

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 581**

51 Int. Cl.:

A61K 38/36 (2006.01)
A61K 47/16 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61K 31/17 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2004 E 04739034 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 1656158**

54 Título: **Composición farmacéutica líquida acuosa de polipéptidos de tipo Factor VII**

30 Prioridad:

14.08.2003 DK 200301161
20.08.2003 US 496443 P
18.03.2004 WO PCT/DK2004/000181

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.06.2016

73 Titular/es:

NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)
Thurgauerstrasse 36/38
8050 Zürich, CH

72 Inventor/es:

JENSEN, MICHAEL BECH;
PETERSEN, ANDERS KLARSKOV y
BOWLER, ANDREW NEIL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 574 581 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica líquida acuosa de polipéptidos de tipo Factor VII

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas líquidas acuosas que contienen polipéptidos de tipo Factor VII y a métodos para preparar y utilizar tales composiciones, así como también a envases que contienen tales composiciones y al uso de tales composiciones en el tratamiento de un síndrome sensible al Factor VII. Más particularmente, la invención se refiere a composiciones líquidas estabilizadas frente a la degradación química y/o física.

Antecedentes de la invención

10 Se han identificado varios Factores implicados en el proceso de coagulación de la sangre, incluido el Factor VII (FVII), una glucoproteína plasmática. La coagulación comienza con la formación de un complejo entre el Factor Tisular (TF, por sus siglas en inglés) que se expone a la circulación sanguínea tras una lesión en la pared del vaso y FVIIa que está presente en la circulación en una cantidad que corresponde a aproximadamente un 1% de la masa proteica de FVII total. FVII existe en el plasma principalmente como un zimógeno monocatenario que es escindido por FXa para generar su forma activada bicatenaria, FVIIa. Se ha desarrollado el Factor VIIa recombinante activado (rFVIIa) como un agente pro-hemostático. La administración de rFVIIa ofrece una respuesta pro-hemostática rápida y sumamente eficaz en sujetos hemofílicos con hemorragias que no pueden ser tratados con otros productos de Factores de coagulación debido a la formación de anticuerpos. Asimismo, con FVIIa puede tratarse con éxito la hemorragia en sujetos con una deficiencia del Factor VII o sujetos que tienen un sistema de coagulación normal pero que experimentan una hemorragia excesiva.

15 Es deseable disponer de formas de administración del Factor VIIa adecuadas tanto para el almacenamiento como para el suministro. Idealmente, el producto farmacológico se almacena y se administra como un líquido. Como alternativa, el producto farmacológico está liofilizado, es decir, criodesecado, y posteriormente es reconstituido mediante la adición de un diluyente adecuado antes del uso con el paciente. Idealmente, el producto farmacológico tiene la suficiente estabilidad para guardarse en un almacenamiento a largo plazo, es decir, más de seis meses.

20 La decisión de mantener el producto farmacológico final como un líquido o de criodesecarlo depende normalmente de la estabilidad del fármaco proteico en esas formas. La estabilidad proteica puede verse afectada, entre otros, por factores tales como la fuerza iónica, pH, temperatura, ciclos repetidos de congelación/descongelación y exposiciones a fuerzas de cizallamiento. La proteína activa puede perderse como resultado de inestabilidades físicas, que incluyen la desnaturalización y agregación (formación de agregados tanto solubles como insolubles), así como también de inestabilidades químicas que incluyen, por ejemplo, la hidrólisis, desamidación y oxidación, por nombrar tan solo unas pocas. Para consultar una revisión general sobre la estabilidad de los productos farmacéuticos proteicos, remítase, por ejemplo, a Manning *et al.*, *Pharmaceutical Research* 6:903-918 (1989).

25 Aunque se reconoce ampliamente la posible aparición de inestabilidades proteicas, resulta imposible predecir los problemas de inestabilidad concretos de una proteína concreta. Cualquiera de estas inestabilidades puede resultar en la formación de un subproducto o derivado proteico, presentar una menor actividad, una mayor toxicidad y/o una mayor inmunogenicidad. Ciertamente, la precipitación proteica podrá conllevar una trombosis, falta de homogeneidad de la forma farmacéutica y cantidad, así como también jeringuillas obstruidas. Además, las modificaciones posteriores a la traducción tales como, por ejemplo, la gamma-carboxilación de ciertos residuos de ácido glutámico en el extremo N y la adición de cadenas laterales de carbohidratos proporcionan sitios potenciales que podrán ser susceptibles de una modificación en el almacenamiento. Asimismo, algo particular del Factor VIIa por ser una serina proteasa, podrá ocurrir una fragmentación debido a la autocatálisis (degradación enzimática). Por lo tanto, la seguridad y eficacia de cualquier composición de una proteína están directamente relacionadas con su estabilidad. El mantenimiento de la estabilidad en una forma líquida es, por lo general, diferente del mantenimiento de la estabilidad en una forma liofilizada debido a la posibilidad mucho mayor de movimiento molecular y, por lo tanto, la mayor probabilidad de interacciones moleculares. El mantenimiento de la estabilidad en una forma concentrada también es diferente del de los casos anteriores, debido a la propensión para formar agregados con mayores concentraciones proteicas.

30 Cuando se desarrolla una composición líquida se tienen en cuenta muchos factores. La estabilidad del líquido a corto plazo, es decir menos de seis meses, por lo general depende de evitar cambios estructurales importantes, tales como la desnaturalización y agregación. Estos procesos se describen en la bibliografía para varias proteínas y existen muchos ejemplos de agentes estabilizantes. Existe constancia de que un agente eficaz para estabilizar una proteína de hecho desestabiliza otra. Una vez que se ha estabilizado la proteína frente a cambios estructurales importantes, el desarrollo de una composición líquida que posea estabilidad a largo plazo (p. ej., más de seis meses) depende de estabilizar aún más la proteína frente a tipos de degradación específicos de esa proteína. Los tipos de degradación más específicos podrán incluir, por ejemplo, la formación aleatoria de enlaces disulfuro, oxidación de ciertos residuos, desamidación, ciclación. Aunque no siempre es posible identificar las especies individuales de

degradación, se han desarrollado ensayos para monitorizar cambios sutiles de manera que sea posible monitorizar la capacidad de los excipientes específicos para estabilizar de manera exclusiva la proteína de interés.

Es deseable que el pH de la composición esté en un intervalo fisiológicamente adecuado tras la inyección/infusión, de otra manera se puede ocasionar dolor e incomodidad al paciente.

5 Para consultar una revisión general de composiciones proteicas remítase a, 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).

10 El documento WO 2003/055512 (Novo Nordisk A/S) divulga una composición líquida que comprende (i) el polipéptido de tipo Factor VII, (ii) un agente adecuado para mantener el pH en el intervalo de 4.0 a aproximadamente 8.0, (iii) un agente seleccionado a partir de la lista de: una sal de calcio, una sal de magnesio o una mezcla de estas; donde la concentración de (iii) es de al menos 15 mM.

15 El Factor VIIa experimenta varias rutas de degradación, especialmente agregación (dimerización), oxidación y escisión autolítica (recorte del esqueleto peptídico o "degradación de la cadena pesada"). Además, podrá tener lugar la precipitación. Muchas de estas reacciones se pueden ralentizar significativamente eliminando el agua de la proteína. Sin embargo, el desarrollo de una composición acuosa para el Factor VIIa presenta las ventajas de eliminar errores de reconstitución y, de esta manera, incrementar la exactitud de la administración de la dosis, así como también de simplificar el uso del producto desde un punto de vista clínico y, de esta manera, incrementar la adhesión al tratamiento por parte del paciente. Idealmente, las composiciones del Factor VIIa deberán ser estables durante más de 6 meses en un amplio intervalo de concentraciones proteicas. Esto permite métodos de administración flexibles. Por lo general, las formas mucho más concentradas permiten la administración de volúmenes menores, lo que es sumamente deseable desde el punto de vista de los pacientes. Las composiciones líquidas pueden presentar muchas ventajas respecto a los productos criodesecados en lo que respecta a la facilidad de administración y uso.

25 En la actualidad, la única composición del polipéptido de tipo FVII producido de manera recombinante y comercializada es un producto del Factor FVIIa criodesecado que se reconstituye antes de su uso; contiene una concentración del Factor VIIa relativamente baja, p. ej., 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, 5.84 mg de NaCl, 2.94 mg de CaCl₂, 2 H₂O, 2.64 mg de glicilglicina (GlyGly), 0.14 mg de polisorbato 80 y 60.0 mg de manitol; se reconstituyó hasta un pH 5.5 con 2.0 mL de agua para inyección (WFI, por sus siglas en inglés). Cuando se reconstituye, la solución proteica es estable para su uso durante 24 horas. Por lo tanto, en la actualidad no están comercializados productos del Factor VII concentrados o listos para usar líquidos.

35 En consecuencia, es un objetivo de esta invención proporcionar una composición farmacéutica líquida, acuosa del polipéptido de tipo Factor VII que proporcione un control aceptable de los productos de degradación química y/o física tales como los productos de autocatálisis o degradación enzimática.

Compendio de la invención

40 Los presentes inventores han descubierto que el Factor VII o sus análogos ("polipéptidos de tipo Factor VII"), cuando se formulan como composiciones farmacéuticas líquidas, acuosas junto con al menos un agente estabilizante (iii) que comprende un motivo -C₆H₄-C(=N-Z¹-R¹)-NH-Z²-R², muestran una mejor estabilidad y, de esta manera, permiten un almacenamiento prolongado antes de su uso concreto.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica líquida, acuosa adaptada para la administración parenteral que comprende

al menos 0.01 mg/mL de un polipéptido de tipo Factor VII (i);

45 un agente tamponante (ii) adecuado para mantener el pH en el intervalo de 5.0 a 9.0; y

al menos un agente estabilizante (iii) seleccionado a partir del grupo constituido por compuestos de benzamidina que comprenden un motivo -C₆H₄-C(=N-Z¹-R¹)-NH-Z²-R², donde C₆H₄ denota un anillo de benceno sustituido opcionalmente, y donde

50 Z¹ y Z² se seleccionan independientemente a partir del grupo constituido por -O-, -S-, -NR^H- y un enlace sencillo, donde R^H se selecciona a partir del grupo constituido por hidrógeno, alquilo C₁₋₄, arilo y arilmetilo, y R¹ y R² se seleccionan independientemente a partir del grupo constituido por hidrógeno, alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente, alquenilo C₂₋₆ sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, heterociclilo sustituido opcionalmente, o

$-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$ forma un anillo heterocíclico donde $-Z^1-R^1-R^2-Z^2-$ es un birradical.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar una composición farmacéutica líquida, acuosa de un polipéptido de tipo Factor VII, que comprende el paso de proporcionar el polipéptido de tipo Factor VII (i) con una concentración de al menos 0.01 mg/mL en una solución que comprende un agente tamponante (ii) adecuado para mantener el pH en el intervalo de 5.0 a 9.0; y al menos un agente estabilizante (iii) seleccionado a partir del grupo constituido por compuestos de benzamidina que comprenden un motivo $-C_6H_4-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$, donde C_6H_4 denota un anillo de benceno sustituido opcionalmente, y donde

Z^1 y Z^2 se seleccionan independientemente a partir del grupo constituido por $-O-$, $-S-$, $-NR^H-$ y un enlace sencillo, donde R^H se selecciona a partir del grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-4} , arilo y arilmetilo, y R^1 y R^2 se seleccionan independientemente a partir del grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-6} sustituido opcionalmente, alqueno C_{2-6} sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, heterociclilo sustituido opcionalmente, o

$-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$ forma un anillo heterocíclico donde $-Z^1-R^1-R^2-Z^2-$ es un birradical.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica líquida, acuosa para su uso como un medicamento.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica líquida, acuosa para la preparación de un medicamento para tratar un síndrome sensible al Factor VII.

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a un envase hermético que contiene la composición farmacéutica líquida, acuosa y, opcionalmente, un gas inerte.

Descripción detallada de la invención

Tal como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se centra en el desarrollo de una composición farmacéutica líquida, acuosa, estabilizada novedosa que comprende un polipéptido de tipo Factor VII. Más específicamente, una composición farmacéutica líquida, acuosa adaptada para la administración parenteral que comprende

al menos 0.01 mg/mL de un polipéptido de tipo Factor VII (i);

un agente tamponante (ii) adecuado para mantener el pH en el intervalo de 5.0 a 9.0; y

al menos un agente estabilizante (iii)

seleccionado a partir del grupo constituido por compuestos de benzamidina que comprenden un motivo $-C_6H_4-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$, donde C_6H_4 denota un anillo de benceno sustituido opcionalmente, y donde

Z^1 y Z^2 se seleccionan independientemente a partir del grupo constituido por $-O-$, $-S-$, $-NR^H-$ y un enlace sencillo, donde R^H se selecciona a partir del grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-4} , arilo y arilmetilo, y R^1 y R^2 se seleccionan independientemente a partir del grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-6} sustituido opcionalmente, alqueno C_{2-6} sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, heterociclilo sustituido opcionalmente, o

$-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$ forma un anillo heterocíclico donde $-Z^1-R^1-R^2-Z^2-$ es un birradical.

