(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 653 555**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/48	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)
A61K 47/02	(2006.01)
A61K 47/18	(2007.01)
A61K 47/20	(2006.01)
A61K 47/08	(2006.01)
A61K 38/36	(2006.01)
A61K 47/34	(2007.01)
A61K 47/10	(2007.01)
A61K 47/26	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2003** **E 10181033 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017** **EP 2283856**

(54) Título: **Composiciones sólidas estabilizadas de polipéptidos del Factor VIIa**

(30) Prioridad:

21.06.2002 DK 200200963

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.02.2018

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

JENSEN, MICHAEL BECH;
HANSEN, BIRTHE LYKKEGAARD y
KORNFELT, TROELS

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 653 555 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

Composiciones sólidas estabilizadas de polipéptidos del Factor VIIa

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones estables tanto química como físicamente que comprenden un polipéptido del Factor VII activado, de modo que estas composiciones se pueden almacenar, manipular y utilizar a temperatura ambiente.

Antecedentes de la invención

El Factor VII activado es un polipéptido implicado en el proceso de coagulación sanguínea. Hoy en día, el Factor VIIa se puede preparar mediante técnicas recombinantes (rFVIIa) y es de uso generalizado como agente prohemostático. El Factor VII (humano de tipo silvestre) se ha descrito en el documento de patente de EE.UU. nº 4.784.950. El rFVIIa ofrece actualmente una respuesta prohemostática rápida y muy eficaz en individuos hemofílicos que padecen hemorragia. Ventajosamente, el rFVIIa se puede utilizar para tratar individuos hemofílicos que no se pueden tratar con otros productos a base de factores de coagulación, debido a la formación de anticuerpos. También individuos que tienen una carencia de Factor VII o individuos que tienen un sistema de coagulación normal, pero que aun así experimentan una hemorragia excesiva, se pueden tratar con éxito con rFVIIa.

Se tienen que considerar diversos parámetros cuando se desarrolla un medicamento que comprende un polipéptido tal como, por ejemplo, el Factor VIIa. Por ejemplo, el medicamento debe ser eficaz, seguro y generar un buen cumplimiento por parte del paciente. Por otra parte, el medicamento se puede formular para administración parenteral utilizando excipientes farmacéuticamente aceptables, que tendrán que obtener la aprobación de diversas agencias reguladoras médicas mundiales. Con el fin de una administración parenteral, es muy deseable que la formulación sea aproximadamente isotónica y que el pH de la formulación esté en un valor fisiológicamente adecuado después de la inyección/infusión, de lo contrario puede producir dolor y molestias en el paciente. Para una revisión general de las formulaciones de proteínas, véase, por ejemplo, Cleland et al.: The development of stable protein formulations: 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 formulations of proteins and peptides: Stability and stabilizers, Journal of Parenteral Science and Technology 1988 (suplemento), 42 (2S).

Sin embargo, para medicamentos que comprenden polipéptidos, la seguridad puede estar directamente relacionada con la estabilidad física y química del polipéptido. Al ser un polipéptido, el Factor VII o un polipéptido relacionado con el Factor VII es susceptible de una degradación física, incluyendo desnaturalización y agregación, tal como la formación de agregados solubles o insolubles en forma de dímeros, oligómeros y polímeros, o una degradación química, incluyendo, por ejemplo, hidrólisis, desamidación y oxidación. En consecuencia, dicha inestabilidad física y química puede provocar una pérdida de la actividad del polipéptido del Factor VII, una formación de productos de degradación tóxicos e inmunógenos, un riesgo grave de producir trombosis después de la inyección de los polipéptidos degradados del Factor VII, una obstrucción de las agujas utilizadas para las inyecciones y un riesgo de falta de homogeneidad, por mencionar algunos ejemplos.

Por lo tanto, es esencial proporcionar composiciones que comprenden polipéptidos del Factor VII que sean estables frente a la degradación física y química.

En la actualidad, el polipéptido FVII preparado de forma recombinante se proporciona como un producto liofilizado que está destinado a ser almacenado a temperaturas entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8°C. El requisito de unas condiciones refrigeradas provoca una carga y es un inconveniente para el fabricante o el proveedor, así como para el usuario final (el paciente).

El producto FVII preparado de forma recombinante existente es NovoSeven® (Novo Nordisk A/S, Dinamarca) que consiste en 1,2 mg de Factor VIIa humano recombinante, 5,84 mg de NaCl, 2,94 mg de $CaCl_2$, 2 H_2O, 2,64 mg de glicilglicina, 0,14 mg de polisorbato 80 y 60,0 mg de manitol. Cuando se reconstituye en 2,0 ml de agua para inyección (WFI), el pH es 5,5 y la solución que contiene FVII preparada de este modo es suficientemente estable durante 24 horas a temperatura ambiente.

Los presentes investigadores han encontrado que en el almacenamiento del producto NovoSeven® liofilizado durante 6 meses a 25°C, aproximadamente 6 a 7% p/p del contenido inicial del rFVIIa está presente en forma de agregados.

Por lo tanto, las composiciones que comprenden polipéptidos del Factor VII tienen que estar estabilizadas, permitiendo de ese modo el almacenamiento y la manipulación a temperatura ambiente. Sin embargo, la inestabilidad de los polipéptidos se refiere a varios parámetros y es imposible predecir la manera adecuada de estabilizar un Factor VIIa o un polipéptido relacionado con el Factor VII.

Una metodología para la estabilización de una proteína se refiere a la eliminación del agua de la proteína, por ejemplo, proporcionando la proteína en forma de torta liofilizada, un material final obtenido en un proceso de liofilización.

Sin embargo, el proceso de liofilización en sí también es perjudicial para las proteínas; durante la liofilización, la solución de proteína se enfría primero hasta que se congela adecuadamente y la mayoría del agua en masa en la solución de proteína formará hielo en esta etapa. Por ello, la proteína es propensa a tensiones inducidas por la congelación lo que produce deformación y precipitación. En la siguiente etapa, la denominada etapa de secado primaria, el hielo se sublima y en la etapa de secado secundaria, el agua adsorbida o unida se elimina a temperaturas elevadas. Durante esta eliminación del agua, las proteínas pueden perder su conformación apropiada la cual se proporciona principalmente a través de enlaces de hidrógeno.

Por lo tanto, para conservar la conformación, la actividad y la estabilidad de la proteína durante la liofilización, la solución de polipéptido se tiene que complementar con cantidades suficientes de excipientes adecuados con propiedades crioprotectoras y/o lioprotectoras, a fin de proteger la proteína de tensiones inducidas por la liofilización y/o de tensiones durante la eliminación de agua, respectivamente.

Además, cuando se proporciona un producto liofilizado, una característica esencial se refiere a las propiedades de la torta liofilizada. Tiene que tener buenas propiedades en cuanto a su forma y estructura, es decir, no se tiene que colapsar porque las tortas de este tipo colapsadas pueden ser difíciles o incluso imposibles de disolver (reconstituir) antes del uso. Por el contrario, la estructura física de la torta liofilizada no puede ser demasiado hueca y blanda. Por lo tanto, se añaden uno o varios agentes denominados volumétricos a la solución de proteína antes de la liofilización.

Otras publicaciones de interés con respecto a la estabilización de polipéptidos son las siguientes:

El documento de EE.UU. 20010031721 A1 (American Home Products) se refiere a formulaciones de Factor IX muy concentradas, liofilizadas y líquidas.

El documento WO 97/26909 (Genetics Institute) se refiere a preparaciones liofilizadas de Factor IX, adecuadas para el almacenamiento y la administración. Las preparaciones pueden comprender sacarosa o manitol como crioprotector.

El documento WO 95/28954 (Genetics Institute) se refiere a preparaciones de Factor IX, adecuadas para el almacenamiento y la administración. Las preparaciones pueden comprender sacarosa como crioprotector.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar composiciones estables de polipéptidos del Factor VII activado, sustancialmente sin una presencia de productos de degradación y sin una disminución de la actividad de los polipéptidos del Factor VII activado, preferiblemente después de un almacenamiento prolongado en condiciones ambientales, por ejemplo, durante al menos 6 meses. Además, es un objetivo que las composiciones estables sean adecuadas para la administración parenteral, a fin de no causar ningún inconveniente al paciente.

Compendio de la invención

Los presentes investigadores han descubierto que se pueden proporcionar polipéptidos del Factor VII activado en una composición que es suficientemente estable para permitir un almacenamiento a temperatura ambiente durante aproximadamente al menos 8 meses. Los investigadores han encontrado que la estabilización se refiere a la correcta combinación de algunos excipientes farmacéuticamente aceptables.

Por consiguiente, la presente invención se refiere en un primer aspecto a composiciones estabilizadas que tienen un contenido en humedad no superior al 3% y comprenden un polipéptido del Factor VII activado y una combinación de manitol y un sacárido seleccionado a partir del grupo que consiste en sacarosa, dextrosa, lactosa, maltosa, trealosa, ciclodextrinas, maltodextrinas y dextranos; teniendo dicha composición un contenido en humedad no superior al 3%; en donde el polipéptido del Factor VII activado está presente en una concentración de 0,6 mg/ml a 10,0 mg/ml; el manitol está presente en una concentración de 5 mg/ml a 55 mg/ml; el sacárido está presente en una concentración de 5 mg/ml a ff mg/ml; y la relación en peso entre el manitol y el sacárido (manitol:sacárido) es de 20:1 a 1:5.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para preparar un polipéptido estable del Factor VII activado que comprende las etapas de:

i) proporcionar dicho polipéptido del Factor VII activado en una solución que comprende una combinación de manitol y un sacárido seleccionado a partir del grupo que consiste en sacarosa, dextrosa, lactosa, maltosa, trealosa, ciclodextrinas, maltodextrinas y dextranos;

en donde el polipéptido del Factor VII activado está presente en una concentración de 0,6 mg/ml a 10,0 mg/ml; el manitol está presente en una concentración de 5 mg/ml a 55 mg/ml; el sacárido está presente en una concentración de 5 mg/ml a ff mg/ml; y la relación en peso entre el manitol y el sacárido (manitol:sacárido) es de 20:1 a 1:5;

ii) procesar dicha solución para obtener una composición sólida con un contenido en humedad no superior al 3% p/p, en donde dicho procesamiento comprende secado por congelación.

Como se ha mencionado, se requieren polipéptidos estables del Factor VII a fin de minimizar el riesgo de eventos adversos y para mejorar la seguridad y la eficacia cuando se administran polipéptidos del Factor VII con fines tera-

péuticos. Por lo tanto, otro aspecto adicional de la invención se refiere a una composición de la invención para el uso en el tratamiento de un síndrome sensible al Factor VII, en donde dicho síndrome se selecciona entre el grupo que consiste en hemofilia A, hemofilia B, carencia de Factor XI, carencia de Factor VII, trombocitopenia, enfermedad de von Willebrand, presencia de un inhibidor del factor de coagulación, cirugía, traumatismo y terapia anticoagulante.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a composiciones estables durante el almacenamiento que comprenden polipéptidos del Factor VII activado. Las composiciones se pueden almacenar a temperatura ambiente durante un período de tiempo prolongado sin causar una degradación sustancial del polipéptido del Factor VII. Por temperatura ambiente se entiende la temperatura ambiente en el interior de una habitación; normalmente varía desde aproximadamente 5°C hasta aproximadamente 40°C, tal como desde aproximadamente 10°C a 30°C o de 15°C a 25°C.

Mediante la combinación predeterminada apropiada de excipientes farmacéuticamente aceptables particulares, los presentes investigadores han proporcionado composiciones estabilizadas que comprenden polipéptidos del Factor VII activado, permitiendo de este modo que las composiciones se almacenen a temperatura ambiente durante un período de tiempo prolongado, tal como al menos aproximadamente 8 meses. Ventajosamente, las composiciones estabilizadas no se tienen que almacenar en condiciones refrigeradas, tal como entre 2 y 8°C.

