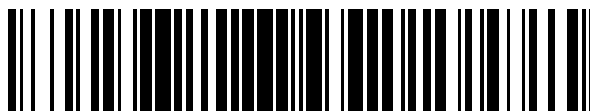


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 959**

51 Int. Cl.:  
**A61K 47/18** (2006.01)  
**A61K 38/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03720286 .8**  
96 Fecha de presentación: **02.05.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1503798**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2005**

54 Título: **Composiciones sólidas estabilizadas de factor VII modificado**

30 Prioridad:  
**03.05.2002 DK 200200677**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.04.2012**

73 Titular/es:  
**Novo Nordisk Health Care AG**  
**Andreasstrasse 15**  
**8050 Zürich**

72 Inventor/es:  
**NEDERGAARD, Hanne;**  
**HANSEN, Lars, Lindgaard;**  
**KLAUSEN, Niels, Kristian;**  
**KORNFELT, Troels y**  
**FLINK, James, M.**

74 Agente/Representante:  
**Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 377 959 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

5 Composiciones sólidas estabilizadas de factor VII modificado

Campo de la invención

10 [0001] La presente invención se refiere a composiciones químicamente al igual que físicamente estables comprendiendo factor VII modificado que puede almacenarse, usarse y manejarse a temperatura ambiente.

Antecedentes de la invención

15 [0002] Moléculas del factor VII modificado son derivados del factor VII de coagulación humano donde el sitio catalítico se modifica de manera que la actividad catalítica de la forma activa, factor VIIa, disminuye, mientras la capacidad de unión del factor tisular se mantiene. Factor VII (humano de tipo salvaje) se ha descrito en la patente US n° 4,784,950. Ejemplos de moléculas del factor VII modificado se han descrito en WO 92/15686, WO 94/27631, WO 96/12800 y WO 97/47651. Así, en similitud a la molécula del factor VIIa nativo, el factor VIIa modificado se unirá con factor tisular, pero al contrario que el factor VIIa nativo, el factor VII modificado no activará los pasos posteriores en la ruta de coagulación extrínseca. Así, el factor VII modificado actúa como un inhibidor de la formación de un coágulo de fibrina. Por lo tanto, moléculas del factor VIIa modificado se han sugerido en el tratamiento de lesión vascular por bloqueo de la producción de trombina y la deposición posterior de fibrina (WO 97/47651).

25 [0003] Como proteína, las moléculas del factor VII modificado son susceptibles a degradación física, incluyendo desnaturalización y agregación, como la formación de agregados insolubles o solubles en forma de dímeros, oligómeros y polímeros, o a degradación química, incluyendo, por ejemplo, hidrólisis, desamidación y oxidación. La consecuencia total es pérdida de actividad de la molécula del factor VII modificado, formación de productos de degradación inmunogénicos y tóxicos, riesgo serio de introducción de trombosis en la inyección de la molécula del factor VII modificado degradado, obstrucción de agujas usadas para inyecciones y riesgo de no-homogeneidad. Así la seguridad y la eficacia de medicamentos comprendiendo factor VII modificado están directamente relacionadas con la estabilidad del factor VII.

35 [0004] El factor VII modificado puede proporcionarse hoy en día en una formulación líquida, que necesita almacenarse congelada a - 80 °C.

40 [0005] Así, composiciones comprendiendo factor VII modificado necesitan estabilizarse. En particular, hay una necesidad para almacenamiento y manipulación de medicamentos comprendiendo factor VII modificado bajo condiciones ambientales sin el requisito de un congelador y donde las composiciones se pueden almacenar durante un tiempo prolongado como durante al menos 6 meses antes de uso.

45 [0006] Un método de estabilización de una proteína se refiere a eliminación de agua de la proteína, por ejemplo, como proporcionando la proteína en forma de un pastel liofilizado, la materia final obtenida en un proceso de liofilización. No obstante, el proceso de liofilización en sí mismo es también nocivo para las proteínas; durante la liofilización, la solución de proteína se enfría antes primero hasta que se congela adecuadamente y el volumen de agua en la solución de proteína formará hielo en esta fase. La proteína es propensa por la presente a tensión inducida por congelación provocando deformación y precipitación. En el siguiente paso, la fase primaria denominada de secado, el hielo sublima y en la fase de secado secundaria, el agua unida o adsorbida se quita bajo temperaturas elevadas. Durante esta eliminación de agua, las proteínas pueden perder su conformación apropiada que se provee principalmente a través de unión de hidrógeno.

50 [0007] Por lo tanto, para preservar la conformación de proteína, actividad y estabilidad durante liofilización, la solución de proteína necesita complementarse con cantidades suficientes de excipientes apropiados con propiedades crioprotectoras y/o lioprotectoras para proteger la proteína de tensión inducida por congelación y/o tensión durante eliminación de agua, respectivamente.

55 [0008] Cuando se proporciona a un producto liofilizado una característica esencial se refiere a las propiedades del pastel liofilizado. Necesita tener buenas propiedades en cuanto a su forma y estructura, es decir, este no debería colapsarse, ya que estos pasteles colapsados pueden ser duros o incluso imposibles de disolver (reconstituir) antes de uso. Por el contrario, la estructura física del pastel liofilizado no puede estar suelta y blanda. Por lo tanto, uno o más agentes denominados de carga se agregan a la solución de proteína antes de liofilización. Agentes de carga son agentes que proporcionan buenas propiedades de pastel liofilizado y que ayudan a la proteína a superar varias tensiones asociadas al proceso de liofilización, por ejemplo, corte/congelación. Además, los agentes de estabilización pueden ayudar en la formación de productos farmacéuticamente estables y de aspecto agradable, que protegen la proteína durante liofilización al igual que durante almacenamiento posterior.

[0009] Durante el desarrollo de un medicamento estable comprendiendo un factor VII modificado apropiado se administra parentalmente y se almacena en condiciones ambientales, excipientes adecuados deberían añadirse y sus niveles ajustarse cuidadosamente para proporcionar un producto que también es aproximadamente isotónico con plasma y tiene un pH en un intervalo fisiológicamente adecuado para inyección o infusión. La elección de agentes capaces de modificar la tonicidad es crucial, ya que más modificadores de tonicidad en forma de sales hacen el proceso de liofilización difícil.

[0010] Así, es un objetivo de la presente invención proporcionar composiciones estables de factor VII modificado, sustancialmente sin la presencia de productos de degradación y sin actividad del factor VII modificado reducida, incluso después de almacenamiento prolongado en condiciones ambientales. Además, es un objetivo esencial que las composiciones estables se adecúen para administración parental y así tengan una tonicidad fisiológicamente apropiada y un margen de pH para no causar cualquier inconveniente al paciente.

#### Resumen de la invención

[0011] Se ha descubierto por los presentes investigadores que factor VII modificado se puede proporcionar en una composición que es suficientemente estable para permitir almacenamiento a 25 °C durante aproximadamente al menos de 12 a 18 meses.

[0012] Por consiguiente, la presente invención se refiere en un primer aspecto a composiciones estabilizadas comprendiendo:

- i) factor VII modificado;
- ii) un agente adecuado para mantener el pH de dicha composición en el intervalo de 4 a 7 cuando dicha composición se disuelve en agua; y, además, ingredientes como en las reivindicaciones y
- iii) un contenido de humedad de como mucho 3%.

[0013] En otro aspecto, la invención se refiere a un método de preparación de un factor VII modificado estable que incluye las etapas de:

- i) provisión de dicho factor VII modificado en una solución con pH en el intervalo de 4 a 7.
- ii) tratamiento de dicha solución para obtener una composición sólida con un contenido de humedad de como mucho 3 % p/p.

[0014] Tal y como se menciona, factor VII modificado estabilizado se solicita para minimizar el riesgo de eventos adversos y para mejorar seguridad y eficacia cuando se administra el factor VII modificado para uso terapéutico. Por lo tanto, todavía otro aspecto de la invención se refiere al uso de un factor VII modificado para la preparación de un medicamento para evitar coagulación de la sangre y/o reacciones mediadas por factor tisular, dicho medicamento comprende una composición comprendiendo;

- i) factor VII modificado;
- ii) un agente adecuado para mantener del pH de dicha composición en el intervalo de 4 a 7 cuando dicha composición se disuelve en agua, y además ingredientes como en las reivindicaciones y
- iii) un contenido de humedad de como mucho 3%.

[0015] Finalmente, la invención se refiere a administración de dicho factor VII modificado estabilizado a un paciente para evitar coagulación de la sangre y/o reacciones mediadas por factor tisular, comprendiendo administración a un sujeto con necesidad de este, una cantidad eficaz de una composición comprendiendo;

- i) factor VII modificado;
- ii) un agente adecuado para mantener el pH de dicha composición en el intervalo de 4 a 7 cuando dicha composición se disuelve en agua; y además ingredientes como en las reivindicaciones y
- iii) un contenido de humedad de como mucho 3%.

#### Descripción detallada de la invención

[0016] La presente invención se refiere a composiciones estables en almacenamiento comprendiendo factor VII modificado. Las composiciones se pueden almacenar a varias temperaturas ambiente incluyendo temperaturas ambiente durante un periodo de tiempo extendido sin causar degradación sustancial del factor VII modificado.

[0017] La presente invención se basa en el descubrimiento de que formulaciones estables en almacenamiento de factor VII modificado que son estables durante al menos aproximadamente de 12 a 18 meses sobre almacenamiento a 25 °C a oscuras. La presente invención también incluye composiciones comprendiendo factor VII modificado que son estables incluso durante periodos de almacenamiento más largos, como 32 meses. Así, la presente invención hace posible almacenar estas composiciones a temperatura ambiente sin aumento en el riesgo de eventos adversos en la administración a pacientes de estas composiciones. Ventajosamente, la estabilidad de almacenamiento mejorada también supondrá coste reducido, ya que ninguna condición especial de enfriado se requiere sobre almacenamiento, además dando como resultado manipulación de la composición más conveniente para el usuario.

[0018] El término factor VII modificado se denomina para significar cualquier proteína del factor VII, que se modifica para reducir la actividad catalítica del factor VIIa, mientras todavía puede unirse a factor tisular. Como resultado, las moléculas del factor VII modificado competirán con factor VII nativo y/o VIIa para unirse a factor tisular, así se inhibe la activación de los factores posteriores, X y IX, de la secuencia de coagulación. La modificación puede, por ejemplo, localizarse en el sitio catalítico.

[0019] El término "factor VII modificado" abarca, sin limitación, polipéptidos en los que la actividad biológica del factor VIIa se ha reducido sustancialmente en relación a la actividad de factor VIIa humano de tipo salvaje (como se describe en la patente US n° 4,784,950). Estos polipéptidos incluyen, sin limitación, factor VII o factor VIIa que se han modificado químicamente y variantes del factor VII en las que una o más alteraciones de la secuencia de aminoácidos específicas se han introducido que modifican o interrumpen la bioactividad del polipéptido. El término "factor VII modificado" además abarca, sin limitación, polipéptidos que han truncado secuencias de aminoácido relativas al factor VII humano (es decir, fragmentos del factor VII), y/o extremo N-terminal incluyendo deleciones o adiciones del aminoácido N-terminal, y/o modificaciones postranslacionales. El factor VII modificado se une a factor tisular con afinidad alta y especificidad, pero no inicia coagulación de la sangre.