La expresión "alquilo C_{1-6} " se pretende que englobe residuos hidrocarbonados saturados cíclicos y acíclicos que tienen 1-6 átomos de carbono y que pueden ser lineales o ramificados. Algunos ejemplos concretos son metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, ciclopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *tert*-butilo, ciclopropilmetilo, *n*-pentilo, isopentilo, *n*-hexilo, etc. De manera similar, la expresión "alquilo C_{1-4} " engloba residuos hidrocarbonados saturados cíclicos y acíclicos que tienen 1-4 átomos de carbono y que pueden ser lineales o ramificados.

De manera similar, la expresión "alqueno C_{2-6} " se pretende que englobe residuos hidrocarbonados cíclicos y acíclicos que tienen 2-6 átomos de carbono y comprenden un enlace insaturado, que pueden ser lineales o ramificados. Algunos ejemplos de grupos alqueno C_{2-6} son vinilo, alilo, but-1-en-1-ilo, but-2-en-1-ilo, pent-1-en-1-ilo y hex-1-en-1-ilo.

La expresión "sustituido opcionalmente" en relación con grupos alquilo C_{1-6} y alqueno C_{2-6} se pretende que indique que el grupo en cuestión podrá estar sustituido una o varias veces, preferentemente 1-3 veces, con un grupo o grupos seleccionados a partir del grupo constituido por hidroxilo, alcoxi C_{1-6} (es decir, alquilo C_{1-6}), alqueno C_{2-6} , oxo (que forme una funcionalidad de tipo ceto o aldehído), arilo, arilo, arilcarbonilo, heterociclilo, heterociclilo, heterociclilcarbonilo, amino, mono- y di(alquilo C_{1-6})amino, halógeno, donde cualquier arilo y heterociclilo podrá estar sustituido tal como se describe específicamente posteriormente para dar lugar a un arilo y heterociclilo sustituidos opcionalmente.

El término “halógeno” incluye fluoro, cloro, bromo y yodo.

Cuando se utiliza en la presente, el término “arilo” se pretende que indique un anillo o sistema anular carbocíclico total o parcialmente aromático tal como fenilo, naftilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, antracilo, fenantracilo, pirenilo, benzopirenilo, fluorenilo y xantenilo, entre los cuales fenilo es un ejemplo preferido.

5 El término “heterociclilo” se pretende que indique un anillo o sistema anular carbocíclico saturado, parcialmente insaturado, parcialmente aromático o totalmente aromático, donde uno o más de los átomos de carbono han sido reemplazados por heteroátomos, p. ej., átomos de nitrógeno (=N o –NH), azufre (-S-) y/u oxígeno (-O). Algunos ejemplos de tales grupos heterociclilo son oxazolilo, oxazolinilo, oxazolidinilo, isoxazolilo, isoxazolinilo, isoxazolidinilo, oxadiazolilo, oxadiazolinilo, oxadiazolidinilo, tiazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, imidazolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, pirazolilo, piridinilo, pirazinilo, piridazinilo, piperidinilo, cumarilo, furilo, quinolilo, benzotiazolilo, benzotriazolilo, benzodiazolilo, benzoxazolilo, diazolilo, diazolinilo, diazolidinilo, triazolilo, triazolinilo, triazolidinilo, tetrazol, etc. Los grupos heterociclilo preferidos son grupos monocíclicos de 5, 6 o 7 miembros tales como isoxazolilo, isoxazolinilo, oxadiazolilo, oxadiazolinilo, pirrolilo, pirrolinilo, diazolilo, diazolinilo, triazolilo, triazolinilo, imidazolilo, imidazolinilo, etc.

15 El término “anillo heterocíclico” se pretende que se refiera a un anillo correspondiente a los definidos en “heterociclilo”.

En relación con los términos y la expresión “arilo”, “heterociclilo” y “anillo heterocíclico”, la expresión “sustituido opcionalmente” se pretende que indique que el grupo en cuestión podrá estar sustituido una o varias veces, preferentemente 1-3 veces, con un grupo o grupos seleccionados entre hidroxilo (el cual, cuando está presente en un sistema enólico podrá representarse en la forma del tautómero ceto), alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, fenilo, bencilo, alcoxi C₁₋₆, oxo (el cual podrá representarse en la forma del tautómero enólico), carboxi, alcocarbonilo C₁₋₆, alquilcarbonilo C₁₋₆, amino, mono- y di(alquilo C₁₋₆)amino, dihalógeno(alquilo C₁₋₄), trihalógeno(alquilo C₁₋₄) y halógeno. Los ejemplos más típicos de sustituyentes son hidroxilo, alquilo C₁₋₄, fenilo, bencilo, alcoxi C₁₋₄, oxo, amino, mono- y dimetilamino y halógeno.

25 Además del hecho de que R¹ y R² se pueden seleccionar independientemente a partir del grupo constituido por hidrógeno, alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente, alquenilo C₂₋₆ sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, heterociclilo sustituido opcionalmente, también es posible que una parte del motivo -C(=N-Z¹-R¹)-NH-Z²-R² pueda ser parte de un anillo heterocíclico mientras que la otra parte del motivo tenga el significado definido para Z¹, Z², R¹ y R², respectivamente. En algunas realizaciones interesantes, -C(=N-Z¹-R¹) podrá formar parte de un anillo heterocíclico seleccionado a partir del grupo constituido por un anillo de 1,2-diazol, un anillo de isoxazol, un anillo de 1,2,4-triazol y un anillo de 1,2,4-oxadiazol, o -C-NH-Z²-R² podrá formar parte de un anillo heterocíclico seleccionado a partir del grupo constituido por un anillo de 1,2-diazolina, un anillo de isoxazolina, un anillo de 1,2,4-triazolina y un anillo de 1,2,4-oxadiazolina. Tales anillos heterocíclicos podrán estar sustituidos tal como se ha descrito anteriormente.

35 En algunas realizaciones, al menos uno de R¹ y R² es hidrógeno, p. ej., ambos son hidrógeno. Además, en algunas realizaciones, que podrán combinarse con las realizaciones mencionadas anteriormente, al menos uno de Z¹ y Z² es un enlace sencillo, p. ej., ambos son un enlace sencillo. En las realizaciones especiales, R¹ y R² son ambos hidrógeno y Z¹ y Z² son ambos un enlace sencillo.

40 En algunas realizaciones, el agente estabilizante (iii) es al menos un compuesto de amidina seleccionado a partir del grupo constituido por benzamidinas que comprenden el motivo -C₆H₄-C(=N-Z¹-R¹)-NH-Z²-R², donde C₆H₄ denota un anillo de benceno sustituido opcionalmente, y de las cuales la benzamidina (R¹ y R² son hidrógeno y Z¹ y Z² son un enlace sencillo) constituye una realización particular (remítase a la Sección experimental).

45 En otras de sus realizaciones particulares, las benzamidinas comprenden el motivo >N-C₆H₄-C(=N-Z¹-R¹)-NH-Z²-R², donde C₆H₄ indica un anillo de benceno sustituido opcionalmente, es decir una *o*-aminobenzamidina, una *m*-aminobenzamidina o una *p*-aminobenzamidina, de las cuales una *p*-aminobenzamidina es la más preferida en la actualidad.

Aventis divulga más ejemplos ilustrativos de *p*-aminobenzamidinas en EP 1 162 194 A1, *cf.* en particular las definidas en las reivindicaciones 1-6 y en las secciones [0009]-[0052] y en EP 1 270 551 A1, *cf.* en particular las reivindicaciones 1 y 2 y las secciones [0010]-[0032].

50 Tal como se ha mencionado anteriormente, el motivo clave de los agentes estabilizantes es -C(=N-Z¹-R¹)-NH-Z²-R². Otras partes del agente estabilizante también podrán ser importantes, en particular en lo que se refiere a la optimización del efecto estabilizante y la tolerancia por parte del paciente.

El peso molecular del agente estabilizante es normalmente como máximo 1000 Da, por ejemplo, como máximo 500 Da.

Los compuestos de la presente invención podrán tener uno o más centros asimétricos y, a menos que se indique lo contrario, se pretende que los estereoisómeros (isómeros ópticos), como estereoisómeros separados, puros o parcialmente purificados o sus mezclas racémicas, estén incluidos en el alcance de la invención.

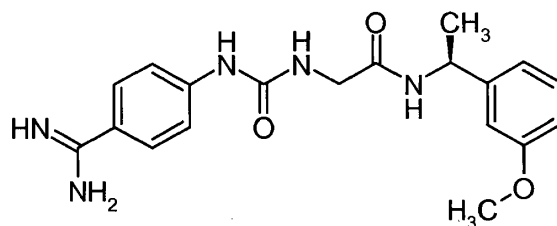
5 La concentración del agente (o agentes) estabilizante (iii) es de normalmente al menos 1 μM . La concentración deseable (o necesaria) depende normalmente del agente (o agentes) estabilizante seleccionado, más concretamente de la afinidad de unión del agente estabilizante seleccionado al polipéptido de tipo Factor VII.

10 En diferentes realizaciones, el agente estabilizante (iii) está presente con una concentración de al menos 5 μM , al menos 10 μM , al menos 20 μM , al menos 50 μM , al menos 100 μM , al menos 150 μM , al menos 250 μM , al menos 500 μM , al menos 1 mM, al menos 2 mM, al menos 4 mM, al menos 5 mM, al menos 8 mM, al menos 9 mM, al menos 10 mM, al menos 15 mM, al menos 20 mM, tal como, p. ej., comprendido en el intervalo de 1-10 000 μM , 10-10 000 μM , 20-10 000 μM , 50-10 000 μM , 10-5000 μM , 10-2000 μM , 20-5000 μM , 20-2000 μM , 50-5000 μM , 0.1-100 mM, 0.1-75 mM, 0.1-50 mM, 0.1-10 mM, 0.2-75 mM, 0.2-50 mM, 0.2-20 mM, 0.5-75 mM o 0.5-50 mM.

15 En una realización, el agente estabilizante (iii) es benzamidina y la concentración de dicho agente es de al menos 1 mM, tal como, p. ej., al menos 2 mM aunque se contempla que las benzamidinas sustituidas puedan ser más potentes y por esa razón se puedan añadir en concentraciones más bajas.

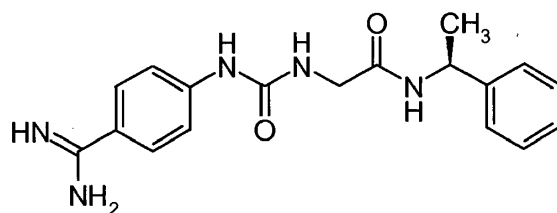
En otra realización, el agente estabilizante (iii) es *p*-aminobenzamidina y la concentración de dicho agente es de al menos 0.001 mM.

En otra realización, el agente estabilizante (iii) es S-2-[3-(4-carbamimidofenil)ureido]-N-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida con la fórmula



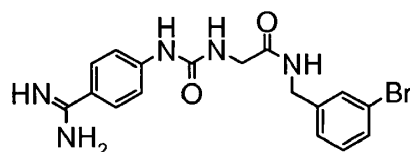
y la concentración de dicho agente es de al menos 0.001 mM.

En otra realización, el agente estabilizante (iii) es S-2-[3-(4-carbamimidofenil)ureido]-N-(1-feniletil)acetamida con la fórmula



y la concentración de dicho agente es de al menos 0.001 mM.

En otra realización, el agente estabilizante (iii) es N-(3-bromobencil)-2-[3-(4-carbamimidofenil)ureido]acetamida con la fórmula



y la concentración de dicho agente es de al menos 0.001 mM.

