.

5

Volumen añadido	Glucagón	A	B	C	D	E	F
5 µl	5 mg/mL	1,5*	1,5*	2*	1	1	1,5*
	4 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1	1,5
	3 mg/mL	1	1,5	1,5*	1	1	1
	2 mg/mL	1	1	1	1	1	1
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1

Volumen añadido	Glucagón	A	B	C	D	E	F
10 µl	5 mg/mL	1,5*	1,5*	2*	1	1	1,5*
	4 mg/mL	1,5*	1,5*	1,5*	1	1	1,5*
	3 mg/mL	1	1,5*	1,5*	1	1	1,5
	2 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
15 µl	5 mg/mL	2*	2*	2,5*	1	1	2*
	4 mg/mL	1,5*	2*	2*	1	1	2*
	3 mg/mL	1,5	1,5*	1,5*	1	1	1,5
	2 mg/mL	1	1,5	1,5	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1	1	1	1
20 µl	5 mg/mL	2*	2,5*	3*	1	1,5	2,5*
	4 mg/mL	1,5*	2*	2,5*	1	1,5	2*
	3 mg/mL	1,5	2*	2*	1	1	1,5
	2 mg/mL	1	1,5	1,5	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1
25 µl	5 mg/mL	2*	2,5*	3*	1	1,5	3*
	4 mg/mL	1,5*	2*	2,5*	1	1,5	2,5*
	3 mg/mL	1,5	2*	2,5*	1	1	2
	2 mg/mL	1	1,5	1,5	1	1	1,5
	1 mg/mL	1	1	1,5	1	1	1

Conclusiones de los experimentos descritos en las Tablas 3 a 8: Las Tablas 3 a 8 muestran los resultados del mismo tipo de experimento que se ha descrito en las Tablas 1 y 2, usando diferente concentración inicial de los agentes tensioactivos catiónicos. Las conclusiones que pueden sacarse de estos resultados adicionales están en línea con las hechas anteriormente en las Tablas 1 y 2, es decir, la solubilidad del glucagón es dependiente del pH y de la fuerza iónica en presencia de todos los agentes tensioactivos catiónicos ensayados. El pH 6, y particularmente el pH 4, (es decir, un pH que por regla general es ligeramente ácido) es preferible a un pH 7,4 (es decir, aproximadamente pH neutro). Además, el uso de un agente de modificación de la tonicidad no cargado (tal como 1,2-propanodiol) es preferible al uso de un agente de modificación de la tonicidad cargado (tal como NaCl), especialmente a altas concentraciones de glucagón. La reducción de la concentración del agente tensioactivo catiónico tiene como resultado una disminución de la solubilidad del glucagón (por ejemplo, compárese la Tabla 1 y la Tabla 7 para ver los extremos de concentración de bencetonio). Sin embargo, incluso utilizando las concentraciones más bajas de bencetonio y de benzalconio (0,005% p/v), es posible producir soluciones claras, aproximadamente isotónicas, de

5  
10

glucagón a los valores del pH ensayados < 7,4, incluso a alta concentración cuando la composición emplea un agente de modificación de la tonicidad no cargado en vez de uno cargado (véanse las Tablas 10 y 11).

Las cifras muestran los resultados de las medidas de la turbidez. Las conclusiones generales están en línea con las extraídas a partir de la evaluación visual de las composiciones (Tablas 1 a 8).

5 De la Figura 1 se puede concluir que el uso de un pH más bajo (4 y 6) y un agente modificador de la tonicidad no cargado permite una solubilidad del glucagón en presencia de 0,05% p/v de cloruro de bencetonio mejor que las formulaciones a pH más alto (7,4) y las formulaciones que contienen cloruro sódico como modificador de la tonicidad.

10 De la Figura 2 se puede concluir que el uso de un pH más bajo (4 y 6) y un modificador de la tonicidad no cargado permite una solubilidad del glucagón en presencia de 0,05% p/v de cloruro de benzalconio mejor que las formulaciones a pH más alto (7,4) y las formulaciones que contienen cloruro sódico como modificador de la tonicidad.

15 De la Figura 3 se puede concluir que el uso de un pH más bajo (4 y 6) y un modificador de la tonicidad no cargado permite una solubilidad del glucagón en presencia de 0,025% p/v de cloruro de bencetonio mejor que las formulaciones a pH más alto (7,4) y las formulaciones que contienen cloruro sódico como modificador de la tonicidad.

20 De la Figura 4 se puede concluir que el uso de un pH más bajo (4 y 6) y un modificador de la tonicidad no cargado permite una solubilidad del glucagón en presencia de 0,025% p/v de cloruro de benzalconio mejor que las formulaciones a pH más alto (7,4) y las formulaciones que contienen cloruro sódico como modificador de la tonicidad.

De la Figura 5 se puede concluir que el uso de un pH más bajo (4 y 6, y especialmente 4) y un modificador de la tonicidad no cargado permite una solubilidad del glucagón en presencia de 0,01% p/v de cloruro de bencetonio mejor que las formulaciones a pH más alto (7,4) y las formulaciones que contiene cloruro sódico como modificador de la tonicidad.

25 De la Figura 6 se puede concluir que el uso de un pH más bajo (4 y 6) y un modificador de la tonicidad no cargado permite una solubilidad del glucagón en presencia de 0,01% p/v de cloruro de benzalconio mejor que las formulaciones a pH más alto (7,4) y las formulaciones que contienen cloruro sódico como modificador de la tonicidad.

30 De la Figura 7 se puede concluir que el uso de un pH más bajo (4 y 6) y un modificador de la tonicidad no cargado permite una solubilidad del glucagón en presencia de 0,005% p/v de cloruro de bencetonio mejor que las formulaciones a pH más alto (7,4) y las formulaciones que contienen cloruro sódico como modificador de la tonicidad. Incluso a tal concentración baja de cloruro de bencetonio se pueden preparar composiciones de glucagón claras, no viscosas y aproximadamente isotónicas bajo el pH y la fuerza iónica óptimos (es decir, pH ligeramente ácido y fuerza iónica baja).

35 De la Figura 8 se puede concluir que el uso de un pH más bajo (4 y 6) y un modificador de la tonicidad no cargado permite una solubilidad del glucagón en presencia de 0,005% p/v de cloruro de benzalconio mejor que las formulaciones a pH más alto (7,4) y las formulaciones que contienen cloruro sódico como modificador de la tonicidad. Incluso a esta concentración de cloruro de benzalconio, se pueden preparar composiciones de glucagón claras, no viscosas y aproximadamente isotónicas bajo el pH y la fuerza iónica óptimos (es decir, pH ligeramente ácido y fuerza iónica baja).

