



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 300 758**

(51) Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04725163 .2**

(86) Fecha de presentación : **01.04.2004**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1620072**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2006**

(54) Título: **Composición de liberación sostenida que contiene cinc, su preparación y procedimiento para producir la misma.**

(30) Prioridad: **01.05.2003 JP 2003-126503**

(73) Titular/es: **LTT Bio-Pharma Co., Ltd.**
5-1, Atago 2-chome
Minato-ku, Tokyo 105-6201, JP

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

(72) Inventor/es: **Kimura, Michio;**
Eto, Tomoko y
Mizushima, Yutaka

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Composición de liberación sostenida que contiene cinc, su preparación y procedimiento para producir la misma.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición de liberación sostenida que contiene cinc, a su preparación y a un procedimiento para producir la misma, caracterizado por mezclar una proteína o un péptido que tienen actividad fisiológica y una sal de cinc soluble en agua con una disolución acuosa de un carbonato soluble en agua y/o un fosfato soluble en agua, formando de este modo un precipitado.

Técnica anterior

En la actualidad se usan preparaciones que comprenden factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) frente a trastornos y afecciones clínicas acompañados por una reducción de neutrófilos. Estas preparaciones pueden administrarse mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea o infusión intravenosa, pero deben administrarse cada día una o dos veces al día.

Esto se atribuye a la poca estabilidad del G-CSF en la sangre y a la corta semivida, así como al requerimiento de que el G-CSF debe existir en más de una cierta concentración en la sangre para mantener su eficacia farmacológica. Por este motivo, un paciente tiene la carga de una administración diaria y por eso tiene la carga de un uso excesivo de G-CSF. Por tanto, se requiere una preparación que haga posible mantener el nivel de G-CSF en sangre constante.

En vista del hecho de que el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) forma un precipitado con iones metálicos tales como ión calcio e ión cinc, una técnica convencional intentó desarrollar una preparación de liberación sostenida basándose en un precipitado insoluble en agua de este tipo. Por ejemplo, un precipitado formado exclusivamente de una proteína y un ión metálico multivalente puede disolverse fácilmente, de modo que no puede conseguirse tal cual la capacidad de liberación sostenida deseada. Para hacer frente a esto, se ha propuesto un procedimiento en el que se añade una segunda sustancia precipitable a la composición de precipitado formada por G-CSF e ión metálico para suprimir la disolución del precipitado formado por G-CSF e ión metálico (publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público número 2003-81865). En este caso, la segunda sustancia precipitable que ha de añadirse son, por ejemplo, proteínas que pueden unirse a un ión metálico pero que casi no tienen eficacia farmacológica por sí mismas, tal como albúmina sérica humana y similares. También se da a conocer que añadiendo un mucopolisacárido ácido tal como condroitina sulfato, la proteína mezclada puede precipitar de una manera más eficaz y el precipitado resultante muestra una capacidad de liberación sostenida mucho mejor de G-CSF.

El procedimiento anterior, sin embargo, implica el problema de que aunque el 95% o más del G-CSF precipita mediante coprecipitación con estas proteínas cuando se usa a una concentración de aproximadamente varios cientos de $\mu\text{g/ml}$, la eficacia de precipitación disminuye hasta el 90% o menos cuando la concentración de G-CSF es de 1 mg/ml o superior. Adicionalmente, puesto que la albúmina sérica humana o el condroitina sulfato usados como coprecipitados son un material biológico, surge un problema de seguridad. Además el procedimiento anterior debe contrarrestar el problema de que se limita el uso de los materiales biológicos que se añaden necesariamente porque son caros e influyen bastante en el coste de producción. Además, considerando el número de las etapas de procedimiento que dependen del tipo de composición, hay todavía margen de mejora.

La publicación internacional número WO 03/000282 da a conocer la combinación de una hormona del crecimiento, hidrogenocarbonato de sodio y acetato de cinc con el fin de solidificar la hormona del crecimiento (véanse los ejemplos 1 y 2) y, sin embargo, no hace referencia al efecto de liberación sostenida de la hormona del crecimiento sólida formada. Además, ésta difiere de la composición descubierta por los presentes inventores para conseguir la capacidad de liberación sostenida.

Por tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar una preparación insoluble en agua que pueda prepararse más fácilmente que usando los procedimientos mencionados anteriormente y que pueda hacer precipitar un péptido o una proteína fisiológicamente activos tal como G-CSF con alto rendimiento y estabilizar los mismos, y permitir que la proteína o el péptido fisiológicamente activos conserven su eficacia farmacológica durante varios días en un organismo vivo debido al efecto de liberación sostenida del precipitado obtenido.

Con el fin de conseguir este objetivo, los presentes inventores examinaron un procedimiento que utiliza la coprecipitación con una sal de cinc insoluble en agua para descubrir una sustancia que pueda hacer que una proteína fisiológicamente activa interactúe con un precipitado de ión cinc con alta eficacia en presencia de un ión cinc sin usar un material biológico tal como albúmina sérica humana o condroitina sulfato según se describió anteriormente.

Como resultado, se descubrió que una proteína fisiológicamente activa que interacciona con un ión cinc está contenida de manera eficaz en un precipitado formado mezclando una sal de cinc soluble en agua tal como cloruro de cinc o acetato de cinc con un carbonato soluble en agua tal como hidrogenocarbonato de sodio o carbonato de sodio y, opcionalmente, un fosfato soluble en agua tal como fosfato de sodio.

En resumen, los presentes inventores descubrieron que si una proteína fisiológicamente activa que se une al cinc tal como G-CSF coexiste durante la formación de un precipitado mezclando una sal de cinc soluble en agua y una disolución acuosa de carbonato soluble en agua y, opcionalmente, un fosfato soluble en agua, puede formarse un precipitado que contiene de manera eficaz una proteína fisiológicamente activa de este tipo. También se confirmó que la composición de precipitado así obtenida podía liberar la proteína fisiológicamente activa contenida en la misma de manera sostenida.

También se descubrió que usando una combinación de carbonato soluble en agua y fosfato soluble en agua y variando la proporción de mezclado de la misma es posible controlar la tasa de liberación sostenida de la proteína fisiológicamente activa tal como G-CSF.

Como preparación de liberación sostenida particulada usando una sal inorgánica insoluble en agua similar, se conoce una preparación de carbonato de calcio dada a conocer en la publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público número 2002-348234. En este caso, se requiere formar materiales particulados de carbonato de calcio a una concentración de 1 M o superior para hacer que el precipitado resultante contenga G-CSF de aproximadamente 100 $\mu\text{g/ml}$. Además, dado que la cantidad de liberación de G-CSF a partir del precipitado resultante es muy pequeña y, por tanto, la característica del precipitado es diferente de la composición de precipitado de la presente invención.

Por ejemplo, según la presente invención, casi todo el G-CSF de aproximadamente 1 mg/ml de G-CSF en concentración puede incorporarse en el precipitado resultante mezclando simultáneamente de manera aproximada acetato de cinc 20 mM o cloruro de cinc (concentración de cinc: aproximadamente 1,3 mg/ml) y aproximadamente hidrogenocarbonato de sodio 20 mM y, opcionalmente, un fosfato.

Es decir, los presentes inventores descubrieron que puede hacerse precipitar casi el 100% del G-CSF, por ejemplo, con cinc de un peso prácticamente equivalente al G-CSF usando una sal de cinc soluble en agua y un carbonato soluble en agua y, opcionalmente, un fosfato, y consiguieron la presente invención.

El precipitado obtenido es suficientemente fino para pasar a través de una aguja hipodérmica, de modo que puede usarse como una preparación inyectable.

Además, estudios experimentales que usan ratones han demostrado que la presente invención mejora no sólo el rendimiento de formación de precipitados de una proteína fisiológicamente activa sino también el efecto de liberación sostenida en un organismo vivo, y se llevó a cabo la presente invención.

Descripción de la invención

Por tanto, un aspecto de la presente invención proporciona una composición de liberación sostenida que contiene cinc que comprende un precipitado que contiene un péptido o una proteína fisiológicamente activos obtenido mezclando un péptido o una proteína fisiológicamente activos, una sal de cinc soluble en agua y una disolución acuosa de un carbonato soluble en agua y, opcionalmente, un fosfato soluble en agua.

Más específicamente, la presente invención es una composición de liberación sostenida que contiene cinc en la que la sal de cinc soluble en agua es acetato de cinc o cloruro de cinc.

Específicamente, la presente invención proporciona una composición de liberación sostenida que contiene cinc en la que el carbonato soluble en agua es carbonato de sodio o hidrogenocarbonato de sodio y el fosfato soluble en agua es fosfato de sodio o hidrogenofosfato de sodio.