En varias realizaciones, la relación molar entre el agente estabilizante (iii) y el polipéptido de tipo FVII (agente (iii):FVII) es: superior a 0.1, superior a 0.5, superior a 1, superior a 2, superior a 5, superior a 10, superior a 25, superior a 100, superior a 250, superior a 1000, superior a 2500 o superior a 5000, tal como, p. ej., comprendida en el intervalo de 0.1-10 000, 0.1-5000, 0.1-2500, 0.1-1000, 0.1-250, 0.1-100, 0.1-25, 0.1-10, 0.5-10 000, 0.5-5000, 0.5-2500, 0.5-1000, 0.5-250, 0.5-100, 0.5-25, 0.5-10, 1-10 000, 1-5000, 1-2500, 1-1000, 1-250, 1-100; 1-25; 1-10, 10-

10 000, 10-5000, 10-250, 1000-10 000 o 1000-5000.

La concentración deseable depende normalmente del agente (o agentes) estabilizante seleccionado, más concretamente de la afinidad de unión del agente seleccionado al polipéptido de tipo Factor VII.

5 El efecto biológico de la composición farmacéutica se atribuye principalmente a la presencia del polipéptido de tipo Factor VII, aunque podrán incluirse otros principios activos combinados con el polipéptido de tipo Factor VII.

Tal y como se utiliza en la presente, la expresión "polipéptido de tipo Factor VII" engloba el Factor VII natural (es decir, un polipéptido que tenga la secuencia de aminoácidos divulgada en la patente de EE. UU. N.º 4 784 950), así como también otras variantes del Factor VII que muestren una actividad biológica sustancialmente idéntica o mejorada respecto al Factor VII natural. La expresión "Factor VII" se pretende que englobe los polipéptidos de tipo Factor VII en su forma no escindida (zimógeno), así como también aquellos que han sido procesados proteolíticamente para generar sus respectivas formas bioactivas, que se podrán denominar Factor VIIa. Normalmente, el Factor VII es escindido entre los residuos 152 y 153 para generar el Factor VIIa. La expresión "polipéptido de tipo Factor VII" también engloba los polipéptidos, incluidas las variantes, en los cuales la actividad biológica del Factor VIIa se ha modificado sustancialmente o se ha reducido en cierto grado respecto a la actividad del Factor VIIa natural. Estos polinucleótidos incluyen, sin carácter limitante, el Factor VII o Factor VIIa en los cuales se han introducido alteraciones en la secuencia de aminoácidos específicas que modifican o alteran la bioactividad del polipéptido.

La actividad biológica del Factor VIIa en la coagulación de la sangre se 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 el Factor IX o X activado (Factor IXa o Xa, respectivamente).

A efectos de la invención, la actividad biológica de los polipéptidos de tipo Factor VII ("actividad biológica del Factor VII") podrá cuantificarse midiendo la capacidad de una preparación para promover la coagulación de la sangre, *cf.* Ensayo 4 descrito en la presente. En este ensayo, se expresa la actividad biológica como la reducción en el tiempo de coagulación respecto a una muestra de control y se convierte en "unidades del Factor VII" por comparación con un patrón de suero humano combinado que contiene 1 unidad/mL de actividad del Factor VII. Como alternativa, se podrá cuantificar la actividad biológica del Factor VIIa (i) midiendo la capacidad del Factor VIIa o un polipéptido relacionado con el Factor VII para producir el Factor X activado (Factor Xa) en un sistema que comprende TF incluido en una membrana lipídica y Factor X (Persson *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:19919-19924, 1997); (ii) midiendo la hidrólisis del Factor X en un sistema acuoso ("Ensayo de proteólisis *in vitro*", remítase al Ensayo 2 más adelante); (iii) midiendo la unión física del Factor VIIa o un polipéptido relacionado con el Factor VII al TF utilizando un instrumento de resonancia de plasmones superficiales (Persson, *FEBS Letts.* 413:359-363, 1997); (iv) midiendo la hidrólisis de un sustrato sintético por parte del Factor VIIa y/o un polipéptido relacionado con el Factor VII ("Ensayo de hidrólisis *in vitro*", remítase al Ensayo 1 más adelante); o (v) midiendo la generación de trombina en un sistema *in vitro* independiente del TF (remítase al Ensayo 3 más adelante).

Las variantes del Factor VII que tienen una actividad biológica sustancialmente idéntica o mejorada respecto al Factor VIIa natural engloban aquellas que muestran al menos aproximadamente un 25%, tal como, p. ej., al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 75% o al menos aproximadamente un 90% de la actividad específica del Factor VIIa que ha sido producido en el mismo tipo celular, cuando se estudian en uno o más de: un ensayo de coagulación (Ensayo 4), ensayo de proteólisis (Ensayo 2) o ensayo de unión al TF tal como se describe anteriormente. Las variantes del Factor VII que tienen una actividad biológica sustancialmente reducida respecto al Factor VIIa natural son aquellas que muestran menos de aproximadamente un 25%, tal como, p. ej., menos de aproximadamente un 10% o menos de aproximadamente un 5% de la actividad específica del Factor VIIa natural que ha sido producido en el mismo tipo celular cuando se estudia en uno o más de: un ensayo de coagulación (Ensayo 4), ensayo de proteólisis (Ensayo 2) o un ensayo de unión al TF tal como se ha descrito anteriormente. Las variantes del Factor VII que presentan una actividad biológica sustancialmente modificada respecto al Factor VII natural incluyen, sin carácter limitante, las variantes del Factor VII que muestran actividad proteolítica sobre el Factor X independiente del TF y aquellas que se unen al TF pero que no escinden el Factor X.

Las variantes del Factor VII, que muestran una bioactividad sustancialmente idéntica o mejor que el Factor VII natural o, como alternativa, que muestran una bioactividad sustancialmente modificada o reducida respecto al Factor VII natural, incluyen, sin carácter limitante, polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia del Factor VII natural por la inserción, delección o sustitución de uno o más aminoácidos.

Los ejemplos de variantes del Factor VII que tienen sustancialmente la misma actividad biológica que el Factor VII natural incluyen S52A-FVIIa, S60A-FVIIa (Lino *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 352: 182-192, 1998); variantes de FVIIa que muestran una mayor estabilidad proteolítica tal como se divulga en la patente de EE. UU. N.º 5 580 560; Factor VIIa que ha sido escindido 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 de FVII tal como se divulgan en el documento PCT/DK02/00189; y

variantes de FVII que muestran una mayor estabilidad proteolítica tal como se divulga en el documento WO 02/38162 (Instituto de Investigación Scripps); variantes de FVII que tienen un dominio Gla modificado y que muestran un aumento en la unión a la membrana tal como se divulga en el documento WO 99/20767 (Universidad de Minnesota); y variantes de FVII tal como se divulgan en el documento WO 01/58935 (Maxygen ApS).

5 Los ejemplos de variantes del Factor VII que tienen una mayor actividad biológica en comparación con FVIIa natural incluyen variantes de FVII tal como las divulgadas en los documentos WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, WO 03/27147, WO 03/37932; WO 02/38162 (Instituto de Investigación Scripps); y variantes de FVIIa con mayor actividad tal como se divulga en el documento JP 2001061479 (Inst. Inv. Químico-Sero-Terapéutico).

10 Los ejemplos de variantes del Factor VII que tienen una actividad biológica sustancialmente reducida o modificada respecto al Factor VII natural incluyen R152E-FVIIa (Wildgoose *et al.*, *Biochem* 29:3413-3420, 1990).

Los ejemplos de polipéptidos de tipo Factor VII incluyen, sin carácter limitante, 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/V158D/E296V-FVII, S314E/L305V/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-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/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-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-FVII, 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/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A -FVII, K316Q/L305V/V158D/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/V158D/E296V-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q-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,

La expresión “agente tamponante” incluye aquellos agentes o combinaciones de agentes que mantienen el pH de la solución en un intervalo aceptable de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 9.0.

5 En una realización, el agente tamponante (ii) es al menos un componente seleccionado a partir de los grupos constituidos por 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, sodio o 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 sobreentender que el agente tamponante podrá comprender una mezcla de dos o más componentes, donde la mezcla es capaz de proporcionar un valor de pH en el intervalo especificado. A modo de ejemplo se puede mencionar el ácido acético y el acetato de sodio, etc.

10 La concentración del agente tamponante se escoge de manera que mantenga el pH preferido de la solución. En diversas realizaciones, la concentración del agente tamponante es 1-100 mM; 1-50 mM; 1-25 mM o 2-20 mM.

En una realización, el pH de la composición se mantiene entre 4.0 y 9.0; entre 5.0 y 9.0; entre 5.0 y 8.0; tal como entre 5.0 y 7.5; entre 5.0 y 7.0; entre 5.0 y 6.5; entre 5.0 y 6.0; entre 5.5 y 7.0; entre 5.5 y 6.5; entre 6.0 y 7.0; entre 6.0 y 6.5; entre 6.3 y 6.7 o entre aproximadamente 5.2 y 5.7.

15 Además de los tres componentes imprescindibles, la composición farmacéutica líquida, acuosa podrá comprender componentes adicionales beneficiosos para la preparación, formulación, estabilidad o administración de la composición.

20 Así pues, la composición farmacéutica también podrá incluir un surfactante no iónico. Los surfactantes (también conocidos como detergentes) incluyen por lo general aquellos agentes que protegen a la proteína de la agresión inducida por la interfase aire/solución y las agresiones inducidas por la solución/superficie (p. ej., que resultan en la agregación proteica).

Los tipos comunes de surfactantes no iónicos son polisorbatos, poloxámeros, éteres alquílicos de polioxietileno, copolímeros en bloque de polietileno/polipropileno, polietilenglicol (PEG), estearatos de polioxietileno y aceites de ricino polioxietilenado.

25 Los ejemplos ilustrativos de surfactantes no iónicos son Tween[®], polisorbato 20, polisorbato 80, Brij-35 (éter dodecílico de polioxietileno), poloxámero 188, poloxámero 407, PEG8000, polioles Pluronic[®], éter polioxi-23-laurílico, Myrj 49 y Cremophor A.

En una realización, el surfactante no iónico está presente en una cantidad de 0.005-2.0% en peso.

Asimismo, la composición podrá comprender además un agente modificador de la tonicidad (v).

30 Tal y como se utiliza en la presente, la expresión “agente modificador de la tonicidad” incluye agentes que contribuyen a la osmolalidad de la solución. El agente modificador de la tonicidad (v) incluye al menos un agente seleccionado a partir del grupo constituido por sales neutras, aminoácidos, péptidos de 2-5 residuos aminoácidos, monosacáridos, disacáridos, polisacáridos y alditoles. En algunas realizaciones, la composición comprende dos o más de tales agentes combinados.

35 Con la expresión “sal neutra” se hace referencia a una sal que no es ni un ácido ni una base cuando se disuelve en una solución acuosa.

40 En una realización, al menos un agente modificador de la tonicidad (v) es una sal neutra seleccionada a partir del grupo constituido por sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio y sales de magnesio, tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, acetato de calcio, gluconato de calcio, levulato de calcio, cloruro de magnesio, acetato de magnesio, gluconato de magnesio y levulato de magnesio.

En una realización adicional, el agente modificador de la tonicidad (v) incluye cloruro de sodio combinado con al menos un compuesto seleccionado a partir de los grupos constituidos por cloruro de calcio, acetato de calcio, cloruro de magnesio y acetato de magnesio.

45 En una realización adicional más, el agente modificador de la tonicidad (v) es al menos un compuesto seleccionado a partir del grupo constituido por cloruro de sodio, cloruro de calcio, sacarosa, glucosa y manitol.

En diferentes realizaciones, el agente modificador de la tonicidad (v) está presente con una concentración de al menos 1 mM, al menos 5 mM, al menos 10 mM, al menos 20 mM, al menos 50 mM, al menos 100 mM, al menos 200 mM, al menos 400 mM, al menos 800 mM, al menos 1000 mM, al menos 1200 mM, al menos 1500 mM, al menos 1800 mM, al menos 2000 mM o al menos 2200 mM.

50 En una serie de realizaciones, el agente modificador de la tonicidad (v) está presente con una concentración de 5-2200 mM, tal como 25-2200 mM, 50-2200 mM, 100-2200 mM, 200-2200 mM, 400-2200 mM, 600-2200 mM, 800-

2200 mM, 1000-2200 mM, 1200-2200 mM, 1400-2200 mM, 1600-2200 mM, 1800-2200 mM o 2000-2200 mM; 5-1800 mM, 25-1800 mM, 50-1800 mM, 100-1800 mM, 200-1800 mM, 400-1800 mM, 600-1800 mM, 800-1800 mM, 1000-1800 mM, 1200-1800 mM, 1400-1800 mM, 1600-1800 mM; 5-1500 mM, 25-1400 mM, 50-1500 mM, 100-1500 mM, 200-1500 mM, 400-1500 mM, 600-1500 mM, 800-1500 mM, 1000-1500 mM, 1200-1500 mM; 5-1200 mM, 25-1200 mM, 50-1200 mM, 100-1200 mM, 200-1200 mM, 400-1200 mM, 600-1200 mM u 800-1200 mM

En una realización de la invención, al menos un agente modificador de la tonicidad (v) es un agente modificador de la fuerza iónica (v/a).