[0020] Como se usa aquí, factor VII modificado puede estar en forma del zimógeno (es decir, una molécula monocatenaria) o se puede dividir en su sitio de activación. Así, el término "factor VII modificado" se destina para significar un factor VII modificado que, sobre activación a factor VIIa modificado, al igual que las moléculas del factor VIIa modificado que son capaces de unirse a factor tisular, capaces de competir con factor VII auténtico y/o factor VIIa para unirse a factor tisular en la coagulación en cascada inhibiendo así la activación de factor IX a IXa y factor X a Xa. Esta competición puede determinarse fácilmente mediante, por ejemplo, un ensayo de coagulación de competición, un ensayo de competición FIXa o de generación de FXa, o un ensayo de unión de competición, usando, por ejemplo, una línea celular con factor tisular de su superficie de la célula, como la línea de célula de carcinoma de vejiga humano J82 (Sakai et al. *J. Biol. Chem.* 264: 9980-9988 (1989), incorporado aquí como referencia), por ejemplo, como se describe en la presente especificación (ver sección "ensayo", abajo),

[0021] En una forma de realización de la invención, factor VII modificado abarca aquellos polipéptidos que muestran al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 100%, al menos aproximadamente 110%, o al menos aproximadamente 120% de la afinidad de TF-unión específica de factor VIIa de tipo salvaje, cuando se evalúa en uno o más ensayos de unión TF como se describe en la presente especificación. En una forma de realización preferida, los antagonistas de TF muestran al menos aproximadamente 75% de la afinidad de enlace de factor VIIa de tipo salvaje. El término "actividad de enlace de TF", como se utiliza en este caso, significa la capacidad de un polipéptido FVIIa o antagonista de TF para inhibir la unión de 125I-FVIIa humano recombinante a TF humano de superficie celular. La actividad de enlace de TF puede medirse, por ejemplo, como se describe en el ensayo 3 (de la presente especificación). En otra forma de realización, factor VII modificado abarca aquellos polipéptidos que muestran menos de aproximadamente 25%, más preferiblemente menos de aproximadamente 10%, o 5%, o 3%, o 2%, y de forma más preferida menos de aproximadamente 1% de la actividad específica de factor VIIa de tipo salvaje, cuando se evalúan en uno o más de un ensayo de coagulación, ensayo de generación de FIXa o FXa, amidólisis o ensayo de proteólisis como se describe en los ensayos 1-2 y 4-7 de la presente descripción.

[0022] Los términos "sitio activo" o "sitio catalítico", cuando se usan aquí con referencia a FVIIa, se refieren al sitio de unión de sustrato de zimógeno y catalítico, incluyendo el sitio "S<sub>1</sub>" de FVIIa como el término definido por Schechter, I. and Berger, A., (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7:157-162.

[0023] El sitio catalítico de proteínas del factor VII humano y bovino comprende los aminoácidos Ser344; Asp242 y His193 (numeración de subíndice indicando la posición en la secuencia) que forman un catalítico denominado "tríada". Los sitios catalíticos en el factor VII de otras especies mamíferas pueden determinarse usando técnicas actualmente disponibles incluyendo, entre otros, aislamiento de proteína y análisis de secuencia de aminoácidos. Sitios catalíticos pueden determinarse también alineando una secuencia con la secuencia de otras serina proteasas, particularmente quimiotripsina, cuyo sitio activo ha sido determinado previamente (Sigler et al., *J. Mol. Biol.*, 35:143-164 (1968), incorporado aquí como referencia, y desde ahí determinando dicho alineamiento los residuos de sitio activo análogos. Así, como se usa aquí, factor VII modificado abarca polipéptidos del factor VII derivados de cualquier especie mamífera.

[0024] La modificación de la actividad catalítica del factor VIIa se puede efectuar de varias maneras, incluyendo, sin limitación, derivatización química, reacciones enzimáticas o por sustitución, inserción o deleción de aminoácidos.

[0025] En una forma de realización, la actividad catalítica del factor VIIa se inhibe por derivatización química del sitio catalítico, o tríada. La derivatización se puede realizar al reaccionar factor VII con un inhibidor irreversible como un compuesto de organofósforo, un sulfonil fluoruro, una cetona de halometilo peptídica o un azapéptido, o por acilación, como ejemplos no limitativos. Inhibidores incluyen, sin limitación, clorometilcetonas peptídicas o peptidil clorometanos; azapéptidos; agentes acilantes como varios derivados de guanidinobenzoato y 3-alcoxi-4-cloroisocumarinas; sulfonil fluoruros como fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF); diisopropilfluorofosfato (DFP); tosilpropilclorometil cetona (TPCK); tosilisilclorometil cetona (TLCK); nitrofenilsulfonatos; inhibidores de proteasa heterocíclicos como isocumarinas y cumarinas.

[0026] Halometilcetonas peptídicas preferidas incluyen Phe-Phe-Arg clorometilcetona (FFR-cmk), D-Phe-Phe-Arg clorometilcetona (D-FFR-cmk), Phe-Pro-Arg clorometilcetona (FPR-cmk), D-Phe-Pro-Arg clorometilcetona (D-FPR-cmk) (ver patente US n° 4,318,904 incorporada aquí como referencia), L-Glu-Gly-Arg clorometilcetona (EGR-cmk) y D-Glu-Gly-Arg clorometilcetona (D-EGR-cmk), Dansil-Phe-Phe-Arg clorometilcetona, Dansil-D-Phe-Pro-Arg clorometilcetona, Dansil-Phe-Pro-Arg clorometilcetona, Dansil-D-Phe-Pro-Arg clorometilcetona, Dansil-L-Glu-Gly-Arg clorometilcetona y Dansil-D-Glu-Gly-Arg clorometilcetona.

[0027] En la forma de realización donde la molécula del factor VII modificado está en forma activada, es posible modificar FVIIa reaccionado con un inhibidor de serina proteasa. En una forma de realización, el inhibidor de proteasa es un compuesto de organofósforo, un sulfanil fluoruro, una halometilcetona peptídica, o un aza péptido. En una forma de realización, el inhibidor de proteasa es una halometilcetona peptídica seleccionada de Phe-Phe-Arg clorometilcetona (FFR-cmk), D-Phe-Phe-Arg clorometilcetona (D-FFR-cmk), Phe-Pro-Arg clorometilcetona (FPR-cmk), D-Phe-Pro-Arg clorometilcetona (D-FPR-cmk), L-Glu-Gly-Arg clorometilcetona (EGR-cmk) y D-Glu-Gly-Arg clorometilcetona (D-EGR-cmk), D-ansil-Phe-Phe-Arg clorometilcetona, Dansil-D-Phe-Pro-Arg clorometilcetona, Dansil-L-Glu-Gly-Arg clorometilcetona y Dansil-D-Glu-Gly-Arg clorometilcetona. En una forma de realización, el inhibidor de proteasa es una halometilcetona peptídica seleccionada de Dansil-L-Phe-Pro-Arg clorometilcetona, Dansil-L-Glu-Gly-Arg clorometilcetona, Dansil-L-Phe-Phe-Arg clorometilcetona y L-Phe-Phe-Arg clorometilcetona, Dansil-D-Phe-Pro-Arg clorometilcetona, Dansil-D-Glu-Gly-Arg clorometilcetona, Dansil-D-Phe-Phe-Arg clorometilcetona de clorometilo y D-Phe-Phe-Arg clorometilcetona. En una forma de realización, el inhibidor de proteasa es D-Phe-Phe-Arg clorometilcetona (FFR-FVIIa).

[0028] Debe entenderse que cuando la designación "D" precede inmediatamente una abreviación de letra para un aminoácido como se muestra arriba, este aminoácido es el d-enantiómero no natural.

[0029] En otras formas de realización, la actividad catalítica de factor VIIa se inhibe por sustitución, inserción o delección de aminoácidos. En una serie de formas de realización, una o más sustituciones de aminoácido se hacen en la secuencia de aminoácidos de la tríada catalítica del factor VII, definida aquí como las regiones que contienen los aminoácidos que contribuyen en el sitio catalítico del factor VIIa. Las sustituciones, inserciones o delecciones en la tríada catalítica están generalmente en o adyacentes a los aminoácidos que forman el sitio catalítico. En proteínas del factor VII humano y bovino, los aminoácidos que forman una "tríada" catalítica son Ser344; Asp242 y His193 (numeración de subíndice indicando posición en el factor VII humano de tipo salvaje). Los sitios catalíticos en el factor VII de otras especies mamíferas pueden determinarse usando técnicas actualmente disponibles incluyendo, entre otros, aislamiento de proteína y análisis de secuencia de aminoácidos. Sitios catalíticos pueden determinarse también alineando una secuencia con la secuencia de otras serina proteasas, particularmente quimiotripsina, cuyo sitio activo se ha determinado previamente (Sigler et al., *J. Mol. Biol.*, 35:143-164 (1968), incorporado aquí como referencia), y desde ahí determinando dicho alineamiento los residuos de sitio activo análogos.

[0030] Las sustituciones de aminoácido, inserciones o delecciones se hacen para prevenir o, de otra manera, inhibir activación por el factor VIIa de factores X y/o IX. El factor VII así modificado debería, no obstante, retener también la capacidad para concurrir con factor VII y/o factor VIIa auténticos para unión a factor tisular en la coagulación en cascada. Esta competición puede determinarse fácilmente mediante, por ejemplo, un ensayo de coagulación o un ensayo de enlace de competición como se describe en la presente especificación, usando, por ejemplo, una línea celular con factor tisular de superficie de la célula, como la línea de célula de carcinoma de vejiga humano J82 (Sakai et al. *J. Biol. Chem.* 264: 9980-9988 (1989)).

[0031] En la presente invención, se prefiere cambiar solo un único aminoácido, minimizando así la probabilidad de aumentar la antigenicidad de la molécula o inhibir su capacidad para unión a factor tisular. No obstante, dos o más cambios en aminoácidos (sustituciones, adiciones o delecciones) pueden hacerse y combinaciones de sustitución(es), adición(es) y delección(es) pueden también hacerse. Los aminoácidos que forman el sitio catalítico en el factor VII, como Ser344, Asp242 y His193 en el factor VII humano y bovino, pueden sustituirse también o eliminarse. En una forma de realización preferida para factor VII humano y bovino, Ser344 se sustituye preferiblemente con Ala, pero Gly, Met, Thr u otros aminoácidos pueden sustituirse también. Se prefiere reemplazar Asp con Glu y reemplazar His con Lys o Arg. En general, sustituciones se eligen para interrumpir la estructura de la proteína terciaria lo menos posible. El modelo de Dayhoff et al. (en *Atlas of Protein Structure* 1978, Nat. Biomed. Res. Found. Washington, D.C.), incorporado aquí como referencia, se puede utilizar como una guía en la selección de otras sustituciones de aminoácido. Uno puede introducir alteraciones de residuo como se ha descrito anteriormente en el sitio catalítico de la secuencia del factor VII humano apropiada, bovino u otras especies y probar la proteína resultante para un nivel deseado de inhibición de actividad catalítica y actividad anticoagulante resultante como se describe en este caso.

[0032] En formas de realización preferidas de factor VII humano y VII bovino, sitio activo del residuo de Ser344 se modifica, se sustituye con Gly, Met, Thr, o más preferiblemente, Ala. Esta sustitución podría hacerse separadamente o en combinación con sustitución(es) en otros sitios en la tríada catalítica, que incluye His193 y Asp242.

[0033] Ejemplos no limitativos de factor VII modificado con actividad biológica sustancialmente reducida relativo a factor de tipo salvaje VII incluyen R152E-FVIIa (Wildgoose et al., *Biochem* 29:3413-3420, 1990), S344A-FVIIa (Kazama et

al., *J. Biol. Chem.* 270:66-72, 1995), FFR-FVIIa (Holst et al., *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 15:515-520, 1998), y factor VIIa carente del dominio Gla, (Nicolaisen et al., *FEBS Letts.* 317:245-249, 1993). Ejemplos no limitativos también incluyen FVIIa humano, que tiene el residuo de lisina en la posición 341 sustituido por otro residuo de aminoácido; FVIIa humano, que tiene el residuo de serina en la posición 344 sustituido por otro residuo de aminoácido; FVIIa humano, que tiene el residuo de ácido aspártico en la posición 242 sustituido por otro residuo de aminoácido; FVIIa humano, que tiene el residuo de histidina en la posición 193 sustituido por otro residuo de aminoácido; FVII-(K341A); FVII-(S344A); FVII-(D242A); FVII-(H193A); Phe-Phe-Arg-FVII (FFR-FVII), D-Phe-Phe-Arg-FVII (D-FFR-FVII), Phe-Pro-Arg-FVII (FPR-FVII), D-Phe-Pro-Arg-FVII (D-FPR-FVII), L-Glu-Gly-Arg-FVII (EG R-FVII) and D-Glu-Gly-Arg-FVII (D-EGR-FVII), Dansil-Phe-Phe-Arg-FVII, Dansil-D-Phe-Phe-Arg-FVII, Dansil-Phe-Pro-Arg-FVII, Dansil-D-Phe-Pro-Arg-FVII, Dansil-L-Glu-Gly-Arg-FVII y Dansil-D-Glu-Gly-Arg-FVII. Ejemplos no limitativos de polipéptidos del factor VII químicamente modificados y variantes de secuencia se describen, por ejemplo, en la patente US n° 5,997,864.

[0034] Por otra parte, el término "factor VII modificado" se refiere a moléculas del factor VII modificado que derivan de animales, como seres humanos o producidos por medios sintéticos y/o recombinantes.

