(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 382 157**

(51) Int. CI.:

A61K 38/48 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04738944 .0**
(96) Fecha de presentación: **24.06.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1641487**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2006**

(54) Título: **Composición líquida de polipépttidos del factor VII**

(30) Prioridad:
25.06.2003 DK 200300959
02.07.2003 US 484334 P
18.03.2004 WO PCT/DK2004/000181

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.06.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.06.2012

(73) Titular/es:
NOVO NORDISK HEALTH CARE AG
ANDREASSTRASSE 15
8050 ZÜRICH, CH

(72) Inventor/es:
HANSEN, Birthe, Lykkegaard;
JENSEN, Michael, Bech y
KORNFELT, Troels

(74) Agente/Representante:
Tomas Gil, Tesifonte Enrique

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición líquida de polipéptidos del factor VII.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a composiciones líquidas acuosas que contienen polipéptidos del factor VII, y a métodos para la producción y uso de tales composiciones. Más particularmente, esta invención se refiere a composiciones líquidas estabilizadas contra la degradación física y/o química.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Una variedad de factores implicados en el proceso de coagulación de la sangre han sido identificados, incluyendo el factor VII (FVII), una glicoproteína de plasma. La hemostasis se inicia mediante la formación de un complejo entre el factor tisular (TF) que se expone a la sangre en circulación después de producirse una herida en la pared de un vaso, y el FVIIa que está presente en la circulación en una cantidad correspondiente a aproximadamente un 1% del total de la masa de proteína del FVII. El FVII existe en el plasma principalmente como un zimógeno monocatenario, que es dividido por FXa en su forma bicatenaria activada, el FVIIa. El factora VIIa recombinante activado (rFVIIa) ha sido desarrollado como un agente prohemostático. La administración de rFVIIa ofrece una respuesta prohemostática rápida y altamente eficaz en sujetos hemofílicos con sangrados que no se pueden tratar con otros productos de factor de coagulación debido a la formación de anticuerpos. También el sangrado en sujetos con deficiencia del factor VII o sujetos con un sistema de coagulación normal pero que experimentan sangrado se pueden tratar exitosamente con FVIIa.

[0003] Es deseable tener formas de administración del factor VIIa adecuadas tanto para el almacenamiento como para la distribución. Idealmente, el producto de fármaco se almacena y administra como un líquido. Alternativamente, el producto de fármaco es liofilizado, es decir, secado por congelación, y luego reconstituido añadiendo un diluyente adecuado justo antes del uso del paciente. Idealmente, el producto de fármaco tiene una estabilidad suficiente para su almacenamiento a largo plazo, es decir, más de seis meses.

[0004] La decisión de mantener el producto de fármaco final como un líquido o liofilizarlo se basa normalmente en la estabilidad del fármaco de proteínas en dichas formas. La estabilidad de la proteína se puede ver afectada entre otras cosas por factores tales como la fuerza iónica, pH, temperatura, ciclos repetidos de congelación/descongelación, y exposiciones a esfuerzos cortantes. La proteína activa puede perderse como resultado de inestabilidades físicas, incluyendo la desnaturalización y la agregación (tanto la formación de agregados solubles como insolubles), así como inestabilidades químicas, incluyendo, por ejemplo, hidrólisis, desamidación y oxidación, por nombrar sólo unos pocos. Para una reseña general de la estabilidad de fármacos de proteínas, véase, por ejemplo, Manning, et al., Pharmaceutical Research 6:903- 918 (1989).

[0005] Mientras la posible incidencia de inestabilidades de proteína es muy apreciada, es imposible predecir los problemas de inestabilidad particulares de una proteína en particular. Cualquiera de estas inestabilidades pueden dar como resultado la formación de un subproducto de proteínas, o derivado, que tenga una actividad reducida, una toxicidad aumentada, y/o una inmunogenicidad aumentada. De hecho, la precipitación de proteínas puede dar lugar a una trombosis, una falta de homogeneidad de la forma y cantidad de dosificación, así como a jeringas atascadas. Además, modificaciones postraduccionales tal como, por ejemplo, la carboxilación gamma de determinados residuos de ácido glutámico en el N-terminal y la adición de cadenas laterales de carbohidratos proporcionan sitios potenciales que pueden ser susceptibles de modificación durante el almacenamiento. También, específicamente para el factor VIIa, siendo una serín proteasa, puede ocurrir una fragmentación debida a autocatálisis (degradación enzimática). Así, la seguridad y eficacia de cualquier composición de una proteína está directamente relacionada con su estabilidad. Mantener la estabilidad en una forma líquida es generalmente diferente a una forma liofilizada debido al potencial aumentado considerablemente para el movimiento molecular y, por lo tanto, la probabilidad aumentada de interacciones moleculares. Mantener la estabilidad en una forma concentrada es también diferente debido a la propensión a la formación de agregados en concentraciones de proteína aumentadas.

[0006] Al desarrollar una composición líquida, se tienen en cuenta muchos factores. A corto plazo, es decir, menos de seis meses, la estabilidad líquida generalmente depende de evitar grandes cambios estructurales, tal como la desnaturalización y agregación. Estos procesos son descritos en la bibliografía para varias proteínas, y existen muchos ejemplos de agentes estabilizantes. Es bien conocido que un agente eficaz para estabilizar una proteína actúa en realidad para desestabilizar otra. Una vez la proteína ha sido estabilizada contra grandes cambios estructurales, desarrollar una composición líquida para una estabilidad a largo plazo (p. ej., de más de seis meses) depende de estabilizar adicionalmente la proteína a partir de tipos de degradación específicos para dicha proteína. Tipos más específicos de degradación pueden incluir, por ejemplo, la aleatorización de enlace de disulfuro, oxidación de determinados residuos, desamidación, ciclización. Aunque no siempre es posible precisar los tipos de degradación individual, se han desarrollado ensayos para controlar cambios imperceptibles para controlar la capacidad de excipientes específicos para estabilizar únicamente la proteína de interés.

[0007] Además de las consideraciones de estabilidad, se seleccionan generalmente excipientes, que están aprobados por varias agencias médicas reguladoras a nivel mundial. Es deseable que el pH de la composición esté en un intervalo fisiológicamente adecuado en una inyección/infusión, de lo contrario el paciente puede experimentar dolor y molestias.

[0008] Para una reseña general de composiciones de proteína, véase, por ejemplo, Cleland et al.:*The development of stable protein compositions: A closer look at protein aggregation, deamidation and oxidation, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 1993, 10(4): 307-377 ; y Wang et al., *Parenteral compositions of proteins and peptides: Stability and stabilizers, Journal of Parenteral Science and Technology* 1988 (suplemento), 42 (2S).

[0009] Otras publicaciones de interés con relación a la estabilización de proteínas son de la siguiente manera. El documento U.S. 20010031721 A1 (American Home Products) se refiere a composiciones altamente concentradas, liofilizadas, y líquidas del factor IX. El documento U.S. 5,770,700 (Genetics Institute) se refiere a composiciones líquidas del factor IX. El documento WO 97/19687 (American Red Cross) se refiere a composiciones líquidas de proteínas plasmáticas, en particular factor VIII y factor IX. El documento U.S. 4,297,344 divulga la estabilización de factores de coagulación II y VIII, antitrombina III, y plasminógeno contra el calor añadiendo aminoácidos seleccionados tales como glicina, alanina, hidroxiprolina, glutamina, y ácido aminobutírico, y un carbohidrato tal como un monosacárido, un oligosacárido, o un alcohol de azúcar.

[0010] El documento US6310183 divulga una composición que consiste en rFVIIa, cloruro de sodio (2,92 mg/ml), glicilglicina, polisorbato 80, cloruro de calcio (1,47 mg/ml) y manitol a un pH de 5,5.

[0011] El factor VIIa experimenta varias vías de degradación, especialmente agregación (dimerización), oxidación, y escisión autolítica (recorte del esqueleto peptídico). Además, la precipitación puede ocurrir. Muchas de estas reacciones se pueden ralentizar significativamente mediante la eliminación del agua de la proteína. No obstante, el desarrollo de una composición acuosa para el factor VIIa tiene las ventajas de eliminar errores de reconstitución, aumentando así la exactitud de dosificación, así como simplificar el uso del producto clínicamente, aumentando así la adaptabilidad del paciente. Idealmente, las composiciones de factor VIIa deberían ser estables durante más de 6 meses en un intervalo amplio de concentraciones de proteína. Esto permite flexibilidad en los métodos de administración. Generalmente, formas más altamente concentradas permiten la administración de volúmenes inferiores, lo que es altamente deseable desde el punto de vista de los pacientes. Composiciones líquidas pueden tener muchas ventajas sobre los productos liofilizados con respecto a la facilidad de administración y uso.

[0012] Hoy, la única composición de polipéptido del FVII, obtenida por recombinación y disponible comercialmente, es un producto del factor FVIIa liofilizado que es reconstituido antes de su uso; éste contiene una concentración relativamente baja del factor VIIa, por ejemplo, aproximadamente 0,6 mg/ml. Un vial (1,2 mg) de NovoSeven® (Novo Nordisk A/S, Dinamarca) contiene 1,2 mg del factor VIIa humano recombinante, 5,4 mg de NaCl, 2,94 mg de $CaCl_2$, 2 H_2O, 2,64 mg de GlyGly, 0,14 mg de polisorbato 80, y 60,0 mg de manitol; éste se reconstituye a un pH de 5,5 mediante 2,0 ml de agua para inyección (WFI). Cuando está reconstituida, la solución de proteína es estable para su uso durante 24 horas. Así, ningún líquido listo para su uso o productos del factor VII concentrado están habitualmente disponibles comercialmente.

[0013] Por consiguiente, hay una necesidad en la técnica de métodos para mejorar la estabilidad de polipéptidos del factor VII, incluyendo el factor VIIa humano (estabilidad física y/o química), aumentando la concentración, manteniendo los niveles de actividad, y proporcionando composiciones líquidas adecuadas para su almacenamiento. Así, es un objetivo de esta invención el proporcionar una composición acuosa de polipéptidos del factor VII que proporciona un control aceptable de productos de degradación química y/o física tal como la degradación enzimática o productos de autocatálisis.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0014] Los presentes inventores han descubierto ahora que el factor VII o sus análogos (i) ("polipéptidos del factor VII"), cuando se formulan en la solución acuosa con una fuerza iónica de al menos 200 mM son estables en el intervalo de pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9.

[0015] Así, en un aspecto, la presente invención proporciona una composición líquida acuosa que comprende un polipéptido del factor VII (i); un agente tampón (ii) adecuado para mantener el pH en el intervalo de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9,0; un agente (iii) seleccionado de la lista de: una sal de calcio, una sal de magnesio, o una mezcla de las mismas; donde la concentración de (iii) es inferior a 15 mM; y un agente modificador de la fuerza iónica (iv); donde la fuerza iónica de la composición es al menos aproximadamente 200 mM.