#### Sumario de los resultados

45 Se demostró que la solubilidad del glucagón en presencia de los agentes tensioactivos catiónicos cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio, depende del pH. Otra cuestión a considerar es la presencia de especies cargadas. La solubilidad es considerablemente mayor a un pH de 4 a 6 que a pH 7,4 en todas las concentraciones de los agentes tensioactivos catiónicos ensayadas (0,005% a 0,05% p/v). Esta conclusión puede sacarse de todas las Tablas (1 a 8) y todas las Figuras (1 a 8) comparando las composiciones a un pH 7,4 frente a las de pH 4 y 6. Además, la solubilidad del glucagón se ve comprometida en presencia de especies cargadas, siendo este efecto especialmente acusado a concentraciones de glucagón más altas. Esta conclusión se puede hacer de todas las Tablas (1 a 8) y todas las Figuras (1 a 8) comparando las composiciones que contienen 1,2-propanodiol como agente modificador de la tonicidad clave frente a aquellos que se basan en NaCl como agente modificador de la tonicidad clave.

#### **Ejemplo 3: Investigación adicional del efecto de los agentes tensioactivos sobre la solubilidad del glucagón.**

##### ***Finalidad del experimento.***

5 La solubilidad del glucagón en soluciones acuosas a un pH entre 3 y 9 es extraordinariamente baja. La finalidad de este experimento fue evaluar el efecto de la concentración de los agentes tensioactivos cloruro de bencetonio y cloruro de benzalconio, sobre la solubilidad del glucagón a pH 4,5 y pH 5,5, por medio de la evaluación visual en la preparación y después del almacenamiento. Se utilizaron formulaciones de base que incluían un solo tampón (acetato 5 mM) y un agente modificador de la tonicidad (manitol 250 mM), a pH 4,5 o bien a pH 5,5. Los excipientes tensioactivos se ensayaron en un intervalo de concentraciones seleccionadas como se indica.

**Procedimiento experimental.**

10 Se pesaron aproximadamente 2 mg de glucagón en un vial de vidrio y se añadió la solución de excipientes en una de las formulaciones de base para dar una concentración final de glucagón de 1 mg/mL. La concentración del agente tensioactivo usado estaba en el intervalo de 0,01% a 0,6% p/v; concretamente 0,01, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,15, 0,2, 0,4 y 0,6% p/v. Las observaciones visuales se realizaron a tiempo cero y a las 14 semanas.

**Resultados.**

Las tablas que se presentan a continuación muestran las formulaciones preparadas y los resultados de las evaluaciones visuales:

15 Tabla 9. Cuantía de la precipitación visible clasificada en una escala de 1 a 3; 1 = solución clara; 3 = precipitación significativa; \* = formación de gel.

				Tiempo cero	14 semanas 4 °C	14 semanas 40 °C
Manitol (mM)	Acetato (mM)	Cloruro de benzalconio % p/v	pH			
250	5	0,01	4,5	1	2*	1*
250	5	0,01	5,5	1	1*	1*
250	5	0,025	4,5	1	1*	1*
250	5	0,025	5,5	1	3	1*
250	5	0,05	4,5	1	3	3
250	5	0,05	5,5	1	3	3
250	5	0,075	4,5	1	3	3
250	5	0,075	5,5	1	3	3
250	5	0,1	4,5	1	3	3
250	5	0,1	5,5	1	2	2
250	5	0,15	4,5	1	1	1
250	5	0,15	5,5	1	1	1
250	5	0,2	4,5	1	1	1
250	5	0,2	5,5	1	1	1
250	5	0,4	4,5	1	1	1
250	5	0,4	5,5	1	1	1
250	5	0,6	4,5	1	1	1
250	5	0,6	5,5	1	1	1

Conclusiones del experimento descrito en la Tabla 9: Las observaciones visuales mostradas en la Tabla 9 indican que se forman soluciones acuosas transparentes en la preparación de todas las formulaciones. Después del

almacenamiento durante 14 semanas a 40 °C, los preparados que contienen cloruro de bencetonio en el intervalo de concentración de 0,15 a 0,6% p/v permanecen como soluciones acuosas claras. Es probable que se prefieran las concentraciones en el extremo inferior de este intervalo (por ejemplo 0,15 a 0,2% p/v) por razones de biocompatibilidad. Dependiendo del pH, un 0,01 a 0,025% p/v de cloruro de bencetonio puede proporcionar también preparados útiles en forma de geles acuosos claros.

Tabla 10. Cuantía de la precipitación visible clasificada en una escala de 1 a 3; 1 = solución clara; 3 = precipitación significativa; \* = formación de gel.

				Tiempo cero	14 semanas 4 °C	14 semanas 40 °C
Manitol (mM)	Acetato (mM)	Cloruro de benzalconio % p/v	pH			
250	5	0,01	4,5	1	1*	2*
250	5	0,01	5,5	1	1*	1*
250	5	0,025	4,5	1	1*	2*
250	5	0,025	5,5	1	1*	1*
250	5	0,05	4,5	1	2	1*
250	5	0,05	5,5	1	2	1*
250	5	0,075	4,5	1	2	1*
250	5	0,075	5,5	1	2	2
250	5	0,1	4,5	1	1	1
250	5	0,1	5,5	1	1	1
250	5	0,15	4,5	1	1	1
250	5	0,15	5,5	1	1	1
250	5	0,2	4,5	1	1	1
250	5	0,2	5,5	1	1	1
250	5	0,4	4,5	1	1	1
250	5	0,4	5,5	1	1	1
250	5	0,6	4,5	1	1	1
250	5	0,6	5,5	1	1	1

Conclusiones del experimento descrito en la Tabla 10: Las observaciones visuales mostradas en la Tabla 10 indican que se forman soluciones acuosas transparentes en la preparación de todas las formulaciones. Después del almacenamiento durante 14 semanas a 40 °C, los preparados que contienen cloruro de benzalconio en el intervalo de concentración de 0,1 a 0,6% p/v permanecen como soluciones acuosas claras. Es probable que se prefieran las concentraciones en el extremo inferior de este intervalo (por ejemplo, 0,10 a 0,2% p/v) por razones de biocompatibilidad. Dependiendo del pH, el 0,01 a 0,05% p/v de cloruro de benzalconio puede proporcionar también preparados útiles en forma de geles acuosos claros.