[0035] En una forma de realización, la molécula del factor VII modificado es factor VIIa, preferiblemente factor VII bovino o humano, que se modifica por el inhibidor de proteasa D-Phe-Phe-Arg clorometilcetona.

[0036] En una forma de realización, la molécula del factor VII modificado es factor VIIa humano de tipo salvaje modificado por el inhibidor de proteasa D-Phe-Phe-Arg clorometilcetona. En que forma de realización, la molécula del factor VII modificado se abrevia FFR-FVIIa.

[0037] Como se utiliza en este caso, concentración de FFR-FVIIa se expresa convenientemente como mg/ml o como U/ml, con 1 mg/ml aproximadamente equivalente a 20 U/ml.

[0038] El polipéptido del factor VII modificado puede estar presente en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 10,0 mg/ml, como de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 8,0 mg/ml, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5,0 mg/ml, o de aproximadamente 1,0 mg/ml a aproximadamente 5,0 mg/ml.

[0039] Como se utiliza en este caso, "estabilización" abarca minimización de la formación de agregados (soluble y/o insoluble) y/o degradación química al igual que provisión de mantenimiento de pH y conformación apropiada de la proteína durante almacenamiento o producción de las composiciones, de modo que retención sustancial de actividad biológica y estabilidad de proteína se mantienen. Por otra parte, estabilización también abarca lio protección y crioprotección de la proteína durante producción de las composiciones a condiciones de liofilización.

[0040] El término "estabilidad estructural" o "estabilización estructural" abarca la capacidad para formar un apón o pastel liofilizado con buenas propiedades y apariencia, por ejemplo, de manera que este no tiene un colapso y se disuelve fácilmente antes de uso.

[0041] Un producto estable en el almacenamiento es un producto que se estabiliza sobre almacenamiento a temperaturas entre 5°C - 50°C y permanece dentro de especificaciones de producto preseleccionadas para un periodo de tiempo predeterminado, frecuentemente varios meses.

[0042] Estabilidad física se refiere a la formación (o falta) de agregados solubles y/o insolubles en forma de formas poliméricas, dimericas y oligoméricas de factor VII modificado al igual que cualquier deformación estructural y desnaturalización de la molécula.

[0043] La estabilidad química se refiere a la formación (o falta) de cualquier cambio químico en el factor VII modificado sobre almacenamiento en estado disuelto o sólido a condiciones aceleradas. Por ejemplo no limitativo son hidrólisis, desamidación y oxidación. Particularmente, los aminoácidos con azufre son propensos a oxidación con la formación de los sulfóxidos correspondientes.

[0044] El término "crioprotectores", como se utiliza en este caso, incluye generalmente agentes, que proporcionan estabilidad a la proteína de tensiones inducidas por la congelación. Ejemplos no limitativos de crioprotectores incluyen polioles, como, por ejemplo, manitol, e incluyen sacáridos, como, por ejemplo, sacarosa, al igual que incluye tensioactivos, como, por ejemplo, polisorbato, poloxámero o polietilenglicol y similares. Los crioprotectores también contribuyen a la tonicidad de las formulaciones.

[0045] El término "lioprotector", como se utiliza en este caso, incluye agentes que proporcionan estabilidad a la proteína durante eliminación de agua sobre el proceso de secado del proceso de liofilización, como, por ejemplo, manteniendo la conformación apropiada de la proteína. Ejemplos no limitativos de lioprotectores incluyen sacáridos, particularmente di- o trisacáridos. Los crioprotectores pueden también tener efectos lioprotectores.

[0046] El término "agente adecuado para mantener el pH en el intervalo de 4 a 7" abarca a aquellos agentes que mantienen la solución en un intervalo de pH aceptable entre 4,0 a 7,0. Ejemplos típicos no limitativos de agentes capaces de mantener el pH dentro de un intervalo de 4 a 7 son citrato (sodio o potasio), acetato (amonio, sodio o

calcio), histidina (L- histidina), malato, fosfato (sodio o potasio), ácido tartárico, ácido succínico, MES, HEPES, imidazol, TRIS, lactato, glutamato y glicil-glicina.

5 [0047] El término "pastel liofilizado", como se utiliza en este caso, abarca la composición sólida obtenida sobre el tratamiento de una composición disuelta o al menos parcialmente disuelta bajo condiciones implicando al menos un paso de enfriamiento de dicha composición disuelta/parcialmente disuelta a hielo seguida de al menos un paso de secado al vacío.

10 [0048] EL "liofilización" abarca un proceso durante el que el líquido se quita de una composición disuelta o al menos parcialmente disuelta bajo condiciones implicando al menos un paso de congelación de la solución disuelta o parcialmente disuelta a hielo seguido de secado al vacío. La liofilización es el proceso más común para hacer fármacos de proteína sólidos. El proceso consiste en dos pasos mayores: congelación de una solución de proteína y secado del sólido congelado al vacío. El paso de secado se divide posteriormente en dos fases: secado primario y secundario. El secado primario retira el agua congelada (sublimación de hielo) y el secado secundario retira el agua "unida" no congelada (desorción de agua). Análisis más detallado de cada paso de liofilización se provee en, por ejemplo, Wang et al, *International Journal of Pharmaceutics* 203 (2000): 1-60 (ver sección 4, página 16 ff.).

20 [0049] Típicamente, una composición se liofiliza rellenando en viales, congelando en los estantes del liofilizador, después de lo cual un vacío se establece y los estantes calentados para implementar secado primario (o sublimación de hielo). Luego, secado secundario (o desorción de agua sorbida) se desarrolla a una temperatura más alta hasta que la finalización del proceso, es decir, donde la composición contiene un contenido suficientemente bajo de humedad (agua). Métodos para liofilización se conocen generalmente en la técnica, ver, por ejemplo, Wang et al, *International Journal of Pharmaceutics* 203 (2000): 1-60. Está en la habilidad común del profesional para optimizar las condiciones de liofilización teniendo en cuenta temperatura(s), tiempo(s) a cada temperatura, y también presión que debe usarse durante el proceso para una composición específica.

30 [0050] El término "contenido de humedad" se entiende que abarca agua asociada al producto, incluyendo, sin limitación, agua en forma adsorbida, como agua no congelada atrapada en o adsorbida en la fase de solución congelada y/o asociada a la fase amorfa o adsorbida al sólido cristalino. El término "contenido de agua" se usa de forma intercambiable con "contenido de humedad". El nivel de humedad residual deseado (contenido de humedad) en una función de la duración y la temperatura del paso de secado secundario. Varios métodos para determinar el contenido de humedad residual durante liofilización se conocen en la técnica; por ejemplo, un higrómetro electrónico o un analizador de gas residual pueden utilizarse. El contenido de humedad de formulaciones liofilizadas se puede determinar por diferentes métodos conocidos en la técnica, como, por ejemplo, pérdida-en-secado, valoración de Karl Fischer, análisis termogravimétrico (TGA), cromatografía de gases (GC), o cerca de IR (ver, por ejemplo Wang et al, *International Journal of Pharmaceutics* 203 (2000): 1-60). Métodos para determinación del contenido de agua (contenido de humedad) se describen también en las farmacopeas europeas y estadounidenses. Por ejemplo, determinación del contenido de agua se puede realizar por valoración colorimétrica de Karl Fischer como se describe en la farmacopea estadounidense (USP <921, 1c>) o en la farmacopea europea (EP <2.5.32>)). En resumen, el método es el siguiente:

35 Determinación de contenido de agua por valoración colorimétrica: la reacción Karl Fischer se usa en la determinación colorimétrica de agua basada en la reacción cuantitativa de agua con dióxido de azufre y yodo en un medio anhidro. Yodo se produce electroquímicamente en la célula de reacción por oxidación de yoduro. El yodo producido en el ánodo reacciona inmediatamente con el agua y el dióxido de azufre contenido en la célula de reacción. La cantidad de agua en la sustancia es directamente proporcional a la cantidad de electricidad hasta el punto final de valoración. Cuando todo el agua en la célula se ha consumido, el punto final se alcanza y así un exceso de yodo aparece que es detectado electrométicamente, indicando así el punto final. El porcentaje de contenido de agua presente en la sustancia se calcula luego.

50 [0051] El contenido de humedad se puede definir en cuanto al peso de la muestra en el vial en el tiempo de análisis (es decir, sólidos más el agua presente llamada base de peso en húmedo) o se puede definir en términos donde este se corrige para el agua medida en la muestra (es decir, base de peso en seco). En caso de productos liofilizados con contenido de humedad bajo las dos mediciones (base de peso en húmedo frente a base de peso en seco) produjeron resultados muy similares. Como se utiliza en este caso, contenido de humedad se define en cuanto a los sólidos más el agua presente (es decir, base de peso en húmedo).

55 [0052] El término "agente de carga" generalmente incluye agentes, que proporcionan buenas propiedades de pastel liofilizado, que forman un producto farmacéuticamente elegante, que ayudan a la proteína a superar varias tensiones, corte/congelación, por ejemplo, asociados a procesos de liofilización, y que ayudan a mantener niveles de actividad de proteína durante el proceso de liofilización y almacenamiento posterior. Ejemplos no limitativos de agentes de carga incluyen manitol, glicina, sacarosa, lactosa. Estos agentes pueden contribuir también a la tonicidad de las formulaciones.

60 [0053] El término "modificador de tonicidad" abarca cualquier agente capaz de contribuir a la osmolalidad de la solución, ajustando así la tonicidad de la composición, de manera que sobre la disolución de la composición durante el uso, la composición tiene una tonicidad en el intervalo fisiológico de la sangre, líquido peritoneal u otros líquidos biológicos pertinentes. Obviamente, la tonicidad puede también depender en si la solución de reconstitución comprende agentes de modificadores de tonicidad.

5 [0054] El término "tensioactivos" generalmente incluye aquellos agentes, que protegen a la proteína de tensiones inducidas por interfaz de aire/solución y tensiones inducidas por solución/superficie. Por ejemplo tensioactivos pueden proteger a la proteína de agregación. Tensioactivos adecuados pueden incluir, sin limitación, polisorbato como Tween 20, Tween 80, o poloxámero como poloxámero 188 o 407, y otros polímeros en bloque de etileno/polipropileno o polietilenglicol (PEG) como PEG8000. Detergentes preferidos son poloxámeros, por ejemplo, poloxámero 188, poloxámero 407, alquil éteres, por ejemplo Cremofor A25, Sympatens ALM/230; ALM/230 y polisorbatos/Tweens, por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80. Más preferidos son poloxámeros, por ejemplo, poloxámero 188, y Tweens, por ejemplo, Tween 20 y Tween 80.

10 [0055] El término "contenido teórico" se refiere a la cantidad de factor VII modificado añadido a una composición durante la preparación. La concentración dada aquí (mg/ml) se refiere a la concentración en la solución de factor VII modificado antes de liofilización o se refiere como % p/p (peso/peso), que luego se refiere a la concentración en el pastel liofilizado.

15 [0056] Como se utiliza en este caso, cantidades específicas se entienden que son  $\pm$  aproximadamente 10%; así aproximadamente 50 mM incluye 50 mM  $\pm$  5mM, 4% incluye 4%  $\pm$  0,4%, etc.

20 [0057] Como se declara arriba, la presente invención proporciona métodos y composiciones para estabilización de proteínas del factor VII modificado, permitiendo así al macenamiento a largo plazo sin causar riesgo aumentado e inconveniente al usuario.

25 [0058] Los presentes investigadores han descubierto que un número de parámetros cruciales necesita ajustarse en estabilización del factor VII modificado. Como un primer parámetro se refiere, al menos en parte, el contenido de humedad, por ejemplo, agua. El contenido de humedad de bería ser limitado. Como otro parámetro esencial, la composición debería incluir un agente adecuado para mantener el pH dentro de pH 4 a 7.

[0059] Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a una composición comprendiendo:

- 30 i) factor VII modificado;  
 ii) un agente adecuado para mantener el pH de dicha composición en el intervalo de 4 a 7 cuando dicha composición se disuelve en agua; y  
 iii) un contenido de humedad de como mucho 3%.

35 [0060] El factor VII modificado que se puede formular conforme a la presente invención se describe anteriormente. En formas de realización adecuadas de la invención, el factor VII modificado se selecciona del grupo consistente en dansil-EGR-FVIIa, dansil-EGR-FVII, FFR-FVIIa, FFR-FVII, PPA-FVIIa, PPA-FVII, Ser344-FVIIa and Ser344-FVII. Preferiblemente, el factor VII modificado es FFR-FVIIa o FFR-FVII.