En este caso, el carbonato soluble en agua mejora la formación de la precipitación y la capacidad de liberación sostenida inicial del precipitado y el fosfato insoluble en agua mejora la durabilidad de la liberación sostenida del péptido o de la proteína fisiológicamente activos a partir del precipitado.

Más específicamente, la presente invención proporciona una composición de liberación sostenida que contiene cinc en la que la proteína fisiológicamente activa es G-CSF, anticuerpo, hormona del crecimiento, IFN, EPO, GM-CSF, BDNF, NT3, interleucina o FGF.

En un aspecto específico más preferido, la presente invención es una composición de liberación sostenida que contiene cinc en la que la composición de liberación sostenida que contiene cinc está liofilizada y en una forma adecuada para inyección subcutánea o inyección intramuscular.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una preparación de liberación sostenida que contiene cinc que comprende la composición de liberación sostenida que contiene cinc mencionada anteriormente, y más específicamente una preparación de liberación sostenida que contiene cinc preparada añadiendo un aditivo farmacéuticamente aceptable a la composición de liberación sostenida que contiene cinc mencionada anteriormente, si fuera necesario.

Específicamente, la presente invención es una preparación de liberación sostenida que contiene cinc en la que el aditivo farmacéuticamente aceptable es un agente dispersante, un tensioactivo, un agente antiséptico o un estabilizador,

y más específicamente una preparación de liberación sostenida que contiene cinc en la que el aditivo farmacéuticamente aceptable es un sacárido.

Preferiblemente, la presente invención es una preparación de liberación sostenida que contiene cinc en la que está liofilizada y está en una forma adecuada para inyección subcutánea e inyección intramuscular.

Entre otros, la presente invención es, en particular, un agente para aumentar los leucocitos que comprende una preparación de liberación sostenida que contiene cinc en la que la proteína fisiológicamente activa es G-CSF.

En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una composición de liberación sostenida que contiene cinc caracterizado por mezclar un péptido o una proteína fisiológicamente activos, una sal de cinc soluble en agua y una disolución acuosa de un carbonato soluble en agua y, opcionalmente, un fosfato soluble en agua, formando de este modo un precipitado que contiene el péptido o la proteína fisiológicamente activos.

15 **Mejor modo para llevar a cabo la invención**

Según se describió anteriormente, un aspecto de la presente invención proporciona una composición de liberación sostenida que contiene cinc que comprende un precipitado que contiene un péptido o una proteína fisiológicamente activos, compuesto típico que es G-CSF, obtenido mezclando un péptido o una proteína fisiológicamente activos, una sal de cinc soluble en agua y una disolución acuosa de un carbonato soluble en agua y/o un fosfato soluble en agua.

La presente invención se caracteriza por formar un precipitado en un intervalo de pH desde 4,5 hasta 9,0, en particular. Es decir, puesto que el intervalo de pH se fija alrededor de la neutralidad, la producción sin perder actividad es posible para una proteína tal como G-CSF cuya actividad se perderá a valores de pH extremos. Además, la presente invención se caracteriza por hacer que el G-CSF esté contenido en el precipitado en una proporción alta. En la condición óptima de este caso, se realiza un contenido en G-CSF no inferior al 99%.

Una composición de liberación sostenida insoluble en agua que es un precipitado proporcionado mediante la presente invención se forma preferiblemente mezclando en primer lugar básicamente de 10 a 2000 $\mu\text{g/ml}$ de G-CSF con una disolución de hidrogenocarbonato de sodio de concentración final no inferior a 20 mM y añadiendo después una disolución de acetato de cinc o cloruro de cinc de concentración final no inferior a 20 mM, formando de este modo un precipitado que es la composición de liberación sostenida de precipitado. En este caso, preferiblemente, la sal de cinc soluble en agua se añade de modo que la proporción molar del péptido o de la proteína fisiológicamente activos y el cinc en la sal de cinc soluble en agua es de 1:100 o superior.

De la misma manera, como para un anticuerpo, interferón u hormona del crecimiento, fue posible producir una composición de precipitado que parece tener casi las mismas propiedades que las del G-CSF, mediante el procedimiento de producción de precipitado según la presente invención.

Además, también se descubrió que usando tanto un carbonato soluble en agua como un fosfato soluble en agua y cambiando la proporción de mezclado de los mismos, es posible controlar la tasa de liberación sostenida de G-CSF.

Además, añadiendo un mucopolisacárido ácido tal como condroitina sulfato o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PL-GA), es posible controlar el efecto de liberación sostenida.

En la composición de precipitado de la presente invención, pueden añadirse sacáridos tales como manitol y trehalosa a la suspensión tras la formación del precipitado, que entonces se liofiliza y vuelve a suspenderse en agua destilada inyectable antes de su uso.

Se llevó a cabo un análisis de HPLC para los precipitados antes y después de la liofilización disueltos con EDTA, descubriendo que los patrones de elución no eran diferentes de los del G-CSF usado para formar los precipitados y que el G-CSF no se agregaba ni descomponía durante la formación de precipitado o durante la liofilización. Por tanto, se confirmó la excelente estabilidad del precipitado. También se confirmó que con una preparación que contiene el precipitado según la invención, el G-CSF no se desnaturalizó a lo largo de un mes a 37°C en una prueba de estabilidad en almacenamiento.

La preparación que contiene una composición de precipitado que es otro aspecto proporcionado mediante la presente invención, por ejemplo, una preparación que contiene G-CSF comprende un precipitado obtenido mediante la formación de precipitado según se describió anteriormente y un aditivo farmacéuticamente aceptable tal como un agente dispersante, un tensioactivo, un agente antiséptico, un estabilizador o sacárido, y esta preparación puede administrarse mediante inyección subcutánea, inyección intramuscular o medios similares.

La preparación de la presente invención así proporcionada, por ejemplo, una preparación de G-CSF, no sólo mantiene su eficacia farmacológica durante una semana o más mediante una única dosis en ratones sino también reduce la cantidad de dosificación en comparación con la cantidad de G-CSF que se administra cada día para mantener la eficacia farmacológica.

Por tanto, la composición de liberación sostenida que contiene cinc proporcionada mediante la presente invención se produce concretamente mezclando un péptido o una proteína fisiológicamente activos, una sal de cinc soluble en agua y una disolución acuosa de un carbonato soluble en agua y, opcionalmente, un fosfato soluble en agua, formando de este modo un precipitado que contiene el péptido o la proteína fisiológicamente activos.

La preparación de liberación sostenida que contiene cinc producida mediante este procedimiento puede contener péptidos o proteínas fisiológicamente activos que pueden formar un precipitado con un ión cinc así como G-CSF. Los ejemplos de tales péptidos o proteínas fisiológicamente activos incluyen hirudina, interleucina-2 (IL-2), interferón (IFN), etanercept, anticuerpo, anticuerpo frente al TNF, eritropoyetina (EPO), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), hormona del crecimiento, BDNF, NT3, FGF, proteínas que tienen ácido γ -carboxiglutámico, preparaciones de proteínas recombinantes con etiqueta de His y similares. Entre éstos, se prefieren particularmente los factores biológicos que muestran la eficacia farmacológica mediante una cantidad pequeña.

Por ejemplo, si un anticuerpo, interferón u hormona del crecimiento se hace precipitar según el procedimiento de la presente invención, estaba contenido en el precipitado con un rendimiento tan alto como el observado en G-CSF, de modo que puede esperarse un efecto de liberación sostenida comparativo.

La composición de liberación sostenida proporcionada mediante la presente invención puede prepararse dentro de una preparación para administración parenteral aprovechando su propiedad.

Los ejemplos de la preparación parenteral incluyen preparaciones inyectables (inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intravenosa, etc.), preparaciones en disolución tales como infusión intravenosa, preparaciones nasales tales como preparación en pulverizador, y preparaciones para administración transmucosa. Cualquiera de estas preparaciones puede prepararse de acuerdo con el procedimiento descrito en "General Rules for Preparations" en La Farmacopea Japonesa. En una preparación pueden seleccionarse y usarse de manera apropiada un vehículo, un plastificante, un agente isotonizante, un estabilizador y similares que se usan comúnmente en el campo farmacéutico.

El contenido de la composición de precipitado, que es un principio activo en la preparación de liberación sostenida proporcionada mediante la presente invención, no puede limitarse particularmente. En general, una cantidad de dosificación que permite que el péptido o la proteína fisiológicamente activos ejerzan su actividad farmacológica y expresen el efecto debe estar contenida en la composición de precipitado aunque varía dependiendo de la edad, el sexo, el peso corporal, la afección clínica y similares del paciente al que ha de administrarse.