La presente invención también se refiere a composiciones estables durante el almacenamiento que son estables durante al menos aproximadamente 8 meses, después de un almacenamiento a aproximadamente 30°C. La composición se almacena preferiblemente en la oscuridad. Por lo tanto, la presente invención hace posible el almacenamiento de tales composiciones a temperatura ambiente sin aumentar el riesgo de efectos adversos en el paciente al que se administran tales composiciones. Ventajosamente, la mejora de la estabilidad durante el almacenamiento también dará lugar a una reducción de los costes porque no se requieren unas condiciones especiales durante el almacenamiento, lo que produce además una manipulación más conveniente por parte del usuario de la composición.

La expresión "polipéptido del Factor VII" se considera que significa cualquier polipéptido del Factor VII que es eficaz en la prevención o el tratamiento de una hemorragia. Incluye polipéptidos del Factor VII obtenidos a partir de la sangre o el plasma, o producidos por medios recombinantes.

Tal y como se usa en este documento, "polipéptido del Factor VII" incluye, sin limitación, Factor VII, así como polipéptidos relacionados con el Factor VII. El término "Factor VII" se entiende que incluye, sin limitación, polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos 1-406 del Factor VII humano de tipo silvestre (como se describe en el documento de patente de EE.UU. nº 4.784.950), así como Factor VII de tipo silvestre de otras especies, tales como, por ejemplo, bovino, porcino, canino, murino y de salmón, dicho Factor VII obtenido a partir de sangre o plasma, o producido por medios recombinantes. También incluye variaciones alélicas naturales del Factor VII que pueden existir y producirse de un individuo a otro. También, el grado y la localización de una glicosilación u otras modificaciones posteriores a la traducción pueden variar dependiendo de las células hospedadoras seleccionadas y de la naturaleza del entorno celular del hospedador. El término "Factor VII" también se entiende que incluye polipéptidos del Factor VII en su forma no escindida (zimógeno), así como aquellos que se han procesado proteolíticamente para producir sus formas bioactivas respectivas, que se pueden denominar Factor VIIa. Por lo general, el Factor VII se escinde entre los residuos 152 y 153 para generar el Factor VIIa.

Como se ha mencionado, la expresión "polipéptidos del Factor VII" se considera que significa también "polipéptidos relacionados con el Factor VII". La expresión "polipéptidos relacionados con el Factor VII" se entiende que incluye tales polipéptidos en su forma no escindida (zimógeno), así como aquellos que se han procesado proteolíticamente para generar sus formas bioactivas respectivas. Tal y como se utiliza en esta memoria, "polipéptidos relacionados con el Factor VII" incluye, sin limitación, polipéptidos que muestran sustancialmente la misma actividad biológica o una actividad mejorada en relación con el Factor VII humano de tipo silvestre. Estos polipéptidos incluyen, sin limitación, Factor VII o Factor VIIa que se ha modificado químicamente y variantes del Factor VII en las que se han introducido alteraciones específicas de la secuencia de aminoácidos que modifican o mejoran ligeramente la actividad biológica del polipéptido.

Además, los polipéptidos relacionados con el Factor VII, que incluyen variantes del Factor VII que muestran sustancialmente la misma actividad biológica o una actividad mejor que la del Factor VII de tipo silvestre, incluyen sin limitación polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia del Factor VII de tipo silvestre mediante inserción, deleción o sustitución de uno o varios aminoácidos.

Los polipéptidos relacionados con el Factor VII, que incluyen variantes, que tienen sustancialmente la misma actividad biológica o una actividad mejorada en relación con la del Factor VIIa de tipo silvestre, incluyen los que muestran al menos aproximadamente 25%, preferiblemente al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 100%, más preferiblemente al menos aproximadamente 110%, más preferiblemente al menos aproximadamente 120% y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 130% de la actividad específica del Factor VIIa de tipo silvestre que se ha producido en el mismo tipo de célula, cuando se somete a ensayo en uno o varios ensayos entre ensayo de coagulación, ensayo de proteó-

lisis o ensayo de unión a FT, tal y como se describe en la presente memoria descriptiva.

En algunas realizaciones, los polipéptidos del Factor VII son polipéptidos relacionados con el Factor VII, en particular variantes, en donde la relación entre la actividad de dicho polipéptido del Factor VII y la actividad del Factor VIIa humano natural (FVIIa de tipo silvestre) es de al menos aproximadamente 1,25 cuando se somete a ensayo en el "Ensayo de Hidrólisis in vitro" (véase el Ejemplo 9, más abajo); en otras realizaciones, la relación es de al menos aproximadamente 2,0; en realizaciones adicionales, la relación es de al menos aproximadamente 4,0. En algunas realizaciones de la invención, los polipéptidos del Factor VII son polipéptidos relacionados con el Factor VII, en particular variantes, en donde la relación entre la actividad de dicho polipéptido del Factor VII y la actividad del Factor VIIa humano natural (FVIIa de tipo silvestre) es al menos de aproximadamente 1,25 cuando se somete a ensayo en el "Ensayo de Proteólisis in vitro" (véase el Ejemplo 9, más abajo); en otras realizaciones, la relación es de al menos aproximadamente 2,0; en realizaciones adicionales, la relación es de al menos aproximadamente 4,0; en realizaciones adicionales, la relación es de al menos aproximadamente 8,0.

Ejemplos no limitativos de variantes del Factor VII que tienen sustancialmente la misma actividad biológica o una actividad mejorada que la del Factor VII de tipo silvestre, incluyen S52A-FVII, S60A-FVII (Lino et al., Arch. Biochem. Biophys. 352: 182-192, 1998); L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L3051-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII y S336G-FVII; variantes de FVIIa que muestran una mayor estabilidad proteolítica tal y como se describe en el documento de Patente de Estados Unidos nº 5.580.560; Factor VIIa que se ha 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 como se describen en el documento PCT/DK02/00189; variantes de FVII que muestran una mayor estabilidad proteolítica como se describen en el documento WO 02/38162 (Scripps Research Institute); variantes de FVII que tienen un dominio Gla modificado y que muestran una unión mejorada a la membrana como se describe en el documento WO 99/20767 (Universidad de Minnesota); variantes de FVII como se describen en el documento WO 01/58935 (Maxygen ApS); variantes de FVII que tienen una actividad biológica mejorada en comparación con FVIIa de tipo silvestre como se describen en los documentos WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, PCT/DK02/00635, solicitud de patente danesa PA 2002 01423, solicitud de patente danesa PA 2001 01627; WO 02/38162 (Scripps Research Institute); y variantes de FVIIa con actividad mejorada como se describen en el documento JP 2001061479 (Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.).

Ejemplos de factor VII o de polipéptidos relacionados con el factor VII incluyen, sin limitación, Factor VII de tipo silvestre, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L3051-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M2980-FVII, V158D/E296V/M2980-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, y S336G-FVII, L305V/K337A-FVII, L305V/V158D-FVII, L305V/E296V-FVII, L305V/M298Q-FVII, L305V/V158T-FVII, L305V/K337A/V158T-FVII, L305V/K337A/M298Q-FVII, L305V/K337A/E296V-FVII, L305V/K337A/V158D-FVII, L305V/V158D/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V-FVII, L305V/V158T/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V-FVII, L305V/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/K316H-FVII, S314E/K316Q-FVII, S314E/L305V-FVII, S314E/K337A-FVII, S314E/V158D-FVII, S314E/E296V-FVII, S314E/M298Q-FVII, S314E/V158T-FVII, K316H/L305V-FVII, K316H/K337A-FVII, K316H/V158D-FVII, K316H/E296V-FVII, K316H/M298Q-FVII, K316H/V158T-FVII, K316Q/L305V-FVII, K316Q/K337A-FVII, K316Q/V158D-FVII, K316Q/E296V-FVII, K316Q/M298Q-FVII, K316Q/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D-FVII, S314E/L305V/E296V-FVII, S314E/L305V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/K337A/E296V-FVII, S314E/L305V/K337A/V158D-FVII, S314E/L305V/V158D/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V-FVII, S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V-FVII, S314E/L305V/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D-FVII, K316H/L305V/E296V-FVII, K316H/L305V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/K337A/E296V-FVII, K316H/L305V/K337A/V158D-FVII, K316H/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V-FVII, K316H/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V-FVII, K316H/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D-FVII, K316Q/L305V/E296V-FVII, K316Q/L305V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158T-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-FVII, K316Q/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/K337A-FVII, F374Y/V158D-FVII, F374Y/E296V-FVII, F374Y/M298Q-FVII, F374Y/V158T-FVII, F374Y/S314E-FVII, F374Y/L305V-FVII, F374Y/L305V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D-FVII, F374Y/L305V/E296V-FVII, F374Y/L305V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T-FVII, F374Y/L305V/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII, F374Y/K337A/M298Q-FVII, F374Y/K337A/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q-FVII, F374Y/V158D/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q-FVII, F374Y/V158T/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/S314E/M298Q-FVII, F374Y/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII, F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII, F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII, F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158T-FVII, F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII, F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII, F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII, F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII, F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, S52A-Factor VII, S60A-Factor VII; y P11Q/K33E-FVII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; FVII que tiene sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos desde 233Thr a 240Asn, FVII que tiene sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos desde 304Arg a 329Cys y FVII que tiene sustituciones, deleciones o adiciones en la secuencia de aminoácidos Ile153-Arg223.

Para los fines de la invención, la actividad biológica de polipéptidos del Factor VII ("actividad biológica del Factor VII") se puede cuantificar midiendo la capacidad de una preparación para favorecer la coagulación de la sangre usando plasma que carece de Factor VII y tromboplastina, como se describe, por ejemplo, en el documento de patente de EE.UU. nº 5.997.864. En este ensayo, la actividad biológica se expresa como la reducción del tiempo de coagulación con respecto a una muestra testigo y se convierte en "unidades de Factor VII" comparando con un patrón de suero humano agrupado que contiene 1 unidad/ml de actividad del Factor VII. Alternativamente, la actividad biológica del Factor VIIa se puede cuantificar

(i) midiendo la capacidad del Factor VIIa o de un polipéptido relacionado con el Factor VIIa para producir Factor X activado (Factor Xa) en un sistema que comprende FT incrustado 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", véase el Ejemplo 12, más adelante);

(iii) midiendo la unión física del Factor VIIa o de un polipéptido relacionado con el Factor VIIa, a FT usando un instrumento basado en la resonancia de plasmón superficial (Persson, FEBS Letts. 413:359-363, 1997); y

(iv) midiendo la hidrólisis de un sustrato sintético mediante Factor VIIa y/o un polipéptido relacionado con el Factor VIIa ("Ensayo de Hidrólisis in vitro", véase el Ejemplo 12, más adelante); y

(v) midiendo la generación de trombina en un sistema in vitro independiente de FT.

La expresión "actividad biológica del Factor VII" o "actividad del Factor VII" se entiende que incluye la capacidad para generar trombina; la expresión también incluye la capacidad para generar trombina en la superficie de plaquetas activadas en ausencia de Factor tisular.

El Ejemplo 12 de la presente memoria descriptiva describe con detalle ensayos útiles para analizar la actividad biológica de FVII.

Por otra parte, a lo largo de la presente memoria descriptiva, los términos a continuación tienen el siguiente significado:

El término "estabilizar" se entiende que incluye la reducción de la formación de agregados (insolubles y/o solubles) y/o la degradación química, así como proporcionar un mantenimiento del pH y una conformación apropiada de la proteína durante el almacenamiento o la producción de las composiciones, de modo que se conserva una retención sustancial de la actividad biológica y una estabilidad de la proteína. Por otra parte, estabilizar también se considera que significa lioprotección y crioprotección de la proteína durante la producción de las composiciones en condiciones de liofilización.