40 [0061] Como se declara, el pH debería mantenerse en el intervalo de pH dentro de 4 a 7 cuando se disuelve en el agua. Ventajosamente, este margen de pH está también en el intervalo fisiológico deseado, causando así ningún daño al usuario sobre administración de la composición por medios parentales. Preferiblemente el pH de la solución es de 5,0 a 7,0, de 5,5 a 7,0 o de 5,8 a 6,8, como cercano a un pH de 6,0 y 6,5.

45 [0062] Algunos de los agentes adecuados para mantener el pH en el intervalo deseado necesitan añadirse en cantidades limitadas para conseguir el pH deseado. Por ejemplo, cuando el agente es glicil-glicina, su contenido necesita ajustarse.

50 [0063] Así, en todavía otras formas de realización interesantes, donde el agente adecuado para mantener el pH de dicha composición en el intervalo de 4 a 7 es glicil-glicina, está presente en una cantidad de como mucho 7 mg/ml. Por consiguiente, en formas de realización adecuadas de esta, el agente adecuado para mantener el pH en el intervalo de 4 a 7 se selecciona del grupo consistente en citrato, histidina, malato, fosfato, ácido tartárico, ácido succínico, MES, HEPES, imidazol, TRIS, lactato, glutamato y glicil-glicina, con la condición de que cuando dicho agente es glicil-glicina, está presente en una cantidad de como mucho 7 mg/ml.

55 [0064] En otras formas de realización relacionadas aquí, la cantidad de glicil-glicina está incluso más restringida, de manera que la cantidad de glicil-glicina es de como mucho aproximadamente 4 mg/ml, preferiblemente de como mucho aproximadamente 3 mg/ml, de forma más preferida de como mucho aproximadamente 2 mg/ml.

60 [0065] Además, el agente adecuado para mantener el pH en el intervalo de 4 a 7 puede también ser una mezcla de al menos dos de estos agentes enumerados, donde la mezcla es capaz de proporcionar un valor de pH en el intervalo definido. La concentración de los agentes adecuados está en el intervalo de aproximadamente 1 mM a 100 mM; de 1 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 25 mM; de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 20 mM; o aproximadamente 10 mM.

65 [0066] Como se declara arriba, el contenido de humedad debería ser limitado. Así, en formas de realización adecuadas de la invención, el contenido de humedad está a como mucho 2% p/p, de forma más preferida a como mucho 1% p/p.



[0067] Típicamente, proteínas del factor VII modificado, cuando se proporcionan en masa, están en forma líquida. Así, además procesamiento de las proteínas en masa para la fabricación de composiciones requiere los pasos de adición de excipientes adecuados y eliminación del líquido de la masa, dicha adición de excipientes se puede llevar a cabo antes o después de la eliminación del líquido. Un medio para la eliminación de líquido de una proteína se refiere a liofilización. Por lo tanto, en una forma de realización preferida de la presente invención, la composición está en forma de un pastel liofilizado.

[0068] Así, en formas de realización adecuadas según la invención, la composición comprende además, crioprotectores lioprotectores y/o agentes de carga. En una forma de realización de esta, la composición comprende además un alcohol de azúcar seleccionado del grupo consistente en manitol, sorbitol y xilitol. En otra forma de realización de esta, la composición comprende además un sacárido seleccionado del grupo consistente en sacarosa, dextrosa, lactosa, maltosa, trehalosa, ciclodextrinas, maltodextrinas y dextranas.

[0069] Típicamente, el contenido de crioprotectores, lioprotectores y agentes de carga necesitan ajustarse adecuadamente para contribuir a la estabilidad de proteínas del factor VII modificado durante liofilización y después de terminación de liofilización, durante almacenamiento a varias condiciones.

[0070] Los presentes investigadores han descubierto que el alcohol de azúcar debería estar en una cantidad que varía de aproximadamente 30% p/p a 95% p/p. Preferiblemente, la cantidad del alcohol de azúcar debería variar de aproximadamente 35% p/p a 95% p/p, más preferiblemente de aproximadamente 40% p/p a 90% p/p y de forma más preferida de aproximadamente 45% p/p a 90% p/p.

[0071] Como se puede observar en el ejemplo 3, los presentes investigadores han proporcionado composiciones con contenido bajo de productos de degradación en la terminación del proceso de liofilización (menos de 24 horas después de terminación del proceso liofilización) incluyendo un contenido apropiado de manitol correspondiente a 40 mg/ml (concentración antes de liofilización). Así, las composiciones según la invención se caracterizan por tener un bajo contenido inicial de formas oxidadas y agregados antes de estar sometidos a almacenamiento.

[0072] Típicamente, las composiciones se estabilizan en la terminación de la liofilización de manera que menos de 4% p/p del factor VII modificado se convierte en sus formas oxidadas, menos de 1% p/p se recupera como formas diméricas y formas poliméricas de orden mayor no se detectan usando métodos convencionales analíticos (como, por ejemplo, los métodos descritos en el ejemplo 2 de la presente descripción).

[0073] Por otra parte y ventajosamente, las composiciones de la invención son estables en almacenamiento, por ejemplo, menos de 5% p/p, como 4%, 3%, o 2,5%, del factor VII modificado se convierte en una forma oxidada y menos de 5% p/p, como 4%, 3%, o 2,5% se convierte en una forma dimérica sobre almacenamiento a 25 °C durante 12 meses a oscuras, o 2,5% se convierte en forma dimérica sobre almacenamiento a 25 °C durante 12 meses a oscuras.

[0074] Los presentes investigadores proporcionan datos aquí indicando que además degradación de factor VII modificado es mínima sobre almacenamiento bajo condiciones ambientales. Como se puede observar en el ejemplo 4, el aumento es de manera que menos de 2% p/p de factor VII modificado, como aproximadamente 1% p/p se recupera como formas oxidadas de factor VII modificado además del contenido inicial de dichas formas oxidadas presentes sobre terminación de liofilización. Por otra parte, menos de 2% p/p, como aproximadamente 1% p/p de factor VII modificado se recupera adicionalmente como formas diméricas sobre almacenamiento durante 12 meses a 25°C. De gran importancia, ningún aumento en el contenido de formas poliméricas se monitoreó durante dicho almacenamiento a 25°C durante 12 meses.

[0075] Tal y como se menciona, la degradación de factor VII modificado puede suponer oxidación a igual que agregación. No obstante, la ruta oxidante resultó ser más sensible a almacenamiento por lo que las formas oxidadas de factor VII modificado son útiles como un parámetro indicador de estabilidad.

[0076] Así, en algunas formas de realización, la invención se refiere a una composición que es estable en el almacenamiento de la composición durante 12 meses a 25 °C, de manera que formas oxidadas de dicho factor VII modificado están en una cantidad de como máximo aproximadamente 4% p/p en relación al contenido inicial teórico de dicho factor VII modificado. El contenido inicial teórico de dicho factor VII modificado es la cantidad añadida a la composición en la preparación de la composición antes del paso de liofilización. Por optimización apropiada del contenido de crioprotectores, lioprotectores y agentes de carga, las formas oxidadas de dicho factor VII modificado están en una cantidad de como mucho aproximadamente 3,5% p/p, más preferiblemente de como mucho aproximadamente 3,0% p/p. En otra forma de realización adecuada de esta, las formas oxidadas de dicho factor VII modificado están en una cantidad de como mucho aproximadamente 2,5% p/p en relación al contenido inicial teórico de dicho factor VII modificado.

[0077] Tal y como se menciona, la invención se refiere en parte para limitar la degradación de factor VII modificado del tiempo de fabricación de la composición sólida de factor VII modificado, por ejemplo, después de terminación de liofilización hasta el tiempo de uso, por ejemplo, al mismo tiempo cuando la composición debe administrarse a un paciente. Por lo tanto, según la presente invención, composiciones adecuadas tienen un aumento limitado en el

5 contenido de formas oxidadas sobre el almacenamiento durante largo plazo a condiciones ambientales. Que en otras formas de realización, la composición es estable de manera que en el almacenamiento de la composición durante 12 meses a 25 °C, formas oxidadas de dicho factor VII modificado aumentan en contenido en comparación con su contenido inicial por como mucho aproximadamente 2,0% p/p en relación al contenido inicial teórico de dicho factor VII modificado. En otras formas de realización adecuadas de esta, el aumento en el contenido de formas oxidadas está a como mucho aproximadamente 1,5% p/p, a como mucho aproximadamente 1,0% p/p, o preferiblemente a como mucho aproximadamente 0,5% p/p. El aumento en contenido de formas oxidadas expresa la cantidad de factor VII modificado recuperado como formas oxidadas sobre almacenamiento.

10 [0078] Las composiciones según la invención son adecuadas también para almacenamiento a largo plazo a 25°C y pueden incluso poseer una estabilidad apropiada a condiciones causando degradación acelerada, como a temperaturas más altas, por ejemplo, a 45°C.

15 [0079] En otras formas de realización, la composición es estable de manera que en el almacenamiento de la composición durante 18 meses a 25 °C, formas oxidadas de dicho factor VII modificado están en una cantidad a como mucho aproximadamente 4,5% p/p en relación al contenido inicial teórico de dicho factor VII modificado. Preferiblemente, la cantidad de formas oxidadas está a como mucho aproximadamente 4,0 % p/p, más preferiblemente a como mucho aproximadamente 3,5% p/p, incluso más preferiblemente a como mucho aproximadamente 3,0% p/p de forma más preferida a como mucho aproximadamente 3,5% p/p.

20 [0080] Que es más que decir que la composición es estable de manera que el siguiente almacenamiento de la composición durante 18 meses a 25 °C, formas oxidadas de dicho aumento factor VII modificado en el contenido en comparación con su contenido inicial por como mucho aproximadamente 2,8% p/p en relación al contenido inicial teórico de dicho factor VII modificado. En otras formas de realización de esta, el aumento corresponde a un aumento en el contenido de formas oxidadas en una cantidad de a como mucho aproximadamente 2,5% p/p y en formas de realización más preferidas de a como mucho aproximadamente 2,0% p/p. En todavía otras formas de realización, el aumento en el contenido de formas oxidadas es de como mucho aproximadamente 1,5% p/p, de forma más preferida de como mucho aproximadamente 1,0% p/p, como a como mucho aproximadamente 0,5 % p/p.

25 [0081] Todavía otras formas de realización de la invención se refieren a donde la composición es estable de manera que en el almacenamiento de la composición durante 32 meses a 25 °C, formas oxidadas de dicho factor VII modificado están en una cantidad de como mucho aproximadamente 9,0% p/p en relación al contenido inicial teórico de dicho factor VII modificado, preferiblemente en una cantidad de como mucho aproximadamente 8,0 % p/p, incluso más preferiblemente de como mucho aproximadamente 7,0% p/p, todavía más preferiblemente de como mucho aproximadamente 6% p/p, como aproximadamente 5% p/p, preferiblemente de como mucho aproximadamente 4% p/p, de forma más preferida como mucho aproximadamente 3% p/p.

30 [0082] En todavía otras formas de realización, la composición es estable de manera que el siguiente almacenamiento de la composición durante 32 meses a 25 °C, formas oxidadas de dicho factor VII modificado aumentan en el contenido en comparación con su contenido inicial por como mucho aproximadamente 7,0% p/p en relación al contenido inicial teórico de dicho factor VII modificado, preferiblemente en una cantidad de como mucho aproximadamente 6,0% p/p, más preferiblemente de como mucho aproximadamente 5,0% p/p, tal como, como mucho aproximadamente 4% p/p y 3% p/p, incluso más preferiblemente de como mucho aproximadamente 2,0% p/p de forma más preferida de como mucho aproximadamente 1,0% p/p.

35 [0083] En condiciones aceleradas, la composición todavía tiene estabilidad superior. Como tal, en otras formas de realización, la invención se refiere a una composición que es estable de manera que en el almacenamiento de la composición durante 8 semanas a 45 °C, formas oxidadas de dicho factor VII modificado están en una cantidad de como mucho aproximadamente 4% p/p en relación al contenido inicial teórico de dicho factor VII modificado, preferiblemente en una cantidad de como mucho aproximadamente 3,5% p/p, incluso más preferiblemente de como mucho aproximadamente 3,0% p/p, de forma más preferida de como mucho aproximadamente 2,5% p/p.