**Ejemplo 4: Efecto de la concentración de cloruro de bencetonio sobre la velocidad de desamidación del glucagón.**

**Finalidad del experimento.**

La finalidad de este experimento era evaluar el efecto de la concentración de cloruro de bencetonio sobre la desamidación del glucagón después de la incubación a 4 y a 40 °C. La evaluación visual se realizó al mismo tiempo para permitir la correlación entre el nivel de gelificación y la desamidación.

**Procedimiento experimental.**

5 Se prepararon formulaciones líquidas de glucagón (1 mg/mL) y se incubaron a 4 y a 40 °C. La desamidación y la evaluación visual se determinaron al cabo de 4 meses de incubación a las temperaturas especificadas. La desamidación se determinó mediante cromatografía de fase inversa tanto en la preparación como después del almacenamiento. Se utilizaron formulaciones de base que comprenden tampón (acetato 5 mM), agente de modificación de la tonicidad (manitol 250 mM) y una concentración especificada de cloruro de bencetonio, a pH 5,5.

10 La concentración de cloruro de bencetonio estaba en el intervalo de 0,01% a 0,6% p/v; específicamente 0,01, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,15, 0,2, 0,4 y 0,6% p/v. El método de HPLC de fase inversa utilizó una columna C18 de 4,6 x 150 mm, 5 µm, a 45 °C, a una velocidad de flujo de 1 mL/ min, con un volumen de inyección de 30 µL y se detectó a 214 nm. El tampón A era KPO<sub>4</sub> 200 mM, pH 2,5, en acetonitrilo al 20%, y el tampón B era acetonitrilo:agua 60:40 a los tiempos (minutos): tampón B (%), 0:5, 5:5, 30:45, 32:90, 35:90, 40:5 y 50:5).

15 **Resultados y Conclusiones.**

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 11. Se demostró que la concentración de cloruro de bencetonio tenía un intenso efecto sobre la estabilidad física de glucagón (es decir, formación de gel y/o precipitación), así como la velocidad de desamidación del glucagón. Niveles más altos de bencetonio (≥ 0,15% p/v) tuvieron por resultado el mantenimiento de la formulación líquida no viscosa a ambas temperaturas. Sin embargo, la velocidad de desamidación fue relativamente alta en estas concentraciones de bencetonio. Con los niveles más

20 bajos de cloruro de bencetonio (0,01% y 0,025% p/v) se observó una desamidación reducida y al final del período de almacenamiento las formulaciones tenían la forma de geles acuosos claros. Estas composiciones pueden ser preferidas debido a la baja velocidad de desamidación.

Tabla 11. Evaluación visual y % de desamidación en composiciones acuosas de glucagón después de la incubación a 4 y 40 °C. La cuantía de la precipitación visible se clasificó en una escala de 1 a 3; 1 = solución clara; 3 = precipitación significativa; \* = formación de gel (todas las muestras fueron un líquido transparente con < 1% de variantes desamidadas en la preparación).

25

[cloruro de bencetonio], % (p/v)	% de desamidación		Evaluación visual	
	4 °C (4 meses)	40 °C (4 meses)	4 °C (4 meses)	40 °C (4 meses)
0,01	1,9	6,8	1*	1*
0,025	0,4	7,7	1	1*
0,050	0,7	4,8	1	2
0,075	0,8	9,3	1	2
0,1	1,7	24,4	2	2
0,15	3,1	27,5	1	1
0,2	5,0	30,9	1	1
0,4	4,9	32,5	1	1
0,6	4,6	30,2	1	1

30 **Ejemplo 5: Efecto de la naturaleza del agente de modificación de la tonicidad sobre la estabilidad del glucagón.**

**Finalidad del experimento.**

La finalidad de este experimento fue evaluar el efecto de los agentes modificadores de la tonicidad elegidos sobre la solubilidad del glucagón, en presencia de cloruro de bencetonio a pH 5,5, por medio de la evaluación visual en la preparación y después del almacenamiento.

35 **Procedimiento experimental.**

5 Se prepararon formulaciones líquidas de glucagón (1 mg/mL), que contiene un tampón (acetato 5 mM), cloruro de bencetonio (a una concentración especificada) y un agente modificador de la tonicidad (a una concentración especificada), a pH 5,5. En algunos casos, la composición contenía una concentración especificada de un antioxidante. El efecto de la naturaleza y la concentración del agente modificador de la tonicidad sobre la estabilidad física (es decir, la formación de gel y/o la agregación) se determinó por evaluación visual después del almacenamiento.

**Resultados y Conclusiones.**

10 En el primer experimento se compararon a 50 °C los efectos del manitol y el 1,2-propanodiol como agentes modificadores de la tonicidad. La formulación de fondo contenía acetato 5 mM y 0,075% de cloruro de bencetonio, y se ajustó a pH 5,5. Los resultados se muestran en la Tabla 12. Se demostró que el manitol es preferible al 1,2-propanodiol como modificador de la tonicidad. El uso de 1,2-propanodiol tuvo como resultado la aparición mucho más temprana de la agregación y formación de gel en comparación con el uso de manitol. No se encontró que el uso de una mayor concentración de 1,2-propanodiol mejorase la estabilidad de glucagón.

15 Tabla 12. Evaluación visual de composiciones acuosas producidas de glucagón después de la incubación a 50 °C. Cuantía de la precipitación visible clasificada en una escala de 1 a 3; 1 = solución clara; 3 = precipitación significativa; \* = formación de gel.

Agente modificador de la tonicidad	Evaluación visual (incubación a 50 °C)				
	0 días	1 semana	3 semanas	7 semanas	14 semanas
Manitol (250 mM)	1	1	1	1	1
1,2-propanodiol (250 mM)	1	1*	1*	1*	2
1,2-propanodiol (1000 mM)	1	1*	1*	1*	2
1,2-propanodiol (5000 mM)	1	2	3	3	3

20 En otro experimento, se compararon a 50 °C los efectos del manitol y el glicerol como agentes modificadores de la tonicidad. La formulación de base contenía acetato 5 mM, 0,075% de cloruro de bencetonio y hidroxitolueno butilado 1,3 mM y se ajustó a pH 5,5. Los resultados se muestran en la Tabla 13. Se demostró que el manitol es preferible al glicerol como agente modificador de la tonicidad ya que las composiciones en presencia de glicerol mostraron signos de precipitación después de la incubación a 50 °C durante 6 semanas.