[0016] En un segundo aspecto, la invención también proporciona un método para preparar una composición acuosa líquida de un polipéptido del factor VII, comprendiendo el paso de proporcionar el polipéptido del factor VII en una solución que comprende un agente tampón (ii) adecuado para mantener el pH en el intervalo de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9,0; un agente (iii) seleccionado de la lista de: una sal de calcio, una sal de magnesio, o una mezcla de las mismas, donde la concentración de (iii) es inferior a 15 mM; y un agente modificador de la fuerza

iónica (iv); mientras se garantiza que, en la composición final, la fuerza iónica de la composición es al menos aproximadamente 200 mM.

[0017] En un tercer aspecto, la invención también se refiere al uso de una composición tal como se ha definido anteriormente para su uso como medicamento.

[0018] En un cuarto aspecto, la invención también se refiere al uso de una composición tal como se ha definido anteriormente para la preparación de un medicamento para tratar un síndrome sensible al factor VII.

[0019] En un quinto aspecto, la invención se refiere a un método para reducir la degradación del factor VII en una formulación líquida, comprendiendo dicho método el paso de proporcionar el polipéptido del factor VII en una solución comprendiendo un agente tampón (ii) adecuado para mantener el pH en el intervalo de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9,0; un agente (iii) seleccionado de la lista de: una sal de calcio, una sal de magnesio, o una mezcla de las mismas; donde la concentración de (iii) es inferior a 15 mM; y un agente de modificación de la fuerza iónica (iv); mientras se garantiza que, en la composición final, la fuerza iónica es al menos 200 mM.

[0020] En un séptimo aspecto, la invención se refiere a un recipiente hermético, al menos parcialmente lleno, que contiene una formulación farmacéutica acuosa líquida tal como se ha definido anteriormente, y opcionalmente un gas inerte, comprendiendo dicho recipiente (i) una parte de pared y (ii) uno o más medios de cierre que no constituyen parte de dicha parte de pared.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0021] Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención reside en el desarrollo de una nueva composición farmacéutica acuosa, líquida y estabilizada que comprende un polipéptido del factor VII. Más específicamente, la composición farmacéutica acuosa líquida comprende un polipéptido del factor VII (i), un agente tampón (ii) adecuado para mantener el pH en el intervalo de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9,0, un agente (iii) seleccionado de la lista de: una sal de calcio, una sal de magnesio, o una mezcla de las mismas; donde la concentración de (iii) es inferior a 15 mM, y un agente modificador de la fuerza iónica (iv); donde la resistencia iónica de la composición es al menos aproximadamente 200 mM.

[0022] Las composiciones según la presente invención son útiles como composiciones estables y preferiblemente listas para su uso de polipéptidos del factor VII. Además, se cree que los principios, pautas y formas de realización específicas dadas aquí son igualmente aplicables para el almacenamiento a granel de polipéptidos del factor VII, *mutatis mutandis*. Las composiciones son estables durante al menos seis meses, y preferiblemente hasta 36 meses; cuando se almacenan a temperaturas en el intervalo de 2° a 8° C. Las composiciones son químicamente y/o físicamente estables, en particular químicamente estables, cuando se almacenan durante al menos 6 meses a una temperatura de 2° a 8°C.

[0023] El término "estable en almacenamiento" o el intercambiable "estable" abarca un producto que se estabiliza con un almacenamiento a temperaturas de entre 2°C - 8°C y permanece dentro de las especificaciones de producto preseleccionadas durante un período de tiempo adecuado, frecuentemente varios meses.

[0024] El término "estable" tiene como objetivo abarcar una composición que, después de su almacenamiento durante 6 meses a entre 2 y 8°C, retiene al menos el 50% de su actividad biológica inicial como se mide en un ensayo de coagulación de una etapa, por ejemplo, esencialmente como se describe en el ensayo 4 de la presente especificación. Preferiblemente, la composición estable retiene al menos el 70%, tal como el 75% o el 80% de su actividad inicial después de su almacenamiento durante 6 meses a una temperatura de 2 a 8°C.

[0025] Además, el término "estable" abarca una composición que, después de su almacenamiento durante al menos 6 meses a una temperatura de 2 a 8°C, contiene menos (en %) de al menos uno de los siguientes productos de degradación: (i) productos de degradación enzimática, (ii) agregados (dímeros, oligómeros, polímeros), (iii) formas oxidadas, o (iv) formas deamidadas en relación a la cantidad de producto(s) de degradación correspondientes contenidos en una solución de producto de NovoSeven® reconstituido que ha sido almacenado bajo condiciones similares durante un periodo de tiempo similar.

[0026] El término "estable físicamente" de los polipéptidos del factor VII se refiere a la formación de agregados solubles y/o insolubles en forma de formas diméricas, oligoméricas y poliméricas de polipéptidos del factor VII al igual que cualquier deformación estructural y desnaturalización de la molécula.

[0027] El término "estabilidad química" tiene como objetivo referirse a la formación de cualquier cambio químico en los polipéptidos del factor VII con el almacenamiento en la solución en condiciones aceleradas. Por ejemplo están la hidrólisis, desamidación y oxidación, así como la degradación enzimática, dando como resultado la formación de fragmentos de polipéptidos del factor VII (tal como degradación de cadena pesada). En particular, los aminoácidos con azufre son propensos a la oxidación con la formación de los correspondientes sulfóxidos.

[0028] En formas de realización interesantes de la invención, composiciones adecuadas tienen un aumento limitado en el contenido de formas de degradación enzimática con el almacenamiento durante al menos 6 meses a una temperatura de 2-8°C. Formas de realización interesantes se refieren a composiciones que son estables de manera que no más de aproximadamente un 25% p/p, tal como un 20%, 15%, 10%, o no más de aproximadamente un 5% del contenido inicial de polipéptido del factor VII se convierte a formas de degradación enzimática fragmentos de cadena pesada con el almacenamiento de dicha composición a una temperatura de 2-8°C durante 6 meses.

[0029] El término "contenido inicial" se refiere a la cantidad de polipéptidos del factor VII añadida a una composición en la preparación de la composición.

[0030] Las composiciones comprenden polipéptidos del factor VII (i), iones de calcio y/o de magnesio (iii), agentes amortiguadores (II), agentes de modificación de la fuerza iónica (iv) y, opcionalmente, otros excipientes, que además estabilizan los polipéptidos del factor VII, incluyendo detergentes y modificadores de tonicidad. La concentración de polipéptidos del factor VII varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 15 mg/mL.

Polipéptido del factor VII (i):

[0031] Los términos "FVII" o "factor VII humano" indica el factor VII humano producido por métodos que incluyen la extracción de la fuente natural y purificación, y por sistemas de cultivo de células recombinantes. Su secuencia y características se exponen, por ejemplo, en la patente estadounidense n°. 4,784,950. Los términos abarcan asimismo equivalentes del factor VII humano biológicamente activos, por ejemplo, que difieren en uno o más aminoácido(s) en la secuencia total. Además, los términos usados en esta solicitud tienen como objetivo abarcar las variantes de sustitución, deleción e inserción de aminoácidos del factor VII o modificaciones postranslacionales. Como se utiliza en este caso "polipéptido del factor VII" abarca, sin limitación, el factor VII, así como polipéptidos relacionados con el factor VII. Polipéptidos relacionados con el factor VII incluyen, sin limitación, polipéptidos del factor VII que han sido bien modificados químicamente en relación al factor VII humano y/o contienen una o más alteraciones de secuencia de aminoácidos relativos al factor VII humano (es decir, variantes del factor VII), y/o contienen secuencias truncadas de aminoácidos relativas al factor humano VII (es decir, fragmentos del factor VII). Tales polipéptidos relacionados con el factor VII pueden mostrar propiedades diferentes en relación al factor VII humano, incluyendo estabilidad, unión de fosfolípido, actividad específica alterada, y similares.

[0032] El término "factor VII" tiene como objetivo abarcar polipéptidos del factor VII en sus forma no dividida (zimógena), así como aquellos que han sido procesados proteolíticamente para producir sus formas bioactivas respectivas, que pueden ser factor VIIa designado. Típicamente, el factor VII se divide entre los residuos 152 y 153 para producir el factor VIIa. El término "Factor VII" tiene también como objetivo abarcar, sin limitación, polipéptidos con la secuencia de aminoácidos 1-406 del factor VII humano natural (como se divulga en la patente estadounidense n°. 4,784,950), así como el factor VII natural derivado de otras especies, tal como, por ejemplo, factor II bovino, porcino, canino, murino, y de salmón. Además abarca variaciones alélicas naturales del factor VII que pueden existir y ocurren de un individuo a otro. También, el grado y ubicación de la glicosilación u otras modificaciones de postraducción pueden variar dependiendo de las células huésped elegidas y la naturaleza del entorno huésped celular.

[0033] Como se utiliza en este caso "polipéptidos relacionados con el factor VII" abarca, sin limitación, polipéptidos que muestran sustancialmente una actividad biológica igual o mejorada en relación al factor VII humano natural. Estos polipéptidos incluyen, sin limitación, el factor VII o factor VIIa que ha sido modificado químicamente y variantes del factor VII en las que se han introducido alteraciones de la secuencia de aminoácidos específica, que modifican o interrumpen la bioactividad del polipéptido.

[0034] Además abarca polipéptidos con una secuencia de aminoácidos ligeramente modificada, por ejemplo, polipéptidos con un extremo N-terminal modificado que incluye deleciones o adiciones de aminoácidos N-terminal, y/o polipéptidos que han sido modificados químicamente en relación al factor VIIa humano.

[0035] Polipéptidos relacionados con el factor VII, incluyendo variantes del factor VII, muestran sustancialmente una bioactividad igual o mejor que el factor VII natural, incluyendo, sin limitación, polipéptidos con una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia del factor VII natural por inserción, deleción, o sustitución de uno o más aminoácidos.

[0036] Polipéptidos relacionados con el factor VII, incluyendo variantes, que tienen sustancialmente una actividad biológica igual o mejorada en relación al factor VIIa natural abarcan aquellos que muestran al menos aproximadamente un 25%, tal como, por ejemplo, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 100%, al menos aproximadamente un 110%, al menos aproximadamente un 120%, o al menos aproximadamente un 130% de la actividad específica del factor VIIa natural que ha sido producido en el mismo tipo celular, cuando se evaluó en uno o más de un ensayo de coagulación, ensayo de proteólisis, o ensayo de enlace TF como se describe en la presente especificación.