40 [0084] Por otra parte, el aumento de formas oxidadas después de terminación del proceso de liofilización está limitado. Así, en aún otras formas de realización, la composición es estable de manera que en el almacenamiento de la composición durante 8 semanas a 45 °C, formas oxidadas de dicho aumento del factor VII modificado en el contenido en comparación con su contenido inicial por como mucho aproximadamente 2,0% p/p en relación al contenido inicial teórico de dicho factor VII modificado, preferiblemente en una cantidad de como mucho aproximadamente 1,5% p/p, incluso más preferiblemente de como mucho aproximadamente 1,0% p/p, incluso más preferiblemente de como mucho aproximadamente 0,8% p/p de forma más preferida de como mucho aproximadamente 0,5% p/p de formas oxidadas.

45 [0085] Mejor estabilidad se consigue sobre almacenamiento a condiciones más frías como a 5° C. A esta temperatura, las composiciones pueden almacenarse también durante un periodo de tiempo más largo antes de la degradación de factor VII modificado es inadecuado. Como se puede observar en el ejemplo 4, menos de aproximadamente 1,5% p/p de factor VII modificado se degrada sobre almacenamiento durante 32 meses.

5 [0086] Así, otras formas de realización de la invención se refieren a composiciones estables de manera que en el almacenamiento de la composición durante 32 meses a 5 °C, formas oxidadas de dicho factor VII modificado están en una cantidad de como mucho aproximadamente 5,0 % en peso en relación al contenido inicial teórico de dicho factor VII modificado, preferiblemente en una cantidad de como mucho aproximadamente 4,5% p/p, más preferiblemente de como mucho aproximadamente 4,0 % p/p, incluso más preferiblemente de como mucho aproximadamente 3,5 % p/p de forma más preferida de como mucho aproximadamente 3,0% p/p, como aproximadamente 2,5% p/p.

10 [0087] Además, en todavía otras formas de realización, la composición es estable de manera que el siguiente almacenamiento de la composición durante 32 meses a 5 °C, formas oxidadas de dicho aumento del factor VII modificado en el contenido en comparación con su contenido inicial por como mucho aproximadamente 2,5% p/p en relación al contenido inicial teórico de dicho factor VII modificado, preferiblemente en una cantidad de como mucho aproximadamente 2,0% p/p, más preferiblemente de como mucho aproximadamente 1,5% p/p, incluso más preferiblemente de como mucho aproximadamente 1,0% p/p, de forma más preferida de como mucho aproximadamente 0,5% p/p.

15 [0088] Como se ha mencionado anteriormente, la estabilidad mejorada se refiere, en parte, a selección adecuada de crioprotectores, lioprotectores y agentes de carga y a ajustar su contenido. Como se declara al menos un grupo de estos excipientes debería estar presente en la composición de la invención para conseguir la estabilidad apropiada. No obstante, como se descubrió por los presentes investigadores, la estabilidad es incluso más favorable sobre combinación de excipientes con las propiedades mencionadas anteriormente. Por lo tanto, formas de realización de la invención adecuadas se refieren a composiciones comprendiendo además un sacárido. Sacáridos de interés son di- y trisacáridos, pero también algunos polisacáridos de manera que los sacáridos pueden seleccionarse de un grupo consistente en sacarosa, dextrosa, lactosa, maltosa, trehalosa, ciclodextrinas, maltodextrinas y dextranos.

20 [0089] Los presentes investigadores han reconocido la combinación apropiada de los polialcoholes y los sacáridos al igual que su contenido para, al menos en parte, conseguir estabilidad favorable.

25 [0090] Así, en algunas formas de realización de la invención, el sacárido está presente en la composición en una cantidad que varía de aproximadamente 1% p/p a 45% p/p. En otras formas de realización interesantes de esta, la cantidad varía de aproximadamente 5% p/p a 40% p/p, de manera más interesante de aproximadamente 5% p/p a 35% p/p y más adecuadamente de aproximadamente 10% p/p a 30% p/p.

30 [0091] De manera importante, la proporción entre el alcohol de azúcar y el sacárido necesita ajustarse debidamente. En algunas formas de realización de la invención, dicho alcohol de azúcar está en una proporción de peso en relación a dicho sacárido que varía de aproximadamente 100:1 a 1:20. En otras formas de realización de esta, dicha proporción en peso es de aproximadamente 50:1 a 1:10, más preferiblemente de aproximadamente 20:1 a 1:5. En otras formas de realización, la proporción en peso se refiere a intervalos de aproximadamente 10:1 a 1:2 y de aproximadamente 4:1 a 1:2. No obstante, como se descubrió por los presentes investigadores (véase ejemplo 5), la incorporación de pastel liofilizado con el paso de incorporación de cantidades más altas de los sacáridos. Como tal, algunas formas de realización se refieren a donde dicho alcohol de azúcar está en una proporción en peso en relación a dicho sacárido que varía de aproximadamente 3:1 a 1:1, como de aproximadamente 3:1 a 3:2.

35 [0092] Por otra parte, la estabilidad favorable se refiere, al menos en parte, al contenido de dicho alcohol de azúcar y dicho sacárido en relación al contenido de dicho factor VII modificado. Por lo tanto, en otras formas de realización de la invención, las composiciones comprendiendo factor VII modificado tienen una proporción en peso de factor VII modificado en relación a la suma de dicho alcohol de azúcar y dicho sacárido que varía de aproximadamente 1:200 a 1:5. Preferiblemente, la proporción en peso varía de aproximadamente 1:100 a 1:8 y, más preferiblemente, de aproximadamente 1:75 a 1:10. En otras formas de realización, la proporción en peso varía de aproximadamente 1:60 a 1:15, como de aproximadamente 1:50 a 1:20.

40 [0093] En algunas formas de realización de la invención, el alcohol de azúcar es manitol y en todavía otras formas de realización, el sacárido es sacarosa.

45 [0094] Así, en aquellas formas de realización, la proporción entre manitol y sacarosa es de manera que dicho manitol está en una proporción en peso en relación a dicha sacarosa que varía de aproximadamente 10:1 a 1:10. Más interesante, dicha proporción es de aproximadamente 10:1 a 1:5, todavía más interesante de aproximadamente 5:1 a 1:2. No obstante, cuando la composición se provee como un pastel liofilizado, formas de realización muy adecuadas se refieren a aquellas donde dicho manitol está en una proporción en peso en relación a dicho sacárido que varía de aproximadamente 5:1 a 1:1, de forma más preferida de aproximadamente 4:1 a 5:4, como de aproximadamente 3:1 a 3:2.

50 [0095] En otras formas de realización de la invención, dicho factor VII modificado está en una proporción en peso en relación a la suma de dicho manitol y dicha sacarosa que varía de aproximadamente 1:100 a 1:5, preferiblemente de aproximadamente 1:75 a 1:10, más preferiblemente de aproximadamente 1:60 a 1:15, de forma más preferida de aproximadamente 1:50 a 1:20.

[0096] Como puede entenderse, la composición estabilizada según la presente invención está en forma sólida; es decir, la composición se ha sometido a liofilización. No obstante, esto implica que la composición se provee originalmente como un líquido que debe liofilizarse. Para fines, al menos en parte, de estabilizar la composición líquida antes de eliminación de humedad y para fines de estabilizar la composición sólida sobre almacenamiento, la composición comprende un agente capaz de mantener el pH a un nivel óptimo para evitar degradación. De gran importancia este margen de pH de 4-7 está también en el intervalo fisiológico de administración parental de la composición.

[0097] Opcionalmente, las composiciones pueden incluir un antioxidante. El término antioxidante abarca cualquier sustancia que impide oxidación química del factor VII modificado. Así, en algunas formas de realización de la invención favorables, las composiciones además comprenden un antioxidante. Ejemplos no limitativos de antioxidantes adecuados incluyen ácido ascórbico, cisteína, homocisteína, cistina, cistationina, metionina, glutatión y péptidos con cualquier cisteína, homocisteína, cistina, cistationina, metionina y glutatión, en particular, péptidos con 2 a 5 residuos de aminoácidos donde al menos uno de los residuos es residuo de cisteína, homocisteína, cistina, cistationina, metionina o glutatión. En algunas formas de realización de esta, el antioxidante es metionina, en particular L-metionina. El antioxidante se incluye a una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5,0 mg/ml, como de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5,0 mg/ml, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 4,0 mg/ml, de aproximadamente 0,1 a 3,0 mg/ml, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,0 mg/ml, o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,0 mg/ml, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,7 mg/ml, como a aproximadamente 2,5 mg/ml.

[0098] El antioxidante contribuye, al menos en parte, a estabilizar la composición durante el tiempo de almacenamiento proporcionando la composición con un contenido de humedad de más del 3%, por ejemplo, de la terminación del proceso de liofilización hasta uso. Como se puede observar en el ejemplo 4, el aumento en formas oxidadas sobre almacenamiento de una composición comprendiendo metionina durante 32 meses a 25°C es 0,9% en peso.

[0099] Las composiciones pueden formularse además por incorporación de otros excipientes farmacéuticamente aceptables para conseguir composiciones aceptables para administración parenteral, en particular, administración intravenosa. Métodos para preparar composiciones para administración parental se conocerán o serán evidentes a los expertos en la técnica y se describen con más detalle en, por ejemplo, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy, 19th ed.*, Mack Publishing Company, Easton, PA (1995). El término "excipientes" incluye reactivos farmacéuticos aceptables para proporcionar buenas propiedades de pastel liofilizado (agentes de carga) al igual que proporcionar lio protección y crioprotección de la proteína, mantenimiento de pH, mantenimiento de tonicidad aceptable al igual que conformación apropiada de la proteína durante el almacenamiento de modo que retención su actividad biológica y estabilidad de proteína se mantienen.

[0100] Así, según la invención, las composiciones además comprenden un modificador de tonicidad. Modificadores de tonicidad incluyen, pero de forma no limitativa, aminoácidos; péptidos pequeños (p.ej., teniendo de 2 a 5 residuos de aminoácido); sales neutras; mono- o disacáridos; polisacáridos; polialcoholes, o una mezcla de al menos dos de dichos modificadores. Ejemplos de modificadores de tonicidad incluyen, pero de forma no limitativa, cloruro sódico, cloruro de potasio, citrato sódico, sacarosa, glucosa, glicil-glicina y manitol. Normalmente, los modificadores están presentes en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mM; de aproximadamente 1 a aproximadamente 300 mM; de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 mM; o de aproximadamente 20 a aproximadamente 150 mM, dependiendo de los otros ingredientes presentes. Sales neutras como, por ejemplo, cloruro sódico o cloruro de potasio se pueden utilizar. Por "sal neutra" se entiende una sal que no es ni un ácido ni una base cuando se disuelve en solución acuosa.

[0101] En una forma de realización, el modificador de tonicidad se selecciona del grupo consistente en acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro de potasio y cloruro de calcio. También se nota que, estas composiciones pueden comprender concentraciones mucho más altas del agente modificador de tonicidad, puesto que la composición se hace isotónica antes de uso, por ejemplo, composiciones en masa no necesitan ser isotónicas con el intervalo fisiológico. Composiciones que deben administrarse por inyección o infusión deberían ser preferiblemente isotónicas con suero antes de uso (es decir, aproximadamente 300 ± 50 milliosmol/kg).

[0102] Otra estabilización de la proteína liofilizada se puede obtener por la adición de tensioactivos. Así, en algunas formas de realización de la invención, las composiciones comprenden además un tensioactivo, el tensioactivo se selecciona del grupo consistente en polisorbatos, por ejemplo, Tween®, como polisorbato 20 o 80, polioxietileno alquil éteres o poloxámeros, como poloxámero 188 (p.ej. Pluronic®) o poloxámero 407, (por ejemplo, Lutrol®) y otros polímeros en bloque de etileno/polipropileno o polietilenglicol (PEG) como PEG8000. Típicamente, los tensioactivos se agregan en una cantidad de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 5 mg/ml, como de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5,0 mg/ml, de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 3,0 mg/ml, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 3,0 mg/ml, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,0 mg/ml, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,0 mg/ml, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 mg/ml, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 mg/ml, o de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,25 mg/ml. Cantidades preferidas son de 0,01 a 3 mg/ml, como de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,0 mg/ml, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,0 mg/ml, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 mg/ml, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 mg/ml, o de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,25 mg/ml, como aproximadamente 0,1

mg/ml para Tween 20 y/o Tween 80, y de aproximadamente 0,05 a 3,0 mg/ml, como de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2,0 mg/ml, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1,0 mg/ml, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 mg/ml, o de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,25 mg/ml para poloxámero 188.