Tal y como se utiliza en la presente, la expresión “agente modificador de la fuerza iónica” incluye agentes que contribuyen a la fuerza iónica de la solución. Los agentes incluyen, sin carácter limitante, sales neutras, aminoácidos, péptidos de 2-5 residuos aminoacídicos. En algunas realizaciones, la composición comprende dos o más de tales agentes combinados.

Algunos ejemplos no limitantes de agentes modificadores de la fuerza iónica (v/a) son sales neutras tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y cloruro de magnesio. En una realización, el agente (v/a) es cloruro de sodio.

La expresión “fuerza iónica” se refiere a la fuerza iónica de la solución (μ) que está definida por la ecuación: $\mu = \frac{1}{2} \sum ([i](Z_i^2))$, donde μ es la fuerza iónica, $[i]$ es la concentración milimolar de un ion y Z_i es la carga (+ o -) de ese ion (remítase a, p. ej., Solomon, *Journal of Chemical Education*, 78(12):1691-92, 2001; James Fritz y George Schenk: *Quantitative Analytical Chemistry*, 1979).

En diferentes realizaciones de la invención, la fuerza iónica de la composición es de al menos 50 mM, tal como de al menos 75 mM, al menos 100 mM, al menos 150 mM, al menos 200 mM, al menos 250 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.

En algunas realizaciones específicas, la concentración total del agente modificador de la tonicidad (v) y el agente modificador de la fuerza iónica (v/a) está comprendida en el intervalo de 1-1000 mM, tal como 1-500 mM, 1-300 mM, 10-200 mM o 20-150 mM; o tal como 100-1000 mM, 200-800 mM o 500-800 mM, dependiendo del efecto que otros ingredientes cualesquiera puedan tener en la tonicidad y fuerza iónica.

En una realización, la composición es isotónica; en otra es hipertónica.

El término “isotónico” significa “isotónico respecto al suero”, es decir, de aproximadamente 300 ± 50 miliosmol/kg. Se pretende que la tonicidad sea una medida de la osmolalidad de la solución antes de la administración. El término “hipertónico” se pretende que señale niveles de osmolalidad superiores al nivel fisiológico del suero, tal como niveles superiores a 300 ± 50 miliosmol/kg.

Asimismo, una realización particular de la presente invención se refiere a la combinación del agente estabilizante (iii) con una concentración bastante elevada de un agente modificador de la fuerza iónica (v/a). En una de sus realizaciones, el agente modificador de la fuerza iónica (v/a) se selecciona a partir del grupo constituido por sales de sodio, sales de calcio y sales de magnesio. En esta realización, el agente modificador de la fuerza iónica (v/a), es decir, la sal de sodio, sal de calcio y/o sal de magnesio, está presente con una concentración de 15-1500 mM, tal como 15-1000 mM, 25-1000 mM, 50-1000 mM, 100-1000 mM, 200-1000 mM, 300-1000 mM, 400-1000 mM, 500-1000 mM, 600-1000 mM, 700-1000 mM; 15-800 mM, 25-800 mM, 50-800 mM, 100-800 mM, 200-800 mM, 300-800 mM, 400-800 mM, 500-800 mM; 15-600 mM, 25-600 mM, 50-600 mM, 100-600 mM, 200-600 mM, 300-600 mM; 15-400 mM, 25-400 mM, 50-400 mM o 100-400 mM.

En esas realizaciones, la sal de sodio podrá ser cloruro de sodio, la sal de calcio se podrá seleccionar a partir del grupo constituido por cloruro de calcio, acetato de calcio, gluconato de calcio y levulato de calcio y la sal de magnesio se podrá seleccionar a partir del grupo constituido por cloruro de magnesio, acetato de magnesio, gluconato de magnesio, levulato de magnesio y sales magnésicas de ácidos fuertes. En una realización más específica, se utilizan una sal de calcio y/o una sal de magnesio combinadas con cloruro de sodio.

En una realización, la composición comprende uno o más agentes modificadores de la fuerza iónica seleccionados a partir del grupo constituido por sales de calcio (Ca^{2+}) y sales de magnesio (Mg^{2+}), p. ej., una o más sales seleccionadas a partir del grupo constituido por cloruro de calcio, acetato de calcio, gluconato de calcio, levulato de calcio, cloruro de magnesio, acetato de magnesio, sulfato de magnesio, gluconato de magnesio, levulato de magnesio y sales magnésicas de ácidos fuertes.

En una realización, el calcio (Ca^{2+}) y/o el magnesio (Mg^{2+}) están presentes con una concentración de al menos aproximadamente $0.1 \mu\text{M}$, tal como, p. ej., al menos aproximadamente $0.5 \mu\text{M}$, al menos aproximadamente $1 \mu\text{M}$, al menos aproximadamente $5 \mu\text{M}$, al menos aproximadamente $10 \mu\text{M}$, al menos aproximadamente $50 \mu\text{M}$, al menos aproximadamente $100 \mu\text{M}$, al menos aproximadamente 1mM , al menos aproximadamente 2mM , al menos

aproximadamente 5 mM o al menos aproximadamente 10 mM. En una realización particular, la composición comprende al menos Ca^{2+} 2 mM.

5 En varias realizaciones, la relación molar entre los iones de calcio (Ca^{2+}) y/o de magnesio (Mg^{2+}) y el polipéptido de tipo 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.

10 En una realización de la presente invención, la relación molar entre el calcio (Ca^{2+}) y/o magnesio (Mg^{2+}) no complejados y el polipéptido de tipo Factor VII es inferior a 0.5, p. ej., está comprendida 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 realización de la presente invención, la relación molar entre el calcio (Ca^{2+}) no complejado y el polipéptido de tipo Factor VII es inferior a 0.5, p. ej., está comprendida 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.

15 Cuando se utiliza en la presente, la expresión “la concentración de iones de calcio y/o magnesio no complejados” se pretende que se refiera a la diferencia entre la concentración total de iones de calcio y/o magnesio y la concentración de calcio y/o magnesio unidos a quelantes de calcio/magnesio. En este sentido, el polipéptido de tipo Factor VII no se considera un “quelante de calcio/magnesio” aunque se espera que el calcio y/o el magnesio se unan o se asocien con el polipéptido de tipo Factor VII en ciertas condiciones.

20 En otra realización, la relación molar de iones de calcio y/o magnesio no complejados al polipéptido de tipo Factor VII es superior a 0.5. En otra realización, la relación molar de iones de calcio no complejado al polipéptido de tipo Factor VII es superior a 0.5.

25 Con el fin de obtener una relación relativa baja entre los iones de calcio y/o magnesio (Ca^{2+}) y el polipéptido de tipo Factor VII, podrá ser necesario o deseable eliminar el exceso de iones de calcio y/o magnesio, p. ej., poniendo en contacto la composición con un material de intercambio iónico en condiciones adecuadas para eliminar Ca^{2+} y/o Mg^{2+} o añadiendo un quelante de calcio/magnesio con el fin de que se una a (compleje con) los iones de calcio y/o magnesio. Esto resulta particularmente relevante cuando la relación entre los iones de calcio y/o magnesio y el polipéptido de tipo Factor VII en una solución procedente de un paso del proceso anterior al paso de formulación supera el límite mencionado anteriormente. Los ejemplos de “quelantes de calcio/magnesio” incluyen EDTA, ácido cítrico, NTA, DTPA, ácido tartárico, ácido láctico, ácido málico, ácido succínico, HIMDA, ADA y compuestos similares.

30 En una realización adicional, la composición comprende además un antioxidante (vi). En diferentes realizaciones, se selecciona el antioxidante a partir del grupo constituido por L-metionina, D-metionina, análogos de metionina, péptidos que contienen metionina, homólogos de metionina, ácido ascórbico, cisteína, homocisteína, glutatión, cistina y cistationina. En una realización preferida, el antioxidante es L- metionina.

35 La concentración del antioxidante es normalmente de 0.1-5.0 mg/mL, tal como 0.1-4.0 mg/mL, 0.1-3.0 mg/mL, 0.1-2.0 mg/ml o 0.5-2.0 mg/mL.

En realizaciones particulares, la composición no incluye un antioxidante; en su lugar, se controla la susceptibilidad del polipéptido de tipo Factor VII a oxidarse eliminando el aire atmosférico. El uso de un antioxidante podrá, obviamente, también combinarse con la eliminación de aire atmosférico.

40 Por lo tanto, la presente invención también proporciona un envase hermético (p. ej., un vial o un cartucho (tal como un cartucho para un aplicador de bolígrafo)) que contiene una composición farmacéutica líquida, acuosa tal como se define en la presente y, opcionalmente, un gas inerte.

45 El gas inerte se podrá seleccionar a partir de los grupos constituidos por nitrógeno, argón, etc. El envase (p. ej., un vial o un cartucho) está hecho normalmente de vidrio o plástico, en particular vidrio, opcionalmente cerrado con un septum de caucho u otro medio de cierre que permite la penetración a la vez que se mantiene la integridad de la composición farmacéutica. En una realización particular de la presente, la composición no comprende un conservante (vii). En una realización adicional, el envase es un vial o cartucho contenido en una bolsa sellada, p. ej., una bolsa de plástico sellada tal como laminada (p. ej., bolsa de plástico laminada metálica (tal como de aluminio)).

Además de los componentes indispensables, el surfactante no iónico (iv), el agente modificador de la tonicidad (v) y el antioxidante opcional (vi), la composición farmacéutica podrá comprender además un conservante (vii).

50 Se podrá incluir un conservante en la composición para retrasar el crecimiento microbiano y, de esta manera, permitir un empaquetamiento “multiusos” de los polipéptidos de tipo Factor VII. Los ejemplos de conservantes incluyen fenol, alcohol bencílico, *orto*-cresol, *meta*-cresol, *para*-cresol, parabeno metílico, parabeno propílico, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. El conservante se incluye normalmente con una concentración de 0.1-20

mg/mL dependiendo del intervalo de pH y el tipo de conservante.

Es más, la composición también podrá incluir uno o más agentes capaces de inhibir la desamidación e isomerización.

En una realización, la composición farmacéutica líquida, acuosa comprende:

- 5 0.1-20 mg/mL de un polipéptido de tipo Factor VII (i);
 un agente tamponante (ii) adecuado para mantener el pH en el intervalo de 5.0 a 9.0;
 al menos un agente estabilizante (iii) que comprende el motivo $-C_6H_4-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$ con una
 concentración de al menos 5 μ M;
 un surfactante no iónico (iv); y
- 10 al menos un agente modificador de la tonicidad (v) con una concentración de al menos 5 mM.

Tal y como se utiliza en la presente, los valores de pH especificados como “aproximadamente” se sobreentiende que son ± 0.1 , p. ej., un pH de aproximadamente 8.0 incluye un pH de 8.0 ± 0.1 .

- 15 Los porcentajes son (peso/peso) tanto cuando se refieren a sólidos disueltos en una solución como a líquidos mezclados con soluciones. Por ejemplo, en el caso de Tween[®], es el peso de una solución madre al 100%/peso de la solución.

- 20 Las composiciones de acuerdo con la presente invención son útiles como composiciones estables y, preferentemente, listas para usar de polipéptidos de tipo Factor VII. Además, se cree que los principios, directrices y realizaciones específicas que se proporcionan en la presente son igualmente aplicables para el almacenamiento a granel de los polipéptidos de tipo Factor VII, *mutatis mutandis*. Las composiciones son normalmente estables durante al menos seis meses y, preferentemente, hasta 36 meses, cuando se almacenan a temperaturas comprendidas entre 2 °C y 8 °C. Las composiciones son química y/o físicamente estables, en particular químicamente estables, cuando se almacenan durante al menos 6 meses entre 2 °C y 8 °C.

- 25 El término “estable” se pretende que signifique que (i) después de un almacenamiento de 6 meses entre 2 °C y 8 °C la composición mantiene al menos un 50% de su actividad biológica inicial medida según un ensayo de coagulación de una etapa esencialmente tal como se describe en el Ensayo 4 de la presente memoria descriptiva, o (ii) después de un almacenamiento de 6 meses entre 2 °C y 8 °C, el incremento del contenido de productos de degradación de cadena pesada es como máximo de un 40% (p/p) del contenido inicial del polipéptido de tipo Factor VII.

La expresión “contenido inicial” se refiere a la cantidad de polipéptidos de tipo Factor VII añadidos a una composición al preparar la composición.