La expresión "estabilización estructural" o "estabilidad estructural" se entiende que incluye la capacidad para formar un tapón o una torta liofilizada con propiedades y apariencia adecuadas, por ejemplo, de tal manera que no se colapsa y se disuelve fácilmente antes del uso.

La expresión "estable durante el almacenamiento" define un producto que está estabilizado en el almacenamiento a temperaturas entre 5°C - 40°C y se conserva con unas características preseleccionadas del producto durante un periodo de tiempo adecuado - frecuentemente varios meses.

La expresión "estabilidad física" de polipéptidos del Factor VII se refiere a la formación de agregados insolubles y/o solubles en forma de formas dímeras, oligómeras y polímeras de polipéptidos del Factor VII, así como a cualquier deformación estructural y desnaturalización de la molécula.

La expresión "estabilidad química" se refiere a la formación de cualquier cambio químico en los polipéptidos del Factor VII en el almacenamiento en estado disuelto o sólido, en condiciones aceleradas. Un ejemplo es la hidrólisis, la desamidación y la oxidación. En particular, los aminoácidos que contienen azufre son propensos a la oxidación con formación de los sulfóxidos correspondientes.

El término "crioprotectores" tal y como se usa en el presente documento, incluye generalmente agentes que proporcionan estabilidad a la proteína desde las tensiones inducidas por la congelación. Ejemplos de crioprotectores incluyen polioles tales como, por ejemplo, manitol, e incluyen sacáridos tales como, por ejemplo, sacarosa, así como incluyen tensioactivos tales como, por ejemplo, polisorbato, poloxámero o polietilenglicol y similares. Los crioprotectores también contribuyen a la tonicidad de las formulaciones.

El término "lioprotector" tal y como se utiliza en el presente documento, incluye agentes que proporcionan estabilidad a la proteína durante la eliminación del agua en el proceso de secado del proceso de liofilización. Por ejemplo mediante el mantenimiento de la conformación apropiada de la proteína. Ejemplos de lioprotectores incluyen sacáridos, en particular disacáridos o trisacáridos. Los crioprotectores también pueden tener efectos lioprotectores.

La expresión "agente adecuado para mantener el pH en el intervalo de 3 a 9" incluye los agentes que mantienen el pH de la solución en un intervalo aceptable entre 3,0 y 9,0. Ejemplos típicos de agentes capaces de mantener el pH dentro de un intervalo de 3 a 9, son la forma ácida o las sales de ácido cítrico, ácido acético, histidina, ácido málico, ácido fosfórico, ácido tartárico, ácido succínico, MES, HEPES, PIPES, imidazol, TRIS, ácido láctico, ácido glutárico y glicilglicina. Se debe entender que en la presente invención también se puede usar una combinación de agentes, en donde la combinación de agentes es adecuada para mantener el pH en el intervalo descrito anteriormente.

La expresión "torta liofilizada" tal y como se usa en esta memoria, incluye la composición sólida obtenida en el procesamiento de una composición disuelta o al menos parcialmente disuelta, en condiciones que implican al menos una etapa de enfriamiento hasta congelar dicha composición disuelta/parcialmente disuelta, seguida por al menos una etapa de secado al vacío.

La expresión "liofilización" y "secado por congelación" incluye un proceso durante el cual el líquido se extrae desde una composición disuelta o al menos parcialmente disuelta, en condiciones que implican al menos una etapa de enfriamiento hasta congelar la solución disuelta o parcialmente disuelta, seguida de secado al vacío. La liofilización, o secado por congelación, es el proceso más común para la preparación de productos farmacéuticos sólidos de proteínas. El proceso consiste en dos etapas principales: la congelación de una solución de proteína y el secado al vacío del sólido congelado. La etapa de secado se divide en dos fases: secado primario y secundario. El secado primario elimina el agua congelada (sublimación del hielo) y el secado secundario elimina el agua "unida" no congelada (desorción del agua). Un análisis más detallado de cada etapa de la liofilización se proporciona, por ejemplo, en Wang et al., International Journal of Pharmaceutics 203 (2000): 1-60 (véase la sección 4, página 16 y siguientes).

Normalmente, una composición se liofiliza mediante el llenado en viales, la congelación en los estantes del aparato liofilizador, después de lo cual se establece un vacío y los estantes se calientan para poner en marcha el secado primario (o sublimación del hielo). A continuación, tiene lugar el secado secundario (o desorción del agua absorbida) a una temperatura más alta hasta el término del proceso, es decir, cuando la composición tiene un contenido suficientemente bajo en humedad (agua). Los métodos de liofilización son generalmente conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Wang et al., International Journal of Pharmaceutics 203 (2000): 1-60. Dentro de la experiencia ordinaria de un profesional se encuentra el optimizar las condiciones del secado por congelación en relación con la temperatura(s), el tiempo(s) en cada temperatura y también la presión que se va a utilizar durante el proceso para una composición específica.

La expresión "contenido en humedad" se considera que incluye agua asociada con el producto, incluyendo, sin limitación, agua en forma adsorbida, tal como agua no congelada atrapada o adsorbida a la fase de soluto congelado y/o asociada con la fase amorfa o adsorbida al sólido cristalino. La expresión "contenido en agua" se utiliza indistintamente con "contenido en humedad". El nivel de humedad residual deseado (contenido en humedad) es una función de la duración y la temperatura de la etapa de secado secundaria. Se conocen en la técnica varios métodos para determinar el contenido en humedad residual durante la liofilización; por ejemplo, se puede usar un higrómetro electrónico o un analizador de gases residuales. El contenido en humedad de formulaciones liofilizadas se puede determinar por varios métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, la pérdida por desecación, la valoración de Karl Fischer, el análisis termogravimétrico (ATG), la cromatografía de gases (CG) o el IR cercano (véase, por ejemplo, Wang et al., International Journal of Pharmaceutics 203 (2000): 1-60). Los métodos para determinar el contenido en agua (contenido en humedad) también se describen en la Farmacopea tanto europea como estadounidense. Por ejemplo, la determinación del contenido en agua se puede realizar mediante la valoración culombimétrica de Karl Fischer, como se describe en la Farmacopea de EE.UU. (USP <921, Ic>) o en la Famacopea Europea (EP <2.5.32>).

En resumen, el método es como sigue:

Determinación del contenido en agua mediante valoración culombimétrica: La reacción de Karl Fischer se utiliza en la determinación culombimétrica de agua basada en la reacción cuantitativa del agua con dióxido de azufre y yodo en un medio anhidro. El yodo se produce electroquímicamente en la celda de reacción por oxidación de yoduro. El yodo producido en el ánodo reacciona inmediatamente con el agua y el dióxido de azufre contenido en la celda de reacción. La cantidad de agua en la sustancia es directamente proporcional a la cantidad de electricidad hasta el punto final de la valoración. Cuando se ha consumido toda el agua en la célula, se alcanza el punto final y por lo tanto aparece un exceso de yodo que se detecta electrométricamente indicando así el punto final. A continuación se calcula el porcentaje de contenido en agua presente en la sustancia.

El contenido en humedad se puede definir en términos del peso de la muestra en el vial, en el momento del análisis (es decir, sólidos más el agua presente - denominado base de peso húmedo) o se puede definir en términos en los que se corrige para el agua medida en la muestra (es decir, base de peso seco). En el caso de productos liofilizados con bajos contenidos en humedad, las dos mediciones (base de peso húmedo frente a base de peso seco) dan resultados muy similares. Tal y como se emplea en esta memoria, el contenido en humedad se define en términos de los sólidos más el agua presente (es decir, base de peso húmedo).

La expresión "agente volumétrico" generalmente incluye agentes que proporcionan buenas propiedades a la torta liofilizada, que forman un producto farmacéuticamente refinado, que ayudan a que la proteína supere diversas tensiones, cizalla/congelación por ejemplo, asociadas con los procesos de liofilización, y que ayudan a mantener unos niveles de actividad de la proteína durante el proceso de liofilización y el posterior almacenamiento. Ejemplos típicos de agentes volumétricos incluyen manitol, glicina, sacarosa, lactosa. Estos agentes también pueden contribuir a la tonicidad de las formulaciones.

La expresión "modificador de la tonicidad" se considera que significa cualquier agente capaz de ajustar la tonicidad de la composición, de manera que después de disolver la composición en el momento del uso, la composición tiene una tonicidad como el valor fisiológico de la sangre, líquido peritoneal u otros líquidos corporales pertinentes. Obviamente, la tonicidad también puede depender de si la solución reconstituida comprende agentes modificadores de la tonicidad.

El término "tensioactivos" generalmente incluye aquellos agentes que protegen a la proteína de tensiones inducidas por la interfaz aire/solución y de tensiones inducidas por solución/superficie. Por ejemplo, los tensioactivos pueden proteger a la proteína de la agregación. Los tensioactivos adecuados pueden incluir, por ejemplo, polisorbatos, éteres alquílicos de polioxietileno tales como Brij 35®, o poloxámero tal como Tween 20, Tween 80 o Poloxámero 188. Los detergentes preferidos son poloxámeros, por ejemplo, Poloxámero 188, Poloxámero 407; alquil éteres de polioxietileno, por ejemplo, Brij 35®, Cremophor A25, Sympatens ALM/230; y polisorbatos/Tweens, por ejemplo, Polisorbato 20, Polisorbato 80. Se prefieren más los poloxámeros, por ejemplo Poloxámero 188, y Tweens, por ejemplo, Tween 20 y Tween 80.

La expresión "contenido inicial" se refiere a la cantidad de polipéptidos del Factor VII añadida a una composición en el momento de la preparación. La concentración proporcionada en el presente documento (mg/ml) se refiere a la

concentración en la solución del polipéptido del Factor VII antes de eliminar la humedad (por ejemplo, antes de la liofilización) o en la composición reconstituida, o se denomina % p/p, que entonces se relaciona con la concentración en la composición sólida, por ejemplo, la torta liofilizada.

Tal como se usa en el presente documento, las cantidades especificadas se entiende que son ± aproximadamente el 10%; por lo tanto aproximadamente 50 mM incluye 50 mM ± 5 mM, 4% incluye 4% ± 0,4%, etc.

Como se ha indicado anteriormente, los presentes investigadores han contribuido esencialmente a la técnica mediante la estabilización de polipéptidos del Factor VII, permitiendo de ese modo un almacenamiento a largo plazo sin causar un aumento del riesgo ni de las molestias para el usuario.

Los presentes investigadores han encontrado que se tiene que ajustar una cantidad de parámetros cruciales para la estabilización de polipéptidos del Factor VII. Un parámetro importante se refiere, al menos en parte, al contenido en humedad, por ejemplo, agua. El contenido en humedad debe estar limitado. Como otro parámetro esencial, la composición debe incluir al menos un agente estabilizador. Tal como se describe en el presente documento, un agente estabilizador adecuado incluye la combinación de al menos dos grupos de excipientes farmacéuticamente aceptables, seleccionados a partir del grupo que consiste en antioxidantes, sacáridos y polioles. Los sacáridos y los polioles tienen propiedades lioprotectoras y/o crioprotectoras que pueden ser importantes, al menos en parte, en el caso de liofilizar la composición. En general, se puede lograr una mejora de la estabilidad, en parte, mediante la combinación adecuada de al menos dos de estos grupos de excipientes. Sin embargo, se encontró más específicamente que cuando dicha combinación comprende un sacárido (sacarosa) o un antioxidante (metionina), el efecto estabilizador puede ser incluso más significativo. Por otra parte, también se encontró sorprendentemente que la metionina evita la degradación oxidativa de los polipéptidos del Factor VII.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un polipéptido del Factor VII activado y una combinación de manitol y un sacárido seleccionado a partir del grupo que consiste en sacarosa, dextrosa, lactosa, maltosa, trealosa, ciclodextrinas, maltodextrinas y dextranos; teniendo dicha composición un contenido en humedad no superior al 3%;

en donde el polipéptido del Factor VII activado está presente en una concentración de 0,6 mg/ml a 10,0 mg/ml; el manitol está presente en una concentración de 5 mg/ml a 55 mg/ml; el sacárido está presente en una concentración de 5 mg/ml a ff mg/ml; y la relación en peso entre el manitol y el sacárido (manitol:sacárido) es de 20:1 a 1:5.