Ejemplos

La presente invención se describirá en detalle a modo de ejemplos, sin embargo, la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

Ejemplo 1

Preparación de composición de liberación sostenida de precipitado mezclando G-CSF con acetato de cinc o cloruro de cinc (20 mM) y disolución de hidrogenocarbonato de sodio (20 mM), tasa de precipitación de G-CSF y comparación con un caso en el que se usó calcio como sal de metal

En primer lugar se mezclaron 50 μ l de disolución de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 8 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 134 μ l de agua Milli-Q, y entonces se le añadieron a la mezcla 8 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) o cloruro de cinc (0,5 M) con agitación y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. De la misma manera, en primer lugar se mezclaron 50 μ l de disolución de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 8 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 134 μ l de agua Milli-Q, y entonces se le añadieron a la mezcla 8 μ l de cloruro de calcio (0,5 M) con agitación y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifugaron estas suspensiones a aproximadamente 10.000 xg. Se recogieron los sobrenadantes y se disolvieron los precipitados en disolución de EDTA 0,1 M (pH 7,4) y se determinó el contenido en G-CSF contenido en los sobrenadantes y precipitados mediante un procedimiento ELISA.

Los resultados se muestran en la tabla 1.

TABLA 1

Tasa de precipitación de G-CSF en formación de precipitado mezclando G-CSF con disolución de cloruro de cinc o acetato de cinc y disolución de hidrogenocarbonato de sodio, y tasa de precipitación de G-CSF mezclando con disolución de cloruro de calcio y disolución de hidrogenocarbonato de sodio

	Contenido en C-CSF (%)	
	Sobrenadante	Precipitado
Hidrogenocarbonato de sodio + acetato de cinc	0,8	99,2
Hidrogenocarbonato de sodio + cloruro de cinc	0,1	99,9
Hidrogenocarbonato de sodio + cloruro de calcio	93,2	6,8

Tal como se muestra en la tabla 1, a la concentración de G-CSF de 1 mg/ml, el precipitado no contenía más del 10% de G-CSF cuando el precipitado se formaba usando cloruro de calcio. Por el contrario, cuando el precipitado se formaba usando cloruro de cinc o acetato de cinc 20 mM, el precipitado contenía G-CSF con una alta eficacia no inferior al 99%.

En la publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público 2002-348234 a la que se hizo referencia previamente como técnica convencional, con el fin de hacer que el G-CSF esté contenido en el precipitado con alta eficacia, el precipitado se produce añadiendo además 2,5 ml de carbonato de sodio (1 M) a 650 μ l de cloruro de calcio (5 M) y 250 μ l de G-CSF (0,5 mg/ml).

Ejemplo 2

Estudios de la concentración de cinc requerida para hacer un precipitado al 99% o superior a partir de 1 mg/ml de disolución de G-CSF

(1) Se preparó una preparación en la que la concentración final de cinc es 20 mM mezclando en primer lugar 50 μ l de disolución de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 40 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,1 M) y 70 μ l de agua Milli-Q, añadiendo después a esta disolución 40 μ l de disolución de acetato de cinc (0,1 M) con agitación y dejando la disolución resultante a temperatura ambiente durante 10 minutos.

(2) Se preparó una preparación en la que la concentración final de cinc es 10 mM mezclando en primer lugar 50 μ l de disolución de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 20 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,1 M) y 110 μ l de agua Milli-Q, añadiendo después a esta disolución 20 μ l de disolución de acetato de cinc (0,1 M) con agitación y dejando la disolución resultante a temperatura ambiente durante 10 minutos.

(3) Se preparó una preparación en la que la concentración final de cinc es 5 mM mezclando en primer lugar 50 μ l de disolución de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 10 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,1 M) y 130 μ l de agua Milli-Q, añadiendo después a esta disolución 10 μ l de disolución de acetato de cinc (0,1 M) con agitación y dejando la disolución resultante a temperatura ambiente durante 10 minutos.

(4) Se preparó una preparación en la que la concentración final de cinc es 2 mM mezclando en primer lugar 50 μ l de disolución de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 4 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,1 M) y 142 μ l de agua Milli-Q, añadiendo después a esta disolución 4 μ l de disolución de acetato de cinc (0,1 M) con agitación y dejando la disolución resultante a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Se centrifugaron estas suspensiones (1) a (4) a aproximadamente 10.000 xg. Se recogieron los sobrenadantes y se disolvieron los precipitados en disolución de EDTA 0,1 M (pH 7,4) y se determinaron las cantidades de G-CSF contenidas en los sobrenadantes y precipitados mediante un procedimiento ELISA.

ES 2 300 758 T3

Los resultados se muestran en la tabla 2.

TABLA 2

Concentración de cinc y contenido en G-CSF de los precipitados formados usando acetato de cinc e hidrogenocarbonato de sodio a partir de la disolución con una concentración de G-CSF de 1 mg/ml

Concentración de cinc (mM)	Contenido en G-CSF (%)	
	Sobrenadante	Precipitado
20	0,3	99,7
10	66,1	33,9
5	79,2	20,8
2	89,0	11,0

Tal como se muestra en la tabla 2, cuando se usó una disolución de acetato de cinc que tiene una concentración final de 20 mM (G-CSF:Zn (p/p) = 1:1,3), el precipitado no contenía menos del 99% de G-CSF, mientras que cuando la concentración final no era mayor que 10 mM, la tasa de precipitación de G-CSF se redujo drásticamente.

Ejemplo 3

Estudios de la concentración de cinc requerida para hacer un precipitado al 99% o superior a partir de 1 mg/ml de disolución de G-CSF sin fosfato

(1) Se preparó una preparación en la que la concentración final de cinc es 20 mM mezclando en primer lugar 80 μ l de disolución de G-CSF (2,5 mg/ml) disueltos en agua inyectable, 8 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 104 μ l de agua Milli-Q, añadiendo después a esta disolución 8 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación y dejando la disolución resultante a temperatura ambiente durante 10 minutos.

(2) Se preparó una preparación en la que la concentración final de cinc es 15 mM mezclando en primer lugar 80 μ l de disolución de G-CSF (2,5 mg/ml) disueltos en agua inyectable, 6 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 108 μ l de agua Milli-Q, añadiendo después a esta disolución 6 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación y dejando la disolución resultante a temperatura ambiente durante 10 minutos.

(3) Se preparó una preparación en la que la concentración final de cinc es 10 mM mezclando en primer lugar 80 μ l de disolución de G-CSF (2,5 mg/ml) disueltos en agua inyectable, 4 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 112 μ l de agua Milli-Q, añadiendo después a esta disolución 4 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación y dejando la disolución resultante a temperatura ambiente durante 10 minutos.

(4) Se preparó una preparación en la que la concentración final de cinc es 5 mM mezclando en primer lugar 80 μ l de disolución de G-CSF (2,5 mg/ml) disueltos en agua inyectable, 2 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 116 μ l de agua Milli-Q, añadiendo después a esta disolución 2 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación y dejando la disolución resultante a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Se centrifugaron estas suspensiones (1) a (4) a aproximadamente 10.000 xg. Se recogieron los sobrenadantes y se disolvieron los precipitados en disolución de EDTA 0,1 M (pH 7,4) y se determinaron las cantidades de G-CSF contenidas en los sobrenadantes y precipitados mediante un procedimiento ELISA. Los resultados se muestran en la tabla 3.

ES 2 300 758 T3

TABLA 3

Concentración de cinc y contenido en G-CSF de los precipitados formados usando acetato de cinc e hidrogenocarbonato de sodio a partir de la disolución con una concentración de G-CSF de 1 mg/ml

Concentración de acetato de cinc e hidrogenocarbonato de sodio (mM)	Contenido en G-CSF (%)	
	Sobrenadante	Precipitado
20	0,7	99,3
15	0,7	99,3
10	1,3	98,7
5	0,7	99,3

Tal como resulta evidente a partir los resultados mostrados en la tabla 3, cuando no estaba presente un fosfato en la formación de precipitado, incluso una disolución de acetato de cinc con un concentración final de tan sólo 5 mM (G-CSF:Zn (p/p) = 1:0,33) podía hacer aproximadamente el 99% de precipitado de G-CSF.