25 Tabla 13. Evaluación visual de composiciones acuosas producidas de glucagón después de la incubación a 50 °C. La cuantía de la precipitación visible se clasificó en una escala de 1 a 3; 1 = solución clara; 3 = precipitación significativa; \* = formación de gel.

Agente modificador de la tonicidad	Evaluación visual (incubación a 50 °C)		
	0 días	6 días	6 semanas
Manitol (250 mM)	1	1	1
Glicerol (250 mM)	1	1	2
Glicerol (800 mM)	1	1	2
Glicerol (2000 mM)	1	1	2

30 En otro experimento, se compararon a 50 °C los efectos del manitol y la trehalosa como modificadores de la tonicidad. La formulación de base contenía acetato 5 mM, metionina 5 mM, y 0,075% de cloruro de bencetonio, y se ajustó a pH 5,5. Los resultados se muestran en la Tabla 14. Las composiciones de glucagón se mantuvieron como un líquido claro al incubar a 50 °C durante un máximo de 6 semanas, tanto en presencia de manitol (250 y 500 mM) como en presencia de trehalosa (250 y 500 mM).

Tabla 14. Evaluación visual de composiciones acuosas producidas de glucagón después de la incubación a 50 °C. La cuantía de la precipitación visible se clasificó en una escala de 1 a 3; 1 = solución clara; 3 = precipitación significativa; \* = formación de gel.

Agente modificador de la tonicidad	Evaluación visual (incubación a 50 °C)			
	0 semanas	1 semana	4 semanas	6 semanas
Manitol (250 mM)	1	1	1	1
Manitol (500 mM)	1	1	1	1
Trehalosa (250 mM)	1	1	1	1
Trehalosa (500 mM)	1	1	1	1

**Ejemplo 6: Investigación del efecto del fenol, como excipiente adicional, sobre la solubilidad del glucagón.**

**Finalidad del experimento.**

5 La finalidad de este experimento fue evaluar el efecto del fenol como excipiente adicional sobre la solubilidad y la posterior estabilidad del glucagón en presencia de cloruro de bencetonio y otros componentes de la formulación elegidos.

**Procedimiento experimental.**

10 Se preparó solución de glucagón (1 mg/mL) en una formulación que contiene acetato 5 mM (tampón), 0,075% (p/v) de cloruro de bencetonio, manitol 250 mM (modificador de la tonicidad), hidroxitolueno butilado 1,3 mM (antioxidante), tanto en presencia como en ausencia de fenol 30 mM. El pH de ambas formulaciones se ajustó en 5,5. Con fines comparativos, también se preparó una composición acuosa que representa una forma reconstituida del producto de glucagón comercializado actualmente - esta composición contenía 1 mg/mL de glucagón, glicerol 130 mM, lactosa 143 mM (pH 2,5). El aspecto de todas las formulaciones se anotó poco después de la preparación y luego después del almacenamiento a 50 °C durante períodos de tiempo específicos.

15 **Resultados y conclusiones.**

20 La composición acuosa de glucagón que representa la forma reconstituida del producto de glucagón actualmente comercializado mostró una rápida formación de gel en la incubación a 50 °C. La formación de gel y/o la agregación se retrasaron en ambas formulaciones basadas en bencetonio (es decir, con y sin fenol). Se demostró que, sin embargo, la presencia de fenol en la composición líquida de glucagón que contiene cloruro de bencetonio retrasa considerablemente más la agregación y la formación de gel en comparación con la misma formulación en ausencia de fenol (Tabla 15).

Tabla 15. Evaluación visual de composiciones acuosas producidas de glucagón después de la incubación a 50 °C. La cuantía de la precipitación visible se clasificó en una escala de 1 a 3; 1 = solución clara; 3 = precipitación significativa; \* = formación de gel.

Agente modificador de la tonicidad	Evaluación visual (incubación a 50 °C)				
	0 días	3 días	6 días	12 días	4 semanas
Lactosa (143 mM), glicerol (130 mM), pH 2,5	1	1*	1*	1*	1*
Acetato (5 mM), cloruro de bencetonio (0,075% p/v), manitol (250 mM), hidroxitolueno butilado 1,3 mM, fenol (30 mM)	1	1	1	1	1
Acetato (5 mM), cloruro de bencetonio (0,075% p/v), manitol (250 mM), hidroxitolueno butilado 1,3 mM	1	2	2	1*	1*

25 A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, y a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra "comprender", y variaciones de la misma tales como "comprende" y "que comprende", implican la inclusión de un número entero expresado, etapa, grupo de números enteros o grupo de etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero, etapa, grupo de números enteros o grupo de etapas.

30 La invención abarca todas las combinaciones de grupos preferidos y más preferidos y grupos adecuados y más adecuados y formas de realización de los grupos citados anteriormente.

LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID No: 1

NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser- Arg-Arg-Ala-Gln-  
 Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu- Met-Asn-Thr-COOH