En realizaciones interesantes de la invención, la combinación de un sacárido y manitol comprende además un antioxidante. En una realización, la composición de la invención comprende manitol y sacarosa; en otra realización, la composición comprende manitol, sacarosa y metionina; en otra realización, la composición comprende manitol y trehalosa; en otra realización, la composición comprende manitol, trehalosa y metionina

El polipéptido del Factor VII se considera que incluye los polipéptidos como se han descrito anteriormente. En realizaciones adecuadas de la invención, el polipéptido del Factor VII se selecciona a partir del grupo que consiste en Factor VIIa humano, Factor VIIa humano recombinante y una variante de la secuencia del Factor VII. Preferiblemente, el polipéptido del Factor VII es Factor VIIa humano o Factor VIIa humano recombinante o un polipéptido relacionado con el Factor VII en el que la relación entre la actividad de dicho polipéptido relacionado con el Factor VII y el Factor VII de tipo silvestre es de al menos 1,25, cuando se somete a ensayo en uno o varios de los ensayos "Ensayo de Proteólisis in vitro" y "Ensayo de Hidrólisis in vitro", tal y como se describen en la presente memoria descriptiva.

Como se ha indicado, el contenido en humedad debe estar limitado. Para los fines de la presente invención, los polipéptidos del Factor VII, cuando se proporcionan en masa, se pueden proporcionar en forma sólida o líquida. Sin embargo, normalmente los polipéptidos del Factor VII, cuando se proporcionan en masa, están en forma líquida. Por lo tanto, un tratamiento adicional de las proteínas en masa para la preparación de composiciones, requiere las etapas de añadir excipientes adecuados y eliminar el líquido de la masa, dicha adición de excipientes se puede llevar a cabo antes o después de eliminar el líquido. Uno de tales medios para la eliminación del líquido de una proteína se refiere a la liofilización. Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, la composición está en forma de torta liofilizada. Sin embargo, la presente invención no excluye otros procesos que son adecuados para eliminar el líquido del polipéptido en masa, a fin de lograr una composición sólida con un contenido en humedad que no sea superior a aproximadamente 3% p/p.

Además, según la invención, el contenido en humedad es preferiblemente no superior a aproximadamente 2,5% p/p, preferiblemente no superior a aproximadamente 2% p/p, más preferiblemente no superior a aproximadamente 1,5% p/p.

Como se puede entender, la invención se refiere, en parte, a limitar la degradación de polipéptidos del Factor VII durante la preparación, por ejemplo, durante la mezcla por adición de excipientes y la eliminación de líquido, con el fin de lograr una composición sólida con un contenido en humedad que sea como máximo del 3% p/p, a limitar dicha degradación desde el periodo de preparación de la composición sólida hasta el momento del uso, por ejemplo, hasta el momento en el que se va a administrar la composición a un paciente.

Por lo tanto, como un parámetro adicional en la estabilización de composiciones que comprenden polipéptidos del

Factor VII, el pH debe mantenerse en el intervalo de pH entre 3 a 9, cuando se disuelven en un disolvente acuoso, tal como, por ejemplo, agua pura o tampón acuoso. Es decir, que el pH en la solución de polipéptido en el momento antes de eliminar el contenido en humedad, por ejemplo, antes de la liofilización, se debe mantener dentro de un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 9. De manera ventajosa, este intervalo de pH está también en el valor fisiológico deseado, lo que no provoca ningún daño al usuario después de administrar la composición por vía parenteral. Preferiblemente, el pH de la solución es desde aproximadamente 4,0 a aproximadamente 9,0, tal como de 4,0 a 8,0, de 4,0 a 7,5, de 4,0 a 7,0, de 4,5 a 7,0, de 4,5 a 6,8, de 4,5 a 6,5, de 5,0 a 7,0, de 5,0 a 6,5, de 5,0 a 6,0, de 5,5 a 6,5, o de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0 tal como aproximadamente 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 o 6,0.

Por lo tanto, unas realizaciones interesantes de la invención comprenden además un agente adecuado para mantener el pH de dicha composición en el intervalo de 3 a 9 cuando se disuelve en solución acuosa (por ejemplo agua). En consecuencia, en realizaciones adecuadas del mismo, el agente adecuado para mantener el pH en el intervalo de 3 a 9 se selecciona a partir del grupo que consiste en ácido o sales de ácido cítrico, ácido acético, histidina, ácido málico, ácido fosfórico, ácido tartárico, ácido succínico, MES, HEPES, imidazol, TRIS, ácido láctico, ácido glutárico, PIPES y glicilglicina.

Además, el agente adecuado para mantener el pH en el intervalo de 3 a 9 también puede ser una mezcla de al menos dos de tales agentes mencionados, en donde la mezcla es capaz de proporcionar un valor de pH en el intervalo especificado. La concentración de los agentes adecuados está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mM a 100 mM; de aproximadamente 0,2 mM a 50 mM; de aproximadamente 0,5 mM a 25 mM; de aproximadamente 1 mM a 20 mM; o de aproximadamente 1 mM a 10 mM.

Como se puede observar en los Ejemplos 5 y 6, los presentes investigadores han proporcionado composiciones con bajo contenido en formas oxidadas y agregados al término del proceso de preparación, es decir, después de terminar el proceso de liofilización, mediante la combinación de cantidades adecuadas de manitol (un poliol), sacarosa (un sacárido) y un antioxidante (metionina). Por lo tanto, las composiciones según la invención se caracterizan por tener un bajo contenido inicial en formas oxidadas y agregados antes de ser sometidas a almacenamiento.

La degradación del polipéptido del Factor VII por la vía oxidativa, así como por la vía de agregación son parámetros sensibles de la estabilidad.

Normalmente, las composiciones se estabilizan al término de la liofilización, de modo que menos del 5% p/p, tal como menos de 4, 3 o 2% p/p del contenido inicial en polipéptido del Factor VII, se convierte en sus formas oxidadas. Siendo el contenido inicial en dicho polipéptido del Factor VII, la cantidad añadida a la composición durante la preparación de la composición antes de la etapa de liofilización. Además, menos del 5% p/p, tal como menos del 4,0%, 3,0%, 2,5%, 2%, 1,5% o menos del 1% p/p del contenido inicial en polipéptido del Factor VII, se recupera como formas agregadas, tal como se determina por métodos analíticos convencionales (tales como, por ejemplo, los que se describen en los Ejemplos de la presente solicitud).

Los presentes investigadores han encontrado que una degradación adicional (es decir, tal como se calcula desde el momento de la terminación del proceso de preparación hasta 8 meses de almacenamiento a 30°C) de un polipéptido del Factor VII es mínima en el almacenamiento en condiciones ambientales. Como se puede observar en el Ejemplo 5, en el almacenamiento a 30°C durante 8 meses, el aumento es tal que menos del 10% p/p del contenido inicial en polipéptidos del Factor VII, se recupera como formas oxidadas de polipéptidos del Factor VII, además del contenido en dichas formas oxidadas presentes en el momento de la terminación de la liofilización. Se encontró de gran importancia que las composiciones que comprenden un antioxidante (metionina) son más estables frente a la degradación oxidativa del polipéptido del Factor VII.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, las composiciones adecuadas tienen un aumento limitado del contenido en formas oxidadas en el almacenamiento durante al menos 8 meses en condiciones ambientales.

Es decir que en realizaciones aún más interesantes, la composición es estable de modo que no más de aproximadamente el 6% p/p del contenido inicial en polipéptido del Factor VII, se degrada adicionalmente en formas oxidadas en el almacenamiento de la composición durante 8 meses a 30°C, después de la terminación del proceso de preparación, por ejemplo, el proceso de liofilización. En realizaciones adicionales adecuadas de la misma, no más de aproximadamente el 5, 4, 3, 2 o 1,5% p/p del polipéptido del Factor VII se convierte adicionalmente en formas oxidadas, según se calcula desde el momento de la terminación del proceso de preparación, hasta 8 meses de almacenamiento a 30°C. En estas realizaciones de la invención, las composiciones son estables de tal manera que no más de aproximadamente el 5% (4, 3, 2 o 1,5%) p/p del contenido inicial en polipéptido del Factor VII se convierte en formas oxidadas a lo largo del almacenamiento de dicha composición a 30°C durante 8 meses. Como se ha indicado anteriormente, el contenido inicial se refiere a la cantidad de polipéptido del Factor VII añadida a la composición en la preparación de la composición, antes de la etapa de liofilización.

Como se ha indicado, la degradación de los polipéptidos del Factor VII por la vía de agregación también se puede considerar como un parámetro esencial que indica una estabilidad.

Los presentes investigadores han encontrado que una degradación adicional (es decir, tal como se calcula desde el momento de la terminación del proceso de preparación hasta 8 meses de almacenamiento a 30°C) de un polipéptido

del Factor VII, es mínima en el almacenamiento en condiciones ambientales. Como puede observarse en el Ejemplo 6, no más de aproximadamente el 5% p/p, como no más de aproximadamente el 4, 3, 2,5, 2,0, 1,5 o 1,0% p/p del contenido en un polipéptido del Factor VII, se recupera adicionalmente como agregados en el almacenamiento durante 8 meses a 30°C. También se encontró de gran importancia, que las composiciones que comprenden un sacárido (sacarosa) son más estables frente a la formación de agregados.

Por lo tanto, realizaciones interesantes de la invención se refieren a composiciones que son estables de modo que no más de aproximadamente el 5% p/p del contenido inicial en polipéptido del Factor VII se convierte en agregados en el almacenamiento de dicha composición a 30°C durante 8 meses. Como se ha indicado anteriormente, el contenido inicial en dicho polipéptido del Factor VII es la cantidad añadida a la composición en la preparación de la composición antes de la etapa de liofilización. Con una optimización adecuada de por lo menos, en parte, el contenido en sacáridos, polioles y antioxidantes, la composición es estable de modo que no más de aproximadamente el 4,0%, 3,0% p/p, tal como 2,5, 2,0, 1,5 o 1,0% p/p, del contenido inicial en polipéptido del Factor VII, se convierte en agregados en el almacenamiento de dicha composición a 30°C durante 8 meses.

Por lo tanto, ventajosamente, las composiciones de la invención tienen un contenido bajo en formas oxidadas y agregados al terminar el proceso de preparación, es decir, al terminar el proceso de liofilización y, por lo tanto, las composiciones según la invención se caracterizan por tener una bajo contenido inicial en formas oxidadas y agregados antes de ser sometidas a almacenamiento, por ejemplo, no más de aproximadamente 5% p/p, tal como 4%, 3% o 2% p/p del contenido inicial en polipéptido del Factor VII, se convierte en una forma oxidada, y menos del 5% p/p, tal como no más de aproximadamente el 4,0%, 3,0%, 2,5%, 2%, 1,5%, o no más de aproximadamente el 1% p/p, se convierte en una forma dímera o polímera de orden superior al terminar el proceso de preparación

Por otra parte y de manera ventajosa, las composiciones de la invención son estables durante el almacenamiento, por ejemplo, menos del 10% p/p, tal como el 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1,5% p/p del contenido inicial en polipéptido del Factor VII se convierte en una forma oxidada, y menos del 5% p/p, tal como el 4%, 3%, 2,5%, 2%, 1,5% o 1% p/p se convierte en una forma dímera o polímera de orden superior en el almacenamiento a 30°C durante al menos 8 meses en la oscuridad.