Ejemplo 4

Efecto del fosfato sobre la formación de precipitado de G-CSF a partir de 1 mg/ml de disolución de G-CSF usando acetato de cinc 20 mM e hidrogenocarbonato de sodio 20 mM

Se mezcló en primer lugar una mezcla de 80 μ l de disolución de G-CSF desalada (2,5 mg/ml) (concentración final: 1 mg/ml) y 8 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) (concentración final: 20 mM) con diferentes proporciones de tampón fosfato (0,2 M) (pH 7,2)/agua Milli-Q tal como sigue:

- (1) 40 μ l/64 μ l (concentración de fosfato final: 40 mM)
- (2) 20 μ l/84 μ l (concentración de fosfato final: 20 mM)
- (3) 10 μ l/94 μ l (concentración de fosfato final: 10 mM)
- (4) 5 μ l/99 μ l (concentración de fosfato final: 5 mM)
- (5) 0 μ l/104 μ l (concentración de fosfato final: 0 mM).

Entonces, a estas disoluciones se les añadieron 8 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para preparar suspensiones que tuvieran las concentraciones de fosfato finales respectivas. Se centrifugaron estas suspensiones a aproximadamente 10.000 xg. Se recogieron los sobrenadantes y se disolvieron los precipitados en disolución de EDTA 0,1 M (pH 7,4) y se determinaron las cantidades de G-CSF contenidas en los sobrenadantes y precipitados mediante un procedimiento ELISA.

Los resultados se muestran en la tabla 4. Tal como resulta evidente a partir los resultados mostrados en la tabla 4, cuando se formaba un precipitado de G-CSF 1 mg/ml mediante la combinación de acetato de cinc 20 mM/hidrogenocarbonato de sodio 20 mM, un fosfato no inhibía la formación de precipitado de G-CSF a una concentración final de 10 mM o menor.

TABLA 4

Contenido en G-CSF de los precipitados formados usando acetato de cinc 20 mM e hidrogenocarbonato de sodio 20 mM a partir de la disolución con una concentración de G-CSF de 1 mg/ml con fosfato

Concentración de fosfato (mM)	Contenido en G-CSF (%)	
	Sobrenadante	Precipitado
40	73,3	26,7
20	50,1	49,9
10	0,2	99,8
5	0,2	99,8
0	0,1	99,9

Ejemplo 5

Perfil cinético en sangre de preparación de liberación sostenida de G-CSF preparada usando G-CSF disuelto en tampón fosfato

(1) Se preparó una preparación de liberación sostenida que contenía 2 mg/ml de G-CSF mezclando en primer lugar 1000 μ l de disolución de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 160 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 680 μ l de agua Milli-Q, y añadiendo a esta disolución 160 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación.

(2) Se preparó una preparación de liberación sostenida que contenía 0,2 mg/ml de G-CSF mezclando en primer lugar 100 μ l de disolución de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 160 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 1580 μ l de agua Milli-Q, y añadiendo a esta disolución 160 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación.

(3) Se preparó una preparación de liberación sostenida que contenía 0,02 mg/ml de G-CSF mezclando en primer lugar 10 μ l de disolución de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 160 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 1670 μ l de agua Milli-Q, y añadiendo a esta disolución 160 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación.

(4) Se preparó una disolución preparación que contenía 0,2 mg/ml de G-CSF mezclando 100 μ l de disolución de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM y 1900 μ l de agua Milli-Q.

A estas disoluciones (1) a (4) se le añadieron 0,1 g de manitol, y cada 5 ml/kg de las disoluciones resultantes se administraron por vía subcutánea a ratones ddY de 8 semanas de edad (2 ratones por grupo). Se tomó una muestra de sangre (65 μ l) a 4 horas, 1, 2, 3 y 4 días tras la administración para medir la concentración de G-CSF mediante un procedimiento ELISA.

Tal como resulta evidente a partir los resultados mostrados en la tabla 5, la preparación de liberación sostenida que contiene G-CSF que se administró por vía subcutánea se observó en la sangre durante varios días de una manera sostenida. Por el contrario, cuando se administró la preparación en disolución, se detectó G-CSF en la sangre sólo durante un día.

TABLA 5

Perfil cinético en sangre de G-CSF en los ratones a los que se administró preparación de G-CSF

Preparación (dosificación)	Concentración de G-CSF en sangre (ng/ml)				
	4 h	1 día	2 días	3 días	4 días
Preparación de liberación sostenida (2 mg/ml)	907,35	272,44	77,62	15,72	0,30
Preparación de liberación sostenida (0,2 mg/ml)	27,31	46,04	6,91	1,04	0,09
Preparación de liberación sostenida (0,02 mg/ml)	1,13	0,84	0,06	ND	ND
Preparación en disolución (0,2 mg/ml)	208,2	0,24	ND	ND	ND

ND: No detectado

Ejemplo 6

Comparación del perfil cinético en sangre entre la preparación de liberación sostenida de G-CSF preparada usando G-CSF disuelto en tampón fosfato y la preparación de liberación sostenida de G-CSF preparada usando disolución de G-CSF sin fosfato mediante desalación

Se preparó una preparación de liberación sostenida que contenía fosfato mezclando en primer lugar 250 μ l de disolución de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 40 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 170 μ l de agua Milli-Q, y añadiendo a esta disolución 40 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación. Se preparó una preparación de liberación sostenida sin fosfato mezclando en primer lugar 400 μ l de disolución de G-CSF desalada (2,5 mg/ml), 40 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 20 μ l de agua Milli-Q en agua inyectable, y añadiendo a esta disolución 40 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación. A estas preparaciones se les añadieron 0,025 g de manitol, y cada 5 ml/kg de las preparaciones resultantes se administraron por vía subcutánea a ratones ddY de 8 semanas de edad (2 ratones por grupo). Se tomó una muestra de sangre (65 μ l) a 4 horas, 1, 2, 3 y 4 días tras la administración para medir la concentración de G-CSF mediante un procedimiento ELISA.

Como puede observarse a partir de los resultados en la tabla 6, la concentración de G-CSF en sangre se conservó aproximadamente 10 veces más mediante la preparación de G-CSF que contenía fosfato.

TABLA 6

Perfil cinético en sangre de G-CSF en ratones a los que se les administró preparación de G-CSF

Preparación	Concentración de G-CSF en sangre (ng/ml)				
	4 h	1 día	2 días	3 días	4 días
Preparación de liberación sostenida (con fosfato)	8457,41	747,93	59,41	9,03	1,94
Preparación de liberación sostenida (sin fosfato)	1891,14	590,43	12,18	0,78	0,24

ES 2 300 758 T3

Ejemplo 7

Influencia de la proporción cuantitativa entre G-CSF y cinc sobre la capacidad de liberación sostenida en una preparación de liberación sostenida de G-CSF

- (1) Se preparó una preparación en la que la proporción molar de G-CSF:Zn es 1:400 mezclando en primer lugar 834 μ l de disolución de G-CSF desalada (2,4 mg/ml), 80 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 6 μ l de agua Milli-Q, y añadiendo después a esta disolución 80 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación.
- (2) Se preparó una preparación en la que la proporción molar de G-CSF:Zn es 1: 200 mezclando en primer lugar 834 μ l de disolución de G-CSF desalada (2,4 mg/ml), 40 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 86 μ l de agua Milli-Q, y añadiendo después a esta disolución 40 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación.
- (3) Se preparó una preparación en la que la proporción molar de G-CSF:Zn es 1:100 mezclando en primer lugar 834 μ l de disolución de G-CSF desalada (2,4 mg/ml), 20 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 126 μ l de agua Milli-Q, y añadiendo después a esta disolución 20 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación.
- (4) Se preparó una preparación (que no contenía carbonato) en la que la proporción molar de G-CSF:Zn es 1:400 mezclando en primer lugar 834 μ l de disolución de G-CSF desalada (2,4 mg/ml) y 86 μ l de agua Milli-Q, y añadiendo después a esta disolución 80 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación.

A estas preparaciones se les añadieron 0,05 g de manitol, y cada 5 ml/kg de las preparaciones resultantes se administraron por vía subcutánea a ratones ddY de 8 semanas de edad (2 ratones por grupo). Se tomó una muestra de sangre (65 μ l) a 4 horas, 1, 2, 3 y 4 días tras la administración para medir la concentración de G-CSF mediante un procedimiento ELISA.

Los resultados se muestran en la tabla 7. Tal como resulta evidente a partir los resultados en la tabla, la capacidad de liberación sostenida de la preparación empeora según la menor proporción de cinc a G-CSF. A la misma proporción de cinc a G-CSF, la capacidad de liberación sostenida de la preparación que no contenía carbonato se vio afectada significativamente.