[0037] En algunas formas de realización los polipéptidos del factor VII son polipéptidos relacionados con el Factor

VII, en particular variantes, donde la relación entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del Factor VIIa humano nativo (FVIIa natural) es al menos aproximadamente 1,25 cuando se analizó en el "ensayo de hidrólisis in vitro" (véase "Ensayos", más abajo); en otras formas de realización, la relación es al menos aproximadamente 2,0; en otras formas de realización, la relación es al menos aproximadamente 4,0. En algunas formas de realización de la invención, los polipéptidos del factor VII son equivalentes del factor VII, en particular variantes, donde la relación entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del Factor VIIa humano nativo (FVIIa natural) es al menos aproximadamente 1,25 cuando se evaluó en el "ensayo de proteólisis in vitro" (véase "Ensayos", más abajo); en otras formas de realización, la relación es al menos aproximadamente 2,0 en otras formas de realización, la relación es al menos aproximadamente 4,0 en otras formas de realización, la relación es al menos aproximadamente 8,0.

[0038] En algunas formas de realización, el polipéptido del factor VII es factor VII humano, como se divulga, por ejemplo, en la patente estadounidense n°. 4,784,950 (factor VII natural). En algunas formas de realización, el polipéptido del factor VII es factor VIIa humano. En una serie de formas de realización, los polipéptidos del factor VII incluyen polipéptidos que muestran al menos aproximadamente un 90%, tal como, por ejemplo, al menos aproximadamente un 100%, al menos aproximadamente un 120%, al menos aproximadamente un 140%, o al menos aproximadamente un 160%, de la actividad biológica específica del factor VIIa humano.

[0039] En algunas formas de realización, los polipéptidos del factor VII tienen una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia del factor VII natural por inserción, deleción, o sustitución de uno o más aminoácidos.

[0040] En una serie de formas de realización, polipéptidos del factor VII incluyen polipéptidos que muestran al menos aproximadamente un 70%, preferiblemente al menos aproximadamente un 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90%, y más preferible al menos aproximadamente un 95%, de identidad con la secuencia del factor VII natural como se divulga en la patente estadounidense n°. 4,784,950. La homología/identidad de la secuencia de aminoácidos es convenientemente determinada a partir de secuencias alineadas, usando un programa informático adecuado para la alineación de secuencias, tal como, por ejemplo, el programa ClustalW, versión 1.8, 1999 (Tompson et al., 1994, *Nucleic Acid Research*, 22: 4673-4680).

[0041] Ejemplos no limitativos de variantes del factor VII que tienen sustancialmente una actividad biológica igual o mejorada como el factor VII natural incluyen S52A-FVII, S60A-FVII (Lino et al., arco. Biochem. Biophys. 352: 182-192, 1998); L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, y S336G-FVII; variantes del FVIIa que muestran una estabilidad proteolítica aumentada como se divulga en la patente estadounidense n°. 5,580,560; Factor VIIa que ha sido dividido proteolíticamente entre los residuos 290 y 291 o entre los residuos 315 y 316 (Mollerup et al., Biotechnol. Bioeng. 48:501-505, 1995); formas oxidadas del factor VIIa (Kornfelt et al., Arch. Biochem. Biophys. 363:43-54, 1999); variantes del FVII como se divulga en PCT/DK02/00189; variantes del FVII que muestran una estabilidad proteolítica aumentada como se divulga en WO 02/38162 (Scripps Research Institute); variantes del FVII con un dominio Gla modificado y que muestran una unión de membrana mejorada como se divulga en WO 99/20767 (Universidad de Minnesota); variantes del FVII como se divulga en WO 01/58935 (Maxigen ApS); variantes FVII con actividad biológica aumentada en comparación con el FVIIa natural como se divulga en WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, PCT/DK02/00635, solicitud de patente danesa PA 2002 01423, solicitud de patente danesa PA 2001 01627; WO 02/38162 (Scripps Research Institute); y variantes del FVIIa con una actividad mejorada como se divulga en JP 2001061479 (Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.).

[0042] Ejemplos de factor VII o polipéptidos relacionados con el factor VII incluyen, sin limitación, factor VII natural, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q- FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q- FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, y S336G-FVII, L305V/K337A-FVII, L305V/V158D-FVII, L305V/E296V-FVII, L305V/M298Q-FVII, L305V/V158T-FVII, L305V/K337A/V158T-FVII, L305V/K337A/M298Q-FVII, L305V/K337A/E296V-FVII, L305V/K337A/V158D-FVII, L305V/V158D/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V-FVII, L305V/V158T/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V-FVII, L305V/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/K316H-FVII, S314E/K316Q-FVII, S314E/L305V-FVII, S314E/K337A-FVII, S314E/V158D-FVII, S314E/E296V-FVII, S314E/M298Q-FVII, S314E/V158T-FVII, K316H/L305V-FVII, K316H/K337A-FVII, K316H/V158D-FVII, K316H/E296V-FVII, K316H/M298Q-FVII, K316H/V158T-FVII, K316Q/L305V-FVII, K316Q/K337A-FVII, K316Q/V158D-FVII, K316Q/E296V-FVII, K316Q/M298Q-FVII, K316Q/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D-FVII, S314E/L305V/E296V-FVII, S314E/L305V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/K337A/E296V-FVII, S314E/L305V/K337A/V158D-FVII, S314E/L305V/V158D/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V-FVII, S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V-FVII, S314E/L305V/E296V/M298Q-FVII,

S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q- FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D-FVII, K316H/L305V/E296V-FVII, K316H/L305V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/K337A/E296V-FVII, K316H/L305V/K337A/V158D-FVII, K316H/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V-FVII, K316H/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V-FVII, K316H/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/K337A FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D-FVII, K316Q/L305V/E296V-FVII, K316Q/L305V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158T-FVIII, K316Q/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/K337A/E296V-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158D-FVII, K316Q/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII, K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V-FVII, K316Q/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q- FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/K337A-FVII, F374Y/V158D-FVII, F374Y/E296V-FVII, F374Y/M298Q-FVII, F374Y/V158T-FVII, F374Y/S314E-FVII, F374Y/L305V-FVII, F374Y/L305V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D-FVII, F374Y/L305V/E296V-FVII, F374Y/L305V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T-FVII, F374Y/L305V/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII, F374Y/K337A/M298Q-FVII, F374Y/K337A/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q-FVII, F374Y/V158D/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q-FVII, F374Y/V158T/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/S314E/M298Q-FVII, F374Y/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII, F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII, F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII, F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158T-FVII, F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII, F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII, F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII, F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII, F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, S52A- factor VII, factor de S60A VII; y P11Q/K33E-FVII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; FVII que tiene sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos desde 233Tr a 240Asn, FVII que tiene sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos desde 304Arg a 329Cys, y FVII que tiene sustituciones, deleciones, o adiciones en la secuencia de aminoácidos Ile153-Arg223.

[0043] En diferentes formas de realización, el polipéptido del factor VII es factor VIIa humano; factor VIIa humano recombinante; un polipéptido relacionado con el factor VII; una variante de secuencia del factor VII; o un polipéptido del factor VII donde la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del Factor VIIa humano nativo (FVIIa natural) es al menos aproximadamente 1,25, preferiblemente al menos aproximadamente 2,0 ó 4,0, más preferiblemente al menos aproximadamente 8,0, cuando se evaluaron en el "ensayo de proteólisis in vitro" como se

describe en la presente especificación. En una forma de realización, el polipéptido del factor VII tiene una glicosilación diferente al factor VII humano natural. En diferentes formas de realización, el polipéptido del factor VII está presente en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml; de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 10,0 mg/ml; de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 5,0 mg/ml; de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 4,0 mg/ml; de aproximadamente 1,0 mg/ml a aproximadamente 4,0 mg/ml; de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml; de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 4,0 mg/ml; de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml; o de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 1,5 mg/ml.

Agente tampón (ii):

[0044] Para producir la composición farmacéutica acuosa líquida útil para su administración directa parenteral a un mamífero tal como un humano, es normalmente necesario que el valor de pH. de la composición se mantiene dentro de determinados límites, tal como de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 9,0. Para asegurar un valor de pH adecuado bajo las condiciones dadas, la composición farmacéutica también comprende un agente tampón (ii) adecuado para mantener el pH en el intervalo de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9,0.

[0045] El término "agente tampón" engloba aquellos agentes o combinaciones de agentes que mantienen el pH de la solución en un intervalo aceptable de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9,0. Estos pueden incluir, pero de forma no limitativa, ácidos y sal de: MES, PIPES, ACES BES, TES, HEPES, TRIS, histidina (p. ej. L-histidina), imidazol, glicina, glicilglicina, glicinamida, ácido fosfórico (p. ej. fosfato de sodio o de potasio), ácido acético (p. ej. a cetato de amonio, de sodio o de calcio), ácido láctico, ácido glutárico, ácido cítrico (p. ej. citrato de sodio o de potasio), ácido tartárico, ácido málico, ácido maleico, y ácido succínico. Se debe entender que el agente tampón puede comprender una mezcla de dos o más componentes, donde la mezcla es capaz de proporcionar un valor de pH en el intervalo definido. Como ejemplo puede ser ácido acético y acetato sódico mencionados, o ácido acético e histidina, etc.

[0046] En una forma de realización, el agente tampón (ii) es al menos un componente seleccionado de los grupos que consisten en ácidos y sales de MES, PIPES, ACES, BES, TES, HEPES, TRIS, histidina (p. ej. L-histidina), imidazol, glicina, glicilglicina, glicinamida, ácido fosfórico (p. ej. fosfato de sodio o de potasio), ácido acético (p. ej. acetato de amonio, de sodio o de calcio), ácido láctico, ácido glutárico, ácido cítrico (p. ej. citrato de sodio o de potasio), ácido tartárico, ácido málico, ácido maleico, y ácido succínico.

[0047] En formas de realización determinadas de la invención, la composición farmacéutica comprende cantidades muy pequeñas de calcio; así, es posible utilizar un sistema de tampón basado en ácido fosfórico, es decir, un tampón de fosfato, sin precipitación indeseable de fosfatos de calcio. Así, en una forma de realización interesante, el tampón es un tampón de fosfato.

[0048] La concentración del agente tampón se elige para mantener el pH preferido de la solución. En varias formas de realización, la concentración del agente tampón es 1-100 mM; 1-50 mM; 1-25 mM; o 2-20 mM.

[0049] En una forma de realización, el pH de la composición se mantiene de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9,0, tal como de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5 de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,0 de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5 de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,5 de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5 o de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,0 de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,6, o aproximadamente 6,5, o aproximadamente 5,5.

[0050] Como se utiliza en este caso, los valores de pH especificados como "aproximadamente" se entiende que son ± 0,1, por ejemplo aproximadamente pH 8,0 incluye pH 8,0± 0,1.