5

LISTA DE SECUENCIAS

10 <110> Arecor Ltd  
 Derham, Barry K  
 Jezek, Jan

<120> Nueva composición

15

<130> ACR-P1166PCT

<150> US 61/409,723

<151>03-11-2010

20

<150> US 61/409,785

<151> 03-11-2010

<150> US 61/503,104

<151> 03-06-2011

25

<150> US 61/503,178

<151> 03-06-2011

30

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

35

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25

40

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición en solución acuosa que tiene un pH entre 4 y 7 que comprende (i) glucagón a una concentración de 0,05% a 0,5% p/v, y (ii) un agente tensioactivo catiónico elegido entre sales de benzalconio y sales de bencetonio como agente solubilizante en una cantidad suficiente para disolver el glucagón en la solución, que comprende además un agente de modificación de la tonicidad sin carga, y en donde la concentración global de las especies cargadas, distintas de las que se originan del glucagón y del agente tensioactivo catiónico, en la composición es menor que 150 mM.
2. Una composición según la reivindicación 1, en la que el agente tensioactivo catiónico se elige entre sales de bencetonio, tales como el cloruro de bencetonio.
- 10 3. Una composición según la reivindicación 1, en la que el agente tensioactivo catiónico se elige entre sales de benzalconio, tales como el cloruro de benzalconio.
4. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la concentración de agente tensioactivo catiónico es de 0,05 a 0,20% p/v, p. ej. de 0,15 % a 0,20 % p/v.
- 15 5. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende adicionalmente fenol en una concentración de 1 a 50 mM.
6. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que contiene glucagón en una concentración de 0,1 a 0,2 % p/v.
- 20 7. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la concentración global de especies cargadas distintas de las que se originan a partir del glucagón y el agente tensioactivo catiónico en la composición es menor que 50 mM.
8. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que está sustancialmente libre de agentes tensioactivos no iónicos.
- 25 9. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que está sustancialmente libre de agentes tensioactivos iónicos, incluyendo agentes tensioactivos aniónicos, catiónicos y zwitteriónicos, aparte de un agente tensioactivo catiónico elegido entre las sales de benzalconio y las sales de bencetonio.
10. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el agente de modificación de la tonicidad no cargado es un poliol elegido entre 1,2-propanodiol, glicerol, manitol, sorbitol, xilitol, lactitol, sacarosa, rafinosa y trehalosa, p. ej. es manitol, o bien trehalosa, o bien una mezcla de los mismos.
- 30 11. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que contiene acetato como tampón.
12. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende adicionalmente metionina como antioxidante.
13. Un recipiente que contiene una dosis unitaria de composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 35 14. Un inyector de un solo uso para la administración intramuscular, subcutánea o parenteral, que comprende un aparato de inyección y un recipiente que contiene una dosis unitaria de composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que se ha de inyectar.
15. Un dispositivo de bomba que comprende un recipiente en comunicación fluida con una aguja, que contiene una dosis unitaria de composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que se ha de inyectar o infundir.