TABLA 7

Perfil cinético en sangre de G-CSF en ratones a los que se les administraron preparaciones de G-CSF con proporciones variables de G-CSF a cinc

Proporción G-CSF:Zn de la preparación de G-CSF	Concentración de G-CSF en sangre (ng/ml)				
	4 h	1 día	2 días	3 días	4 días
1:400	1772,29	449,93	26,35	0,59	0,23
1:200	5811,21	214,2	0,94	0,09	ND
1:100	5187,81	87,72	0,27	ND	ND
1:400 (sin carbonato)	1463,42	191,69	1,71	0,06	ND

ND: no detectado

Ejemplo 8

Control de la capacidad de liberación sostenida de una preparación de liberación sostenida de G-CSF que contiene cinc mediante carbonato y fosfato

- (1) Se preparó una preparación usando carbonato mezclando en primer lugar 640 μ l de disolución de G-CSF desalada (2,3 mg/ml) y 64 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M), y añadiendo a esta disolución 64 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación.
- (2) Se preparó una preparación usando tanto carbonato como fosfato mezclando en primer lugar 640 μ l de disolución de G-CSF desalada (2,3 mg/ml), 64 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 40 μ l de tampón fosfato (0,2 M) a pH 7,2, y añadiendo después a esta disolución 64 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación.

ES 2 300 758 T3

(3) Se preparó una preparación usando fosfato mezclando en primer lugar 640 μ l de disolución de G-CSF desalada (2,3 mg/ml) y 20 μ l de tampón fosfato (0,2 M) a pH 7,2, y añadiendo después a esta disolución 64 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación.

A estas preparaciones se les añadieron 0,04 g de manitol, y cada 5 ml/kg de las preparaciones resultantes se administraron por vía subcutánea a ratones ddY de 8 semanas de edad (2 ratones por grupo). Se tomó una muestra de sangre (65 μ l) a 4 horas, 1, 2, 3 y 4 días tras la administración para medir la concentración de G-CSF mediante un procedimiento ELISA.

Los resultados se muestran en la tabla 8. Como puede observarse a partir de los resultados en la tabla 8, la adición de carbonato o fosfato en la producción de preparación de G-CSF que contiene cinc dio como resultado una diferencia en la capacidad de liberación sostenida y se consiguió una excelente capacidad de liberación sostenida cuando se usaron tanto carbonato como fosfato. También se descubrió que la tasa de liberación sostenida puede controlarse cambiando la proporción de mezclado de carbonato y fosfato.

TABLA 8

Perfil cinético en sangre de G-CSF en ratones a los que se les administraron preparaciones de liberación sostenida de G-CSF que contienen cinc usando carbonato y/o fosfato

Preparación	Concentración de G-CSF en sangre (ng/ml)				
	4 h	1 día	2 días	3 días	4 días
Acetato de cinc / hidrogenocarbonato de sodio	3335,96	692,46	25,92	0,59	0,15
Acetato de cinc / hidrogenocarbonato de sodio / tampón fosfato	4683,65	742,90	50,72	3,90	0,67
Acetato de cinc / tampón fosfato	11104,73	75,64	1,55	0,43	0,18

Ejemplo 9

Influencia mediante liofilización de una preparación de liberación sostenida de G-CSF y su perfil cinético en sangre

Mezclando en primer lugar 0,5 ml de disolución de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 4,0 ml de hidrogenocarbonato de sodio (0,1 M) y 4,7 ml de agua Milli-Q, se añadieron a esta disolución 0,8 ml de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación formando un precipitado, entonces se le añadieron 0,5 g de manitol o trehalosa, se dispensaron en alícuotas de 1 ml y se liofilizaron. A 450 μ l de muestra antes de la liofilización se le añadieron 50 μ l de EDTA 0,5 M para disolver el precipitado, de los que se analizó una porción de 100 μ l mediante HPLC en fase inversa. Tras la liofilización volvió a suspenderse la muestra en 1 ml de agua inyectable, del que se extrajeron 450 μ l y se disolvió el precipitado añadiendo 50 μ l de EDTA 0,5 M. Se analizó una porción de 100 μ l mediante HPLC en fase inversa de manera similar según se describió anteriormente. Se comparó la recuperación de G-CSF basándose en el área del pico de elución.

Los resultados se muestran en la tabla 9. Tal como resulta evidente a partir los resultados en la tabla, el G-CSF se recuperó a casi el 100% incluso tras la liofilización y no se observó ni agregación ni descomposición.

TABLA 9

Recuperación de G-CSF tras la liofilización una preparación de liberación sostenida de G-CSF

	Manitol		Trehalosa	
	Área pico de G-CSF (mAU x ml)	Recuperación (%)	Área pico de G-CSF (mAU x ml)	Recuperación (%)
Antes de la liofilización	357,0643	100	346,3886	100
Tras la liofilización	373,9416	105	333,5237	96

Dado que se confirmó la disponibilidad de liofilización, se llevó a cabo el experimento del ejemplo 5 usando preparaciones liofilizadas. Las preparaciones liofilizadas volvieron a suspenderse en carmelosa al 0,5% y cada 5 ml/kg de estas disoluciones se administraron por vía subcutánea mediante una única dosis a ratones ddY de 8 semanas de edad. Se observó efecto de liberación sostenida también en las preparaciones liofilizadas tal como se muestra en la tabla 10.

TABLA 10

Perfil cinético en sangre de G-CSF en ratones a los que se les administró una preparación de liberación sostenida de G-CSF liofilizada

Preparación (dosificación)	Concentración de G-CSF en sangre (ng/ml)				
	4 h	1 día	2 días	3 días	4 días
Preparación de liberación sostenida (2 mg/ml)	4683,35	497,86	49,89	6,86	1,66
Preparación de liberación sostenida (0,2 mg/ml)	46,30	49,11	8,42	0,94	0,41
Preparación de liberación sostenida (0,02 mg/ml)	0,33	0,57	0,12	0,06	0,06
Preparación en disolución (0,2 mg/ml)	283,90	0,62	ND	ND	ND

ND: no detectado

Ejemplo 10

Efecto de la adición de manitol sobre la capacidad de liberación sostenida en una preparación de liberación sostenida de G-CSF

Se preparó una preparación de liberación sostenida que contenía manitol mezclando en primer lugar 476 μ l de disolución de G-CSF (4,2 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 80 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 364 μ l de agua Milli-Q, añadiendo después a esta disolución 80 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación y añadiendo 0,05 g de manitol.

Se preparó una preparación de liberación sostenida que no contenía manitol mezclando en primer lugar 476 μ l de disolución de G-CSF (4,2 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 80 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 364 μ l de solución salina, y añadiendo a esta disolución 80 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M).

ES 2 300 758 T3

Cada 5 ml/kg de estas preparaciones se administró por vía subcutánea a ratones ddY de 8 semanas de edad (2 ratones por grupo). Se tomó una muestra de sangre (65 μ l) a 4 horas, 1, 2, 3 y 4 días tras la administración para medir la concentración de G-CSF mediante un procedimiento ELISA.

- 5 Los resultados se muestran en la tabla 11. Tal como se muestra en la tabla 11, la adición de manitol no mostró ningún efecto de mejora de la capacidad de liberación sostenida.

TABLA 11

Perfil cinético en sangre de G-CSF en ratones a los que se les administró una preparación de G-CSF

Preparación	Concentración de G-CSF en sangre (ng/ml)				
	4 h	1 día	2 días	3 días	4 días
Preparación de liberación sostenida (con manitol)	4193,76	290,37	62,95	7,96	2,95
Preparación de liberación sostenida (sin manitol)	3700,81	803,20	67,07	16,08	6,92

Ejemplo 11

Efecto de aumento de leucocitos de una preparación de liberación sostenida de G-CSF

- 30 A cada una de una preparación de liberación sostenida que contenía 0,2 mg/ml de G-CSF que se preparó mezclando en primer lugar 100 μ l de disolución de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 160 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 1580 μ l de agua Milli-Q, y añadiendo a esta disolución 160 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación; y una preparación de liberación sostenida que contenía 0,02 mg/ml de G-CSF que se preparó mezclando en primer lugar 10 μ l de disolución de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en
 35 tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 160 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 1670 μ l de agua Milli-Q, y añadiendo a esta disolución 160 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación, se les añadieron 0,1 g de manitol y se liofilizó la mezcla. Las preparaciones liofilizadas resultantes volvieron a suspenderse añadiendo carmelosa al 0,5% y cada 5 ml/kg de las preparaciones se administró por vía subcutánea a ratones ddY de 7 semanas de edad (3 ratones por grupo) mediante una única dosis. Se tomó una muestra de sangre (35 μ l) durante 12 días y se
 40 contó el número de leucocitos usando un hematímetro automático.