Agente con calcio y/o magnesio (iii):

[0051] La composición farmacéutica estable y líquida comprende un agente (iii) seleccionado de la lista de una sal de calcio, una sal de magnesio, o una mezcla de las mismas. La concentración del agente (iii) es inferior a 15mM. En varias formas de realización, el agente (iii) está presente en una concentración de al menos aproximadamente 0,1 µM; al menos aproximadamente 0,5 µM; al menos aproximadamente 1 µM; al menos aproximadamente 5 µM; al menos aproximadamente 10 µM; al menos aproximadamente 50 µM; al menos aproximadamente 100 µM; al menos aproximadamente 1 mM; al menos aproximadamente 2 mM; al menos aproximadamente 5 mM; al menos aproximadamente 10mM.

[0052] En varias formas de realización, la relación molar entre iones de y/o magnesio no complejos (Ca2+/Mg2+) y polipéptido FVII es: 0,001-750; 0,001-250; 0,001-100; 0,001-10; 0,001-1,0; 0,001-0,5; 0,5-750; 0,5-250; 0,5-100; 0,5-10; 0,5-1,0; 0,001-0,4999; 0,005-0,050.

[0053] Cuando se usa aquí, el término "la concentración de iones de calcio y/o magnesio no complejos" tiene como

objetivo referirse a la diferencia entre la concentración total de iones de calcio y/o magnesio y la concentración de calcio y/o magnesio ligada a agentes quelantes de calcio/magnesio. A este respecto, el polipéptido del factor VII no está considerado como un "agente quelante de calcio/magnesio" aunque se prevé que el calcio y/o magnesio enlace con, o se asocie a, el polipéptido del factor VII bajo determinadas condiciones.

[0054] En una forma de realización de la presente invención, la relación molar de iones de calcio y/o magnesio no complejos (Ca^{2+}/Mg^{2+}) al polipéptido del factor VII es inferior a 0,5, por ejemplo, en el intervalo de 0,001-0,499, tal como 0,005-0,050, o en el intervalo de 0,000-0,499, tal como en el intervalo de 0,000-0,050, o aproximadamente 0,000. En una forma de realización de la presente invención, la relación molar de calcio no complejo (Ca^{2+}) al polipéptido del factor VII es inferior a 0,5, por ejemplo en el intervalo de 0,001-0,499, tal como 0,005-0,050, o en el intervalo de 0,000-0,499, tal como en el intervalo de 0,000-0,050, o aproximadamente 0,000.

[0055] En otra forma de realización, la relación molar de iones de calcio y/o magnesio no complejos al polipéptido del factor VII es superior a 0,5. En otra forma de realización, la relación molar de iones de calcio no complejos al polipéptido del factor VII es superior a 0.5.

[0056] Para obtener la baja relación relativa entre iones de calcio y/o magnesio (Ca^{2+}) y el polipéptido del factor VII, puede ser necesario o deseable eliminar el exceso de iones de calcio y/o magnesio, por ejemplo, por contacto de la composición con un material de intercambio de iones bajo condiciones adecuadas para la eliminación de Ca^{2+} y/o Mg^{2+}, o añadir un agente quelante de calcio / magnesio para enlazar el exceso de iones (complejos) de calcio y/o magnesio. Esto es particularmente relevante cuando la relación entre iones de calcio y/o magnesio y el polipéptido del factor VII en una solución de un paso del proceso que precede al paso de formulación excede el límite establecido anteriormente. Ejemplos de "agentes quelantes de calcio/magnesio" incluyen EDTA, ácido cítrico, NTA, DTPA, ácido tartárico, ácido láctico, ácido málico, ácido succínico, HIMDA, ADA y compuestos similares.

[0057] En una forma de realización, la sal de calcio se selecciona de la lista de: cloruro de calcio, acetato de calcio, gluconato de calcio, levulato de calcio, o una mezcla de los mismos.

[0058] En una forma de realización, la sal de magnesio se selecciona de la lista de: cloruro de magnesio, acetato magnésico, sulfato magnésico, gluconato de magnesio, levulato de magnesio, sales magnésicas de ácidos fuertes, o una
mezcla de los mismos.

[0059] En una forma de realización preferida, el agente (iii) comprende Ca^{2+}.

[0060] En formas de realización preferidas, el agente (iii) se selecciona de la lista de: cloruro de calcio, acetato de calcio, cloruro de magnesio, acetato magnésico, sulfato magnésico, o una mezcla de los mismos; y el agente de modificación de la fuerza iónica (iv) es cloruro de sodio o una mezcla de cloruro de sodio y al menos un agente modificador adicional de la fuerza iónica.

Agente modificador de la fuerza iónica (iv):

[0061] Como se utiliza en este caso, el término "agente modificador de la fuerza iónica" incluye agentes, que contribuyen a la fuerza iónica de la solución. Los agentes incluyen, pero de forma no limitativa, sales neutras, por ejemplo, cloruro sódico o cloruro de potasio; aminoácidos; péptidos pequeños (p. ej., que tienen de 2 a 5 residuos de aminoácidos tal como, por ejemplo, glicilglicina), o una mezcla de al menos dos de dicho agentes modificadores. El "agente modificador de la fuerza iónica" puede también ser una mezcla de dos o más de tales agentes que en combinación son capaces de modificar la fuerza iónica a un nivel tal y como se define en la presente invención. Agentes preferidos son el cloruro sódico o una mezcla de cloruro sódico con uno o más pequeños péptidos o aminoácidos. El agente(s) modificador(es) de la fuerza iónica está(n) presente(s) en una concentración suficiente para elevar la fuerza iónica de la solución a al menos 200 mM (calculado en base a concentraciones milimolares de agentes). Los agentes modificadores de la fuerza iónica pueden, por ejemplo, sin limitación, estar cada uno presente en una concentración de al menos aproximadamente 5 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 400 mM, 800 mM, 1000 mM, 1200 mM, 1500 mM, 1800 mM, 2000 mM, o al menos 2200 mM.

[0062] El término "fuerza iónica" es la fuerza iónica de la solución (μ) que, en el presente contexto, se define mediante la ecuación: $\mu = \frac{1}{2} \sum C_i (Z_i^2)$, donde μ es la fuerza iónica, C_i es la concentración molar de un ión, y Z_i es la carga (+ o -) de ese ión (véase, por ejemplo, Solomon, *Journal of Chemical Education*, 78(12):1691-92, 2001 ; James Fritz y George Schenk: *Quantitative Analytical Chemistry*, 1979).

[0063] En varias formas de realización de la invención, la fuerza iónica de la composición es al menos 200 mM, tal como al menos 250 mM, al menos 300 mM, al menos 400 mM, al menos 500 mM, al menos 650 mM, al menos 800 mM, al menos 1000 mM, al menos 1200 mM, al menos 1600 mM, al menos 2000 mM, al menos 2400 mM, al menos 2800 mM, o al menos 3200 mM (cálculos de fuerza iónica en base a concentraciones milimolares (mM) de componentes).

[0064] En diferentes formas de realización, el agente modificador de la fuerza iónica (iv) se selecciona de la lista de: una sal neutra, por ejemplo, cloruro sódico; un aminoácido; o un péptido pequeño, o una mezcla de al menos dos de dichos agentes modificadores. En una forma de realización el agente modificador de la fuerza iónica comprende cloruro sódico. En otra forma de realización el agente modificador de la fuerza iónica es cloruro sódico.

[0065] Por "sal neutra" se entiende una sal que no es ni un ácido ni una base cuando se disuelve en la solución acuosa. Ejemplos incluyen cloruro sódico o cloruro de potasio.

[0066] En formas de realización importantes, la composición farmacéutica es adaptada para la inyección subcutánea, intravenosa o intramuscular según métodos conocidos en la técnica. La concentración posiblemente alta de sales pueden ser desventajosa para determinados grupos de pacientes. Por tanto, la presente invención también proporciona un método antes de su uso para reducir la concentración de sal en una composición farmacéutica acuosa líquida, donde dicho método comprende el paso de poner en contacto la composición farmacéutica acuosa líquida definida aquí con un material de intercambio de iones, un material adecuado para la desalación, y/o el paso de dilución de la composición.

[0067] El material de intercambio de iones es preferiblemente contenido en un recipiente estéril, por ejemplo, en un cartucho de vidrio o plástico.

[0068] Se prevé que la composición farmacéutica acuosa líquida esté en contacto con el material de intercambio de iones, por ejemplo, mediante el paso a través de un cartucho que contiene el material de intercambio de iones, inmediatamente antes de su uso. En una forma de realización particular, se prevé que el cartucho sea una parte integrante de un conjunto de jeringuilla.

Otros ingredientes:

Modificador de tonicidad:

[0069] Como se utiliza en este caso, el término "modificador de tonicidad" incluye agentes, que contribuyen a la osmolalidad de la solución. Los modificadores de tonicidad incluyen, pero de forma no limitativa, aminoácidos; péptidos pequeños (p. ej., que tienen de 2 a 5 residuos de aminoácidos); 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, glicilglicina, trehalosa, 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 tal como, por ejemplo, cloruro de sodio o cloruro de potasio pueden ser utilizadas.

[0070] En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende un agente modificador de tonicidad (v). En una forma de realización el agente modificador de tonicidad (v) se selecciona de la lista de: una sal neutra; un mono-, di- o polisacárido; un alcohol de azúcar; un aminoácido; o un pequeño péptido, o una mezcla de al menos dos de dichos agentes modificadores.

Tensioactivo

[0071] Opcionalmente, las composiciones pueden también contener un tensioactivo o detergente (vi). "Tensioactivos" o "detergentes" generalmente incluyen aquellos agentes que protegen la proteína de tensiones inducidas de interfaz de aire/solución y tensiones inducidas de solución/superficie (p. ej., dando como resultado una agregación de proteínas). El detergente es preferiblemente un detergente no iónico incluyendo, sin limitación, polisorbatos (p. ej. Tween®), tal como polisorbato 20 o 80 éteres de alquilo de polioxietileno o poloxámeros, tal como poloxámero 188 ó 407, (p. ej., Polioles de Pluronic®) y otros polímeros en bloque de etileno/polipropileno, o polietilenoglicol (PEG) tal como PEG8000. La cantidad de tensioactivo presente varía de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 2,0%.

[0072] En varias formas de realización, el tensioactivo no iónico es un polisorbato o un poloxámero o un éter de alquilo de polioxietileno; preferiblemente poloxámero 188 o poloxámero 407, o polisorbato 20 o polisorbato 80, o lauril éter de polioxi 23.

Antioxidantes

[0073] Opcionalmente, la composición puede incluir un antioxidante (vii). Los antioxidantes incluyen, pero de forma no limitativa, ácido ascórbico, cisteína, homocisteína, cistina, cistationina, metionina, glutatión, y otros péptidos con cisteína o metionina, en particular péptidos con de 2 a 5 residuos de aminoácidos donde al menos uno de los residuos es un residuo de metionina o de cisteína; se prefiere la metionina, en particular la L-metionina. El antioxidante se incluye en una concentración de 0,1 a 5 mg/ml, tal como 0,1 a 4; 0,1 a 2; ó 0,5 a 2 mg/ml.