- 30 En una realización, la composición estable mantiene al menos un 70%, tal como, p. ej., al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de su actividad biológica inicial después de un almacenamiento de 6 meses entre 2 y 8 °C.

- 35 En diferentes realizaciones de la invención, la composición estable mantiene además al menos un 50% de su actividad biológica inicial medida según un ensayo de coagulación de una etapa esencialmente tal como se describe en el Ensayo 4 de la presente memoria descriptiva después de un almacenamiento de al menos 30 días, tal como de 60 días o 90 días.

- 40 En varias realizaciones, el incremento del contenido de productos de degradación de cadena pesada en las composiciones estables no es superior a aproximadamente un 30% (p/p), no es superior a aproximadamente un 25% (p/p), no es superior a aproximadamente un 20% (p/p), no es superior a aproximadamente un 15% (p/p), no es superior a aproximadamente un 10% (p/p), no es superior a aproximadamente un 5% (p/p), o no es superior a aproximadamente un 3% (p/p) del contenido inicial del polipéptido de tipo Factor VII.

- 45 A efectos de determinar el contenido de productos de degradación de cadena pesada, se realizó un experimento de HPLC con fase inversa en una columna de propiedad privada de sílice con grupos butilo unidos de 4.5x250 mm con un tamaño de partícula de 5 μ m y un tamaño de poro de 300 Å. Temperatura de la columna: 70 °C. Tampón-A: 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético. Tampón-B: 0.09% (v/v) de ácido trifluoroacético, 80% (v/v) de acetonitrilo. La columna se eluyó con un gradiente lineal desde X hasta (X+13)% de B en 30 minutos. Se ajustó X de manera que el FVIIa eluyera con un tiempo de retención de aproximadamente 26 minutos. Tasa de flujo: 1.0 mL/min. Detección: 214 nm. Carga: 25 μ g de FVIIa.

- 50 La expresión “estabilidad física” de los polipéptidos de tipo Factor VII se refiere a la formación de agregados insolubles y/o solubles en forma de formas dimericas, oligoméricas y poliméricas de los polipéptidos de tipo Factor

VII, así como también cualquier desnaturalización y deformación estructural de la molécula. Las composiciones estables físicamente engloban las composiciones que se mantienen transparentes visualmente. La estabilidad física de las composiciones se evalúa a menudo por medio de una inspección visual y turbidez después del almacenamiento de la composición a diferentes temperaturas durante diferentes periodos de tiempo. La inspección visual de la composición se lleva a cabo con una luz enfocada nítida con un fondo oscuro. Se clasifica una composición como físicamente inestable cuando muestra turbidez visual.

La expresión "estabilidad química" se pretende que se refiera a la formación de cualquier cambio químico en los polipéptidos de tipo Factor VII tras su almacenamiento en solución en condiciones aceleradas. Algunos ejemplos son la hidrólisis, desamidación y oxidación, así como también la degradación enzimática que conlleva la formación de fragmentos de los polipéptidos del Factor VII. En particular, los aminoácidos que contienen azufre tienen tendencia a oxidarse y a formar los correspondientes sulfóxidos.

La expresión "estable químicamente" se pretende que se refiera a una composición que mantiene al menos un 50% de su actividad biológica inicial tras su almacenamiento durante 6 meses entre 2 y 8 °C, medida según un ensayo de coagulación de una etapa (Ensayo 4).

En un aspecto adicional, la invención también proporciona un método para preparar una composición farmacéutica líquida, acusa de un polipéptido de tipo Factor VII, que comprende el paso de proporcionar el polipéptido de tipo Factor VII con una concentración de al menos 0.01 mg/mL (i) en una solución que comprende un agente tamponante (ii) adecuado para mantener el pH en el intervalo de 5.0 a 9.0; y al menos un agente estabilizante (iii) seleccionado a partir de un grupo constituido por compuestos de benzamidina que comprenden un motivo $C_6H_4-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$, donde

Z^1 y Z^2 se seleccionan independientemente a partir del grupo constituido por -O-, -S-, -NR^H- y un enlace sencillo, donde R^H se selecciona a partir del grupo constituido por hidrógeno, alquilo C₁₋₄, arilo y arilmetilo, y R¹ y R² se seleccionan independientemente a partir del grupo constituido por hidrógeno, alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente, alqueno C₂₋₆ sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, heterociclilo sustituido opcionalmente o

-C(=N-Z¹-R¹)-NH-Z²-R² forma un anillo heterocíclico donde -Z¹-R¹-R²-Z²- es un birradical.

Métodos de uso

Como se sobreentenderá, las composiciones farmacéuticas líquidas, acuosas definidas en la presente se pueden utilizar en el campo de la medicina. Por lo tanto, la presente invención en particular proporciona las composiciones farmacéuticas líquidas, acuosas definidas en la presente para su uso como un medicamento, más en concreto para su uso como un medicamento para tratar un síndrome sensible al Factor VII.

En consecuencia, la presente invención también proporciona el uso de la composición farmacéutica líquida, acuosa tal como se define en la presente para la preparación de un medicamento para tratar un síndrome sensible al Factor VII.

Las preparaciones de la presente invención se podrán utilizar para tratar cualquier síndrome sensible al Factor VII, tal como, p. ej., trastornos hemorrágicos, incluidos aquellos provocados por deficiencias del Factor coagulante (p. ej., hemofilia A, hemofilia B, deficiencia del Factor XI de coagulación, deficiencia del Factor VII de coagulación); por la trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand o por inhibidores del Factor de la coagulación, y hemorragia intracerebral, o hemorragia excesiva debida a cualquier causa. Las preparaciones también se podrán administrar a los pacientes combinadas con la cirugía u otro procedimiento traumático o a pacientes que reciben terapia anticoagulante.

La expresión "cantidad eficaz" es la dosis eficaz que determinará el facultativo cualificado, el cual podrá ajustar la dosificación para conseguir la respuesta deseada. Los factores que se han de tener en cuenta en relación con la dosis incluirán la potencia, biodisponibilidad, perfiles farmacocinético/farmacodinámico deseados, condición del tratamiento, factores relacionados con el paciente (p. ej., peso, salud, edad, etc.), presencia de medicamentos administrados conjuntamente (p. ej., anticoagulantes), momento de la administración u otros factores que el médico conoce.

El término "tratamiento" se define como la atención y el cuidado de un sujeto, p. ej., un mamífero, en particular un ser humano, con el objetivo de combatir la enfermedad, afección o trastorno e incluye la administración de un polipéptido de tipo Factor VII para prevenir el inicio de los síntomas o complicaciones, o para mejorar los síntomas o complicaciones, o para eliminar la enfermedad, afección o trastorno. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención que contienen un polipéptido de tipo Factor VII se podrán administrar por vía parenteral a un sujeto que necesite un tratamiento de este tipo. La administración parenteral se podrá realizar mediante una inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa por medio de una jeringuilla, opcionalmente una jeringuilla de tipo bolígrafo. Como alternativa, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión.

En realizaciones importantes, la composición farmacéutica está adaptada para la inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Sección experimental

Métodos generales

5 *Ensayos adecuados para determinar la actividad biológica de los polipéptidos de tipo Factor VII*

Los polipéptidos de tipo Factor VII útiles de acuerdo con la presente invención se podrán seleccionar mediante ensayos adecuados que se pueden realizar como simples pruebas *in vitro* preliminares. Por lo tanto, la presente memoria descriptiva divulga una simple prueba (titulada "Ensayo de hidrólisis *in vitro*") para determinar la actividad de los polipéptidos de tipo Factor VII.

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

Se podrán someter a ensayo el Factor VIIa nativo (natural) y el polipéptido de tipo Factor VII (ambos denominados en la presente en lo sucesivo "Factor VIIa") para determinar sus actividades específicas. También se podrán someter a ensayo en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se lleva a cabo en una placa de microvaloración (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). Se añade el sustrato cromogénico D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilida (S-2288, Chromogenix, Suecia), concentración final de 1 mM, al Factor VIIa (concentración final de 100 nM) en HEPES 50 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 0.1 M, CaCl₂ 5 mM y 1 mg/mL de albúmina de suero bovino. Se mide la absorbancia a 405 nm de manera continua en un lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EE. UU.). La absorbancia desarrollada durante una incubación de 20 minutos, después de restar la absorbancia de un pocillo blanco que no contenía enzima, se utiliza para calcular la relación entre las actividades del polipéptido de tipo Factor VII y el Factor VIIa natural:

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

En función de esto, se podrán identificar polipéptidos de tipo Factor VII con una actividad inferior, comparable o superior a la del Factor VIIa nativo, tal como, por ejemplo, los polipéptidos de tipo Factor VII donde la relación entre la actividad del polipéptido de tipo Factor VII y la actividad del Factor VII nativo (FVII natural) es de aproximadamente 1.0 frente a un valor superior a 1.0.

La actividad de los polipéptidos de tipo Factor VII también se podrá medir utilizando un sustrato fisiológico tal como el Factor X ("Ensayo de proteólisis *in vitro*"), de manera conveniente con una concentración de 100-1000 nM, donde el Factor Xa generado se mide después de añadir un sustrato cromogénico adecuado (p. ej., S-2765). Además, el ensayo de actividad se podrá llevar a cabo a temperatura fisiológica.

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

Se someten a ensayo el Factor VIIa nativo (natural) y el polipéptido de tipo Factor VII (ambos denominados en la presente en lo sucesivo "Factor VIIa") en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se lleva a cabo en una placa de microvaloración (MaxiSorp, Nuc, Dinamarca). Se incuban durante 15 min el Factor VIIa (10 nM) y el Factor X (0.8 microM) en 100 µL de HEPES 50 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 0.1 M, CaCl₂ 5 mM y 1 mg/mL de albúmina de suero bovino. A continuación, se detiene la escisión del Factor X mediante la adición de 50 µL de HEPES 50 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 0.1 M, EDTA 20 mM y 1 mg/mL de albúmina de suero bovino. Se mide la cantidad del Factor Xa generado mediante la adición del sustrato cromogénico Z-D-Arg-Gly-Arg-p-nitroanilida (S-2765, Chromogenix, Suecia), concentración final de 0.5 mM. Se mide la absorbancia a 405 nm de manera continua en un lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EE. UU.). La absorbancia desarrollada durante 10 minutos, después de restar la absorbancia de un pocillo blanco que no contenía FVIIa, se utiliza para calcular la relación entre las actividades proteolíticas del polipéptido de tipo Factor VII y el Factor VIIa natural:

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

En función de esto, se podrá identificar un polipéptido de tipo Factor VII con una actividad inferior, comparable o superior a la del Factor VIIa nativo, tal como, por ejemplo, los polipéptidos de tipo Factor VII donde la relación entre la actividad del polipéptido de tipo Factor VII y la actividad del Factor VII nativo (FVII natural) es de aproximadamente 1.0 frente a un valor superior a 1.0.

Ensayo de generación de trombina (Ensayo 3)

También se puede medir la capacidad del Factor VIIa o los polipéptidos de tipo Factor VII para generar trombina en un ensayo (Ensayo 3) que comprende todos los inhibidores y Factores de coagulación relevantes con concentraciones fisiológicas (menos el Factor VIII cuando se simulan las condiciones de la hemofilia A) y

trombocitos activados (tal como se describe en la pág. 543 en Monroe *et al.* (1997) *Brit. J. Haematol.* 99, 542-547).

Ensayo de coagulación de una etapa (Ensayo de coagulación) (Ensayo 4)

Los polipéptidos de tipo Factor VII también se podrán someter a ensayo para determinar las actividades específicas (“actividad de coagulación”) utilizando un ensayo de coagulación de una etapa (Ensayo 4). Con este objetivo, se diluye la muestra que se va a estudiar en tampón-PIPES 50 mM (pH 7.5), 0.1% de BSA y se incuban 40 µL con 40 µL de plasma deficiente en el Factor VII y 80 µL de factor tisular recombinante humano que contiene fosfolípidos sintéticos y Ca²⁺ 10 mM. Los tiempos de coagulación (tiempos de formación del coágulo) se miden y se comparan con una curva patrón utilizando un patrón de referencia en un ensayo paralelo en línea.

Preparación y purificación de polipéptidos de tipo Factor VII

El Factor VIIa purificado humano adecuado para su uso en la presente invención se genera preferentemente mediante tecnología de ADN recombinante, p. ej., tal como se describe en Hagen *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 83: 2412-2416, 1986 o como se describe en la patente europea N.º 0 200 421 (ZymoGenetics, Inc.).