Los resultados se muestran en la tabla 12. Tal como se muestra en la tabla 12, aunque hay una diferencia en el aumento del número de leucocitos dependiendo de la dosificación, se conservó la eficacia farmacológica a lo largo de una semana para ambas dosificaciones.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 300 758 T3

TABLA 12

Cambio en el número de leucocitos en ratones a los que se les administró una preparación de liberación sostenida de G-CSF

	Número de leucocitos ($\times 10^2$ células/mm ³)	
	Cantidad de dosificación	
	0,2 mg/ml de G-CSF	0,02 mg/ml de G-CSF
Antes de la administración	75 $\pm$ 15	81 $\pm$ 30
Día 1	156 $\pm$ 30	189 $\pm$ 60
Día 2	326 $\pm$ 53	294 $\pm$ 92
Día 3	383 $\pm$ 103	275 $\pm$ 85
Día 4	359 $\pm$ 36	240 $\pm$ 93
Día 5	416 $\pm$ 57	239 $\pm$ 102
Día 6	342 $\pm$ 184	173 $\pm$ 55
Día 8	264 $\pm$ 151	106 $\pm$ 29
Día 9	171 $\pm$ 107	94 $\pm$ 9
Día 10	188 $\pm$ 109	83 $\pm$ 9
Día 11	132 $\pm$ 75	72 $\pm$ 17
Día 12	114 $\pm$ 20	96 $\pm$ 29

Ejemplo 12

Comparación del efecto de aumento de leucocitos entre una preparación de liberación sostenida de G-CSF y una preparación en disolución de G-CSF

(1) Se preparó una preparación de liberación sostenida que contenía 0,1 mg/ml de G-CSF mezclando en primer lugar 28,6 μ l de disolución de G-CSF (4,2 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 48 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 1075,4 μ l de agua Milli-Q, añadiendo después a esta disolución 48 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación formando un precipitado, y añadiendo 0,06 g de manitol.

(2) Se preparó una preparación en disolución que contenía 0,1 mg/ml de G-CSF mezclando en primer lugar 48 μ l de disolución de G-CSF (4,2 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM y 1952 μ l de agua Milli-Q, y añadiendo después 0,1 g de manitol.

Las preparaciones preparadas según se describió anteriormente se liofilizaron. Las preparaciones liofilizadas resultantes volvieron a suspenderse añadiendo carmelosa al 0,5% y cada 10 ml/kg de las preparaciones se administraron mediante una única dosis a ratones ddY de 7 semanas de edad (3 ratones por grupo).

Para la administración diaria, se mezclaron 38,4 μ l de disolución de G-CSF (4,2 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM y 7961,6 μ l de agua Milli-Q y entonces se añadieron 0,4 g de manitol para preparar una preparación en disolución 0,02 mg/ml, que se dispensó entonces en alícuotas de 1,5 ml y se liofilizaron para preparar una preparación liofilizada que contenía G-CSF. Cada 10 ml/kg de las preparaciones se administraron a ratones ddY de 7 semanas de edad (tres animales) cada día durante los cinco días iniciales.

En cada prueba, se tomó una muestra de sangre (35 μ l) durante 12 días y se contó el número de leucocitos usando un hematímetro automático.

Los resultados se muestran en la tabla 13. Tal como se muestra en la tabla 13, la preparación en disolución administrada en una cantidad equivalente de la preparación de liberación sostenida mediante una única dosis conservó su eficacia farmacológica sólo durante aproximadamente dos días. La preparación de liberación sostenida administrada mediante una única dosis mostró una eficacia farmacológica comparable o mejor que la conseguida mediante la pre-

ES 2 300 758 T3

paración en disolución administrada mediante cinco dosis diarias. Mientras que la preparación en disolución perdió su eficacia farmacológica inmediatamente tras el fin de la administración, la preparación de liberación sostenida mostró una conservación de la eficacia farmacológica.

TABLA 13

Comparación del efecto de aumento del número de leucocitos entre ratones a los que se les administró una preparación de liberación sostenida de G-CSF (única dosis) y ratones a los que se les administró una preparación en disolución (única dosis y cinco dosis diarias)

Preparación	Número de leucocitos ($\times 10^2$ células/mm ³)		
	Preparación de liberación sostenida	Preparación en disolución	Preparación en disolución
Dosificación de G-CSF	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,02 mg/ml
Número de dosis	Única dosis	Única dosis	5 dosis diarias
Antes de la administración	76 $\pm$ 18	87 $\pm$ 7	64 $\pm$ 31
Día 1	141 $\pm$ 28	162 $\pm$ 31	147 $\pm$ 35
Día 2	302 $\pm$ 81	161 $\pm$ 21	267 $\pm$ 69
Día 3	294 $\pm$ 110	96 $\pm$ 15	312 $\pm$ 51
Día 4	262 $\pm$ 76	92 $\pm$ 16	303 $\pm$ 58
Día 5	342 $\pm$ 124	89 $\pm$ 33	392 $\pm$ 108
Día 6	280 $\pm$ 128	93 $\pm$ 26	80 $\pm$ 12
Día 8	156 $\pm$ 37	92 $\pm$ 35	79 $\pm$ 28
Día 9	112 $\pm$ 34	90 $\pm$ 28	72 $\pm$ 30
Día 10	115 $\pm$ 28	102 $\pm$ 34	76 $\pm$ 19
Día 11	93 $\pm$ 27	76 $\pm$ 23	71 $\pm$ 25
Día 12	82 $\pm$ 28	73 $\pm$ 26	67 $\pm$ 20

Ejemplo 13

Comparación del efecto de aumento del número de leucocitos de una preparación de liberación sostenida de G-CSF producida usando acetato de cinc o cloruro de cinc

A una preparación de liberación sostenida que contenía 0,1 mg/ml de G-CSF que se preparó mezclando en primer lugar 50 μ l de disolución de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 80 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 1790 μ l de agua Milli-Q, y añadiendo a esta disolución 80 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) o 80 μ l de cloruro de cinc (0,5 M) con agitación, se le añadieron 0,1 g de manitol y se liofilizó la mezcla. La preparación liofilizada resultante volvió a suspenderse añadiendo carmelosa al 0,5%, cada 10 ml/kg de estas preparaciones se administró a ratones ddY de 7 semanas de edad (3 ratones por grupo) mediante una única dosis, se tomó sangre (35 μ l) durante 12 días y se contó el número de leucocitos mediante un hematímetro automático.

Los resultados se muestran en la tabla 14. Tal como se muestra en la tabla 14, ambas preparaciones de liberación sostenida preparadas usando respectivamente acetato de cinc y cloruro de cinc en la producción de una preparación de liberación sostenida mostraron eficacias farmacológicas similares.

ES 2 300 758 T3

TABLA 14

Cambio en el número de leucocitos en ratones a los que se les administró una preparación de liberación sostenida de G-CSF

Preparación de liberación sostenida	Número de leucocitos ($\times 10^2$ células/mm ³)	
	Usando acetato de cinc	Usando cloruro de cinc
Antes de la administración	70 $\pm$ 12	71 $\pm$ 9
Día 1	168 $\pm$ 32	147 $\pm$ 21
Día 2	352 $\pm$ 71	272 $\pm$ 32
Día 3	340 $\pm$ 89	271 $\pm$ 22
Día 4	362 $\pm$ 101	293 $\pm$ 23
Día 5	468 $\pm$ 72	423 $\pm$ 25
Día 6	502 $\pm$ 93	429 $\pm$ 118
Día 8	426 $\pm$ 98	363 $\pm$ 118
Día 9	361 $\pm$ 39	306 $\pm$ 151
Día 10	324 $\pm$ 36	275 $\pm$ 157
Día 11	268 $\pm$ 50	202 $\pm$ 146
Día 12	188 $\pm$ 113	143 $\pm$ 57

Ejemplo 14

Efecto de aumento y mantenimiento de leucocitos mediante una preparación de liberación sostenida de G-CSF que contiene condroitina sulfato

Se preparó una preparación de liberación sostenida que contenía 0,1 mg/ml de G-CSF mezclando en primer lugar 28,6 μ l de disolución de G-CSF (4,2 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 48 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 1075,4 μ l de agua Milli-Q, y añadiendo después a esta disolución 48 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación; y se preparó una preparación de G-CSF 0,1 mg/ml que contenía condroitina sulfato mezclando en primer lugar 28,6 μ l de disolución de G-CSF (4,2 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 48 μ l de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 1015,4 μ l de agua Milli-Q, y añadiendo después a esta disolución 48 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación, seguido por 60 μ l de condroitina sulfato (20 mg/ml).