[0074] En una forma de realización el antioxidante (vii) se selecciona de la lista de: L- o D-metionina, un análogo de metionina, un péptido que contiene metionina, un homólogo de metionina, ácido ascórbico, cisteína, homocisteína, glutatión, cistina, y cistationina. En una forma de realización, el antioxidante es L-metionina.

Conservante:

[0075] Un conservante (viii) puede también ser incluido en la composición para retardar el crecimiento microbiano y así permitir un empaquetamiento "de uso múltiple" de los polipéptidos del FVII. Los conservantes incluyen fenol, alcohol benzílico, orto-cresol, meta-cresol, para-cresol, metil parabeno, propil parabeno, cloruro de benzalconio, y cloruro de bencetonio. El conservante se incluye normalmente en una concentración de 0,1 a 20 mg/ml dependiendo del intervalo de pH y el tipo de conservante.

[0076] Opcionalmente, la composición puede también incluir un agente capaz de inhibir la desamidación y/o la isomerización.

[0077] Como se utiliza en este caso, se entiende que las cantidades específicas son ± aproximadamente el 10%, por ejemplo, aproximadamente 50 mM incluye 50 mM ± 5 mM; por ejemplo, 4% incluye 4% ± 0,4%, etc.

[0078] Los porcentajes son (peso/peso) tanto cuando se refieren a sólidos disueltos en la solución como a líquidos mezclados en soluciones. Por ejemplo, para Tween, es el peso del 100% material/peso de la solución.

[0079] El término "isotónico" significa "isotónico con serum", es decir, en aproximadamente 300 ± 50 milliosmol/kg. La tonicidad tiene como objetivo ser una medida de osmolalidad de la solución antes de la administración. El término "hipertónico" tiene como objetivo designar niveles de osmolalidad por encima del nivel fisiológico del suero, tal como niveles por encima de 300 ± 50 miliosmol/kg.

[0080] En una forma de realización, la composición es isotónica; en otra, es hipertónica. En una forma de realización, la composición se formula para la administración farmacéutica. En una forma de realización, la composición es estable para su almacenamiento durante al menos 6 meses a 2-8°C.

Métodos de uso:

[0081] Las composiciones o preparaciones de la presente invención se pueden utilizar para tratar cualquier síndrome sensible al factor VII, tal como, por ejemplo, trastornos de la sangre, incluyendo, sin limitación, aquellos provocados por deficiencias en los factores de coagulación (p. ej., hemofilia A y B o deficiencia de los factores de coagulación XI o VII); por trombocitopenia o la enfermedad de von Willebrand, o por inhibidores de los factores de coagulación, o sangrado excesivo a partir de cualquier causa. Las preparaciones pueden también ser administradas a pacientes en combinación con cirugía u otro traumatismo o a pacientes que reciben terapia anticoagulante.

[0082] El término "cantidad efectiva farmaceuticamente" o "cantidad efectiva" es la dosis efectiva que ha de ser determinada por un profesional cualificado, que puede valorar las dosificaciones para conseguir la respuesta deseada. Factores que hay que tener en consideración en las dosis incluyen la potencia, biodisponibilidad, perfiles farmacocinéticos/farmacodinámicos deseados, condición del tratamiento, factores relacionados con el paciente (p. ej. peso, salud, edad, etc.), presencia de medicaciones coadministrados (por ejemplo, anticoagulantes), tiempo de administración, u otros factores conocidos por un profesional médico.

[0083] El término "tratamiento" se define como la supervisión y cuidado de un sujeto, por ejemplo un mamífero, en particular un humano, con el objetivo de combatir la enfermedad, condición, o trastorno e incluye la administración de un polipéptido del factor VII para prevenir la aparición de los síntomas o complicaciones, o aliviar los síntomas o complicaciones, o eliminar la enfermedad, condición, o trastorno. Composiciones farmacéuticas según la presente invención con un polipéptido del factor VII se pueden administrar parenteralmente a sujetos que necesiten tal tratamiento. La administración parenteral se puede realizar mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa mediante una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar mediante una bomba de infusión.

[0084] La concentración del factor VIIa se expresa convenientemente como mg/mL o como UI/mL, con 1 mg normalmente representando 43000 - 56000 UI o más.

[0085] En diferentes formas de realización, el síndrome se selecciona del grupo que consiste en hemofilia A, hemofilia B, deficiencia del factor XI, deficiencia del factor VII, trombocitopenia, enfermedad de von Willebrand, presencia de un inhibidor del factor de coagulación, cirugía, hemorragia intracerebral, traumatismo, transplante de células madre, enfermedad hepática, coagulopatía de dilución, hemorragias digestivas altas, y terapia anticoagulante.

Métodos Generales

Ensayos adecuados para determinar la actividad biológica de los polipéptidos del factor VII:

[0086] La actividad biológica del factor VIIa en la coagulación de la sangre deriva de su capacidad para (i) unirse al factor tisular (TF) y (ii) catalizar la escisión proteolítica del factor IX o factor X para producir factor IX o X activado (factor IXa o Xa, respectivamente).

[0087] Para fines de la invención, la actividad biológica de los polipéptidos del factor VII ("actividad biológica del factor VII") se pueden cuantificar midiendo la capacidad de una preparación para estimular la coagulación sanguínea usando plasma deficiente en factor VII y tromboplastina, como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n°. 5,997,864 o WO 92/15686. En este ensayo, la actividad biológica se expresa como la reducción en el tiempo de coagulación en relación a una muestra de control y se convierte a "unidades de factor VII" por comparación con un estándar de suero humano combinado que contiene 1 unidad/ml de actividad del factor VII. Alternativamente, la actividad biológica del factor VIIa se puede cuantificar por

- medición de la capacidad del factor VIIa o un polipéptido relacionado con el factor VII para producir Factor X activado (Factor Xa) en un sistema que comprende TF introducido en una membrana lípida y factor X. (Persson et al., J. Biol. Chem. 272:19919-19924, 1997);

- medición de la hidrólisis del Factor X en un sistema acuoso ("Ensayo de proteólisis in vitro", véase más abajo);

- medición de la unión física del factor VIIa o un polipéptido relacionado con el factor VII al TF usando un instrumento basado en la resonancia de plasmones de superficie (Persson, FEBS Letts. 413:359-363, 1997);

- medición de la hidrólisis de un sustrato sintético mediante el Factor VIIa y/o un polipéptido relacionado con el factor VII ("Ensayo de hidrólisis in vitro", véase más abajo);

- medición de la generación de trombina en un sistema in vitro independiente de TF.

[0088] Polipéptidos del factor VII útiles conforme a la presente invención se pueden seleccionar mediante ensayos adecuados que se pueden realizar como pruebas preliminares simples in vitro. Así, la presente especificación divulga una prueba simple (llamada "Ensayo de hidrólisis in vitro") para la actividad de polipéptidos del factor VII.

Ensayo de hidrólisis in vitro (**Ensayo 1**)

[0089] El factor VIIa nativo (natural) y el polipéptido del factor VII (ambos de aquí en adelante denominados "factor VIIa") se pueden evaluar para actividades específicas. Estos pueden también ser evaluados en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se lleva a cabo en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). El sustrato cromogénico D-Ile-Pro-Arg-p- nitroanilida (S-2288, Chromogenix, Suecia), concentración final 1 mM, se añade al factor VIIa (concentración final de 100 nM) en 50 mM Hepes, pH 7,4, con 0,1 M NaCl, 5 mM $CaCl_2$ y 1 mg/ml albúmina de suero bovino. La absorbancia en 405 nm se mide continuamente en un lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EE.UU.). La absorbancia desarrollada durante una incubación de 20 minutos, después de la sustracción de la absorbancia en un pocillo para el blanco sin ninguna enzima, se utiliza para calcular la relación entre las actividades del polipéptido del factor VII y el factor VIIa natural:

Relación = (A405 nm del polipéptido del factor VII)/(A405 nm del factor VIIa natural).

[0090] En base a ello, los polipéptidos del factor VII con una actividad inferior, comparable o superior al factor VIIa nativo pueden ser identificados, tal como, por ejemplo, polipéptidos del factor VII donde la relación entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del factor nativo VII (FVII natural) es aproximadamente, versus por encima de 1,0.

[0091] La actividad de los polipéptidos del factor VII puede también ser medida usando un sustrato fisiológico tal como el factor X ("Ensayo de proteólisis in vitro"), adecuadamente a una concentración de 100-1000 nM, donde el Factor Xa generado se mide después de la adición de un sustrato cromogénico adecuado (por ejemplo, S-2765). Además, el ensayo de actividad se puede realizar a una temperatura fisiológica.

Ensayo de proteólisis in vitro (**Ensayo 2**)

[0092] El factor VIIa nativo (natural) y el polipéptido del Factor VII (ambos de aquí en adelante denominados "Factor VIIa") se evalúan en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se lleva a cabo en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). El Factor VIIa (10 nM) y Factor X (0,8 microM) en 100 microL 50 mM de Hepes, pH 7,4, con 0,1 M de NaCl, 5 mM de $CaCl_2$ y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, se incuban durante 15 min. La escisión del Factor X se detienen entonces mediante la adición de 50 microL 50 mM de Hepes, pH 7,4, con 0,1 M de NaCl, 20 mM EDTA y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino. La cantidad del Factor Xa

generado se mide mediante la adición de la z-D-Arg-Gly-Arg-P-nitroanilida de sustrato cromogénico (S-2765, Chromogenix, Suecia), concentración final 0,5 mM. La absorbancia en 405 nm se mide continuamente en un lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EE.UU). La absorbancia desarrollada durante 10 minutos, después de la sustracción de la absorbancia en un pocillo para el blanco sin ningún FVIIa, se utiliza para calcular la relación entre las actividades proteolíticas del polipéptido del factor VII y el factor VIIa natural:

Relación = (A405 nm de polipéptido del factor VII)/(A405 de factor VIIa natural).

[0093] En base a ello, el polipéptido del factor VII con una actividad inferior, comparable o superior al factor VIIa nativo puede ser identificado, tal como, por ejemplo, polipéptidos del factor VII donde la relación entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad de factor VII nativo (FVII natural) es aproximadamente, versus por encima de 1,0.

[0094] La capacidad del factor VIIa o de los polipéptidos del factor VII para generar trombina se puede medir también en un ensayo (**Ensayo 3**) que comprende todos los factores de coagulación pertinentes e inhibidores en concentraciones fisiológicas (minus factor VIII cuando se simulan las condicioens de la hemofilia A) y plaquetas activadas (como se describe en la pág. 543 en Monroe et al. (1997) Brit. J. Haematol. 99, 542-547, que se incorpora aquí como referencia).