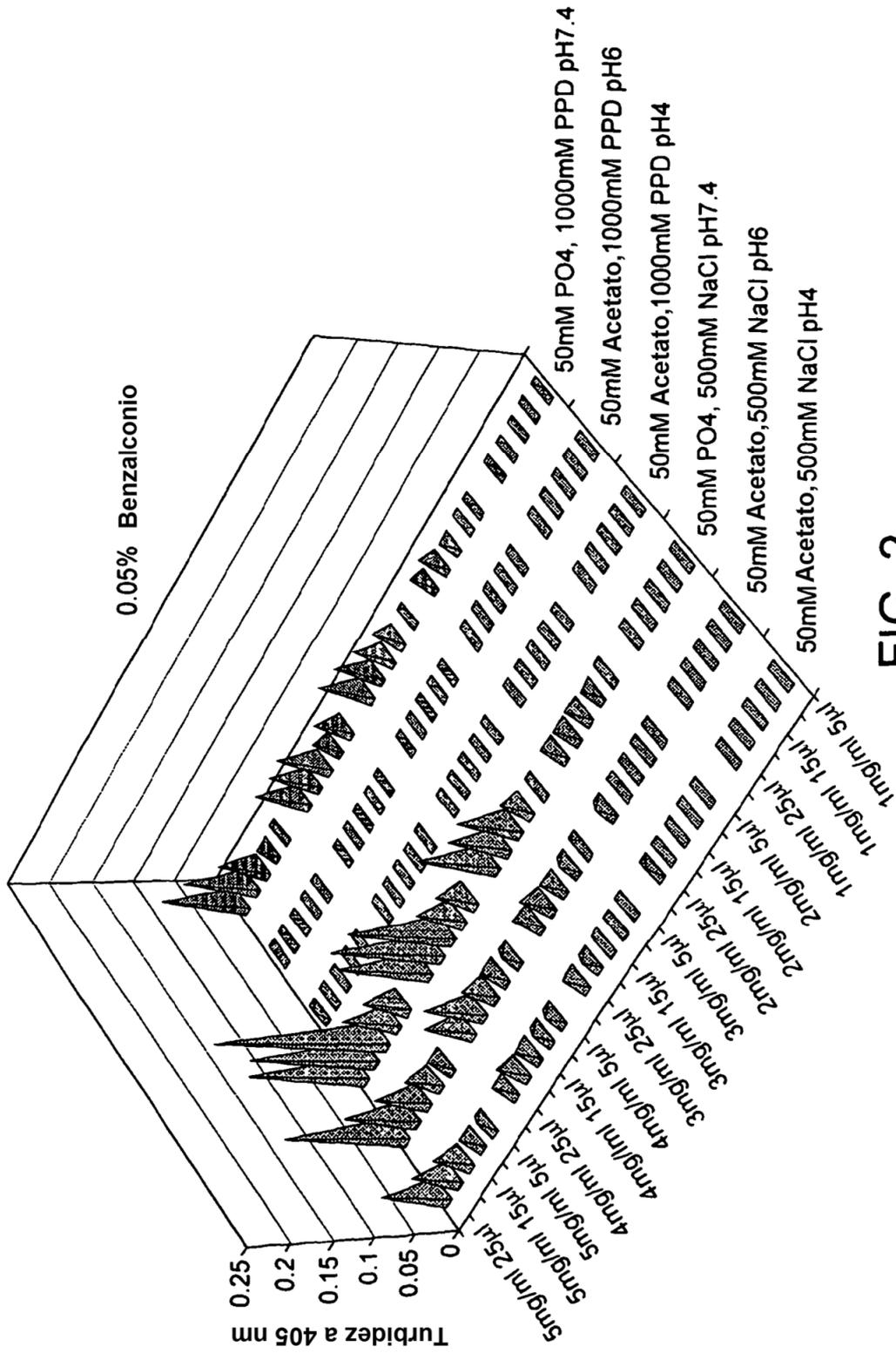


FIG. 2

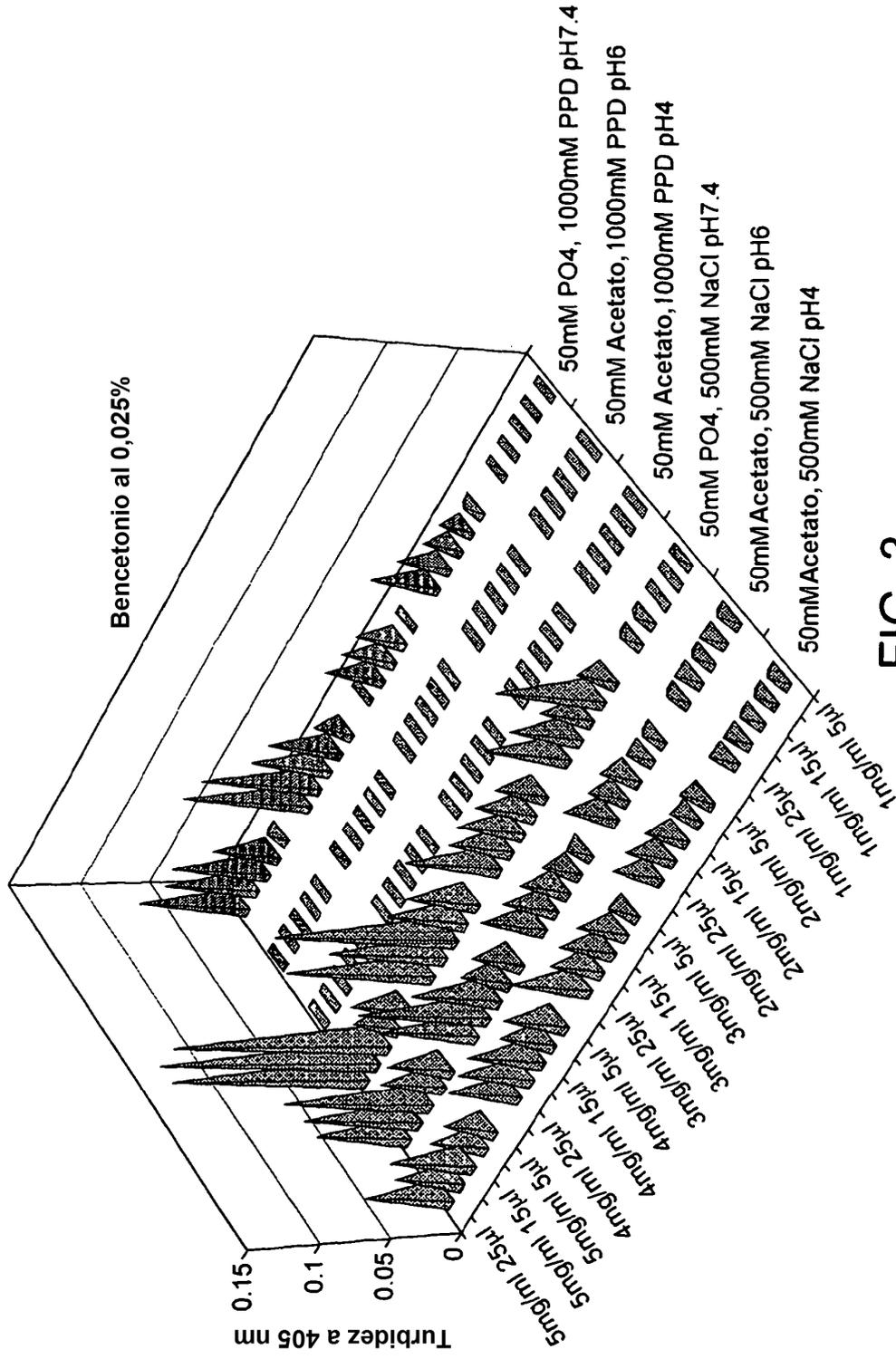


FIG. 3