5 [0103] En algunas formas de realización de la invención, la composición comprende además otros excipientes farmacéuticos que actúan como, por ejemplo, agente de carga. Esto quiere decir que otros agentes de carga que manitol pueden también incluirse en las composiciones. En particular, agentes de carga se incluyen en composiciones preparadas por liofilización.

10 [0104] En una forma de realización, la composición contiene: FVII modificado, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, glicil-glicina, manitol y Tween 80, tiene un contenido de humedad de como máximo 3% y tiene un pH en el intervalo de 4,0 a 7,0 cuando la composición se disuelve en agua.

15 [0105] En otra forma de realización, la composición contiene: FVII modificado, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, glicil-glicina, manitol, sacarosa, metionina, y Tween 80, tiene un contenido de humedad de como máximo 3% y tiene un pH en el intervalo de 4,0 a 7,0 cuando la composición se disuelve en agua.

[0106] En otras formas de realización, la composición contiene:

Compuesto	Formulación A	Formulación B	Formulación C
FFR-rFVIIa	de 1,8 a 2,2 mg/ml	de 1,8 a 2,2 mg/ml	de 1,8 a 2,2 mg/ml
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	de 1,3 a 1,7 mg/ml	de 1,3 a 1,7 mg/ml	de 9,3 a 1,7 mg/ml
NaCl	de 2,7 a 3,1 mg/ml	de 2,7 a 3,1 mg/ml	de 2,7 de 3,1 mg/ml
Glicil-glicina	de 1,1 a 1,5 mg/ml	de 1,1 a 1,5 mg/ml	de 1,1 a 1,5 mg/ml
Manitol	de 25 a 30 mg/ml	de 35 a 45 mg/ml	de 25 a 30 mg/ml
Sacarosa	de 20 a 5 mg/ml	-	de 20 a 5 mg/ml
Metionina	-	-	0,25 mg/ml
Tween 80	de 0,05 a 0,15 mg/ml	de 0,05 a 0,15 mg/l	de 0,05 a 0,15 mg/ml
pH	de 5,0 a 7,0	de 5,0 a 7,0	de 5,0 a 7,0

20

[0107] En otras formas de realización, la composición contiene:

Compuesto	Formulación D	Formulación E	Formulación F
FFR-rFVIIa	2,0 mg/ml	2,0 mg/ml	2,0 mg/ml
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	1,47 mg/ml	1,47 mg/ml	1,47 mg/ml
NaCl	2,92 mg/ml	2,92 mg/ml	2,92 mg/ml
Glicil-glicina	1,32 mg/ml	1,32 mg/ml	1,32 mg/ml
Manitol	26,7 mg/ml	40 mg/ml	26,7 mg/ml
Sacarosa	13,3 mg/ml	-	13,3 mg/ml
Metionina	-	-	0,25 mg/ml
Tween 80	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml
pH	6,0	6,0	6,0

25 [0108] Como se ha mencionado anteriormente, los presentes investigadores han proporcionado un método para estabilización de proteínas del factor VII modificado proporcionando las proteínas en composiciones sólidas comprendiendo excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados, de los cuales es importante incluir un agente capaz de mantener el pH en el intervalo de 4 a 7.

30 [0109] Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un método para preparar un factor VII modificado estable. El método comprende los pasos de:

- i) provisión de dicho factor VII modificado en una solución con pH en el intervalo de 4 a 7.
- ii) tratamiento de dicha solución para obtener una composición sólida con un contenido de humedad de como mucho 3 % p/p.

5 [0110] En otras formas de realización de esta, el método comprende que dicha solución comprende además un alcohol de azúcar seleccionado del grupo consistente en manitol, sorbitol y xilitol. En todavía otras formas de realización interesantes, dicha solución comprende además un sacárido seleccionado del grupo consistente en sacarosa, dextrosa, lactosa, maltosa, trehalosa, ciclodextrinas, maltodextrinas y dextranos. En formas de realización preferidas, el alcohol de azúcar es manitol y el sacárido es sacarosa.

10 [0111] Preferiblemente, el contenido del alcohol de azúcar y opcionalmente el contenido del sacárido en dicha solución debería ajustarse para conseguir proteínas del factor VII modificado y estabilizado superiores. Según la invención, el alcohol de azúcar debería estar en una cantidad que varía de aproximadamente 1 mg/ml a 60 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 10 mg/ml a 50 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 15 mg/ml a 45 mg/ml, de forma más preferida de aproximadamente 20 mg/ml a 40 mg/ml. El sacárido, si está presente, debería proporcionarse en una cantidad que varía de aproximadamente 1 mg/ml a 50 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 2 mg/ml a 35 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 5 mg/ml a 25 mg/ml, de forma más preferida de aproximadamente 10 mg/ml a 20 mg/ml.

15 [0112] Por otra parte, la proporción entre el alcohol de azúcar y el sacárido debería ajustarse. Formas de realización adecuadas se refieren a donde el alcohol de azúcar está en una proporción en peso en relación a dicho sacárido que varía de aproximadamente 100:1 a 1:10, preferiblemente de aproximadamente 50:1 a 1:5, más preferiblemente de aproximadamente 20:1 a 1:3, incluso más preferiblemente de aproximadamente 10:1 a 1:2, todavía más preferiblemente de aproximadamente 4:1 a 1:2, como todavía más preferiblemente de aproximadamente 3:1 a 1:1, de forma más preferida de aproximadamente 3:1 a 3:2.

20 [0113] En una forma de realización preferida, el método para preparar un factor VII modificado estable comprende liofilización. La liofilización se refiere a un proceso, donde la solución comprendiendo dicho factor VII modificado se rellena en viales de liofilización o similares. Dicho factor VII modificado puede opcionalmente someterse a filtración estéril antes del inicio de la liofilización. Enfriamiento se aplica a los estantes de los liofilizadores para congelar los viales y la solución por debajo de temperaturas de producto críticas. El agua se quita introduciendo vacío y condensación de vapor de agua en el condensador de hielo del liofilizador. Cuando el producto se seca, normalmente menos de 1% de contenido de humedad residual, (p. ej., medido por valoración colorimétrica de Karl Fischer como se ha descrito anteriormente) los viales se cierran y se cubren. La fabricación se finaliza y la composición está ahora en forma de un pastel liofilizado.

25 [0114] Estas composiciones, cuando se administran a un paciente por medios inyectables, necesitan reconstituirse en un líquido adecuado antes de uso. Pueden reconstituirse también para otros fines, por ejemplo, para reformulación en otras composiciones farmacéuticas. No obstante, la presente invención no excluye que las composiciones se pueden administrar a un paciente en su forma sólida.

30 [0115] Las composiciones se reconstituyen usando un portador o un diluyente aceptable, preferiblemente estéril, preferiblemente un portador acuoso. Una variedad de portadores acuosos pueden utilizarse, por ejemplo, agua (p. ej. agua para inyección/WFI), agua tamponada, solución salina (p. ej. 0,4% de solución salina), glicina (p. ej. 0,3% de glicina) y similares. El diluyente de reconstitución puede también contener una o más sales, como una sal de calcio (p. ej. CaCl<sub>2</sub>) o una combinación de un sodio y una sal de calcio (p. ej. NaCl y CaCl<sub>2</sub>).

35 [0116] Así, reconstitución de una composición según la invención en solución de Ringier estéril podría componer una composición farmacéutica típica para infusión intravenosa.

40 [0117] Las composiciones reconstituidas se destinan para administración parental para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran parenteralmente, es decir, por vía intravenosa, subcutáneamente, o intramuscularmente, o se administran a modo de infusión pulsátil o continua.

45 [0118] Por lo tanto, otro aspecto adicional de la invención se refiere al uso de la composición sólida estabilizada para la preparación de un medicamento para tratamiento terapéutico, como prevención de coagulación de la sangre o prevención de reacciones mediadas por factor tisular.

50 [0119] Esto quiere decir que un aspecto de la invención se refiere al uso de un factor VII modificado para la preparación de un medicamento para evitar coagulación de la sangre y/o prevenir reacciones mediadas por factor tisular, dicho medicamento comprendiendo una composición comprendiendo;

55 i) factor VII modificado;  
 60 ii) un agente adecuado para mantener el pH de dicha composición en el intervalo de 4 a 7 cuando dicha composición se disuelve en agua; y  
 iii) un contenido de humedad de como mucho 3%.

[0120] Además, en otro aspecto, la invención se refiere a administración de dicho factor VII modificado estabilizado a un paciente para evitar coagulación de la sangre y/o prevenir reacciones mediadas por factor tisular. Así, la invención se refiere a un método de prevención de coagulación de la sangre y/o prevención de reacciones mediadas por factor tisular

comprendiendo administración a un sujeto con la necesidad de este, una cantidad eficaz de una composición comprendiendo;

i) factor VII modificado;

5 ii) un agente adecuado para mantener el pH de dicha composición en el intervalo de 4 a 7 cuando dicha composición se disuelve en agua; y

iii) un contenido de humedad de como mucho 3%.

10 [0121] En diferentes formas de realización, la coagulación de la sangre se une con una condición seleccionada del grupo consistente en: angioplastia, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, derrame cerebral, coagulación intravascular diseminada (DIC), deposición de fibrina en pulmones y riñones asociada a endotoxemia gram-negativa, e infarto de miocardio.

15 [0122] En todavía otras formas de realización, las reacciones mediadas por factor tisular se asocian con una condición seleccionada del grupo consistente en SIRS, ARDS, MOF, HUS y TTP.

20 [0123] Como se declara, la composición está en forma sólida. Por consiguiente, en una forma de realización adecuada, el medicamento debería ser adecuado para disolverse, lo que permite administración parental del medicamento. Así, cuando la administración de las composiciones a un paciente comprende el paso de disolver la composición en un líquido adecuado antes del paso de administración.

[0124] Abreviaturas

25	FVII FVIIa rFVII (rFVIIa) FVIIai	Factor VII de coagulación en su forma monocatenaria Factor VII de coagulación en su forma bicatenaria activada dividida Factor VII recombinante (factor VIIa recombinante) Factor VII modificado que es factor VII de coagulación con al menos una modificación en su centro catalítico, esta modificación inhibe sustancialmente la capacidad del factor VII modificado para activar factor de plasma X o IX.
30	RFVIIai Dansil-EGR- FVIIa  (dansil-EGR- FVII) FFR-FVIIa (FFR-FVII)	Factor VIIa modificado recombinante (recombinante FVIIai) Factor F VIIa ( FVII) de coagulación donde el centro catalítico se ha inactivado reaccionando químicamente FVIIa (FVII) con Dansil-Glu-Gly-Arg clorometilcetona (dansil-EGR-cmk) Factor FVIIa (FVII) de coagulación donde el centro catalítico se ha inactivado por Reaccionando químicamente F VIIa ( FVII) con P he-Phe-Arg clorometilcetona ( FFR-cmk)
35	PPA-FVIIa (PPA-FVII) Dansil-EGR-cmk FFR-cmk PPACK	FVIIa (FVII) reaccionado con D-Phe-Pro-Arg clorometilcetona (PPA-cmk) Dansil-Glu-Gly-Arg clorometilcetona D-Phe-Phe-Arg o Phe-Phe-Arg clorometilcetona D-Phe-Pro-Arg clorometilcetona (PPA-cmk)
40	DFFR-cmk Ser344-FVIIa (Ser344-FVII)	Dansil-D-Phe-Phe-Arg o dansil-Phe-Phe-Arg clorometilcetona Factor FVIIa (FVII) de coagulación donde el centro catalítico se ha inactivado reemplazando el aminoácido nativo en la posición 344 con serina.

45 Ensayos:

Actividad biológica de factor VII

50 [0125] La actividad biológica de factor VIIa en la coagulación de la sangre deriva de su capacidad para (i) unirse con factor tisular (TF) y (ii) catalizar la escisión proteolítica de factor IX o factor X para producir factor IX o X activado (factor IXa o Xa, respectivamente).