[0095] La actividad de los polipéptidos del factor VII puede también ser medida usando un ensayo de coagulación de una etapa (**Ensayo 4**) esencialmente como se describe en el documento WO 92/15686 o US 5,997,864. Brevemente, la muestra que ha de ser evaluada se diluye en 50 mM de Tris (pH 7,5), 0,1% de BSA y 100 µl se incuba con 100 µl del plasma deficiente en factor VII y 200 µl de tromboplastina C con 10 mM de Ca^{2+}. Los tiempos de coagulación se miden y comparan con una curva estándar usando un estándar de referencia o una mezcla de plasma humano normal citratado en la dilución en serie.

Preparación y purificación de polipéptidos del factor VII:

[0096] El factor VIIa humano purificado adecuado para su uso en la presente invención se obtiene preferiblemente mediante tecnología recombinante de ADN, por ejemplo como se describe en Hagen et al., Proc.Natl.Acad.Sci. EE.UU. 83: 2412-2416, 1986, o como se describe en la patente europea n°. 200.421 (ZymoGenetics, Inc.).
El factor VII puede también ser producido mediante los métodos descritos por Broze y Majerus, J.Biol.Chem. 255 (4): 1242-1247, 1980 y Hedner y Kisiel, J.Clin.Invest. 71: 1836-1841, 1983. Estos métodos producen factor VII sin cantidades detectables de otros factores de coagulación sanguínea. Otra preparación más del factor VII purificado se puede obtener mediante la inclusión de una filtración de gel adicional como el paso de purificación final. El factor VII se convierte entonces en factor VIIa activado mediante medios conocidos, por ejemplo, mediante diferentes proteínas plasmáticas, tal como factor XIIa, IXa o Xa. Alternativamente, como es descrito por Bjoern et al. (Research Disclosure, 269 septiembre de 1986, págs. 564-565), el factor VII se puede activar pasándolo a través de una columna de cromatografía de intercambio de iones, tal como Mono Q® (Pharmacia fine Chemicals) o similar, o por autoactivación en la solución.

[0097] Los polipéptidos relacionados con el Factor VII se pueden producir mediante la modificación del factor VII natural o mediante tecnología recombinante. Polipéptidos relacionados con el Factor VII con secuencia de aminoácidos alterada en comparación con el factor VII natural se pueden producir modificando la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el factor VII natural bien alterando los codones de aminoácidos o bien mediante la eliminación de algunos de los codones de aminoácidos en el ácido nucleico que codifica el factor VII natural por medios conocidos, por ejemplo, por mutagénesis de sitio específico.

[0098] Será evidente para los expertos en la técnica que se pueden realizar sustituciones en el exterior de las regiones críticas para la función de la molécula del factor VIIa y todavía dar como resultado de un polipéptido activo. Residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido del factor VII, y por lo tanto preferiblemente no sometidos a la sustitución, se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tal como mutagénesis dirigida o mutagénesis de escaneado de alanina (véase, por ejemplo, Cunningham y Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En esta última técnica, se introducen mutaciones en cada residuo con carga positiva en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para la actividad coagulante, respectivamente de reticulación para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Sitios de interacción de enzima-sustrato pueden también ser determinados por análisis de la estructura tridimensional como se determina por tales técnicas como análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o etiquetado de fotoafinidad (véase, por ejemplo, de Vos et al., 1992, Science 255: 306-312; Smith et al., 1992, *Journal of Molecular Biology* 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Letters 309: 59-64).

[0099] La introducción de una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos para intercambiar un nucleótido por otro nucleótido se puede realizar por mutagénesis dirigida usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Particularmente útil es el procedimiento que utiliza un vector de ADN superenrollado bicatenario con un inserto de interés y dos cebadores sintéticos con la mutación deseada. Los cebadores de oligonucleótidos, cada uno complementario a cadenas opuestas del vector, se extienden durante la variación cíclica de la temperatura mediante

Pfu ADN polimerasa. Con la incorporación de los cebadores, se genera un plásmido mutado con cortes escalonados.
Después del ciclo de temperatura, el producto se trata con DpnI, que es específico para ADN metilado y hemimetilado para digerir el molde de ADN parental y para seleccionar el ADN sintetizado que contiene la mutación. Otros procedimientos conocidos en la técnica para crear, identificar y aislar variantes se pueden usar, tal como, por ejemplo, la transposición genética o técnicas de exposición en fago. La separación de polipéptidos de su célula de origen se puede conseguir por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, la eliminación de medio de cultivo celular con el producto deseado de un cultivo celular adherente; centrifugado o filtración para eliminar células no adherentes; y similares.

[0100] Opcionalmente, los polipéptidos del factor VII se pueden purificar adicionalmente. La purificación se puede conseguir usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, cromatografía de afinidad, tal como, por ejemplo, en una columna de anticuerpos antifactor VII (véase, por ejemplo, Wakabaiashi et al., J. Biol. Chem. 261:11097, 1986; y Thim et al., Biochem. 27:7785, 1988); cromatografía de interacción hidrofóbica; cromatografía de intercambio de iones; cromatografía de exclusión por tamaño; procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoque preparativo (IEF), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico), o extracción y similares. Véase, generalmente, Scopes, *Protein Purification*, Springer-verlag, Nueva York, 1982; y *Protein Purification*, J.C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989. Siguiendo a la purificación, la preparación contiene preferiblemente menos de aproximadamente un 10% en peso, más preferiblemente menos de aproximadamente un 5% y de la forma más preferible menos de aproximadamente un 1%, de polipéptidos no de factor VII derivados de la célula huésped.

[0101] Polipéptidos del factor VII se pueden activar por escisión proteolítica, usando factor XIIa u otras proteasas con especificidad de tipo tripsina, tal como, por ejemplo, factor IXa; kalikreína, factor Xa, y trombina. Véase, por ejemplo, Osterud et al., Biochem. 11: 2853 (1972); Thomas, patente estadounidense n°. 4,456,591; y Hedner et al., J. Clin. Invest. 71:1836 (1983). Alternativamente, polipéptidos del factor VII se pueden activar pasándolos a través de una columna de cromatografía de intercambio de iones, tal como Mono Q® (Pharmacia) o similar, o por autoactivación en la solución. El polipéptido del factor VII activado resultante puede luego ser formulado y administrado como se describe en la presente aplicación.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0102] La Figura 1 muestra contenidos de agregados de FVII y fragmentos de FVII después de 3 meses de almacenamiento a 2-8°C.

[0103] Los siguientes ejemplos ilustran la práctica de la invención. Estos ejemplos son sólo para fines ilustrativos y no están destinados de ninguna manera a limitar el ámbito de la invención reivindicada.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Métodos analíticos usados en la determinación de los parámetros de indicación de la estabilidad:

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

[0104] Columna de HPLC: columna de 4,5x250 mm rellena de sílice unido con butilo con un tamaño de partícula de 5µm y tamaño de poro de 300Å. 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 se eluyó con un gradiente lineal de X% B a (X+13) % B en 30 minutos. Velocidad de flujo: 1,0 ml/min. Detección: 214 nm.

[0105] Las formas oxidadas son sulfóxidos de metionina de polipéptidos del factor VII. Por ejemplo, los dos derivados principales de FVII son Met(O)298 FVII y Met(O)306 FVII.

[0106] El contenido de formas oxidadas se expresa como el porcentaje de la cantidad inicial de factor VII en la composición en la preparación que se recupera como formas oxidadas del factor VII.

[0107] B. Determinación de agregados de polipéptidos del factor VII por cromatografía de permeación en gel de alto rendimiento (GP-HPLC).

[0108] La GP-HPLC se llevó a cabo en una columna Waters Protein Pak 300 SW de 7,5x300 mm usando 0,2 M de sulfato de amonio pH 7,0 con 5% de isopropanol como la fase móvil. Velocidad de flujo: 0,5 ml/min y detección: 215 nm.

[0109] El contenido de agregados se expresa como el porcentaje de la cantidad inicial del factor VII en la

composición en la preparación que se recupera como formas diméricas, oligoméricas y poliméricas del factor VII.

Ejemplo 2

Preparación de la composición

[0110] En general, las muestras acuosas de la composición de FVIIa para el análisis en estos ejemplos experimentales fueron preparadas a partir de una solución a granel purificada por intercambio de tampón en una columna de filtración en gel. Los aditivos de la composición estaban bien contenidos en el tampón de elución en sus proporciones finales o añadidos al eluato. La solución resultante fue filtrada estéril usando un filtro de membrana esterilizada (0,2 micras de tamaño de poro o equivalente) e introducida en viales de cristal estériles, con tapón y sellado con tapones de caucho butílico y tapas tipo *flip-off* de aluminio.

Ejemplo 3 (ejemplo comparativo)

Efecto del pH en la estabilidad química/física

[0111] (I) Viales de la composición acuosa de rFVIIa con 1,4 mg de rFVIIa/ml, 50 mM de cloruro sódico, 10 mM de cloruro de calcio y una mezcla de 10 mM de glicilglicina, acetato y histidina ajustada a pH 3; 3,5; 4,0; 4,5; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; y 9,0 fueron incubados a bien una temperatura de 2-8 °C, o bien a temperaturas de almacenamiento elevadas de 30 °C, y luego retirados en varios puntos de tiempo y evaluados para los cambios en el pH y la estabilidad química fue determinada por RP-HPLC y GP-HPLC.

[0112] Después del almacenamiento a 2-8 °C durante un periodo de hasta tres meses, las composiciones acuosas mostraron cambios insignificantes en el pH. La HPLC no desnaturalizante de exclusión por tamaño que se realizó en muestras almacenadas durante un periodo de hasta tres meses a 2-8 °C no mostró ninguna agregación significativa del producto de fármaco en valores de pH 5,5 (Figura 1). La RP-HPLC realizada en estas muestras no mostró ningún aumento significativo en la fragmentación u oxidación de la proteína en el intervalo de pH de 4,5-5,5.

[0113] La Figura 1 muestra datos después de 3 meses de almacenamiento a 2-8 °C. El contenido inicial de agregados es aproximadamente 0,5% y el contenido inicial de fragmentos es aproximadamente 9%.

[0114] (II) Viales de la composición acuosa de rFVIIa que contiene 1,4 mg de rFVIIa/ml, 200 mM de cloruro sódico, 10 mM de cloruro de calcio y una mezcla de 10 mM de glicilglicina, acetato y histidina ajustada a pH 3; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; y 9,0 se incuban bien a una temperatura de 2-8 °C, o a temperaturas de almacenamiento elevadas de 30°C, y luego se retiran en varios puntos del tiempo y se evalúan para cambios en el pH; la estabilidad química se determina por RP-HPLC y GP-hPLC.