El Factor VII también podrá producirse con 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 el Factor VII sin cantidades detectables de otros Factores de coagulación sanguíneos. Se podrá obtener una preparación del Factor VII incluso más purificado incluyendo una filtración en gel adicional como paso de purificación final. A continuación, se convierte el Factor VII en el Factor VIIa activado por medios conocidos, p. ej., mediante varias proteínas plasmáticas diferentes, tales como el Factor XIIa, IXa o Xa. Como alternativa, tal como describen Bjoern *et al.* (*Research Disclosure*, 269 septiembre de 1986, págs. 564-565), se podrá activar el Factor VII haciéndolo pasar a través de una columna cromatográfica de intercambio iónico, tal como Mono Q[®] (Pharmacia fine Chemicals) o por autoactivación en solución.

Se podrán producir polipéptidos relacionados con el Factor VII mediante la modificación del Factor VII natural o mediante la tecnología recombinante. Los polipéptidos relacionados con el Factor VII con una secuencia de aminoácidos alterada cuando se compara con el Factor VII natural se podrán producir modificando la secuencia de ácido nucleico que codifica el Factor VII natural, ya sea alterando los codones de aminoácidos o eliminando algunos de los codones de aminoácidos en el ácido nucleico que codifica el Factor VII natural por medios conocidos, p. ej., por mutagénesis de sitio específico.

Será evidente para los expertos en la técnica que se pueden realizar sustituciones fuera de las regiones cruciales para la función de la molécula del Factor VIIa y aun así se obtendrá un polipéptido activo. Los residuos aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido de tipo Factor VII y, por lo tanto, preferiblemente no sometidos a una sustitución, se podrán identificar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tal como la mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis con barrido de alanina (remítase a, p. ej., Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En la última técnica, se introducen mutaciones en cada residuo de la molécula cargado positivamente y se estudian las moléculas mutantes resultantes para determinar su actividad coagulante, respectivamente reticulante con el fin de identificar los residuos aminoácidos que son cruciales para la actividad de la molécula. También se pueden determinar los sitios de interacción sustrato-enzima mediante el análisis de la estructura tridimensional determinada por técnicas tales como el análisis por resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcaje de fotoafinidad (remítase a, p. ej., 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).

La introducción de una mutación en la secuencia de ácido nucleico para intercambiar un nucleótido por otro nucleótido se podrá lograr mediante la mutagénesis dirigida al sitio utilizando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Resulta particularmente útil el procedimiento que utiliza un vector de ADN bicatenario superenrollado con un inserto de interés y dos cebadores sintéticos que contienen la mutación deseada. Los cebadores oligonucleotídicos, cada uno complementario a hebras opuestas del vector, son alargados durante los ciclos de temperatura por medio de la ADN polimerasa Pfu. Al incorporar los cebadores, se genera un plásmido mutado que contiene roturas monocatenarias. Tras los ciclos de temperatura, el producto se trata con DpnI que es específico para ADN metilado y hemimetilado para digerir el molde de ADN original y para seleccionar el ADN sintetizado que contiene mutaciones. También se podrán utilizar otros procedimientos conocidos en la técnica para crear, identificar y aislar variantes tales como, por ejemplo, técnicas de reordenamiento de genes o de presentación en fagos.

La separación de los polipéptidos a partir de su célula de origen se podrá lograr mediante cualquier método conocido en la técnica que incluye, sin carácter limitante, la eliminación de medio de cultivo celular que contiene el producto deseado a partir de un cultivo de células adherentes; centrifugación o filtración para eliminar las células no adherentes.

Opcionalmente, los polipéptidos de tipo Factor VII se podrán purificar adicionalmente. La purificación se podrá lograr utilizando cualquier método conocido en la técnica que incluye, sin carácter limitante, la cromatografía de afinidad tal como, p. ej., en una columna con un anticuerpo anti-Factor VII (remítase a, p. ej., Wakabayashi *et al.*, *J. Biol. Chem.*

261:11097, 1986; y Thim *et al.*, *Biochem.* 27:7785, 1988); cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía de intercambio iónico; cromatografía de exclusión por tamaño; procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoque preparativo (IEF), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación con sulfato de amonio) o extracción. En general, remítase a Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, Nueva York, 1982; y *Protein Purification*, J.C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989. Tras la purificación, la preparación contiene preferentemente menos de un 10% en peso, más preferentemente menos de un 5% y de la manera más preferida menos de un 1% de polipéptidos que no son de tipo Factor VII derivados de la célula hospedadora.

Los polipéptidos de tipo Factor VII se podrán activar mediante escisión proteolítica utilizando el Factor XIIIa u otras proteasas que tienen especificidad de tipo tripsina tal como, p. ej., el Factor IXa, kalikreína, Factor Xa y trombina. Remítase a, p. ej., Osterud *et al.*, *Biochem.* 11:2853 (1972); Thomas, patente de EE. UU. N.º 4 456 591; y Hedner *et al.*, *J. Clin. Invest.* 71:1836 (1983). Como alternativa, se podrán activar los polipéptidos de tipo Factor VII haciéndolos pasar a través de una columna de cromatografía de intercambio iónico, tal como Mono Q[®] (Pharmacia), o por autoactivación en solución. El polipéptido de tipo Factor VII activado resultante se podrá formular a continuación y administrar tal como se describe en la presente solicitud.

Los siguientes ejemplos ilustran la puesta en práctica de la invención. Estos ejemplos se incluyen a efectos ilustrativos únicamente y no se pretende que limiten de ninguna manera el alcance de la invención reivindicada.

Ejemplos prácticos

En los siguientes ejemplos prácticos, se determina el contenido de productos de degradación de cadena pesada mediante RP-HPLC tal como se describe a continuación:

Se realizó un experimento de HPLC con fase inversa en una columna de propiedad privada de sílice con grupos butilo unidos de 4.5x250 mm con un tamaño de partícula de 5 µm y un tamaño de poro de 300 Å. Temperatura de la columna: 70 °C. Tampón-A: 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético. Tampón-B: 0.09% (v/v) de ácido trifluoroacético, 80% (v/v) de acetonitrilo. La columna se eluyó con un gradiente lineal desde X hasta (X+13)% de B en 30 minutos. Se ajustó X de manera que el FVIIa eluyera con un tiempo de retención de aproximadamente 26 minutos. Tasa de flujo: 1.0 mL/min. Detección: 214 nm. Carga: 25 µg de FVIIa.

En los siguientes ejemplos, se mide la actividad de coagulación utilizando un ensayo de coagulación de una etapa, esencialmente tal como se describe en el Ensayo 4 de la presente memoria descriptiva.

Ejemplo 1

Con el objetivo de estudiar el efecto de la benzamidina en la estabilidad del rFVIIa, se prepararon las siguientes formulaciones:

Formulación 1:

1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Acetato de sodio 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 Benzamidina 50 mM
 pH = 6.5

Formulación 2:

1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Acetato de sodio 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 Benzamidina 50 mM
 pH = 7.0

Formulación 3:

1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM

Acetato de sodio 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 pH = 6.5

5

Formulación 4:

1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Acetato de sodio 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 pH = 7.0

10

Se prepararon las formulaciones añadiendo histidina 10 mM, acetato de sodio 10 mM y benzamidina 50 mM (únicamente para las formulaciones 1 y 2) a una solución a granel de 1.0 mg/mL de rFVIIa que ya contenía glicilglicina, cloruro de sodio y cloruro de calcio con las concentraciones mencionadas anteriormente. El pH se ajustó al final a 6.5 y 7.0, respectivamente, con hidróxido de sodio 1 M y ácido clorhídrico 1 M.

15

Las formulaciones se almacenaron a una temperatura entre 5 °C y 30 °C y los análisis para determinar la formación de productos de degradación de cadena pesada se llevaron a cabo en los puntos temporales que se muestran en la tabla (Tabla 1).

20

Tabla 1: Formación de productos de degradación de cadena pesada (dcp) en las formulaciones con benzamidina

Formulación	% de dcp después de 0 meses	% de dcp después de 1/2 mes	% de dcp después de 1 mes		% de dcp después de 2 meses		% de dcp después de 3 meses	
			30 °C	5 °C	30 °C	5 °C	30 °C	5 °C
1 (pH 6.5)	7.5	9.5	11.6	7.5	14.6	7.7	17.5	8.1
2 (pH 7.0)	7.3	12.4	17.2	8.0	23.5	8.6	28.4	9.4
3 (pH 6.5)	8.1	-	17.7	16.3	22.7	-	-	30.2
4 (pH 7.0)	9.6	-	29.9	32.5	38.6	-	-	56.9
Formulación		% de dcp a los 6 meses				% de dcp a los 14 meses		
		30 °C		5 °C		5 °C		
1		20.4		8.9		10.5		
2		31.5		11.5		15.4		
3		25.7		42.1		-		
4		45.5		67.3		-		

Como se puede observar en la Tabla 1, después de 6 meses de almacenamiento a 5 °C, el incremento en el contenido de productos de degradación de cadena pesada en las formulaciones de referencia (3 y 4) fue de un 34.0% y un 57.7%, respectivamente, mientras que el incremento en el contenido de productos de degradación de cadena pesada en las composiciones ilustrativas (1 y 2) fue de tan solo un 1.4% y un 4.2%, respectivamente. Después de 14 meses de almacenamiento a 5 °C, el incremento en el contenido de productos de degradación de cadena pesada en las composiciones ilustrativas (1 y 2) fue de tan solo un 3.0% y un 8.1%, respectivamente.

25

El contenido de productos de degradación de cadena pesada se determinó por RP-HPLC tal como se describe a continuación:

30

Se realizó un experimento de HPLC con fase inversa en una columna de propiedad privada de sílice con grupos butilo unidos de 4.5x250 mm con un tamaño de partícula de 5 µm y un tamaño de poro de

300 Å. Temperatura de la columna: 70 °C. Tampón-A: 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético. Tampón-B: 0.09% (v/v) de ácido trifluoroacético, 80% (v/v) de acetonitrilo. La columna se eluyó con un gradiente lineal desde X hasta (X+13)% de B en 30 minutos. Se ajustó X de manera que el FVIIa eluyera con un tiempo de retención de aproximadamente 26 minutos. Tasa de flujo: 1.0 mL/min. Detección: 214 nm. Carga: 25 µg de FVIIa.

5 Ejemplo 2

Con el fin de estudiar el efecto de la arginina en la estabilidad del rFVIIa, se prepararon las siguientes soluciones:

Formulación 5:

10 1.0 mg/mL de rFVIIa
 HEPES 25 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 pH = 7.5

15 Formulación 6:

20 1.0 mg/mL de rFVIIa
 HEPES 25 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 Arginina 200 mM
 pH = 7.5

Formulación 7:

25 1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 20 mM
 Glicilglicina 20 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 30 pH = 7.0

Formulación 8:

35 1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 50 mM
 Glicilglicina 50 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 Arginina 200 mM
 40 pH = 7.0

Formulación 9:

45 1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 50 mM
 Glicilglicina 50 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 Arginina 400 mM
 pH = 7.0

50 Las formulaciones se prepararon añadiendo HEPES 25 mM (soluciones 5 y 6) y arginina (soluciones 6, 8 y 9) a una solución a granel de 1.0 mg/mL de rFVIIa que ya contenía glicilglicina, cloruro de sodio y cloruro de calcio en las concentraciones mencionadas anteriormente. El pH se ajustó al final con hidróxido de sodio 1 M y ácido clorhídrico 1 M.