En realizaciones interesantes, el antioxidante se selecciona a partir del grupo que consiste en homocisteína, cisteína, cistationina, metionina, glutatión y péptidos que contienen uno cualquiera entre homocisteína, cisteína, cistationina, metionina y glutatión.

En una serie de realizaciones de la invención, el excipiente de sacárido utilizado es una combinación de al menos dos disacáridos, trisacáridos y/o polisacáridos, tales como, por ejemplo, sacarosa en combinación con ciclodextrina, trehalosa en combinación con ciclodextrina, sacarosa en combinación con dextrano o sacarosa en combinación con lactosa. En una serie de realizaciones de la invención, el excipiente de antioxidante utilizado es una combinación de al menos dos antioxidantes, tales como, por ejemplo, metionina en combinación con uno o varios entre homocisteína, cisteína, cistationina, glutatión, y péptidos que contienen uno cualquiera entre homocisteína, cisteína, cistationina, metionina y glutatión.

Los presentes investigadores han reconocido la combinación adecuada de manitol y los sacáridos, así como su contenido de modo que, al menos en parte, se logra una estabilidad favorable.

Por lo tanto, en algunas realizaciones más interesantes de la invención, el manitol está presente en una cantidad que varía desde aproximadamente 18% p/p hasta aproximadamente 88% p/p, tal como desde aproximadamente 18% p/p hasta aproximadamente 83% p/p, de 25% a 80 %, de 30% a 65%, de 30% a 80%, de 40% a 80%, de 50% a 80%, de 30% a 75%, de 40% a 75%, de 50% a 75% o desde aproximadamente 50% a aproximadamente 70% p/p.

El manitol está presente en una cantidad que varía desde 5 mg/ml a 55 mg/ml, tal como desde 8 a 45 mg/ml, de 10 a 40 mg/ml, de 10 a 30 mg/ml o desde aproximadamente 2 a 45 mg/ml, de 5 mg/ml a 45 mg/ml, de 5 a 35 mg/ml, de 5 a 25 mg/ml, de 5 a 20 mg/ml, de 20 a 40 mg/ml, o tal como desde aproximadamente 20 a 30 mg/ml,

Además, en realizaciones interesantes del mismo, así como en algunas otras realizaciones interesantes de la invención, el sacárido está presente en la composición en una cantidad que varía desde aproximadamente 3% p/p hasta aproximadamente 80% p/p, tal como desde aproximadamente 7% p/p hasta aproximadamente 75% p/p, de 10% a 70%, de 10% a 50%, de 20% a 50%, de 10% a 40%, o desde aproximadamente 10% p/p hasta aproximadamente 35% p/p.

El sacárido está presente en una cantidad que varía desde 5 mg/ml a 55 mg/ml, tal como desde aproximadamente 8 a 45 mg/ml, desde aproximadamente 10 a 40 mg/ml, desde aproximadamente 10 a 30 mg/ml, o desde aproximadamente 2 a 45 mg/ml, desde aproximadamente 5 mg/ml a 45 mg/ml, desde aproximadamente 5 a 35 mg/ml, desde aproximadamente 5 a 25 mg/ml, tal como desde aproximadamente 5 a 20 mg/ml.

Por otra parte, los presentes investigadores han reconocido que las cantidades adecuadas de antioxidante deben oscilar entre aproximadamente 0,05 y 10 mg/ml, tal como desde aproximadamente 0,1 a 5 mg/ml, de 0,1 mg/ml a 2,5 mg/ml, de 0,1 a 2 mg/ml o desde aproximadamente 0,1 a 1 mg/ml.

Es importante destacar que la relación entre el manitol y el sacárido se tiene que ajustar adecuadamente. En realizaciones adecuadas de la invención, dicho manitol está presente en una relación en peso con respecto a dicho sacárido que varía desde 10:1 a 1:2, y desde aproximadamente 6:1 a 1:2. Sin embargo, como observaron los presentes investigadores (véase el Ejemplo 5), la torta liofilizada se colapsó al incorporar mayores cantidades de sacáridos. Por ello, realizaciones muy adecuadas se refieren a aquellas en las que dicho alcohol de azúcar tiene una relación en peso con respecto a dicho sacárido que oscila desde aproximadamente 4:1 a 1:1, tal como desde aproximadamente 4:1 a 3:2 o desde aproximadamente 1:1 a 3:2.

En algunas realizaciones de la invención, el poliol es manitol y en aún otras realizaciones, el sacárido es sacarosa. Además, en otras realizaciones adicionales el antioxidante es metionina.

Las composiciones se pueden formular además de forma adecuada mediante la incorporación de otros excipientes farmacéuticamente aceptables, a fin de obtener composiciones aceptables para la administración parenteral, en particular, para la administración intravenosa. Los métodos reales para preparar composiciones para la administración parenteral serán conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y se describen con más detalle, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1995). El término "excipientes" incluye reactivos farmacéuticamente aceptables para proporcionar buenas propiedades de torta liofilizada (agentes volumétricos), así como para proporcionar lioprotección y crioprotección de la proteína, mantenimiento del pH, mantenimiento de una tonicidad aceptable, así como una conformación apropiada de la proteína durante el almacenamiento, de modo que se conserva una retención sustancial de la actividad biológica y la estabilidad de la proteína.

Por ello, las composiciones pueden comprender además un modificador de la tonicidad. El modificador de la tonicidad se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio y cloruro de calcio. Sin embargo, no se excluyen otros modificadores adecuados de la tonicidad. También se observa, que las composiciones pueden comprender concentraciones mucho más elevadas del agente modificador de la tonicidad, siempre y cuando la composición se vuelva isotónica o casi isotónica antes del uso (por ejemplo, ligeramente hipertónica o hipotónica), por ejemplo, las composiciones en masa no necesitan ser isotónicas con el valor fisiológico.

Una estabilización adicional de una composición que comprende un polipéptido del Factor VII se puede obtener mediante la adición de agentes tensioactivos. Por lo tanto, en realizaciones todavía interesantes de la invención, las composiciones comprenden adicionalmente un tensioactivo, que se selecciona a partir del grupo que consiste en polisorbatos, por ejemplo, Tween®, tal como polisorbato 20 o 80; alquil éteres de polioxietileno, por ejemplo, lauril éter de polioxilo 23 (Brij 35®) o poloxámeros, tales como poloxámero 188 (por ejemplo, Pluronic®) o poloxámero 407 (por ejemplo, Lutrol®) y otros polímeros en bloque de etileno/polipropileno, polietilenglicoles (PEG) tales como PEG8000, o normalmente, los tensioactivos se añaden en una cantidad de 0,005 a 5 mg/ml. Las cantidades preferidas son de 0,01 a 3 mg/ml, más preferiblemente de 0,01 a 0,3 mg/ml de Tween 20 y/o Tween 80 y de 0,05 a 3,0 mg/ml de Poloxámero 188.

En todavía otras realizaciones preferidas de la invención, la composición comprende adicionalmente otros excipientes farmacéuticos que actúan como un agente volumétrico. Es decir, que en las composiciones se incluyen agentes volumétricos distintos de manitol. En particular, los agentes volumétricos se incluyen en composiciones preparadas mediante secado por congelación.

Un contenido inicial en polipéptido del Factor VII en la composición es preferiblemente desde aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 10,0 mg/ml, tal como desde aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 6,0 mg/ml, desde aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml o desde aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml.

En una realización, la composición comprende: polipéptido del Factor VII, manitol, sacarosa y Tween 80, tiene un contenido en humedad no superior a aproximadamente el 3% y tiene un pH en el intervalo de 5,0 a 7,0, cuando la composición se disuelve en agua. En una realización, la composición comprende además uno o varios componentes seleccionados a partir de la lista: $CaCl_2$, NaCl y glicilglicina. En una realización, el polipéptido del Factor VII es Factor VIIa humano.

En una realización, la composición comprende: polipéptido del Factor VII, manitol, sacarosa, metionina y Tween 80, tiene un contenido en humedad que no es superior a aproximadamente el 3%, y tiene un pH en el intervalo de 5,0 a 7,0, cuando la composición se disuelve en agua. En una realización, la composición comprende además uno o varios componentes seleccionados a partir de la lista: $CaCl_2$, NaCl y glicilglicina. En una realización, el polipéptido del Factor VII es Factor VIIa humano.

En otra realización, la composición comprende polipéptido del Factor VII, manitol, sacarosa, histidina y Tween 80, tiene un contenido en humedad que no es superior a aproximadamente el 3% y tiene un pH en el intervalo de 5,0 a 7,0, cuando la composición se disuelve en agua. En una realización, la composición comprende además uno o varios componentes seleccionados a partir de la lista: $CaCl_2$, NaCl y glicilglicina. En una realización, el polipéptido del Factor VII es Factor VIIa humano.

En una realización, la composición comprende: polipéptido del Factor VII, manitol, sacarosa, metionina, histidina y Tween 80, tiene un contenido en humedad que no es superior a aproximadamente el 3% y tiene un pH en el intervalo de 5,0 a 7,0, cuando la composición se disuelve en agua. En una realización, la composición comprende además uno o varios componentes seleccionados a partir de la lista: CaCl2, NaCl y glicilglicina. En una realización, el polipéptido del Factor VII es Factor VIIa humano.

En otra realización, la composición comprende polipéptido del Factor VII, manitol, sacarosa y Poloxámero 188, tiene un contenido en humedad que no es superior a aproximadamente el 3%, y tiene un pH en el intervalo de 5,0 a 7,0, cuando la composición se disuelve en agua. En una realización, la composición comprende además uno o varios componentes seleccionados a partir de la lista: CaCl2, NaCl y glicilglicina. En una realización, el polipéptido del Factor VII es Factor VIIa humano.

En otra realización, la composición comprende polipéptido del Factor VII, manitol, sacarosa, metionina y Poloxámero 188, tiene un contenido en humedad que no es superior a aproximadamente el 3%, y tiene un pH en el intervalo de 5,0 a 7,0, cuando la composición se disuelve en agua. En una realización, la composición comprende además uno o varios componentes seleccionados a partir de la lista: CaCl2, NaCl y glicilglicina. En una realización, el polipéptido del Factor VII es Factor VIIa humano.

En otra realización, la composición comprende polipéptido del Factor VII, manitol, sacarosa, histidina y Poloxámero 188, tiene un contenido en humedad que no es superior a aproximadamente el 3%, y tiene un pH en el intervalo de 5,0 a 7,0, cuando la composición se disuelve en agua. En una realización, la composición comprende además uno o varios componentes seleccionados a partir de la lista: CaCl2, NaCl y glicilglicina. En una realización, el polipéptido del Factor VII es Factor VIIa humano.

En otra realización, la composición comprende polipéptido del Factor VII, manitol, sacarosa, histidina, metionina y Poloxámero 188, tiene un contenido en humedad que no es superior a aproximadamente el 3%, y tiene un pH en el intervalo de 5,0 a 7,0, cuando la composición se disuelve en agua. En una realización, la composición comprende además uno o varios componentes seleccionados a partir de la lista: CaCl2, NaCl y glicilglicina. En una realización, el polipéptido del Factor VII es Factor VIIa humano.

En otras realizaciones, la composición es como se muestra en la Tabla A, a continuación.