[0115] Después del almacenamiento a 2-8 °C durante un periodo de hasta tres meses las composiciones acuosas mostrarán cambios insignificantes en el pH. La HPLC no desnaturalizane de exclusión por tamaño realizada en muestras almacenadas durante un periodo de hasta tres meses a 2-8 °C no mostrará ninguna agregación significativa del producto de fármaco en valores de pH de 5,5. La RP-HPLC realizada en estas muestras no mostrará ningún aumento significativo en la fragmentación u oxidación de la proteína en el intervalo de pH de 4,5-5,5.

Ejemplo 4

Estabilidad física de las composiciones acuosas con varios detergentes

[0116] Doce composiciones diferentes fueron preparadas. Las composiciones fueron:

rFVIIa	0,75 mg/ml
NaCl	2,92 mg/ml
$CaCl_2$, 2 H_2O	1,47 mg/ml
Glicilglicina	1,32 mg/ml
Detergente/solubilizante	x mg/ml
pH	5,5

[0117] Las concentraciones de los detergentes/solubilizantes evaluados se muestran en la tabla más abajo.

[0118] Las composiciones fueron preparadas a partir de una solución a granel líquida de rFVIIa. Soluciones madre de los detergentes/solubilizantes fueron preparadas en tampones con NaCl, CaCl2, 2 H2O, y glicilglicina en las concentraciones mostradas anteriormente. Las soluciones a granel de rFVIIa y las soluciones de detergentes fueron mezcladas, y el pH en las soluciones se ajustó a 5,5. Las composiciones fueron filtradas (0,2 µm) y se llenaron en viales (1 ml de solución por vial).

[0119] La apariencia de las composiciones fue determinada mediante inspección visual y se determinó la absorbancia de la composición en 400 nm. Posteriormente, los viales fueron agitados durante 19 horas (800/min) a temperatura ambiente. Después de completar la agitación, se determinó la apariencia y la absorbancia en 400 nm. Los resultados se listan en la tabla a continuación.

Tipo de detergente	Conc. (mg/ml)	Apariencia		Absorbancia (400nm)		
		Antes	Después	Antes	Después	Incremento
Ninguna (referencia)	-	Pocas part.	Muy turbio	0,0085	1,4386	1,4301
Tween® 80	0,1	Muy pocas part.	Claro, pocas part.	0,0044	0,0036	-0,0008
Tween® 20	0,1	Muy pocas part.	Claro, pocas part.	0,0039	0,0101	0,0062
Poloxámero 188	1,0	Muy pocas part.	Claro, pocas part.	0,0063	0,0027	-0,0036
Pluronic® F127	1,0	Muy pocas part.	Claro, pocas part.	0,0000	0,0048	0,0048
Polietilenglicol 400	0,1	Muy pocas part.	Turbio	0,0076	1,5708	1,5632
Polietilenglicol 4000	0,5	Pocas part.	Muy turbio	0,0108	1,6624	1,6516
Brij® 35	0,1	Muy pocas part.	Claro, pocas part.	0,0028	0,0015	-0,0013
Myrj® 59	0,1	Muy pocas part.	Claro, pocas part.	0,0002	0,1110	0,1108
Myrj® 52	0,1	Muy pocas part.	Claro, pocas part.	0,0009	0,9390	0,9381
LPCM	0,1	Muy pocas part.	Claro, pocas part.	0,0026	0,0012	-0,0014
Glicerol	1,0	Muy pocas part.	Turbio	0,0040	1,4064	1,4024
"Part." = "partículas"						

[0120] Los resultados muestran que la referencia (sin la adición de ningún detergente/solubilizante) se vuelve visualmente turbia cuando se agita y se observa un aumento significativo en la absorbancia en 400 nm. La adición de Tween® 20 (= polisorbato 20), Tween® 80 (= polisorbato 80), poloxámero 188, Pluronic® F127 (= poloxámero 407), Brij® 35 (= polioxil 23 lauril éter), y LPCM (= a-lisofosfatidilcolina miristoilo) evitó casi por completo un incremento en la turbiedad y absorbancia, mientras se observó un ligero aumento en la turbiedad (en comparación con la referencia) para Myrj® 59 (= polioxil 100 estearato) y Myrj® 52 (= polioxil 40 estearato).

Ejemplo 5

Estabilidad química de composiciones acuosas que contienen metionina como antioxidante

[0121]
(I) Tres composiciones diferentes fueron preparadas. Las composiciones fueron:

rFVIIa	0,75 mg/ml
NaCl	2,92 mg/ml
CaCl2, 2 H2O	1,47 mg/ml
Glicilglicina	1,32 mg/ml
Metionina	0 o 0,25 o 1,0 mg/ml
pH	6,5

Las composiciones fueron preparadas a partir de una solución a granel líquida de rFVIIa. La metionina fue disuelta en tampones con NaCl, $CaCl_2$, 2 H_2O, y glicilglicina en las concentraciones anteriormente mostradas. La solución a granel de rFVIIa y la solución de metionina fueron mezcladas, y el pH en las soluciones fue ajustado a 6,5. Las composiciones fueron filtradas (0,2 µm) y se llenaron en viales (1 ml de solución por vial). Los viales fueron almacenados a 5°C, 25°C y 40°C. Se retiraron muestras y se analizaron para el contenido de formas oxidadas (por

RP-HPLC) enl mismo punto temporl mostrado en la tabla más abajo. La tabla muestra el contenido de formas oxidadas (en %).

Metionina (mg/ml)	Tiempo cero	25°C 14 días	40°C 14 días	25°C 28 días	40°C 28 días	5°C 90 días
0 (reference)	2,4	4,4	7,5	4,4	12,8	3,1
0,25	1,7	2,4	5,3	2,8	9,9	1,9
1,0	1,6	2,3	5,0	2,6	9,6	1,3

Los resultados muestran que la adición de metionina ralentiza el índice de oxidación en la composición.
(II) Tres composiciones diferentes son preparadas. Las composiciones son:

rFVIIa	0,75 mg/ml
NaCl	11,68 mg/ml (200mM)
CaCl2, 2 H2O	1,47 mg/ml
Glicilglicina	1,32 mg/ml
Metionina	0 o 0,25 o 1,0 mg/ml
pH	6,5

Las composiciones se preparan a partir de una solución a granel líquida de rFVIIa. La metionina se disuelve en tampones con NaCl, $CaCl_2$, 2 H_2O, y glicilglicina para obtener las concentraciones mostradas anteriormente. La solución a granel de rFVIIa y la solución de metionina son mezcladas, y el pH en las soluciones se ajusta a 6,5. Las composiciones son filtradas (0,2 µm) y se introducen en viales (1 ml de solución por vial). Los viales se almacenan a 5°C, 25°C y 40°C. Se retiran muestras y se analizan para el contenido de formas oxidadas (en %) (por RP-HPLC) en el mismo punto temporal mostrado en la tabla más arriba.

[0122] Los resultados mostrarán que la adición de metionina ralentiza el índice de oxidación en la composición.

Ejemplo 6

Estabilidad química de composiciones acuosas con cloruro sódico

[0123] Cuatro composiciones diferentes son preparadas. Las composiciones son:

rFVIIa	1,0 mg/ml
NaCl	2,92 mg/ml (50mM; composición 1)
	11,68 mg/ml (200mM; composición 2)
	23,36 mg/ml (400mM; composición 3)
	46,42 mg/ml (800mM; composición 4)
	58,4 mg/ml (1000mM; composición 5)
$CaCl_2$, 2 H_2O	1,47 mg/ml (10mM)
Glicilglicina	1,32 mg/ml
pH	7,0

[0124] Las composiciones se preparan a partir de una solución a granel líquida de rFVIIa. El cloruro de calcio se disuelve en tampones con NaCl y glicilglicina para dar las concentraciones mostradas arriba después de la mezcla con rFVIIa a granel. Después de la mezcla, el pH en las soluciones se ajusta a 7,0. Las composiciones se filtran (0,2 µm) y se introducen en viales (1 ml de solución por vial). Los viales se almacenan a 5°C.

[0125] Para cada formulación la actividad del factor VII (UI/ml) se determina por ensayo de coagulación en 0 meses (medición UI/ml) y después de 3 meses de almacenamiento a 5°C (medición UI/ml). Los ensayos de coagulación mostrarán que las composiciones con al menos 200mM de cloruro de sodio (composiciones 2-5) tienen una actividad de coagulación más alta después de 3 meses de almacenamiento (mayor UI/ml) en comparación con la composición 1.

Degradación de cadena pesada

[0126] Para cada formulación, la formación de fragmentos de cadena pesada se miden por RP-HPLC como se describe en el ejemplo 1. Los resultados (como % de fragmentos) se miden en 0 meses así como durante el almacenamiento a 5°C y 30°C, respectivamente; el contenido de fragmentos de cadena pesada (como % de fragmentos) se miden a 1, 2, 3, y 6 meses.

[0127] Las mediciones mostrarán que la formación de fragmentos de degradación pesados en las composiciones 2-5 (como % de fragmentos) es menor que la formación de fragmentos en la composición 1.

Ejemplo 7

Estabilidad química de composiciones acuosas con cloruro sódico

[0128] Cuatro composiciones diferentes fueron preparadas. Las composiciones fueron:

rFVIIa	1,0 mg/ml
NaCl	0 mg/ml (0mM; composición 1)
	29,2 mg/ml (500mM; composición 2)
	43,8 mg/ml (750mM; composición 3)
	58,4 mg/ml (1000mM; composición 4)
$CaCl_2$, 2 H_2O	1,47 mg/ml (10mM)
PIPES-di-Na	17,3 mg/ml (50mM)
pH	6,5

[0129] Las composiciones fueron preparadas a partir de una solución a granel líquida de rFVIIa. La solución a granel líquida fue desalada en las composiciones deseadas usando columnas PD-10 de Pharmacia.

[0130] Después de la desalación, el pH en las soluciones se ajustó a 6,5. Las composiciones fueron filtradas (0,22 µm) y se llenaron en cartuchos. Los cartuchos fueron almacenados a 5°C.

[0131] Para cada formulación el contenido de fragmentos de cadena pesada (%) fue medido por RP-HPLC (ejemplo 1) en varios puntos de tiempo, los datos se muestran en la tabla de más abajo.

Contenido de fragmentos de cadena pesada (%)					
Composición	Tiempo de almacenamiento a 5° C (meses)				
	0		1	2	3
1	11,6	15,6	19,0	24,1	27,8
2	12,2	13,2	15,3	16,7	18,9
3	12,2	13,2	14,6	16,0	18,1
4	12,2	13,0	14,4	15,3	17,1

[0132] Se puede observar que aumentando la concentración de NaCl se reduce la formación de fragmentos de cadena pesada.