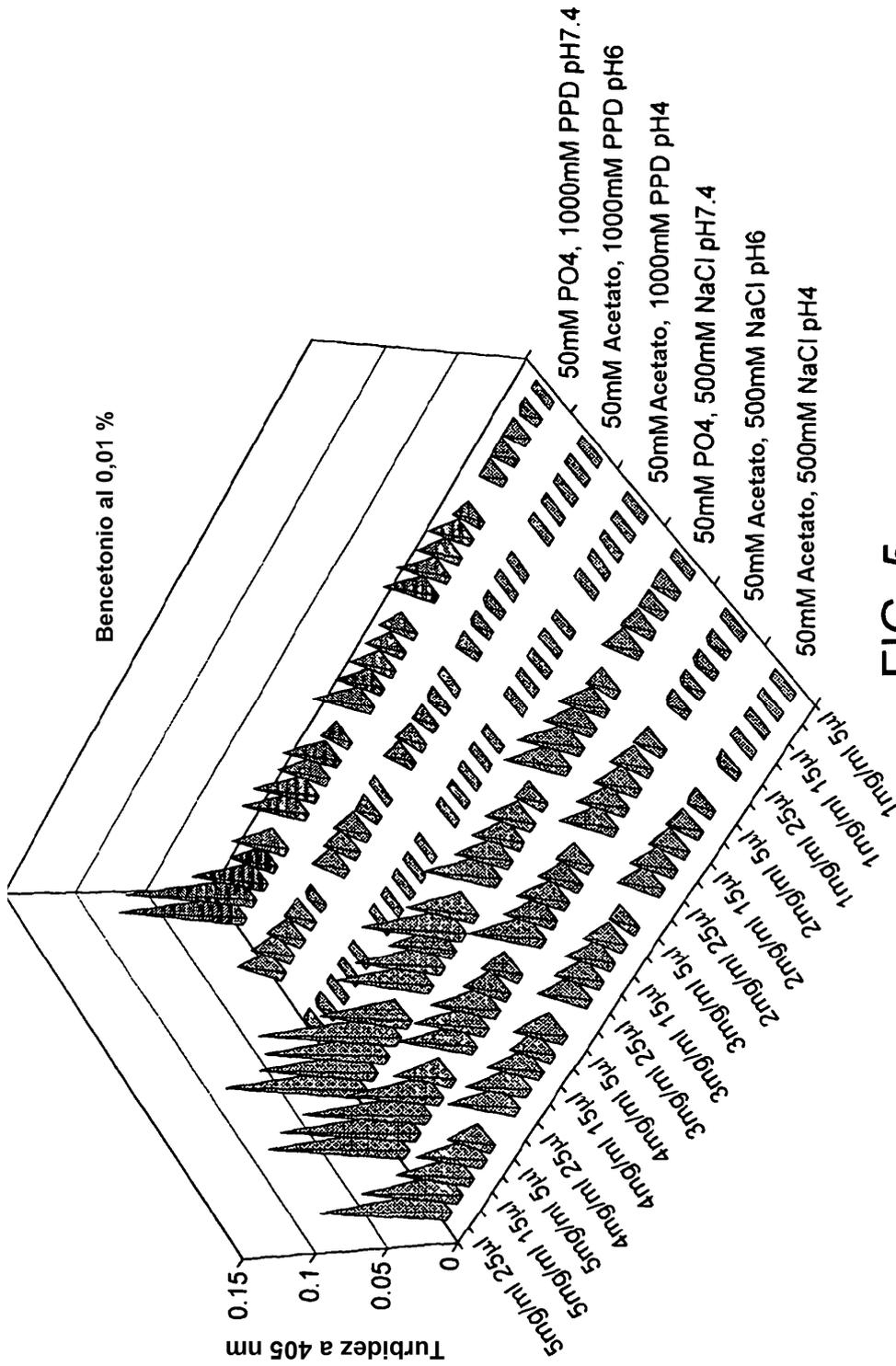


FIG. 5

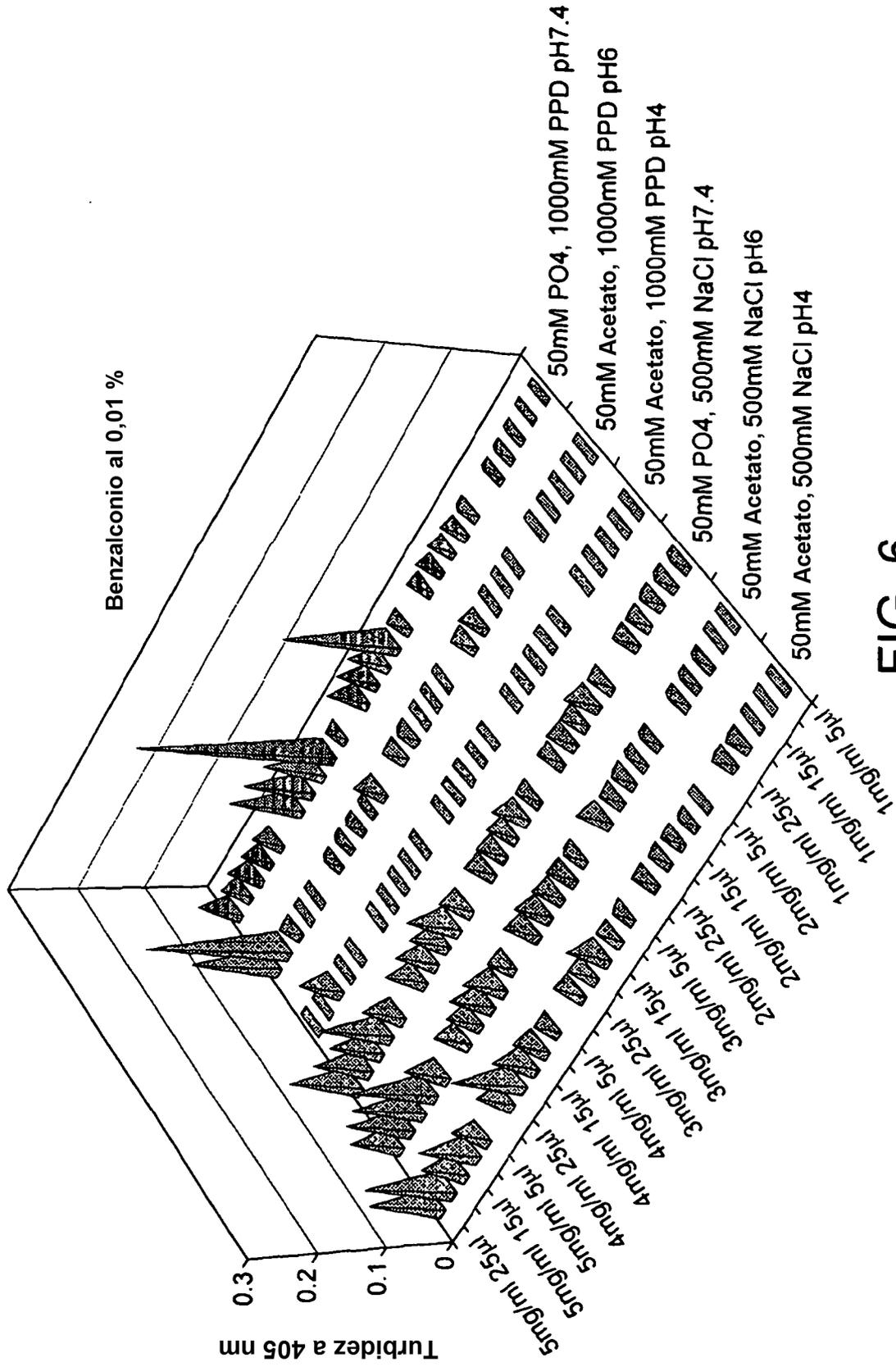


FIG. 6