55 [0126] Actividad biológica de polipéptidos del factor VII ("actividad biológica del factor VII") se puede cuantificar por medición de la capacidad de una preparación para promover coagulación de la sangre usando plasma de factor VII deficiente y tromboplastina (descrito, por ejemplo, en la patente US n° 5,997,864). Alternativamente, actividad biológica del factor VIIa se puede cuantificar por (i) medición de la capacidad del factor VIIa o un polipéptido relacionado con factor VIIa para producir factor X activado (factor Xa) en un sistema comprendiendo TF introducido en una membrana lipídica y factor X. (Persson et al., *J. Biol. Chem.* 272:19919-19924, 1997); (ii) medición de hidrólisis de factor X en un sistema acuoso; (iii) medición de la unión física de polipéptido relacionado con factor VIIa o con factor VIIa para TF usando un instrumento basado en la resonancia de plasmones superficiales (Persson, *FEBS Letts.* 413:359-363, 1997);  
60 (iv) medición de hidrólisis de un sustrato sintético por un polipéptido relacionado con factor VIIa y/o factor VIIa; y (v) medición de generación de trombina en un sistema independiente de TF *in vitro*.

Actividad biológica de factor VII modificado:

5 [0127] La actividad biológica de factor VII modificado puede medirse, por ejemplo, por un ensayo de coágulo de competición esencialmente como descrito en WO 92/15686 (ejemplo III) (ensayo 1) o en uno o más de los ensayos 2 a 7 de debajo.

[0128] Inhibición de FVIIa-fosfolípidos-introducidos TF-catalizado activación de FX por factor VII modificado - Ensayo de generación de FXa (ensayo 2):

10 En el siguiente ejemplo todas las concentraciones son finales. TF lipídado (10 pM), FVIIa (100 pM) y factor VII modificado (0 - 50 nM) en HBS/BSA (50 mM hepes, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml de BSA) se incuban 60 min a temperatura ambiente antes de que FX (50 nM) se añada. La reacción se detiene después de otros 10 min por adición de ½ volumen de tampón de parada (50 mM de Hepes, pH 7,4, 100 mM de NaCl, 20 mM de EDTA). La cantidad de FXa generada se determina añadiendo sustrato S2765 (0,6 mM, Chromogenix) y medición de absorbencia a 405 nm se puede calcular continuamente durante 10 min. Valores IC<sub>50</sub> para inhibición de antagonista TF de FVIIa/lipídado TF-mediado activación de FX se pueden calcular. El valor IC<sub>50</sub> para FFR-rFVIIa es 51 +/- 26 pM en este ensayo.

Inhibición de unión de 125I-FVIIa a superficie celular TF por factor VII modificado

20 Ensayo de unión TF (ensayo 3):

25 [0129] En el siguiente ejemplo todas las concentraciones son finales. Estudios de unión se emplean usando la línea de célula de carcinoma de vejiga humano J82 (ATCC nº HTB-1) o la línea de célula de queratinocito humano (CCD1102KerTr ATCC nº CRL-2310) o NHEK P 166 (Clonetics nº CC-2507) todos constitutivamente expresando TF. Monocapas confluentes en placas de cultivo de tejido de 24 pocillos se lavan una vez con tampón A (10 mM de Hepes, pH 7,45, 150 mM de NaCl, 4 mM de KCl y 11 mM de glucosa) complementado con 5 mM de EDTA y luego una vez con tampón B y una vez con tampón C (tampón A complementado con 1 mg/ml de BSA y 5 mM de Ca<sup>2+</sup>). Las monocapas se preincuban 2 min con 100 µl de tampón B frío. Concentraciones variables de factor VII modificado y FVIIa radiomarcado (0,5 nM de 125I-FVIIa) se añaden simultáneamente a las células (volumen final 200 µl). Las placas se incuban durante 2 horas a 4 °C. Al final de la incubación, el material no unido se quita, las células se lavan 4 veces con tampón B enfriado con hielo y lisadas con 300 µl de tampón de lisis (200 mM de NaOH, 1 % de SDS y 10 mM de EDTA). La radioactividad se mide en un contador gamma (Cobra, Packard Instruments). Los datos de unión se analizan y se ajusta la curva usando GraFit4 (Erithacus Software, Ltd., (U.K.)). El valor IC<sub>50</sub> para FFR-rFVIIa es 4 nM en este ensayo.

35 Inhibición de actividad amidolítica FVIIa/sTF (ensayo 4):

40 [0130] Inhibición de actividad amidolítica FVIIa-TF catalizada por factor VII modificado se evalúa utilizando TF humano soluble (10 nM), FVIIa humano recombinante (10 nM) y concentraciones crecientes de factor VII modificado. Concentraciones variables del factor VII modificado se preincuban con 10 nM de sTF y 10 nM Fde VIIa en tampón BSA (50 mM de Hepes, pH 7,4, 100 mM de NaCl, 5 mM de CaCl<sub>2</sub> y 1 mg/ml de BSA) durante 60 min a temperatura ambiente antes de adición de sustrato S2288 (1,2 mM, Chromogenix). El desarrollo de color se mide continuamente durante 30 min a 405 nm. Actividad amidolítica se presenta como mOD/min. Valores IC<sub>50</sub> para inhibición de actividad amidolítica de FVIIa/TF por el factor VII modificado puede calcularse.

45 Inhibición de generación de FXa (ensayo 5):

50 [0131] TF lipídado (10 pM), FVIIa (100 pM) y factor VII modificado (0 - 50 nM) en tampón BSA (ver ensayo 4) se incuban 60 min a temperatura ambiente antes de que FX (50 nM) se añada. La reacción se detiene después de otros 10 min por adición de ½ volumen de tampón de parada (50 mM de Hepes, pH 7,4, 100 mM de NaCl, 20 mM de EDTA). La cantidad de FXa generada se determina por adición de sustrato S2765 (0,6 mM, Chromogenix) y medición de absorbencia a 405 nm se puede calcular continuamente durante 10 min. Valores IC<sub>50</sub> para inhibición factor VII modificado de FVIIa/lipídado TF-mediado activación de FX.

55 Ensayo de coagulación dependiente de TF (ensayo 6):

60 [0132] El ensayo se realiza en un aparato de investigación de coagulación ACL300 (ILS Laboratories). Diluciones de factor VII modificado en 50 mM de imidazol, pH 7,4, 100 mM de NaCl, 0,1 % de BSA se mezclan con 25 mM de CaCl<sub>2</sub> en la proporción de 2 a 5 y se añaden a recipientes de muestras en el aparato de coagulación. Tromboplastina de humano, rata, conejo, babuino, o cerdo diluida con el tampón de imidazol para dar tiempo de coagulación de aproximadamente 30 seg en muestras sin factor VII modificado se coloca en depósito reactivo 2, y plasma de humano, rata, conejo, babuino, o cerdo, en el depósito reactivo 3. Durante el análisis 70 µl de la mezcla de factor VII modificado y CaCl<sub>2</sub> se transfieren a 25 µl de reactivo de tromboplastina y se preincuban 900 seg antes de adición de 60 µl de plasma y medición del tiempo de coagulación. El tiempo de coagulación máxima se fija a 400 seg. Una dilución de la



tromboplastina se usa como curva estándar para tiempos de coagulación de conversión en actividad TF en relación al control sin FVII modificado añadido.

[0133] Inhibición de superficie de F VIIa/célula TF catalizó activación de FX por factor VII modificado ( ensayo 7): monocapas de células expresando TF humano, por ejemplo, fibroblastos de pulmón humanos WI-38 (ATCC n° CCL-75), línea de célula de carcinoma de vejiga humana J82 (ATCC n° HTB-1), línea de célula de queratinocito humano CCD 1102KerTr (ATCC n° CRL-231 0), línea celular de glioblastoma humano U87, o línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB231, se emplean como fuente TF en FVIIa/TF catalizada activación de FX. Monocapas de célula confluentes en una placa de 24, 48, o 96 pocillos se lavan una vez en el tampón A (10 mM de HEPES, pH 7,45, 150 mM de NaCl, 4 mM de KCl y 11 mM de glucosa) y una vez en el tampón B (tampón A complementado con 1 mg/ml de BSA y 5 mM de Ca<sup>2+</sup>). FVIIa (1 nM), FX (135 nM) y concentraciones variables de factor VII modificado en el tampón B se añaden simultáneamente a las células. Alternativamente las células se preincuban 15 min con factor VII modificado antes de adición de FVIIa y FX. Formación de FXa se permite durante 15 min a 37° C. 50-µl de partes alícuotas se quitan de cada pocillo y se añaden a 50 µl de tampón de parada (tampón A complementado con 10 mM de EDTA y 1 mg/ml de BSA). La cantidad de FXa generada se determina por transferencia de 50 µl de la mezcla anterior a una placa de microtitulación de pocillo y por adición de 25 µl de Chromozym X (concentración final 0,6 mM) a los pocillos. La absorbencia a 405 nm se mide continuamente y los índices iniciales de desarrollo de color se convierten a concentraciones de FXa usando una curva de estándar de FXa.

[0134] Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, no a modo de limitación.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

[0135] Composiciones típicas se muestran. La tabla 1 muestra la concentración de sustancia activa y excipientes en el evento donde la composición está en forma líquida, es decir, composición antes de liofilización o en la solución reconstituida después de liofilización. La tabla 2 muestra la concentración de sustancia activa y excipientes en el evento donde la composición está en forma sólida, es decir, en forma liofilizada. Composiciones 04 y 05 son composiciones comparativas.

Tabla 1. Composiciones, contenido de excipientes en la solución

Función principal:	Excipientes:	Contenido de composiciones mg/ml (mmol/l)		
		05	04	107
Ingrediente activo	FFR-FVII o FRR-FVIIa	2	2	2
Modificador de tonicidad	Cloruro sódico	2,92 (50)	2,92 (50)	2,92 (50)
Modificador de tonicidad / estabilizador	Cloruro de calcio, 2H <sub>2</sub> O	1,4 (10)	1,47(10)	1,47(10)
Agente de carga	Glicil-glicina	1,32 (10)	1,32 (10)	1,32 (10)
Tensioactivo	Tween	0,1	0,1	0,1
Agente de carga/ Crioprotector / Lioprotector	Manitol	26,7 (147)	40 (220)	26,7 (147)
Agente de carga / Crioprotector/ Lioprotector	Sacarosa	13,3 (39)	-	13,3 (39)
Antioxidante	Metionina	-	-	0,25
	pH	6	6	6

Tabla 2. Composiciones, contenido de excipientes en forma sólida

Función	Ingredientes	Contenido de composiciones (% p/p)		
		05	04	107
Ingrediente activo	FFR-FVII o FRR-FVIIa	4,2	4,2	4,2
Modificador de tonicidad	Cloruro sódico	6,1	6,1	6,1
Modificador de tonicidad / estabilizador	Cloruro de calcio, 2H <sub>2</sub> O	3,1	3,1	3,1
Agente de carga	Glicil-glicina	2,8	2,8	2,8
Tensioactivo	Tween	0,2	0,2	0,2
Agente de carga/ Crioprotector / Lioprotector	Manitol	55,8	83,7	55,8

Agente de carga/ Crioprotector / Lioprotector	Sacarosa	27,8		27,8
Antioxidante	Metionina			0,5
	pH	6	6	6

**Ejemplo 2**

[0136] Métodos analíticos usados en determinación de parámetros indicadores de estabilidad:

5

A. Determinación de formas oxidadas por HPLC en fase inversa (RP-HPLC):

10

[0137] Columna de HPLC: 4,5x250 mm columna embalada con sílice unido con butilo con un tamaño de partícula de 5µm y tamaño de poro 300A. Temperatura de columna: 70°C. Eluyente A: agua 99,9% V/V y ácido trifluoracético 0.1 % V/V. Eluyente B: acetonitrilo 80% V/V, ácido trifluoracético 0.09% V/V y agua 19.91 % V/V. La columna fue eluída con un gradiente lineal de X% B a (X+13) % B en 30 minutos. Velocidad de flujo: 1,0 ml/min. Detección: 214 nm.

15

[0138] Las formas oxidadas son sulfoxido de metionina de FFR-FVIIa. Los dos derivados principales son Met(O)298-FFR-FVIIa y Met(O)306-FFR-FVIIa.

[0139] El contenido de formas oxidadas se expresa como el porcentaje de la cantidad inicial de FFR-FVIIa en la composición que se recupera como formas oxidadas de FFR-FVIIa. La cantidad inicial de FFR-FVIIa se refiere a la cantidad de FFR-FVIIa en la preparación de la composición antes de liofilización.