A estas preparaciones se les añadieron 0,06 g de manitol y entonces se liofilizaron. La preparación liofilizada resultante volvió a suspenderse añadiendo carmelosa al 0,5%, cada 10 ml/kg de estas preparaciones se administró a ratones ddY de 7 semanas de edad (3 ratones por grupo) mediante una única dosis, se tomó una muestra de sangre (35 μ l) durante 12 días y se contó el número de leucocitos usando un hematímetro automático.

Los resultados se muestran en la tabla 15. Tal como se muestra en la tabla 15, mientras que el valor máximo del número de leucocitos disminuyó en la preparación a la que se añadió condroitina sulfato, se observó más claramente un aumento continuo en el número de leucocitos.

ES 2 300 758 T3

TABLA 15

Cambio en el número de leucocitos en ratones a los que se les administró una preparación de liberación sostenida de G-CSF

Preparación de liberación sostenida	Número de leucocitos ($\times 10^2$ células/mm ³)	
	Sin condroitina sulfato	Con condroitina sulfato
Antes de la administración	84 $\pm$ 19	80 $\pm$ 7
Día 1	138 $\pm$ 37	159 $\pm$ 28
Día 2	307 $\pm$ 101	237 $\pm$ 49
Día 3	293 $\pm$ 114	183 $\pm$ 36
Día 4	255 $\pm$ 79	175 $\pm$ 44
Día 5	313 $\pm$ 98	226 $\pm$ 33
Día 6	218 $\pm$ 29	197 $\pm$ 8
Día 8	145 $\pm$ 42	145 $\pm$ 22
Día 9	97 $\pm$ 6	128 $\pm$ 26
Día 10	115 $\pm$ 36	132 $\pm$ 11
Día 11	100 $\pm$ 25	135 $\pm$ 34
Día 12	77 $\pm$ 37	124 $\pm$ 30

Ejemplo 15

Efecto de aumento de leucocitos de una preparación de liberación sostenida de G-CSF usando fosfato

Se preparó una preparación de liberación sostenida que contenía 0,1 mg/ml de G-CSF mezclando en primer lugar 100 μ l de disolución de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 400 μ l de tampón fosfato de sodio (0,2 M) a pH 7,2 y 3340 μ l de agua Milli-Q, y añadiendo 160 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación. Se añadieron a esta preparación 0,1 g de manitol y se liofilizó. La preparación liofilizada resultante volvió a suspenderse añadiendo agua inyectable y se administraron 10 ml/kg de la preparación a cada uno de los ratones ddY de 7 semanas de edad (3 ratones por grupo) mediante una única dosis, se tomó sangre (35 μ l) durante 12 días y se contó el número de leucocitos mediante un hematímetro automático.

Los resultados se muestran en la tabla 16. Tal como se muestra en la tabla, se conservó la eficacia farmacológica a lo largo de una semana incluso en la preparación de liberación sostenida que contiene cinc usando fosfato en vez de carbonato.

TABLA 16

Cambio en el número de leucocitos en ratones a los que se les administró una preparación de liberación sostenida de G-CSF

	Número de leucocitos (x 10 ² células/mm ³)
Preparación de liberación sostenida	G-CSF 0,1 mg/ml
Antes de la administración	82 ± 9
Día 1	175 ± 18
Día 2	258 ± 17
Día 3	246 ± 60
Día 4	207 ± 40
Día 5	262 ± 60
Día 6	237 ± 15
Día 8	166 ± 21
Día 9	142 ± 23
Día 10	139 ± 16
Día 11	106 ± 16
Día 12	126 ± 16

Ejemplo 16

Contenido en G-CSF en un precipitado preparado añadiendo en último lugar G-CSF y eficacia farmacológica de una preparación de precipitado

Se mezclaron en primer lugar 16 µl de disolución de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 158 µl de agua Milli-Q, disolución a la que se le añadieron después 16 µl de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación y además 10 µl de disolución de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM con agitación y se dejó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó la suspensión a aproximadamente 10.000 xg, se recogió el sobrenadante y se disolvió el precipitado resultante en disolución de EDTA 0,1 M (pH 7,4). Se determinó el contenido en G-CSF contenido en el sobrenadante y precipitado mediante un procedimiento ELISA. Como resultado, casi el 100% del G-CSF estaba contenido en el precipitado.

Con el fin de examinar la eficacia farmacológica, se mezclaron en primer lugar 176 µl de una disolución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 1738 µl de agua Milli-Q, disolución a la que se le añadieron después 176 µl de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación y además 110 µl de disolución de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM con agitación, preparando de este modo una preparación de liberación sostenida que contenía 0,2 mg/ml de G-CSF. A la preparación resultante se le añadieron 0,11 g de manitol y se liofilizó. La preparación liofilizada resultante volvió a suspenderse añadiendo agua inyectable y se administraron 5 ml/kg de la preparación a cada uno de los ratones ddY de 7 semanas de edad (3 ratones por grupo) mediante una única dosis, se tomó una muestra de sangre (35 µl) durante 12 días y se contó el número de leucocitos usando un hematómetro automático.

Los resultados se muestran en la tabla 17. Tal como se muestra en la tabla 17, se confirmó una conservación suficiente de la eficacia farmacológica incluso en la preparación de precipitado preparada añadiendo en primer lugar acetato de cinc y una disolución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio y añadiendo después G-CSF.

TABLA 17

Cambio en el número de leucocitos en ratones a los que se les administró una preparación de liberación sostenida de G-CSF

	Número de leucocitos (x 10 ² células/mm ³)
Preparación de liberación sostenida	G-CSF 0,2 mg/ml
Antes de la administración	51 ± 9
Día 1	100 ± 35
Día 2	277 ± 94
Día 3	242 ± 119
Día 4	185 ± 54
Día 5	299 ± 76
Día 6	285 ± 115
Día 8	271 ± 103
Día 9	221 ± 105
Día 10	167 ± 86
Día 11	125 ± 51
Día 12	124 ± 39

Ejemplo 17

Tasa de precipitación en la formación de precipitado mezclando una disolución de acetato de cinc (20 mM) y una disolución de hidrogenocarbonato de sodio (20 mM), con respecto a anticuerpo anti-TNF (monoclonal), interferón- α y hormona del crecimiento

Se mezclaron en primer lugar 10 μ l de disolución de anticuerpo anti-TNF (10 mg/ml), 8 μ l de disolución de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 174 μ l de agua Milli-Q y se le añadieron después a la disolución resultante 8 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación y se dejó durante 10 minutos a temperatura ambiente, obteniendo de este modo una suspensión.

De manera similar, se mezclaron en primer lugar 77 μ l de interferón- α (1,3 mg/ml), 8 μ l de disolución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 107 μ l de agua Milli-Q, y se le añadieron después a la disolución resultante 8 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación y se dejó durante 10 minutos a temperatura ambiente, obteniendo de este modo una suspensión.

Además, se mezclaron en primer lugar 200 μ l de hormona del crecimiento (0,5 mg/ml), 16 μ l de disolución de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 168 μ l de agua Milli-Q, y se le añadieron después a la disolución resultante 16 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación y se dejó durante 10 minutos a temperatura ambiente, obteniendo de este modo una suspensión.

Se centrifugó cada una de estas suspensiones a aproximadamente 10.000 xg, se recogió el sobrenadante y se disolvió el precipitado en disolución de EDTA 0,1 M (pH 7,4). Se cuantificaron el anticuerpo anti-TNF e interferón- α contenidos en el sobrenadante y precipitado mediante un procedimiento ELISA y se cuantificó la hormona del crecimiento mediante HPLC en fase inversa.

Los resultados se muestran en la tabla 18. Tal como se muestra en la tabla 18, las proteínas que se sabía que se unían al cinc tales como anticuerpo anti-TNF, interferón- α y hormona del crecimiento dieron como resultado un contenido muy alto en precipitado en comparación con el conseguido mediante G-CSF cuando se mezclaron 0,5 mg/ml de anticuerpo anti-TNF o interferón- α o 0,25 mg/ml de hormona del crecimiento con la disolución de hidrogenocarbonato de sodio y disolución de acetato de cinc para formar un precipitado.

TABLA 18

Contenido en anticuerpo anti-TNF, interferón- α y hormona del crecimiento

	Contenido en proteína (%)	
	Sobrenadante	Precipitado
Anticuerpo anti-TNF	0,1	99,9
Interferón- α	2,0	98,0
Hormona del crecimiento	0,8	99,2

Ejemplo 18

Control de la capacidad de liberación sostenida en una preparación de liberación sostenida de hormona del crecimiento humana (hGH) que contiene cinc mediante carbonato y fosfato

(1) Se preparó una preparación usando carbonato mezclando en primer lugar 720 μ l de disolución de hGH desalada (0,5 mg/ml), 24 μ l de disolución de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 432 μ l de agua Milli-Q, y añadiendo 24 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación.