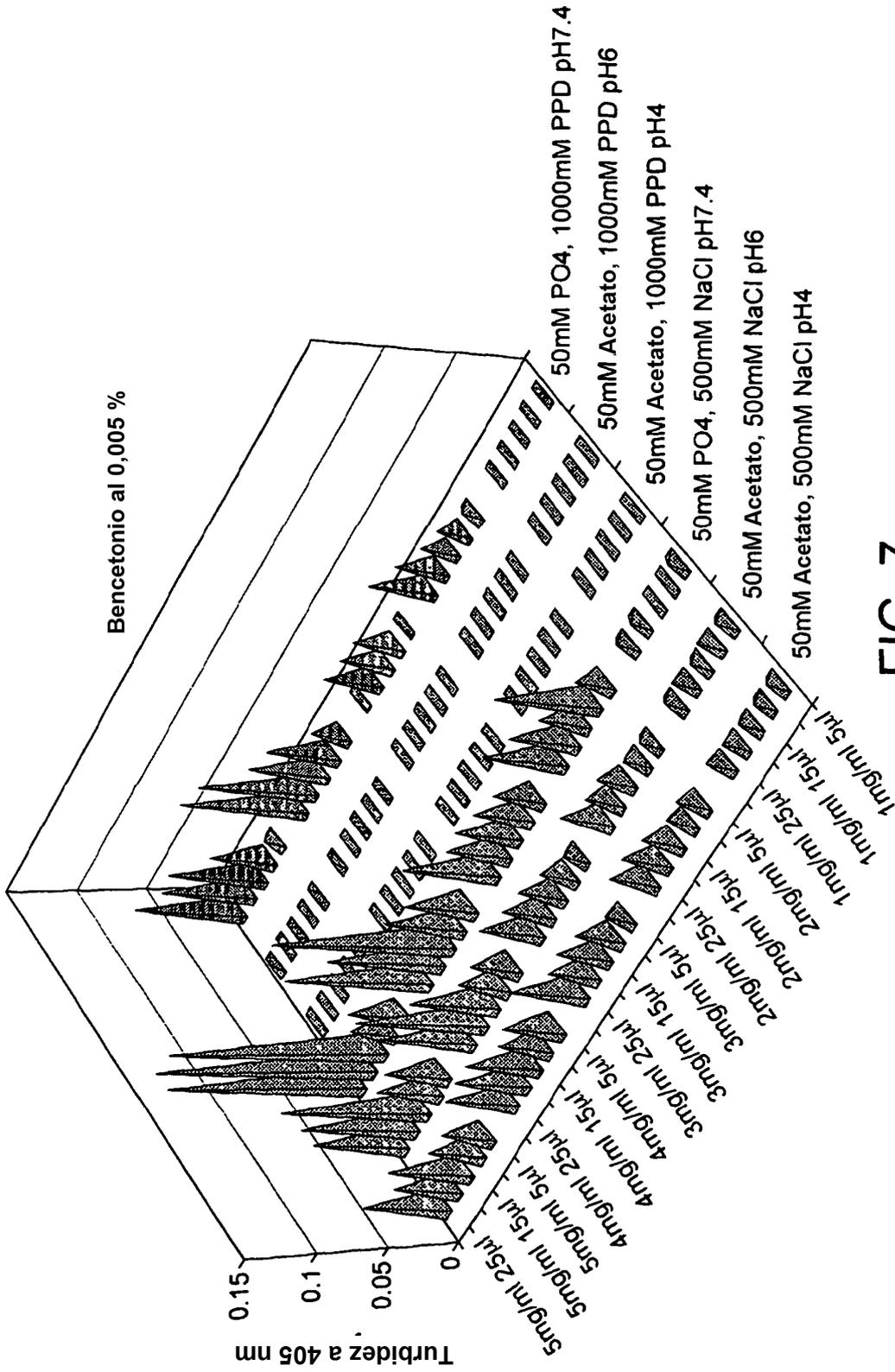


FIG. 7

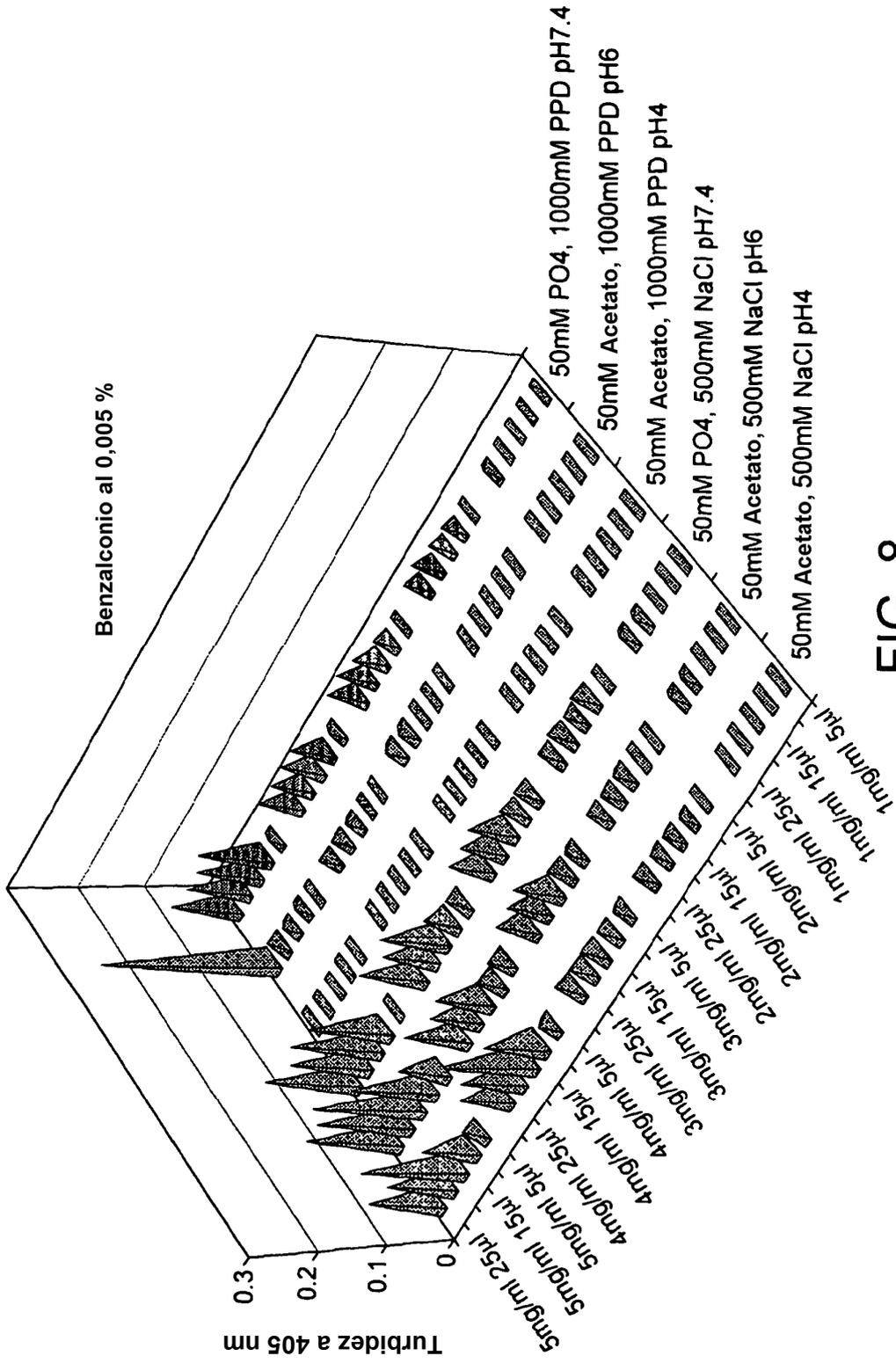


FIG. 8