Las formulaciones se almacenaron a una temperatura entre 5 °C y 30 °C y los análisis para determinar la formación de productos de degradación de cadena pesada se llevaron a cabo como en el Ejemplo 1 en los puntos temporales que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: formación de productos de degradación de cadena pesada (dcp) en formulaciones con arginina

Formulación	% de dcp después de 0 meses	% de dcp después de 1/2 meses		% de dcp después de 1 mes		% de dcp después de 2 meses		% de dcp después de 3 meses	
		30 °C	5 °C	30 °C	5 °C	30 °C	5 °C	30 °C	5 °C
5	17.3	28.7	32.0	35.5	42.7	42.1	57.0	44.4	64.3
6	13.6	19.5	21.2	25.5	29.8	30.9	41.9	34.0	49.0
7	9.4	-	n.a.	-	31.7	-	44.6	-	52.5
8	11.7*	-	17.3	-	23.0	-	31.1	-	37.7
9	11.5*	-	14.0	-	17.4	-	21.5	-	25.4

*analizado con t = 3 días, se espera un ligero incremento desde el día 0 hasta el día 3, n.a.: no analizado

5

Ejemplo 3

Se contempla una formulación de la siguiente composición farmacéutica líquida, acuosa:

A)

10	rhFVIIa	1 mg/mL (aprox. 50 000 UI/mL)
	PIPES	15.12 mg/mL (50 mM)
	Benzamidina	50 mM
	Poloxámero 188	0.5 mg/mL
	Cloruro de sodio	2.92 mg/mL (50 mM)
15	Cloruro de calcio 2H ₂ O	1.47 mg/mL (10 mM)
	Metionina	(0.5 mg/mL)
	NaOH 1 M/HCl 1 M	añadido hasta pH 6.5

B)

20	rhFVIIa	1 mg/mL (aprox. 50 000 UI/mL)
	PIPES	15.12 mg/mL (50 mM)
	p-Aminobenzamidina	10 mM
	Poloxámero 188	0.5 mg/mL
	Cloruro de sodio	2.92 mg/mL (50 mM)
	Cloruro de calcio 2H ₂ O	1.47 mg/mL (10 mM)
25	Metionina	(0.5 mg/mL)
	NaOH 1 M/HCl 1 M	añadido hasta pH 6.5

C)

30	rhFVIIa	1 mg/mL (aprox. 50 000 UI/mL)
	PIPES	15.12 mg/mL (50 mM)
	Arginina	50 mM
	Poloxámero 188	0.5 mg/mL
	Cloruro de sodio	2.92 mg/mL (50 mM)
	Cloruro de calcio 2H ₂ O	1.47 mg/mL (10 mM)
	NaOH 1 M/HCl 1 M	añadido hasta pH 6.5

D)

35	rhFVIIa	1 mg/mL (aprox. 50 000 UI/mL)
----	---------	-------------------------------

5	PIPES	15.12 mg/mL (50 mM)
	Arginina	100 mM
	Poloxámero 188	0.5 mg/mL
	Cloruro de sodio	2.92 mg/mL (50 mM)
	Cloruro de calcio 2H ₂ O	1.47 mg/mL (10 mM)
	NaOH 1 M/HCl 1 M	añadido hasta pH 6.5

10 Las composiciones farmacéuticas A-D se pueden transferir posteriormente a viales o cartuchos estériles purgados con nitrógeno o argón y, a continuación, se puede empaquetar en bolsas de plástico laminadas de aluminio herméticas.

Ejemplo 4

Con el fin de estudiar el efecto de la benzamidina en la estabilidad del rFVIIa, se prepararon las siguientes formulaciones:

Formulación 1:

15 1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 20 pH = 6.5

Formulación 2:

25 1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 Benzamidina 50 mM
 pH = 6.5

Formulación 3:

30 1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 35 pH = 7.5

Formulación 4:

40 1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 Benzamidina 50 mM
 pH = 7.5

45 Se prepararon las formulaciones añadiendo histidina 10 mM y benzamidina 50 mM (únicamente para las formulaciones 2 y 4) a una solución a granel de 1.0 mg/mL de rFVIIa que ya contenía glicilglicina, cloruro de sodio y cloruro de calcio con las concentraciones mencionadas anteriormente. El pH se ajustó al final a 6.5 y 7.0, respectivamente, con hidróxido de sodio 1 M y ácido clorhídrico 1 M.

Las formulaciones se almacenaron a una temperatura de 5 °C y los análisis para determinar la actividad de coagulación se realizaron en los puntos temporales que se muestran en la Tabla 1:

50

Tabla 1: Actividad de coagulación (UI/mL)

Formulación	Tiempo de almacenamiento a 5 °C (meses)			
	0	3	7	10
1	46 200	31 000	< 1000	No analizado
2	43 300	43 800	44 400	43 200
3	42 800	14 900	9700	No analizado
4	44 700	40 000	40 600	39 300

Ejemplo 5

5 Con el fin de estudiar el efecto de diferentes estabilizantes en la estabilidad del rFVIIa, se prepararon las siguientes formulaciones:

Formulación 1:

10 1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 pH = 6.5

Formulación 2:

15 1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 20 *p*-Aminobenzamidina 5 mM
 pH = 6.5

Formulación 3:

25 1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 S-2-[3-(4-Carbamimidoilfenil)ureido]-N-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida 0.5 mM
 pH = 6.5

Formulación 4:

30 1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 35 pH = 7.5

Formulación 5:

40 1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM

Cloruro de calcio 10 mM
p-Aminobenzamidina 5 mM
 pH = 7.5

Formulación 6:

- 5 1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 10 S-2-[3-(4-Carbamimidoilfenil)ureido]-*N*-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida 0.5 mM
 pH = 7.5

15 Se prepararon las formulaciones añadiendo histidina 10 mM, *p*-aminobenzamidina 5 mM (para las formulaciones 2 y 5) y S-2-[3-(4-carbamimidoilfenil)ureido]-*N*-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida 0.5 mM (para las formulaciones 3 y 6) a una solución a granel de 1.0 mg/mL de rFVIIa que ya contenía glicilglicina, cloruro de sodio y cloruro de calcio con las concentraciones mencionadas anteriormente. El pH se ajustó al final a 6.5 y 7.5, respectivamente, con hidróxido de sodio 1 M y ácido clorhídrico 1 M.

Las formulaciones se almacenaron a una temperatura de 5 °C y los análisis para determinar la actividad de coagulación (Tabla 1) y la degradación de cadena pesada (Tabla 2) se realizaron en los puntos temporales que se muestran en las tablas:

20

Tabla 1: Actividad de coagulación (UI/mL)

Formulación	Tiempo de almacenamiento a 5 °C (meses)			
	0	3	6	9
1	42 400	29 300	23 500	20 600
2	40 700	46 700	39 500	41 200
3	43 400	42 400	39 700	44 200
4	38.900	16 200	9800	No analizado
5	44 900	42 500	37 800	35 900
6	39 800	41 200	45 700	43 100

Tabla 2: Contenido de degradación de cadena pesada (%)

Formulación	Tiempo de almacenamiento a 5 °C (meses)			
	0	1	3	6
1	12.9	23.6	38,0	51.1
2	12.1	12.5	13.4	15.2
3	12.1	11.5	10.9	12.0
4	16.9	54.0	71.5	76.7
5	12.7	16.7	22.0	29.1
6	11.9	11.3	11.3	11.7

Ejemplo 6

25 Con el fin de estudiar el efecto de la benzamidina y *N*-(3-bromobencil)-2-[3-(4-carbamimidoilfenil)ureido]acetamida·HCl en la estabilidad del rFVIIa, se prepararon las siguientes formulaciones:

Formulación 1:

5 1.0 mg/mL de rFVIIa
Histidina 10 mM
Glicilglicina 10 mM
Cloruro de sodio 50 mM
Cloruro de calcio 10 mM
pH = 6.5

Formulación 2:

10 1.0 mg/mL de rFVIIa
Histidina 10 mM
Glicilglicina 10 mM
Cloruro de sodio 50 mM
Cloruro de calcio 10 mM
Benzamidina 50 mM
15 pH = 6.5

Formulación 3:

20 1.0 mg/mL de rFVIIa
Histidina 10 mM
Glicilglicina 10 mM
Cloruro de sodio 50 mM
Cloruro de calcio 10 mM
N-(3-Bromobencil)-2-[3-(4-carbamimidoilfenil)ureido]acetamida·HCl 50 µM
pH = 6.5

Formulación 4:

25 1.0 mg/mL de rFVIIa
Histidina 10 mM
Glicilglicina 10 mM
Cloruro de sodio 50 mM
Cloruro de calcio 10 mM
30 *N*-(3-Bromobencil)-2-[3-(4-carbamimidoilfenil)ureido]acetamida·HCl 500 µM
pH = 6.5

Formulación 5:

35 1.0 mg/mL de rFVIIa
Histidina 10 mM
Glicilglicina 10 mM
Cloruro de sodio 50 mM
Cloruro de calcio 10 mM
pH = 7.5

Formulación 6:

40 1.0 mg/mL de rFVIIa
Histidina 10 mM
Glicilglicina 10 mM
Cloruro de sodio 50 mM
Cloruro de calcio 10 mM
45 Benzamidina 50 mM
pH = 7.5

Formulación 7:

50 1.0 mg/mL de rFVIIa
Histidina 10 mM
Glicilglicina 10 mM

Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
N-(3-Bromobencil)-2-[3-(4-carbamimidoilfenil)ureido]acetamida·HCl 50 µM
 pH = 7.5

5 Formulación 8:

1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
N-(3-Bromobencil)-2-[3-(4-carbamimidoilfenil)ureido]acetamida·HCl 500 µM
 pH = 7.5

15 Se prepararon las formulaciones añadiendo histidina 10 mM, benzamidina 50 mM (para las formulaciones 2 y 6) y *N*-(3-bromobencil)-2-[3-(4-carbamimidoilfenil)ureido]acetamida·HCl 50/500 µM (para las formulaciones 3, 4 y 7, 8) a una solución a granel de 1.0 mg/mL de rFVIIa que ya contenía glicilglicina, cloruro de sodio y cloruro de calcio con las concentraciones mencionadas anteriormente. El pH se ajustó al final a 6.5 y 7.5, respectivamente, con hidróxido de sodio 1 M y ácido clorhídrico 1 M.

20 Las formulaciones se almacenaron a una temperatura de 5 °C y 30 °C y los análisis para determinar la actividad de coagulación se realizaron en los puntos temporales que se muestran en la tabla 1:

Tabla 1: Actividad de coagulación (UI/mL)

Formulación	Tiempo de almacenamiento a 5 °C (meses)				
	0	3	7	10	12
1	46 200	31 000	< 1000	No analizado	No analizado
2	43 300	43 800	44 400	43 200	45 000
3	44 300	36 700	33 700	*	31 200
4	46 000	37 800	35 600	*	36 000
5	42 800	14 900	9700	No analizado	No analizado
6	44 700	40 000	40 600	39 300	40 500
7	44 100	35 800	32 700	29 200	*
8	43 300	40 800	39 400	*	36 600

*: resultado no fiable, no se presenta

Formulación	Tiempo de almacenamiento a 30 °C (meses)		
	0	1	2
1	46 200	26 200	16 900
2	43 300	38 100	31 000
3	44 300	25 800	17 500
4	46 000	22 000	14 900
5	42 800	17 200	10 500
6	44 700	28 800	19 000

7	44 100	17 900	13 400
8	43 300	23 900	17 100

Ejemplo 7

Con el fin de estudiar el efecto de diferentes estabilizantes en la estabilidad del rFVIIa, se prepararon las siguientes formulaciones:

5 Formulación 1:

1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 pH = 6.5

Formulación 2:

1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
p-Aminobenzamida 5 mM
 pH = 6.5

20 Formulación 3:

1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 S-2-[3-(4-Carbamimidofenil)ureido]-N-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida 0.05 mM
 pH = 6.5

Formulación 4:

1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 S-2-[3-(4-Carbamimidofenil)ureido]-N-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida 0.5 mM
 pH = 6.5

Formulación 5:

1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 pH = 7.5

Formulación 6:

1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM

Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
p-Aminobenzamidina 5 mM
 pH = 7.5

5 Formulación 7:

10 1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 S-2-[3-(4-Carbamimidoilfenil)ureido]-*N*-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida 0.05 mM
 pH = 7.5

Formulación 8:

15 1.0 mg/mL de rFVIIa
 Histidina 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 20 S-2-[3-(4-Carbamimidoilfenil)ureido]-*N*-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida 0.5 mM
 pH = 7.5

25 Se prepararon las formulaciones añadiendo histidina 10 mM, *p*-aminobenzamidina 5 mM (para las formulaciones 2 y 6) y S-2-[3-(4-carbamimidoilfenil)ureido]-*N*-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida 0.05/0.5 mM (para las formulaciones 3, 7 y 4, 8) a una solución a granel de 1.0 mg/mL de rFVIIa que ya contenía glicilglicina, cloruro de sodio y cloruro de calcio con las concentraciones mencionadas anteriormente. El pH se ajustó al final a 6.5 y 7.5, respectivamente, con hidróxido de sodio 1 M y ácido clorhídrico 1 M.