Tabla A

Compuesto	Formulación A	Formulación B	Formulación C	Formulación D
Polipéptido FVII	0,6 a 10 mg/ml	0,6 a 10 mg/ml	0,6 a 10 mg/ml	0,6 a 10 mg/ml
$CaCl_2$ x $2H_2O$	5 a 20 mM	5 a 20 mM	5 a 20 mM	5 a 20 mM
NaCl	0 - 50 mM	0 - 50 mM	0 - 50 mM	0 - 50 mM
Glicilglicina	0 - 15 mM	0 - 15 mM	0 - 15 mM	0 - 15 mM
L-Histidina	0 - 20 mM	0 - 20 mM	0 - 20 mM	0 - 20 mM
Manitol	20 a 40 mg/ml	20 a 40 mg/ml	20 a 40 mg/ml	20 a 40 mg/ml
Sacarosa	5 a 20 mg/ml	-	-	5 a 20 mg/ml
Metionina	0 - 1 mg/ml	0 - 1 mg/ml	0 - 1 mg/ml	0 - 1 mg/ml
Tween 80	0,05 a 0,15 mg/ml	0,05 a 0,15 mg/ml		
Poloxámero 188	-	-	0,5 - 3 mg/ml	0,5 - 3 mg/ml
pH	5,0 a 7,0	5,0 a 7,0	5,0 a 7,0	5,0 a 7,0

En otras realizaciones, las composiciones son como se muestran en la Tabla B, a continuación

Tabla B

Compuesto	Formulación E	Formulación F	Formulación G	Formulación H
Polipéptido FVIIa	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml
$CaCl_2$ x $2H_2O$	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
NaCl	39 mM	39 mM	39 mM	39 mM
Glicilglicina	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
Manitol	25 mg/ml	25 mg/ml	25 mg/ml	25 mg/ml
Sacarosa	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml
Metionina	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml,	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml
Tween 80	0,1 mg/ml	-	0,1 mg/ml	-
Poloxámero 188	-	1,0 mg/ml		1,0 mg/ml
L-Histidina	-	-	10 mM	10 mM
pH	6,0	6,0	6,0	6,0

Tabla B (continuación)

Compuesto	Formulación I	Formulación J	Formulación K	Formulación L
Polipéptido FVII	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml
$CaCl_2$ x $2H_2O$	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
NaCl	39 mM	39 mM	39 mM	39 mM
Glicilglicina	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
Manitol	25 mg/ml	25 mg/ml	25 mg/ml	25 mg/ml
Sacarosa	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml
Metionina	-	-	-	-
Tween 80	0,1 mg/ml	-	0,1 mg/ml	-
Poloxámero 188	-	1,0 mg/ml		1,0 mg/ml
L-Histidina	-	-	10 mM	10 mM
pH	6,0	6,0	6,0	6,0

En otras realizaciones E1 - L1, las composiciones contienen excipientes y cantidades de los mismos como se indica

en la Tabla B anterior, pero se formulan a pH 5,9.

En otras realizaciones E2 - L2, las composiciones contienen excipientes y cantidades de los mismos como se indica en la Tabla B anterior, pero se formulan a pH 5,8.

En otras realizaciones E3 - L3, las composiciones contienen excipientes y cantidades de los mismos como se indica en la Tabla B anterior, pero se formulan a pH 5,7.

En otras realizaciones E4 - L4, las composiciones contienen excipientes y cantidades de los mismos como se indica en la Tabla B anterior, pero se formulan a pH 5,6.

En otras realizaciones E5 - L5, las composiciones contienen excipientes y cantidades de los mismos como se indica en la Tabla B anterior, pero se formulan a pH 5,5.

Como se ha expuesto anteriormente, los presentes investigadores han proporcionado un método para estabilizar polipéptidos del Factor VII activado, proporcionando las proteínas en composiciones sólidas que comprenden excipientes seleccionados farmacéuticamente aceptables, entre los cuales es importante incluir un agente estabilizador.

Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para preparar un polipéptido estable del Factor VII activado. El método comprende las etapas de:

i) proporcionar dicho polipéptido del Factor VII activado en una solución que comprende una combinación de manitol y un sacárido seleccionado a partir del grupo que consiste en sacarosa, dextrosa, lactosa, maltosa, trealosa, ciclodextrinas, maltodextrinas y dextranos;

en donde el polipéptido del Factor VII activado está presente en una concentración de 0,6 mg/ml a 10,0 mg/ml; el manitol está presente en una concentración de 5 mg/ml a 55 mg/ml; el sacárido está presente en una concentración de 5 mg/ml a ff mg/ml; y la relación en peso entre el manitol y el sacárido (manitol:sacárido) es de 20:1 a 1:5;

ii) procesar dicha solución para obtener una composición sólida con un contenido en humedad no superior al 3% p/p, en donde dicho procesamiento comprende secado por congelación.

En realizaciones particularmente interesantes del mismo, el método comprende que un antioxidante se selecciona a partir del grupo que consiste en homocisteína, cisteína, cistationina, metionina, glutatión, y péptidos que contienen uno cualquiera entre homocisteína, cisteína, cistationina, metionina y glutatión. En una realización preferida, el antioxidante es metionina. En realizaciones preferibles, el sacárido es sacarosa. Además, en realizaciones aún preferibles del mismo, el antioxidante es metionina.

Preferiblemente, el contenido en sacárido y opcionalmente el contenido en antioxidante en dicha solución i) debe ajustarse de forma que se consigan polipéptidos del Factor VII más estabilizados.

Según la invención, el sacárido debe estar presente en una cantidad que varía desde 5 mg/ml a 55 mg/ml, tal como desde aproximadamente 8 a 45 mg/ml, desde aproximadamente 10 a 40 mg/ml, desde aproximadamente 10 a 30 mg/ml o desde aproximadamente 2 a 45 mg/ml, desde aproximadamente 5 mg/ml a 45 mg/ml, desde aproximadamente 5 a 35 mg/ml, desde aproximadamente 5 a 25 mg/ml, tal como desde aproximadamente 5 a 20 mg/ml.

Según la invención, el manitol debe estar presente en una cantidad que varía desde 5 mg/ml a 55 mg/ml, tal como desde aproximadamente 8 a 45 mg/ml, desde aproximadamente 10 a 40 mg/ml, desde aproximadamente 10 a 30 mg/ml o desde aproximadamente 2 a 45 mg/ml, desde aproximadamente 5 mg/ml a 45 mg/ml, desde aproximadamente 5 a 35 mg/ml, desde aproximadamente 5 a 25 mg/ml, tal como desde aproximadamente 5 a 20 mg/ml.

El antioxidante debe proporcionarse en una cantidad que varía desde aproximadamente 0,05 a 10 mg/ml, preferiblemente desde aproximadamente 0,1 a 5 mg/ml, más preferiblemente desde aproximadamente 0,1 mg/ml a 2,5 mg/ml, incluso más preferiblemente desde aproximadamente 0,1 a 2 mg/ml, lo más preferiblemente desde aproximadamente 0,1 a 1 mg/ml.

El método para preparar un polipéptido estable del Factor VII activado comprende la liofilización. La liofilización se refiere a un proceso en el que la solución que comprende dicho polipéptido del Factor VII se introduce en viales de liofilización o similares. Dicho polipéptido del Factor VII se puede someter opcionalmente a filtración estéril antes del inicio de la liofilización. La refrigeración se aplica a los estantes del liofilizador para congelar los viales y la solución por debajo de temperaturas críticas del producto. El agua se elimina mediante la introducción de vacío y la condensación de vapor de agua en el condensador de hielo del liofilizador. Cuando el producto está seco, por lo general menos del 3% de contenido en humedad residual (por ejemplo, medido por la valoración culombimétrica de Karl Fischer, como se ha descrito anteriormente), los viales se cierran y se taponan. La preparación finaliza y la composición se encuentra ahora en forma de torta liofilizada.

Tales composiciones, cuando se administran a un paciente por medios inyectables, se tienen que reconstituir en un líquido adecuado antes del uso. También se pueden reconstituir para otros fines, por ejemplo, para una reformulación en otras composiciones farmacéuticas. Sin embargo, la presente invención no excluye que las composiciones

se puedan administrar a un paciente en su forma sólida.

Las composiciones se reconstituyen usando un diluyente o un vehículo aceptable, preferiblemente estéril, preferiblemente un vehículo acuoso. Se puede utilizar una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua (por ejemplo, agua para inyección/WFI), agua tamponada, solución salina (por ejemplo, solución salina al 0,4%), glicina (por ejemplo, glicina al 0,3%), histidina y similares. El diluyente para la reconstitución también puede contener una o varias sales, tales como una sal de calcio (por ejemplo, CaCl2) o una combinación de una sal de sodio y una sal de calcio (por ejemplo, NaCl y CaCl2).

Las composiciones reconstituidas están destinadas a la administración parenteral para un tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran parenteralmente, es decir, por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular, o se administran por medio de infusión continua o intermitente.

Por lo tanto, otro aspecto adicional de la invención se refiere a una composición de la invención para el uso en el tratamiento de un síndrome sensible al Factor VII, en donde dicho síndrome se selecciona a partir del grupo que consiste en hemofilia A, hemofilia B, carencia de Factor XI, carencia de Factor VII, trombocitopenia, enfermedad de von Willebrand, presencia de un inhibidor del factor de coagulación, cirugía, traumatismo y terapia anticoagulante.

Como se ha indicado, la composición está en forma sólida. Por consiguiente, en una realización adecuada, el medicamento debe ser adecuado para estar disuelto, lo que permite una administración parenteral del medicamento. De este modo, cuando se administran las composiciones a un paciente, se incluye la etapa de disolver la composición en un líquido adecuado antes de la etapa de administración.

Abreviaturas utilizadas en este documento:

FVII	Factor VII de coagulación en su forma de cadena sencilla
FVIIa	Factor VII de coagulación en su forma escindida, activa, de dos cadenas
rFVII (rFVIIa)	Factor VII recombinante (Factor VIIa recombinante)

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, no a modo de limitación:

Ejemplos

Ejemplo 1

Se muestran composiciones que comprenden polipéptidos del Factor VII y que se preparan de acuerdo con el Ejemplo 2. Se muestran excipientes típicos y sus cantidades típicas.

La Tabla 1 muestra la concentración de ingrediente activo y de excipientes en el caso en el que la composición esté en forma líquida, es decir, en la composición antes de finalizar la preparación (por ejemplo, al finalizar la liofilización), o en la solución reconstituida.

La Tabla 2 muestra la concentración de ingrediente activo y de excipientes en el caso en el que la composición esté en forma sólida, es decir, en forma liofilizada.

Tabla 1. Composiciones, contenido en excipientes en solución.

Función principal:	Excipientes:	Contenido (mg/ml) en la composición líquida
Ingrediente Activo	rFVIIa	0,6 - 5
Modificador de la tonicidad	Cloruro de Sodio	0 - 4
Modificador/estabilizador de la tonicidad	Cloruro de Calcio, $2H_2O$	1 - 7
Agente tamponador	Glicilglicina	1,32 (0 - 1,5)
Agente tensioactivo	Polisorbato 80	0,05 - 2
Agente volumétrico/Crioprotector/lioprotector	Manitol	10 - 40
Agente volumétrico/Crioprotector/lioprotector	Sacarosa	10 - 40

Función principal:	Excipientes:	Contenido (mg/ml) en la composición líquida
Antioxidante	Metionina	0 - 1,0
	pH	5 - 6

Tabla 2. Composiciones, contenido de excipientes en forma liofilizada.