(2) Se preparó una preparación usando tanto carbonato como fosfato mezclando en primer lugar 720 μ l de disolución de hGH desalada (0,5 mg/ml), 24 μ l de disolución de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M), 30 μ l de tampón fosfato (0,2 M) a pH 7,2 y 402 μ l de agua Milli-Q, y añadiendo 24 μ l de disolución de acetato de cinc (0,5 M) con agitación.

(3) Se preparó una preparación en disolución mezclando 720 μ l de disolución de hGH desalada (0,5 mg/ml), 24 μ l de disolución de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 432 μ l de agua Milli-Q.

A estas preparaciones se les añadieron 0,03 g de manitol y entonces se liofilizaron. Antes de la administración, se disolvieron las preparaciones (1) y (2) en 600 μ l de una mezcla de acetato de cinc 20 mM/hidrogenocarbonato de sodio 20 mM y se disolvió la preparación (3) en 600 μ l de agua Milli-Q. Cada 5 ml/kg de las preparaciones anteriores se administraron por vía subcutánea a ratones ddY de 7 semanas de edad (2 ratones por grupo). A 4 horas, 1, 2, 3 y 4 días tras la administración se tomó una muestra de sangre (65 μ l) y se midió la concentración de hGH mediante un aparato EIA automático.

Los resultados se muestran en la tabla 19. Tal como resulta evidente a partir los resultados en la tabla, la preparación de hGH que contiene una combinación de cinc/carbonato eluyó el fármaco de una manera sostenida. Añadiendo un fosfato a esta preparación mejora la capacidad de liberación sostenida de modo que se suprime la elución tras varias horas y se observó una concentración de hGH en sangre superior durante varios días más.

TABLA 19

Cinética en sangre de la hGH en ratones a los que se les administró una preparación de liberación sostenida de hGH que contiene cinc

Preparación	Concentración de hGH en sangre (ng/ml)				
	4 h	1 día	2 días	3 días	4 días
Acetato de cinc / hidrogenocarbonato de sodio	79,05	7,94	2,27	0,62	0,24
Acetato de cinc / hidrogenocarbonato de sodio / tampón fosfato	9,15	17,00	5,22	3,03	1,56
Hidrogenocarbonato de sodio	92,88	ND	ND	ND	ND

ND: no detectado

Ejemplo 19

Estabilidad de una preparación de liberación sostenida de G-CSF liofilizada

5 Se mezclaron en primer lugar 0,5 ml de G-CSF (4,0 mg/ml) disueltos en tampón fosfato aproximadamente 30 mM, 0,8 ml de hidrogenocarbonato de sodio (0,5 M) y 7,9 ml de agua Milli-Q, y se añadieron 0,8 ml de disolución de acetato de cinc (0,5 M) a la mezcla con agitación formando un precipitado, después de lo cual se añadieron 0,5 g de trehalosa, se cargó dentro de viales con 1 ml y entonces se liofilizó. Tras la liofilización, se colocaron las muestras en una cámara termostática a 37°C. A 450 µl de muestra antes de la liofilización se le añadieron 50 µl de EDTA 0,5 M para disolver el precipitado. Se sometieron 100 µl de la disolución resultante a HPLC en fase inversa para determinar el contenido en G-CSF. Por otro lado, cada 1 ml de las muestras inmediatamente tras la liofilización, volvieron a suspenderse en agua inyectable 1 semana y 4 semanas tras el almacenamiento en una cámara termostática, de los que se extrajeron 450 µl.

15 A esto se le añadieron entonces 50 µl de EDTA 0,5 M para disolver el precipitado y se sometieron 100 µl de la disolución resultante a HPLC en fase inversa para determinar el contenido en G-CSF.

Basándose en el área del pico de elución de G-CSF, se comparó la recuperación de G-CSF.

20 Tal como se muestra en la tabla 20, se recuperó casi el 100% de G-CSF incluso cuando la preparación de G-CSF liofilizada se almacenó a 37°C durante cuatro semanas y no se observaron ni agregación ni descomposición.

TABLA 20

25 *Estabilidad a las 4 semanas a 37°C de una preparación de liberación sostenida de G-CSF liofilizada*

	Recuperación de G-CSF (%)
30 Antes de la liofilización	100,0
Inmediatamente tras la liofilización	88,1
1 semana tras la liofilización	90,0
35 4 semanas tras la liofilización	90,6

Ejemplo 20

40 *Ejemplo de preparación (inyección en suspensión)*

A una preparación de liberación sostenida que contenía 0,2 mg/ml de G-CSF preparada según el ejemplo 10, se le añadió manitol y se liofilizó. Se cargó la preparación liofilizada resultante dentro de un vial y se preparó una inyección en suspensión volviendo a suspender la preparación añadiendo carmelosa al 0,5% o agua inyectable en otro vial.

Aplicabilidad industrial

50 Según se describió anteriormente, la presente invención proporciona una preparación insoluble en agua que hace precipitar un péptido o una proteína fisiológicamente activos tal como G-CSF con alto rendimiento y estabiliza a los mismos, así como permite que el péptido o la proteína fisiológicamente activos conserven su eficacia farmacológica durante varios días en un organismo vivo debido a la capacidad de liberación sostenida del precipitado obtenido. Por tanto, la presente invención contribuye de manera significativa a la industria médica y farmacéutica.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de liberación sostenida que contiene cinc, **caracterizada** por formar un precipitado mezclando un péptido o una proteína fisiológicamente activos, una sal de cinc soluble en agua y una disolución acuosa de un carbonato soluble en agua.

2. La composición de liberación sostenida que contiene cinc según la reivindicación 1, en la que la sal de cinc soluble en agua es acetato de cinc o cloruro de cinc.

3. La composición de liberación sostenida que contiene cinc según la reivindicación 1, en la que la proporción molar del péptido o de la proteína fisiológicamente activos y cinc en la sal de cinc soluble en agua es de 1:100 o superior.

4. La composición de liberación sostenida que contiene cinc según la reivindicación 1, en la que el carbonato soluble en agua es carbonato de sodio o hidrogenocarbonato de sodio.

5. La composición de liberación sostenida que contiene cinc según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la proteína fisiológicamente activa es G-CSF, anticuerpo, hormona del crecimiento, IFN, EPO, GM-CSF, BDNF, NT3, anticuerpo TNF, interleucina o FGF.

6. La composición de liberación sostenida que contiene cinc según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición de liberación sostenida que contiene cinc está liofilizada.

7. La composición de liberación sostenida que contiene cinc según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición de liberación sostenida que contiene cinc está en una forma adecuada para inyección subcutánea o inyección intramuscular.

8. La composición de liberación sostenida que contiene cinc según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la disolución acuosa comprende además un fosfato soluble en agua.

9. La composición de liberación sostenida que contiene cinc según la reivindicación 8, en la que el fosfato soluble en agua es fosfato de sodio o hidrogenofosfato de sodio.

10. Una preparación de liberación sostenida que contiene cinc, **caracterizada** por añadir cuando sea necesario un aditivo farmacéuticamente aceptable a la composición de liberación sostenida que contiene cinc según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. La preparación de liberación sostenida que contiene cinc según la reivindicación 10, en la que el aditivo farmacéuticamente aceptable es un agente dispersante, un tensioactivo, un agente antiséptico o un estabilizador.

12. La preparación de liberación sostenida que contiene cinc según la reivindicación 10 u 11, en la que el aditivo farmacéuticamente aceptable es un sacárido.

13. La preparación de liberación sostenida que contiene cinc según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que la preparación de liberación sostenida que contiene cinc está liofilizada.

14. La preparación de liberación sostenida que contiene cinc según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en la que la preparación de liberación sostenida que contiene cinc está en una forma adecuada para inyección subcutánea e inyección intramuscular.

15. Un agente para aumentar los leucocitos que comprende la preparación de liberación sostenida que contiene cinc según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en el que la proteína fisiológicamente activa es G-CSF.

16. Un procedimiento para producir una composición de liberación sostenida que contiene cinc, **caracterizado** por mezclar un péptido o una proteína fisiológicamente activo, una sal de cinc soluble en agua, una disolución acuosa de un carbonato soluble en agua para formar un precipitado.

17. El procedimiento para producir una composición de liberación sostenida que contiene cinc según la reivindicación 16, en el que la disolución acuosa comprende además un fosfato soluble en agua.