20

B. Determinación de polímeros, oligómeros o dímeros de FFR-FVII por cromatografía de permeación en gel de alto rendimiento (GP-HPLC).

25

[0140] GP-HPLC fue se realizó en una columna Waters Protein Pak 300 SW, 7.5x300 mm, usando 0,2 M de sulfato de amonio pH 7,0 como la fase móvil. Velocidad de flujo: 0,5 ml/min y detección: 215 nm.

[0141] El contenido de agregados se expresa como el porcentaje de la cantidad inicial de FFR-FVIIa en la composición que se recupera como formas poliméricas y dimericas de FFR-FVIIa. La cantidad inicial de FFR-FVIIa se refiere a la cantidad de FFR-FVIIa en la preparación de la composición antes de liofilización.

30

**Ejemplo 3**

[0142] El contenido de formas dimericas, poliméricas y oxidadas de FFR-VIIa después de terminación de liofilización se proporcionan para las composiciones del ejemplo 1. El contenido expresa la cantidad de factor VII modificado (aquí FFR-VIIa) que se recupera como formas de dímeros, polímeros u oxidadas.

35

Tabla 3. Contenido de dímeros, polímeros y formas oxidadas de FFR-VIIa

Parámetros indicadores de estabilidad	Composiciones		
	05	04	107
	manitol-sacarosa 2:1	manitol-sacarosa 3:0	manitol-sacarosa 2:1 + metionina
Dímeros (% p/p)	0,3	0,5	0,3
Polímeros (% p/p)	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Formas oxidadas (% p/p)	2,1	2,2	1,9
< 0,3: el límite de cuantificación es 0,3.			

**Ejemplo 4**

40

[0143] El aumento en el contenido de dímeros, polímeros y formas oxidadas de FFR-VIIa durante almacenamiento a 5 °C durante 18 meses, 25 ° C durante 6, 12, 18 y 32 meses o a 45 ° C durante 8 se manas se proporciona para las composiciones del ejemplo 1. El tiempo de almacenamiento se calcula del tiempo de terminación de liofilización. El aumento en el contenido expresa la cantidad adicional de FFR-VIIa que se recupera como una forma dimerica, polimérica u oxidadada sobre dicho almacenamiento en el que la composición típicamente comprende una cantidad inicial de productos de degradación sobre finalización de la producción de la composición.

45

Tabla 4. Almacenamiento a 5 °C durante 18 meses

Parámetros indicadores de estabilidad	Composiciones		
	05	04	107
	manitol-sacarosa 2:1	manitol-sacarosa 3:0	manitol-sacarosa 2:1 + metionina
Dímeros	sin aumento	sin aumento	sin aumento
Polímeros	sin aumento	sin aumento	sin aumento
Formas oxidadas	sin aumento	sin aumento	sin aumento

5 Tabla 5. Almacenamiento a 25 °C durante 6 meses

Parámetros indicadores de estabilidad	Composiciones		
	05	04	107
	manitol-sacarosa 2:1	manitol-sacarosa 3:0	manitol-sacarosa 2:1 + metionina
Dímeros	sin aumento	sin aumento	sin aumento
Polímeros	sin aumento	sin aumento	sin aumento
Formas oxidadas	0,5	0,7	sin aumento

Tabla 6. Almacenamiento a 25 °C durante 12 meses

Parámetros indicadores de estabilidad	Composiciones		
	05	04	107
	manitol-sacarosa 2:1	manitol-sacarosa 3:0	manitol-sacarosa 2:1 + metionina
Dímeros	sin aumento	0,7	sin aumento
Polímeros	sin aumento	sin aumento	sin aumento
Formas oxidadas	0,7	1,0	sin aumento

10 Tabla 7. Almacenamiento a 25 °C durante 18 meses

Parámetros indicadores de estabilidad	Composiciones		
	05	04	107
	manitol-sacarosa 2:1	manitol-sacarosa 3:0	manitol-sacarosa 2:1 + metionina
Dímeros	sin aumento	sin aumento	sin aumento
Polímeros	sin aumento	sin aumento	sin aumento
Formas oxidadas	0,7	1,7	0,4

15 Tabla 8. Almacenamiento a 25 °C durante 32 meses

Parámetros indicadores de estabilidad	Composiciones		
	05	04	107
	manitol-sacarosa 2:9	manitol-sacarosa 3:0	manitol-sacarosa 2:1 + metionina
Dímeros	sin aumento	0.6	sin aumento
Polímeros	sin aumento	sin aumento	sin aumento
Formas oxidadas	2,0	6,1	0,9

Tabla 9. Almacenamiento a 45 °C durante 8 semanas

Parámetros indicadores de estabilidad	Composiciones		
	05	04	107
	manitol-sacarosa 2:1	manitol-sacarosa 3:0	manitol-sacarosa 2:1 + metionina
Dímeros	0,4	0,9	sin aumento
Polímeros	sin aumento	sin aumento	sin aumento
Formas oxidadas	0,8	0,9	sin aumento

**Ejemplo 5**

5

[0144] Estabilidad estructural del pastel liofilizado se muestra para varias composiciones, 1-6. El contenido de manitol y sacarosa se proporciona de cada composición (tabla 10). Las composiciones comprenden o bien FFR-FVII o FRR-FVIIa en concentración de 1 mg/ml y comprenden además otros excipientes en una cantidad de 5,7 mg/ml, incluyendo cloruro sódico, cloruro de calcio 2H<sub>2</sub>O, glicil-glicina y tween. La estabilidad estructural del pastel liofilizado se proporciona en la tabla 11.

10

[0145] Composiciones 1 y 4 son composiciones comparativas

Tabla 10. Composiciones comprendiendo varias cantidades de manitol y sacarosa

15

Contenido de manitol / sacarosa:		Composiciones					
		1	2	3	4	5	6
Manitol	mg/ml	25	16,7	8,3	40	26,8	13,2
	% p/p	79	53	26	86	57	28
	mM	137	92	46	220	147	72
Sacarosa	mg/ml	-	8,3	16,7	-	13,2	26,8
	% p/p	-	26	53	-	28	57
	mM	-	24	49	-	39	78

Tabla 11. Estabilidad del pastel liofilizado según la proporción entre manitol y sacarosa

	Composiciones					
	1	2	3	4	5	6
Proporción en peso de Man : Sac		2:1	1:2		2:1	1:2
Proporción en peso de Man : Sac		4:1	9:10		4:1	9:10
Proporción en peso de Man + Sac : FFR-FVIIa	25:1	25:1	25:1	40:1	40:1	40:1
Proporción en peso de Man: FFR-FVIIa	25:1	17:1	8:1	40:1	27:1	13:1
Proporción en peso de Sac : FFR-FVIIa		8:1	17:1		13:1	27:1
Pastel liofilizado	OK	OK	C	OK	OK	C
Solución reconstituída	Sol. clara	Sol. clara	nd	Sol. clara	Sol. clara	nd

C: pastel colapsado, Man: manitol, Sac: sacarosa, sol. clara.: solución clara, nd: no determinado

## REIVINDICACIONES

1. Composición comprendiendo;
- 5 i) factor VII modificado;
- ii) un agente adecuado para mantener el pH de dicha composición en el intervalo de 4 a 7 cuando dicha composición se disuelve en agua;
- iii) un alcohol de azúcar, y donde el alcohol de azúcar es manitol;
- 10 iv) un sacárido, y donde el sacárido es sacarosa;
- v) un antioxidante, y donde el antioxidante se selecciona del grupo consistente en ácido ascórbico, cisteína, homocisteína, cistina, cistationina, metionina, glutatión y péptidos con cualquier cisteína, homocisteína, cistina, cistationina, metionina y glutatión; y
- vi) un contenido de humedad de como mucho 3%.
2. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el agente adecuado para mantener el pH de dicha composición en el intervalo de 4 a 7 es glicilglicina, luego está presente en una cantidad de como mucho 7 mg/ml.
3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el pH de dicha composición está en el intervalo de aproximadamente 5,5 a 7,0 cuando dicha composición se disuelve en agua.
- 20 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho alcohol de azúcar está en una proporción en peso en relación a dicho sacárido que varía de aproximadamente 100:1 a 1:50, preferiblemente de aproximadamente 50:1 a 1:10, más preferiblemente de aproximadamente 20:1 a 1:5, incluso más preferiblemente de aproximadamente 10:1 a 1:2, todavía más preferiblemente de aproximadamente 4:1 a 1:2, como todavía más preferiblemente de aproximadamente 3:1 a 1:1, de forma más preferida de aproximadamente 3:1 a 3:2.
- 25 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho factor VII modificado está en una proporción en peso en relación a la suma de dicho alcohol de azúcar y dicho sacárido que varía de aproximadamente 1:200 a 1:5, preferiblemente de aproximadamente 1:100 a 1:8, más preferiblemente de aproximadamente 1:75 a 1:10, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1:60 a 1:15, de forma más preferida de aproximadamente 1:50 a 1:20.
- 30 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el alcohol de azúcar está en una cantidad que varía de aproximadamente 30% p/p a 95% p/p, preferiblemente de aproximadamente 35% p/p a 95% p/p, más preferiblemente de aproximadamente 40% p/p a 90% p/p, de forma más preferida de aproximadamente 45% p/p a 90% p/p.
- 35 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el sacárido está en una cantidad que varía de aproximadamente 1% p/p a 45% p/p, preferiblemente de aproximadamente 5% p/p a 40% p/p, más preferiblemente de aproximadamente 5% p/p a 35% p/p, de forma más preferida de aproximadamente 10% p/p a 30% p/p.
- 40 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho manitol está en una proporción en peso en relación a dicha sacarosa que varía de aproximadamente 10:1 a 1:10, preferiblemente de aproximadamente 10:1 a 1:5, más preferiblemente de aproximadamente 5:1 a 1:2, incluso más preferiblemente de aproximadamente 5:1 a 1:1, de forma más preferida de aproximadamente 4:1 a 5:4, como de aproximadamente 3:1 a 3:2.
- 45 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho factor VII modificado está en una proporción en peso en relación a la suma de dicho manitol y dicha sacarosa que varía de aproximadamente 1:100 a 1:5, preferiblemente de aproximadamente 1:75 a 1:10, más preferiblemente de aproximadamente 1:60 a 1:15 de forma más preferida de aproximadamente 1:50 a 1:20.
- 50 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo además un modificador de tonicidad.
11. Composición según la reivindicación 10, donde el modificador de tonicidad se selecciona del grupo consistente en acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro de potasio y cloruro de calcio.
- 55 12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo además un tensioactivo.
13. Composición según la reivindicación 12, donde el tensioactivo se selecciona del grupo consistente en polisorbatos, como polisorbato 20 u 80, polioxiétilen alquil éteres o poloxámeros, como poloxámero 188 o 407.
- 60 14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el factor VII modificado se selecciona de la lista de: factor VII humano y bovino, donde el residuo del sitio activo Ser344 se modifica, se sustituye con Gly, Met, Thr, o más preferiblemente, Ala; factor VII humano, donde el residuo Lys341 se sustituye; factor VII humano, donde el residuo Asp242 se sustituye; factor VII humano, donde el residuo His193 se sustituye; FVII-(K341A); FVII-(S344A); FVII-(D242A); FVII-(H193A); un polipéptido del factor VII modificado en el sitio activo por reacción con un reactivo
- 65

seleccionado de la lista de: clorometilcetonas peptídicas o peptidil clorometanos; azapéptidos; agentes acilantes como varios derivados de guanidinobenzoato y 3-alcoxi-4-cloroisocumarinas; sulfonil fluoruros como fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF); diisopropilfluorofosfato (DIPFP); tosilpropilclorometil cetona (TPCK); tosilisilclorometil cetona (TLCK); nitrofenilsulfonatos; inhibidores de proteasa heterocíclicos como isocumarinas y cumarinas.

5

15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el agente adecuado para mantener el pH en el intervalo de 4 a 7 se selecciona del grupo consistente en citrato, histidina, malato, fosfato, ácido tartárico, ácido succínico, MES, HEPES, imidazol, TRIS, lactato, glutamato y glicilglicina, con la condición de que cuando dicho agente es glicilglicina, está presente en una cantidad de como mucho 7 mg/ml.

10

16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho contenido de humedad es como mucho 2% p/p, de forma más preferida como mucho aproximadamente 1% p/p de humedad.

15

17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición es un pastel liofilizado.

18. Uso de una composición tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la preparación de un medicamento.