Función principal:	Excipientes:	Contenido (% p/p) en la composición sólida
Ingrediente Activo	rFVIIa	0,6 - 19
Modificador de la tonicidad	Cloruro de Sodio	0 - 15
Modificador/estabilizador de la tonicidad	Cloruro de Calcio, $2H_2O$	1,0 - 24,0
Agente tampón	Glicilglicina	0 - 6,0
Agente tensioactivo	Polisorbato 80	0,05 - 8,0
Agente volumétrico /Crioprotector/lioprotector	Manitol	13 - 76
Agente volumétrico/Crioprotector/lioprotector	Sacarosa	13 - 76
Antioxidante	Metionina	0 - 4,2
	pH	5 - 6

Ejemplo 2

Preparación de las composiciones

En general, las composiciones se prepararon a partir de una solución en masa purificada. Se añadieron los excipientes y la solución se diluyó hasta la concentración deseada de rFVIIa. La solución resultante se esterilizó por filtración usando un filtro de membrana esterilizado (tamaño de poro de 0,2 micras o equivalente) y se introdujo en viales de vidrio estériles. Los viales se liofilizaron, se taparon y se sellaron con tapas de aluminio de tipo flip-off.

Ejemplo 3

Las composiciones 1-19 que comprenden diversas cantidades de cloruro de sodio, manitol, sacarosa y metionina y tienen diversos valores de pH, se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Las composiciones comprendían concentraciones fijas de Factor VII (1,0 mg/ml), cloruro de calcio, $2H_2O$ (1,47 mg/ml), glicilglicina (1,32 mg/ml) y Polisorbato 80 (1,0 mg/ml).

Tabla 3. Composiciones 1-19.

Composición 1-19. Contenido en excipientes mg/ml					
Nº de Composición	NaCl	Manitol	Sacarosa	Metionina	pH
1	0	10	10	0	6,0
2	3,5	10	10	0	5,0

Composición 1-19. Contenido en excipientes mg/ml					
Nº de Composición	NaCl	Manitol	Sacarosa	Metionina	pH
3	0	40	10	0	5,0
4	3,5	40	10	0	6,0
5	0	10	40	0	5,0
6	3,5	10	40	0	6,0
7	0	40	40	0	6,0
8	3,5	40	40	0	5,0
9	0	10	10	0,5	5,0
10	3,5	10	10	0,5	6,0
11	0	40	10	0,5	6,0
12	3,5	40	10	0,5	5,0
13	0	10	40	0,5	6,0
14	3,5	10	40	0,5	5,0
15	0	40	40	0,5	5,0
16	3,5	40	40	0,5	6,0
17	1,75	25	25	0,25	5,5
18	1,75	25	25	0,25	5,5
19	1,75	25	25	0,25	5,5

Ejemplo 4

Métodos analíticos utilizados para determinar los parámetros que indican estabilidad:

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

Columna de HPLC: columna de 4,5x250 mm rellena con sílice unido a butilo con un tamaño de partícula de 5 µm y tamaño de poro 300 Å. Temperatura de la columna: 70°C. Eluyente A: agua 99,9% v/v y ácido trifluoroacético 0,1% v/v. Eluyente B: acetonitrilo 80% v/v, ácido trifluoroacético 0,09% v/v y agua 19,91% v/v. La columna se eluyó con un gradiente lineal desde X% de B a (X + 13)% de B en 30 minutos. Caudal: 1,0 ml/min. Detección: 214 nm.

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

El contenido en formas oxidadas se expresa como el porcentaje de la cantidad inicial de Factor VII en la composición en la preparación, que se recupera como formas oxidadas del Factor VII.

B. Determinación de agregados de polipéptidos del Factor VII mediante cromatografía de permeación en gel de alto rendimiento (GP-HPLC).

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

El contenido en agregados se expresa como el porcentaje de la cantidad inicial de Factor VII en la composición en la preparación, que se recupera como formas dímeras, oligómeras y polímeras del Factor VII.

Ejemplo 5

El contenido en formas oxidadas del Factor VIIa después de la terminación del proceso de liofilización y en el almacenamiento:

Las composiciones 1-19 del Ejemplo 3 se analizaron por el método A (Ejemplo 4) para estudiar el contenido en formas oxidadas al terminar la liofilización y en los 2 y 8 meses de almacenamiento a 30°C.

Tabla 4. Contenido en formas oxidadas y su incremento en el almacenamiento durante 8 meses.

% del contenido inicial en Factor VIIa recuperado como formas oxidadas				
Nº de la Composición	0	2	8	incremento de 0-8 meses
1	2,5	3,5	4,8	2,3
2	2,7	3	6,1	3,4
3	2,3	3,7	7	4,7
4	2,7	5,5	12	9,3
5	2,6	3,6	5,3	2,7
6	2,7	3,3	5,8	3,1
7	3	3,5	5,2	2,2
8	2,3	2,9	3,4	1,1
9	1,6	1,5	1,7	0,1
10	1,7	1,7	2,1	0,4
11	1,7	1,8	2,5	0,8
12	1,6	1,6	1,9	0,3
13	1,7	1,6	1,7	0
14	1,6	1,5	1,6	0
15	1,6	1,5	1,8	0,2
16	1,7	1,6	1,8	0,1
17	1,7	1,6	n.a.	n.a.

% del contenido inicial en Factor VIIa recuperado como formas oxidadas				
Nº de la Composición	0	2	8	incremento de 0-8 meses
18	1,7	1,6	1,9	0,2
19	1,7	1,6	1,8	0,1
n.a. no analizada				

Un análisis estadístico muestra que las composiciones que comprenden metionina son más estables frente a la degradación oxidativa.

Ejemplo 6

El contenido en agregados del Factor VIIa después de la terminación del proceso de liofilización y en el almacenamiento:

Las composiciones 1-19 del Ejemplo 3 se analizaron por el método B (Ejemplo 4) para estudiar el contenido en agregados al finalizar la liofilización y en los 2 y 8 meses de almacenamiento a 30°C.

Tabla 5. Contenido en agregados y su aumento en el almacenamiento durante 8 meses.

% del contenido inicial en Factor VIIa recuperado como agregados				
Nº de la Composición	0	2	8	incremento de 0-8 meses
1	0,7	0,8	0,9	0,2
2	1	2	2,9	1,9
3	1,5	2,5	3,5	2
4	1,1	2,1	3,1	2
5	0,8	1	1,1	0,3
6	0,8	1,2	1,1	0,3
7	0,9	1	0,9	0
8	0,9	1	1,2	0,3
9	0,9	1	1,1	0,2
10	0,8	1,7	2,5	1,7
11	1	1,2	1,5	0,5
12	1,3	2	2,8	1,5
13	0,7	0,8	0,9	0,2
14	1	1,7	1,4	0,4

% del contenido inicial en Factor VIIa recuperado como agregados				
Nº de la Composición	0	2	8	incremento de 0-8 meses
15	1,1	1,4	1,5	0,4
16	0,8	0,9	1	0,2
17	0,9	1,1	n.a.	n.a.
18	0,8	1	1,5	0,7
19	1	1	1,1	0,1
n.a. no analizada				

Un análisis estadístico muestra que la presencia de sacarosa en las composiciones es importante para disminuir la formación de agregados.

Ejemplo 7

Contenido en formas dímeras y oligómeras del Factor VIIa después de la terminación del proceso de liofilización:

La composición A que comprende poliol y sacárido tal y como se indica en la tabla siguiente, se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. La composición comprendía además Factor VIIa (1,0 mg/ml), cloruro de calcio 2 H_2O (1,47 mg/ml), glicilglicina (1,32 mg/ml) y polisorbato 80 (0,7 mg/ml). El pH era 5,0.

La composición A se analizó mediante el método B (Ejemplo 4) para estudiar el contenido en agregados al finalizar la liofilización y en los 1 y 2 meses de almacenamiento a 30°C. La tabla muestra el % del contenido inicial en Factor VIIa recuperado como agregados:

Tabla 6

% del contenido inicial en Factor VIIa recuperado en forma de agregados				
Composición	Aditivos	Meses		
		0	1	2
A	Manitol 25 mg/ml	1,1	2,0	1,7
	Trehalosa 15 mg/ml			

Ejemplo 8

Se muestra la estabilidad estructural de la torta liofilizada para diversas composiciones, 1-19, véase el Ejemplo 3. La relación de manitol a sacarosa se indica para cada composición.

Tabla 7. Estabilidad de la torta liofilizada de acuerdo con la relación entre manitol y sacarosa

	Composiciones			
	5, 6, 13, 14	1, 2, 7, 8, 9, 10, 15, 16	17, 18 y 19	3, 4, 11, 12
Relación en peso man:sac	1:4	1:1	1:1	4:1

	Composiciones			
	5, 6, 13, 14	1, 2, 7, 8, 9, 10, 15, 16	17, 18 y 19	3, 4, 11, 12
Torta liofilizada	C	OK	OK	OK
C: torta colapsada, man: manitol, sac: sacarosa, OK: ligeramente colapsada o no colapsada				

Ejemplo 9

Se prepararon las siguientes formulaciones tal como se ha descrito en el ejemplo 2, usando volúmenes de llenado de 1 y 5 ml:

Formulación	**A**	**B**	**C**
rFVIIa (mg/ml)	0,6	1,0	1,0
$CaCl_2$ (mM)	10	10	10
Glicilglicina	10	10	10
L-Histidina (mM)	-	10	10
NaCl (mM)	50	39	39
Tween 80 (mg/ml)	0,038	0,07	0,07
Metionina (mg/ml)	-	0,5	2,0
Manitol (mg/ml)	30	25	25
Sacarosa (mg/ml)	-	10	10
pH	5,5	5,5	5,5

La estabilidad de las formulaciones se analizó a 25°C, 30°C y 40°C y se obtuvieron los siguientes resultados. Los viales se reconstituyeron en agua antes del análisis.

Formas dímeras y oligómeras

El contenido en formas dímeras y oligómeras se midió mediante GP-HPLC como se ha descrito en el ejemplo 4. Todos los resultados se expresan en %.

5 ml de volumen de llenado:

Formulación	**0 meses**	**½ mes**	**1 mes**	**3 meses**			**6 meses**
		40°C	**40°C**	**40°C**	**30°C**	**25°C**	**25°C**
A	3,3	5,5	6,4	8,0	6,0	6,3	6,3
B	2,3	2,7	2,8	3,0	2,7	3,2	3,0
C	4,0	4,2	4,6	4,7	4,3	4,4	4,4

1 ml de volumen de llenado:

Formulación	0 meses	3 meses		
		40°C	30°C	25°C
A	2,7	11,0	7,0	6,5
B	2,2	7,4	3,4	2,9
C	3,3	6,9	3,8	3,7

Además, el contenido en formas agregadas para la formulación A (= Ref) y la formulación B (= Nuevo), volumen de llenado 5 ml, se puede ver en la Figura 2a.

Formas oxidadas

El contenido en formas oxidadas se midió mediante RP-HPLC tal y como se ha descrito en el ejemplo 4.

5 ml de volumen de llenado:

Formulación	**0 meses**	**½ mes**	**1 mes**	**3 meses**			**6 meses**
		40°C	**40°C**	**40°C**	**30°C**	**25°C**	**25°C**
A	2,1	2,8	3,4	4,0	3,4	3,1	3,5
B	1,3	1,3	1,6	1,3	1,6	1,6	1,4
C	1,2	1,4	1,6	1,8	1,6	1,6	1,3

1 ml de volumen de llenado:

Formulación	**0 meses**	**3 meses**		
		40°C	**30°C**	**25°C**
A	2,5	4,6	4,0	5,3
B	1,3	2,0	1,1	1,8
C	1,3	1,8	1,7	1,5

Además, el contenido en formas oxidadas para la formulación A (= Ref) y la formulación B (= Nuevo), volumen de llenado 5 ml, se puede ver en la Figura 2b.