Las formulaciones se almacenaron a una temperatura de 5 °C y los análisis para determinar la actividad de coagulación (tabla 1) y degradación de cadena pesada (tabla 2) se realizaron en los puntos temporales que se muestran en las tablas:

30

Tabla 1: Actividad de coagulación (UI/mL)

Formulación	Tiempo de almacenamiento a 5 °C (meses)			
	0	3	6	9
1	42 400	29 300	23 500	20 600
2	40 700	46 700	39 500	41 200
3	39.600	40 800	40 200	40 100
4	43 400	42 400	39 700	44 200
5	38 900	16 200	9800	No analizado
6	44 900	42 500	37 800	35 900
7	39 100	39 100	40 200	38 900
8	39 800	41 200	45 700	43 100
Formulación	Tiempo de almacenamiento a 30 °C (meses)			
	0	2	3	
1	42 400	15 000	8700	
2	40 700	21 600	15 400	

3	39.600	19 100	12 000
4	43 400	29 700	25 400
5	38.900	11 000	6300
6	44 900	18 300	11 100
7	39 100	21 600	15 100
8	39 800	34 800	27 300

Tabla 2: Contenido de degradación de cadena pesada (%)

Formulación	Tiempo de almacenamiento a 5 °C (meses)			
	0	1	3	6
1	12.9	23.6	38,0	51.1
2	12.1	12.5	13.4	15.2
3	12.2	13.0	15.0	18.5
4	12.1	11.5	10.9	12.0
5	16.9	54.0	71.5	76.7
6	12.7	16.7	22.0	29.1
7	12.4	13.3	13.8	17.2
8	11.9	11.3	11.3	11.7
Formulación	Tiempo de almacenamiento a 30 °C (meses)			
	0	1	2	3
1	12.9	23.3	26.3	29.0
2	12.1	20.2	23.2	26.7
3	12.2	20.3	23.8	25.9
4	12.1	14.8	16.4	18.6
5	16.9	41.1	47.7	49.2
6	12.7	34.8	41.5	46.3
7	12.4	32.3	39.1	43.4
8	11.9	14.5	16.3	18.1

Ejemplo 8

- 5 Con el fin de estudiar el efecto de S-2-[3-(4-carbamimidofenil)ureido]-N-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida en la estabilidad de rFVIIa, se prepararon las siguientes formulaciones:

Formulación 1:

- 10 1.0 mg/mL de rFVIIa
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 Glicilicina 10 mM

Histidina 20 mM
 0.5 mg/mL de Metionina
 S-2-[3-(4-carbamimidoilfenil)ureido]-N-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida 5 mM, pH = 6.0

Formulación 2:

5 1.0 mg/mL de rFVIIa
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 10 Histidina 20 mM
 0.5 mg/mL de Metionina
 S-2-[3-(4-carbamimidoilfenil)ureido]-N-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida 5 mM, pH = 6.5

Formulación 3:

15 1.0 mg/mL de rFVIIa
 Cloruro de sodio 50 mM
 Cloruro de calcio 10 mM
 Glicilglicina 10 mM
 Histidina 20 mM
 0.5 mg/mL de Metionina
 S-2-[3-(4-carbamimidoilfenil)ureido]-N-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida 5 mM, pH = 7.5

20 Se prepararon las formulaciones añadiendo histidina 20 mM, S-2-[3-(4-carbamimidoilfenil)ureido]-N-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida 5 mM y 0.5 mg/mL de metionina a una solución de rFVIIa que ya contenía glicilglicina, cloruro de sodio y cloruro de calcio con las concentraciones mencionadas anteriormente. El pH se ajustó al final a 6.0, 6.5 y 7.5, respectivamente, con ácido clorhídrico/hidróxido de sodio 1 M.

25 Las formulaciones se almacenaron a una temperatura de 25 °C y los análisis para determinar la actividad de coagulación (tabla 1) y degradación de cadena pesada (tabla 2) se realizaron en los puntos temporales que se muestran en las tablas:

Tabla 1: Actividad de coagulación (UI/mL)

Formulación	Tiempo de almacenamiento a 5 °C (meses)			Tiempo de almacenamiento a 25 °C (meses)
	0	3	6	3
1	38 400	45 500	41 700	38 500
2	39 800	41 200	37 800	42 400
3	42 400	43 000	39 500	39 900

30 Las formulaciones de referencia sin S-2-[3-(4-carbamimidoilfenil)ureido]-N-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida muestran la siguiente actividad de coagulación.

Tabla 2. Actividad de coagulación (UI/mL) de las soluciones de referencia

Formulación de referencia	Tiempo de almacenamiento a 5 °C (meses)			Tiempo de almacenamiento a 25 °C (meses)
	0	1	3	3
1	38 400*	44 400	21 300	4400
2	39 800*	40 100	15 400	2500
3	42 400*	26 400	7700	< 1000

*: No se dispone de los resultados para tiempo cero de las soluciones de referencia, por esta razón, se han incluido los valores correspondientes de las soluciones que contienen la sustancia inhibidora.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica líquida, acuosa adaptada para la administración parenteral que comprende al menos 0.01 mg/mL de un polipéptido de tipo Factor VII (i);
un agente tamponante (ii) adecuado para mantener el pH en el intervalo de 5.0 a 9.0; y
5 al menos un agente estabilizante (iii)
seleccionado a partir del grupo constituido por compuestos de benzamidina que comprenden un motivo $-C_6H_4-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$, donde C_6H_4 denota un anillo de benceno sustituido opcionalmente, y donde
10 Z^1 y Z^2 se seleccionan independientemente a partir del grupo constituido por $-O-$, $-S-$, $-NR^H-$ y un enlace sencillo, donde R^H se selecciona a partir del grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-4} , arilo y arilmetilo, y R^1 y R^2 se seleccionan independientemente a partir del grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-6} sustituido opcionalmente, alquenilo C_{2-6} sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, heterociclilo sustituido opcionalmente, o
 $-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$ forma un anillo heterocíclico donde $-Z^1-R^1-R^2-Z^2-$ es un birradical.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde al menos uno de R^1 y R^2 es hidrógeno.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde al menos uno de Z^1 y Z^2 es un enlace sencillo.
- 15 4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde R^1 y R^2 son ambos hidrógeno y Z^1 y Z^2 son ambos un enlace sencillo.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde las benzamidinas comprenden el motivo $>N-C_6H_4-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$, donde C_6H_4 denota un anillo de benceno sustituido opcionalmente.
- 20 6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el peso molecular del agente estabilizante es como máximo 1000 Da.
7. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la concentración del agente estabilizante (iii) es de al menos $1 \mu M$.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, donde el agente estabilizante (iii) es benzamidina y la concentración de dicho agente es de al menos 1 mM o al menos 2 mM; o el agente estabilizante (iii) es *p*-aminobenzamidina y la concentración de dicho agente es de al menos 0.001 mM; o el agente estabilizante (iii) es *S*-2-[3-(4-carbamimidoilfenil)ureido]-*N*-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida y la concentración de dicho agente es de al menos 0.001 mM; o el agente estabilizante (iii) es *S*-2-[3-(4-carbamimidoilfenil)ureido]-*N*-[1-feniletil]acetamida y la concentración de dicho agente es de al menos 0.001 mM; o el agente estabilizante (iii) es *N*-(3-bromobencil)-2-[3-(4-carbamimidoilfenil)ureido]acetamida y la concentración de dicho agente es de al menos 0.001 mM.
- 25 9. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polipéptido de tipo Factor VII es el Factor VIIa humano.
10. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el polipéptido de tipo Factor VII es una variante de la secuencia del Factor VII.
11. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, donde la relación entre la actividad del polipéptido de tipo Factor VII y la actividad del Factor VIIa humano nativo (FVIIa natural) es de al menos 1.25 cuando se estudia en el "Ensayo de proteólisis *in vitro*" (Ensayo 2) tal como se describe en la presente.
12. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polipéptido de tipo Factor VII está presente con una concentración de 0.01-20 mg/mL.
13. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, la cual tiene un valor de pH en el intervalo de 4.0 a 8.0.
- 40 14. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el agente tamponante (ii) comprende al menos un componente seleccionado a partir del grupo constituido por ácidos y sales de MES, PIPES, ACES, BES, TES, HEPES, TRIS, histidina, imidazol, glicina, glicilglicina, glicinamida, ácido fosfórico, ácido acético, ácido láctico, ácido glutárico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico, ácido maleico y ácido succínico.
- 45 15. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, donde la concentración del agente tamponante (ii) es 1-100 mM.

16. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende un surfactante no iónico (iv).
17. La composición de acuerdo con la reivindicación 16, donde el surfactante no iónico (iv) es al menos un compuesto seleccionado a partir del grupo constituido por polisorbatos, poloxámeros, éteres alquílicos de polioxietileno, copolímeros en bloque de etileno/polipropileno y polietilenglicol (PEG).
18. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16-17, donde la concentración del surfactante no iónico (iv) es un 0.005-2% en peso.
19. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende un agente modificador de la tonicidad (v).
20. La composición de acuerdo con la reivindicación 19, donde el agente modificador de la tonicidad (v) es al menos un compuesto seleccionado a partir del grupo constituido por sales neutras, aminoácidos, péptidos de 2-5 residuos aminoácidos, monosacáridos, disacáridos, polisacáridos y alditoles.
21. La composición de acuerdo con la reivindicación 20, donde al menos un agente modificador de la tonicidad (v) es una sal neutra seleccionada a partir del grupo constituido por sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio y sales de magnesio.
22. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20-21, donde el agente modificador de la tonicidad (v) es cloruro de sodio combinado con al menos un compuesto seleccionado a partir del grupo constituido por cloruro de calcio, acetato de calcio, cloruro de magnesio y acetato de magnesio.
23. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el agente modificador de la tonicidad (v) está presente con una concentración de al menos 1 mM.
24. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde al menos un agente modificador de la tonicidad (v) es un agente modificador de la fuerza iónica (v/a).
25. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene una fuerza iónica de al menos 50 mM.
26. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene una osmolalidad de 300 ± 50 miliosmol/kg.
27. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un antioxidante (vi).
28. La composición de acuerdo con la reivindicación 27, donde el antioxidante (vi) se selecciona entre L-metionina, D-metionina, análogos de metionina, péptidos que contienen metionina, homólogos de metionina, ácido ascórbico, cisteína, homocisteína, glutatión y cistationina.
29. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27-28, donde el antioxidante (vi) está presente con una concentración de 0.1-5.0 mg/mL.
30. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende un conservante (vii).
31. La composición de acuerdo con la reivindicación 30, donde el conservante (vii) se selecciona a partir del grupo constituido por fenol, alcohol bencílico, *orto*-cresol, *meta*-cresol, *para*-cresol, parabeno metílico, parabeno propílico, cloruro de benzalconio y cloruro de benzaetionio.
32. La composición farmacéutica líquida, acuosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, la cual comprende:
- 0.1-20 mg/mL de un polipéptido de tipo Factor VII (i);
 - un agente tamponante (ii) adecuado para mantener el pH en el intervalo de 5.0 a 9.0;
 - al menos un agente estabilizante (iii) que comprende el motivo $>N-C_6H_4-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$, donde C_6H_4 denota un anillo de benceno sustituido opcionalmente con una concentración de al menos 5 μ M;
 - un surfactante no iónico (iv); y
 - al menos un agente modificador de la tonicidad (v) con una concentración de al menos 5 mM.

33. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está adaptada para la inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa.
34. Un método para preparar una composición farmacéutica líquida, acusa de un polipéptido de tipo Factor VII adaptada para la administración parenteral, que comprende el paso de proporcionar el polipéptido de tipo Factor VII (i) con una concentración de al menos 0.01 mg/mL en una solución que comprende
- 5 un agente tamponante (ii) adecuado para mantener el pH en el intervalo de 5.0 a 9.0; y al menos un agente estabilizante (iii)
- seleccionado a partir del grupo constituido por compuestos de benzamidina que comprenden un motivo $-C_6H_4-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$, donde C_6H_4 denota un anillo de benceno sustituido opcionalmente, y donde
- 10 Z^1 y Z^2 se seleccionan independientemente a partir del grupo constituido por $-O-$, $-S-$, $-NR^H-$ y un enlace sencillo, donde R^H se selecciona a partir del grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-4} , arilo y arilmetilo, y R^1 y R^2 se seleccionan independientemente a partir del grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-6} sustituido opcionalmente, alquenilo C_{2-6} sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, heterocicilo sustituido opcionalmente, o
- $-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$ forma un anillo heterocíclico donde $-Z^1-R^1-R^2-Z^2-$ es un birradical.
- 15 35. Una composición farmacéutica líquida, acuosa tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-33 para su uso como un medicamento.
36. Una composición farmacéutica líquida, acuosa tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-33 para su uso en el tratamiento de un síndrome sensible al Factor VII.
- 20 37. Un envase hermético que contiene una composición farmacéutica líquida, acuosa tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-33 y, opcionalmente, un gas inerte.
38. El envase de acuerdo con la reivindicación 37, donde la composición no comprende un antioxidante (vii).