[0133] Para las formulaciones 1 y 4, la actividad de coagulación del factor VII (UI/ml) fue determinada en varios puntos de tiempo. En la tabla de más abajo la actividad de coagulación en los varios puntos de tiempo ha sido listada en relación al valor cero de punto de tiempo (=100%).

Actividad de coagulación			
Composición	Tiempo de almacenamiento a 5° C (meses)		
	0	3	11
1	100 %	85%	67%*
4	100 %	88%	82%
*: valor de 8 meses			

[0134] Se puede observar que la actividad de coagulación es más alta en la composición 4 que contiene NaCl.

Ejemplo 8

Efecto de fuerza iónica en la estabilidad química

[0135] Cuatro formulaciones fueron preparadas mezclando la solución a granel de rFVIIa purificado con soluciones

madre que contienen excipientes. En las formulaciones el contenido de NaCl y $CaCl_2$ fueron variadas como se muestra en la tabla de más abajo

Formulación	mg/mL NaCl	mg/mL $CaCl_2$
A	2,92	1,47
B	58,4	1,47

[0136] Además, todas las formulaciones contenidas 1. mg/ml rFVIIa, 10 mM de glicilglicina, 10 mM de acetato sódico, y 10 mM de L-histidina. El pH fue ajustado a 7,0 en todas las formulaciones.

[0137] Las formulaciones fueron almacenadas a 30°C y el contenido de fragmentos de cadena pesados fueron medidos por RP- HPLC (ejemplo 1). Los resultados (como % de fragmentos) se listan en la tabla de más abajo.

Formulación	0 meses	1 mes	2 meses	3 meses
A	12,7	31,3	39,1	43,6
B	9,8	19,1	23,2	26,7

[0138] Los resultados muestran que una mayor fuerza iónica (aquí obtenida por adición de NaCl) produce una formación disminuida de fragmentos de cadena pesada durante el almacenamiento.

REIVINDICACIONES

1. Composición acuosa líquida que comprende
Un polipéptido del factor VII (i);
Un agente tampón (ii) adecuado para mantener el pH en el intervalo de 5,5 a 9,0;
Un agente (iii) seleccionado de la lista de: una sal de calcio, una sal de magnesio, o una mezcla de las mismas; donde la concentración de (iii) es inferior a 15 mM; y
Un agente modificador de la fuerza iónica (iv);
donde la fuerza iónica de la composición es al menos 200 mM.

2. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la fuerza iónica de la composición es al menos 250 mM, tal como al menos 300 mM, 400 mM, 800 mM, 1000 mM, 1200 mM, 1500 mM, 1800 mM, 2000 mM, o al menos 2200 mM.

3. Composición según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el agente modificador de la fuerza iónica (iv) se selecciona de la lista de: una sal neutra, por ejemplo, cloruro sódico; un aminoácido; o un péptido pequeño, o una mezcla de al menos dos de dichos agentes modificadores.

4. Composición según la reivindicación 3, donde el agente modificador de la fuerza iónica (iv) comprende cloruro sódico.

5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el agente (iii) está presente en una concentración de al menos 2 mM, tal como al menos 5 mM.

6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la sal de calcio se selecciona de la lista de: cloruro de calcio, acetato de calcio, gluconato de calcio, y levulato de calcio.

7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la sal de magnesio se selecciona de la lista de: cloruro de magnesio, acetato magnésico, sulfato magnésico, gluconato de magnesio, y levulato de magnesio.

8. Composición según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, donde el agente (iii) se selecciona de la lista de: cloruro de calcio, acetato de calcio, cloruro de magnesio, acetato magnésico, sulfato magnésico, o una mezcla de los mismos; y donde el agente modificador de la fuerza iónica (iv) es cloruro de sodio.

9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo además un agente modificador de la tonicidad (v).

10. Composición según la reivindicación 9, donde el agente modificador de la tonicidad (v) se selecciona de la lista de: una sal neutra; un mono-, di- o polisacárido; un alcohol de azúcar; un aminoácido; o un péptido pequeño, o una mezcla de al menos dos de dichos agentes modificadores.

11. Composición según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, donde el agente modificador de la tonicidad (v) está presente en una concentración de 1 mM a 500 mM.

12. Composición según la reivindicación 11, donde la concentración del agente modificador de la tonicidad (iv) es 10 - 250 mM.

13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, comprendiendo además un tensioactivo no iónico (vi).

14. Composición según la reivindicación 13, donde el tensioactivo no iónico es un polisorbato o un poloxámero o un polioxietileno alquil éter tal como poloxámero 188, poloxámero 407, polisorbato 20, polisorbato 80, o polioxi 23 lauril éter.

15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, comprendiendo además un antioxidante (vii).

16. Composición según la reivindicación 15, donde el antioxidante (vii) se selecciona de la lista de: L- o D-metionina, un análogo de metionina, un péptido que contiene metionina, un homólogo de metionina, ácido ascórbico, cisteína, homocisteína, glutatión, cistina, y cistationina.

17. Composición según la reivindicación 16, donde el antioxidante es L-metionina.

18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, donde el antioxidante está presente en una concentración de 0,1 a 5,0 mg/ml, tal como de 0,1 a 4 mg/ml, de 0,1 a 3 mg/ml, de 0,1 a 2 mg/ml, o de 0,5 a 2 mg/ml.

19. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, donde el pH se mantiene en el intervalo de 5,5 a 7,0, o de 5,5 a 6,5.

20. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, donde el agente adecuado para mantener el pH en el intervalo de 5,5 a 7,0 se selecciona de la lista de ácidos y sales de:

> MES, PIPES, ACES, BES, TES, HEPES, TRIS, histidina (p. ej. L-histidina), imidazol, glicina, glicilglicina, glicinamida, ácido fosfórico (p. ej. fosfato de sodio o de potasio), ácido acético (p. ej. acetato de amonio, de sodio o de calcio), ácido láctico, ácido glutárico, ácido cítrico (p. ej. citrato de sodio o de potasio), ácido tartárico, ácido málico, ácido maleico, y ácido succínico, o una mezcla de al menos dos de dichos agentes.

21. Composición según la reivindicación 20, donde la concentración del agente es de 1 mM a 50 mM.

22. Composición según la reivindicación 21, donde la concentración del tampón es aproximadamente 10 mM.

23. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, comprendiendo además un conservante (viii), tal como fenol, alcohol benzílico, orto-cresol, meta-cresol, para-cresol, metil parabeno, propil parabeno, cloruro de benzalconio, o cloruro de bencetonio.

24. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, que se adapta para la administración parenteral.

25. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, que es estable durante al menos 6 meses a 2-8°C.

26. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, donde el polipéptido del factor VII es factor VIIa humano, preferentemente factor VIIa humano obtenido por recombinación.

27. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, donde el polipéptido del factor VII es una variante de la secuencia del factor VII.

28. Composición según la reivindicación 27, donde la relación entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del factor VIIa humano nativo (FVIIa natural) es al menos 1,25, preferiblemente al menos 2,0 o 4,0, más preferiblemente al menos 8,0, cuando se evalúa en el "Ensayo de proteólisis in vitro" como se describe en la presente especificación.

29. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, donde el polipéptido del factor VII está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 15 mg/ml, tal como de 0,5 a 10,0 mg/ml, de 0,5 a 5,0 mg/ml, de 0,6 a 4,0 mg/ml, o de 1,0 mg/ml a 4,0 mg/ml.

30. Método para preparar una composición acuosa líquida de un polipéptido del factor VII, que comprende el paso de proporcionar el polipéptido del factor VII en una solución que comprende un agente tampón (ii) adecuado para mantener el pH en el intervalo de 5,5 a 9,0; un agente (iii) seleccionado de la lista de: una sal de calcio, una sal de magnesio, o una mezcla de las mismas; donde la concentración de (iii) es inferior a 15 mM; y un agente modificador de la fuerza iónica (iv); mientras se garantiza que, en la composición final, la fuerza iónica es de al menos 200 mM.

31. Composición farmacéutica acuosa líquida tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-30 para su uso como medicamento.

32. Uso de una composición tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30 para la preparación de un medicamento para tratar un síndrome sensible al factor VII.

33. Método para reducir la degradación de un polipéptido del factor VII en una formulación líquida, comprendiendo dicho método el paso de proporcionar el polipéptido del factor VII en una solución que comprende un agente tampón (ii) adecuado para mantener el pH en el intervalo de 5,5 a 9,0; un agente (iii) seleccionado de la lista de: una sal de calcio, una sal de magnesio, o una mezcla de las mismas; donde la concentración de (iii) es inferior a 15 mM; y un agente modificador de la fuerza iónica (iv); mientras se garantiza que, en la composición final, la fuerza iónica es al menos 200 mM.

34. Método según la reivindicación 33, donde la concentración de Ca^{+2} es al menos 2 mM, tal como al menos 5 mM.

35. Recipiente hermético, al menos parcialmente lleno que contiene una composición farmacéutica acuosa

líquida tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-31, y opcionalmente un gas inerte, comprendiendo dicho recipiente (i) una parte de pared y (ii) uno o más medios de cierre que no constituyen parte de dicha parte de pared.

36. Recipiente según la reivindicación 35, donde la composición no comprende un antioxidante (vii).

37. Recipiente según cualquiera de las reivindicaciones 35-36, donde dicho recipiente es un vial o cartucho comprendiendo un medio de cierre que comprende un tabique eslastomérico autosellado que puede ser penetrado por una aguja.

38. Recipiente según la reivindicación 37, donde dicho recipiente es un cartucho que comprende además un medio de pistón desplazable por el cual el líquido presente en dicho recipiente se puede expulsar de dicho recipiente.

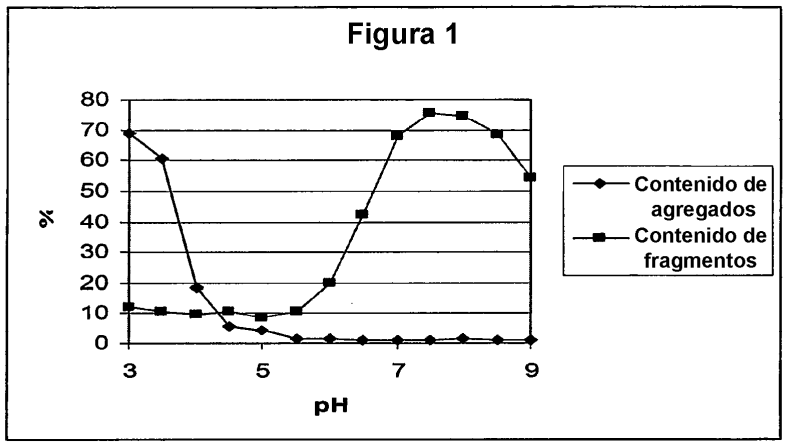
Figura 1
80
70
60
50
40
30
20
10
0
%
3
5
7
9
pH
Contenido de agregados
Contenido de fragmentos

Fig 1