Actividad

La actividad se midió mediante el ensayo de coagulación en una etapa como se describe en el ejemplo 12, para formulaciones que se habían almacenado a 30°C durante 3 meses. La actividad específica se calculó basándose en el contenido en rFVIIa en las formulaciones y se obtuvieron los siguientes resultados:

Formulación	Actividad específica (UI/mg)
A	50523
B	58373
C	60318

Interpretación de los resultados:

Los resultados muestran que las formulaciones B y C, que contienen manitol, sacarosa y metionina son más estables - es decir, muestran un aumento más lento del contenido en formas dímeras y oligómeras y formas oxidadas. Por lo tanto, las actividades de estas formulaciones son más elevadas, tal y como se midió después de un periodo de almacenamiento de 3 meses a 30°C.

Ejemplo 10

Se prepararon las siguientes formulaciones tal como se ha descrito en el ejemplo 2, usando un volumen de llenado de 5 ml.

Formulación	A	B	C	D	E
rFVIIa (mg/ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
$CaCl_2$ (mM)	10	10	10	10	10
Glicilglicina (mM)	10	10	10	10	10
L-Histidina (mM)	10	10	10	10	10
NaCl (mM)	39	39	39	39	39
Metionina (mg/ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tween 20 (mg/ml)	0,1				
Tween 80 (mg/ml)		0,1			
Poloxámero 188 (mg/ml)			1,0		
Brij 35 (mg/ml)				0,1	
Manitol (mg/ml)	25	25	25	25	25
Sacarosa (mg/ml)	10	10	10	10	10
pH	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5

Los viales se reconstituyeron en agua y se sometieron a agitación durante 19 horas con el fin de someter a ensayo la estabilidad física de las formulaciones. El efecto de la agitación se analizó mediante inspección visual y medición de la absorbancia UV a 400 nm (= Abs en la tabla a continuación). Los siguientes resultados muestran claramente el aumento de la estabilidad física obtenida por adición de un detergente.

	Antes de agitar		Después de agitar	
Formulación	**Apariencia visual**	**Abs**	**Apariencia visual**	**Abs**
A	Líquido transparente	0,01	Líquido transparente con pocas partículas	0,01
B	Líquido transparente	0,00	Ligeramente turbio	0,36
C	Líquido transparente	0,00	Líquido transparente con pocas partículas	0,00
D	Líquido transparente	0,00	Líquido transparente con pocas partículas	0,00
E	Líquido transparente	0,01	Turbio	2,18

Ejemplo 11

Se prepararon seis formulaciones tal y como se ha descrito en el ejemplo 2. La composición de las formulaciones era:

rFVIIa	1,0 mg/ml
$CaCl_2$	10 mM
Glicilglicina	10 mM
L-histidina	10 mM
NaCl	39 mM
Tween 80	0,07 mg/ml
Manitol	25 mg/ml
Sacarosa	10 mg/ml

Cada una de las seis formulaciones se ajustó a un pH diferente:

Formulación A: pH 5,0

Formulación B: pH 5,5

Formulación C: pH 6,0

Formulación D: pH 6,5

Formulación E: pH 7,0

Formulación F: pH 7,5

La estabilidad de las seis formulaciones se investigó en viales almacenados a 25°C y 40°C. Se obtuvieron los resultados mostrados en las Tablas a continuación (y en la Figura 1a y 1b).

Formulación	Formas dímeras y oligómeras (agregados) (%)		
	0 MESES	40°C / 3 MESES	25°C / 3 MESES
A	2,2	3,8	2,5
B	1,7	3,2	1,9
C	1,5	2,7	1,7
D	1,1	1,9	1,3
E	0,8	1,6	1,0
F	0,8	1,6	1,0

Formulación	Formas oxidadas (%)		
	0 MESES	40°C / 3 MESES	25°C / 3 MESES
A	2,7	3,3	3,4
B	N/A	4,0	3,6
C	2,6	5,0	3,7
D	2,5	4,9	3,6
E	2,6	10,0	4,6
F	2,6	8,7	4,7

El contenido en formas dímeras y oligómeras y formas oxidadas se determinó tal y como se ha descrito en el ejemplo 4.

Ejemplo 12

Ensayos para someter a ensayo la actividad biológica de los polipéptidos del Factor VII:

Prueba de la actividad del Factor VIIa:

Un ensayo adecuado para someter a ensayo la actividad del Factor VIIa y de este modo seleccionar variantes del Factor VIIa, se puede realizar como un ensayo preliminar sencillo in vitro: (el “Ensayo de Hidrólisis in vitro”).

Ensayo de Hidrólisis in vitro

Factor VIIa natural (de tipo silvestre) y una variante del Factor VIIa (ambos denominados en lo sucesivo "Factor VIIa") se pueden someter a ensayo para estudiar actividades específicas. También se pueden someter a ensayo en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se lleva a cabo en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). El sustrato cromogénico D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilida (S-2288, Chromogenix, Suecia), concentración final 1 mM, se añade al Factor VIIa (concentración final 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. La absorbancia a 405 nm se mide continuamente en un lector de placas SpectraMax® 340 (Molecular Devices, EE.UU.). La absorbancia desarrollada durante un periodo de incubación de 20 minutos, después de la sustracción de la absorbancia en un pocillo de blanco que no contenía enzima, se utiliza para calcular la relación entre las actividades de la variante de Factor VII y el Factor VII de tipo silvestre:

Relación = (A405 nm de la variante del Factor VIIa)/(A405 nm del Factor VIIa de tipo silvestre)

Basándose en ello, se pueden identificar variantes del Factor VIIa con una actividad comparable o superior a la del Factor VIIa natural, como por ejemplo, variantes en las que la relación entre la actividad de la variante y la actividad del Factor VII natural (FVII de tipo silvestre) es aproximadamente 1,0 o superior.

La actividad de las variantes del Factor VIIa o del Factor VIIa también se puede medir usando un sustrato fisiológico tal como el Factor X, de forma adecuada a una concentración de 100-1000 nM, en donde el Factor Xa generado se mide después de la adición de un sustrato cromogénico adecuado (p. ej. S-2765) ("el Ensayo de Proteólisis in vitro"). Además, el ensayo de la actividad se puede ejecutar a temperatura fisiológica.

Ensayo de Proteólisis in vitro

Factor VIIa natural (de tipo silvestre) y variante del Factor VIIa (ambos denominados en lo sucesivo "Factor VIIa") se sometieron a ensayo en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se lleva a cabo en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). Factor VIIa (10 nM) y Factor X (0,8 microM) en 100 microL 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, se incuban durante 15 min. La escisión del Factor X se detiene a continuación mediante la adición de 50 microlitros 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. La cantidad de Factor Xa generada se mide mediante la adición del sustrato cromogénico Z-D-Arg-Gly-Arg-p-nitroanilida (S-2765, Chromogenix, Suecia), concentración final 0,5 mM. La absorbancia a 405 nm se mide continuamente en un lector de placas SpectraMax® 340 (Molecular Devices, EE.UU.). La absorbancia desarrollada durante 10 minutos, después de la sustracción de la absorbancia en un pocillo de blanco que no contiene FVIIa, se utiliza para calcular la relación entre las actividades proteolíticas de la variante y del Factor VIIa de tipo silvestre:

Relación = (A405 nm de la variante del Factor VIIa)/(A405 nm del Factor VIIa de tipo silvestre)

Basándose en ello, se pueden identificar variantes del Factor VIIa con una actividad comparable o superior a la del Factor VIIa natural, como por ejemplo, variantes en las que la relación entre la actividad de la variante y la actividad del Factor VII natural (FVII de tipo silvestre) es aproximadamente 1,0 o superior.

Ensayo de generación de trombina:

La capacidad del Factor VII o de polipéptidos relacionados con el Factor VII o del Factor VIII o polipéptidos relacionados con el Factor VIII (por ejemplo, variantes) para generar trombina, se puede medir en un ensayo que comprende todos los Factores de coagulación pertinentes e inhibidores, a concentraciones fisiológicas y plaquetas activadas (tal y como se describe en la pág. 543 en Monroe et al. (1997) Brit. J. Haematol. 99, 542-547 que se incorpora en esta memoria como referencia).

Ensayo de coagulación:

La actividad de los polipéptidos del Factor VII también se puede medir usando un ensayo de coagulación de una etapa (ensayo 4), esencialmente como se describe en el documento WO 92/15686 o en US 5.997.864. Brevemente, la muestra que se va a someter a ensayo se diluye en Tris 50 mM (pH 7,5), 0,1% de BSA y 100 µl se incuban con 100 µl de plasma que carece de Factor VII y 200 µl de tromboplastina C que contiene Ca2+ 10 mM. Los tiempos de coagulación se miden y se comparan con una curva estándar, usando un patrón de referencia o una agrupación de plasma humano normal citratado en dilución en serie.

Aunque no sea según la invención tal como se reivindica, en este documento también se describen los siguientes aspectos de composiciones y métodos:

1. Una composición que comprende un polipéptido del Factor VII y al menos un agente estabilizante seleccionado del grupo que consiste en

a) una combinación de un antioxidante y manitol;

b) una combinación de metionina y un poliol;

c) una combinación de un sacárido y manitol;

d) una combinación de sacarosa y un poliol; y

e) metionina,

en donde dicha composición tiene un contenido en humedad no superior a aproximadamente el 3%.

2. La composición según el aspecto 1, en donde la combinación de un antioxidante y manitol comprende además un sacárido.

3. La composición según el aspecto 1, en donde la combinación de metionina y un poliol comprende además un sacárido.

4. La composición según el aspecto 1, en donde la combinación de un sacárido y manitol comprende además un antioxidante.

5. La composición según el aspecto 1, en donde la combinación de sacarosa y un poliol comprende además un antioxidante.

6. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, en donde el antioxidante se selecciona a partir del grupo que consiste en homocisteína, cisteína, cistationina, metionina, glutatión, y péptidos que contienen uno cualquiera entre homocisteína, cisteína, cistationina, metionina y glutatión.

7. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, en donde el sacárido se selecciona a partir del grupo que consiste en sacarosa, dextrosa, lactosa, maltosa, trealosa, ciclodextrinas, maltodextrinas y dextranos.

8. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, en donde el poliol se selecciona a partir del grupo que consiste en manitol, sorbitol y xilitol.

9. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, en donde la composición es estable de modo que no más de aproximadamente el 5% p/p del contenido inicial en polipéptido del Factor VII se convierte en agregados en el almacenamiento de dicha composición a 30°C durante 8 meses, peferiblemente no más de aproximadamente el 4,0% p/p, 3,0% p/p, 2,5% p/p, 2,0% p/p, 1,5% p/p o no más de aproximadamente el 1,0% p/p.

10. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, en donde la composición es estable de modo que no más de aproximadamente el 6% p/p del contenido inicial en polipéptido del Factor VII se convierte en formas oxidadas en el almacenamiento de dicha composición a 30°C durante 8 meses, peferiblemente no más de aproximadamente el 5% p/p, 4,0% p/p, 3,0% p/p, 2,5% p/p, 2,0% p/p o no más de aproximadamente el 1,5% p/p.

11. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicho poliol está presente en una cantidad que varía de aproximadamente el 5% p/p al 90% p/p, preferiblemente de aproximadamente el 18% p/p al 88% p/p, del 18% al 83%, del 25% al 80%, del 40% al 80%, del 50% al 80%, o de aproximadamente el 50% p/p al 70% p/p.

12. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicho sacárido está presente en una cantidad que varía de aproximadamente el 0 al 85% p/p, preferiblemente de aproximadamente el 3% p/p al 80% p/p, del 7% al 75%, del 10% al 70%, del 10% al 50%, del 10% al 40%, o de aproximadamente el 10% p/p al 35% p/p.

13. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicho poliol está presente en una relación en peso respecto a dicho sacárido que varía de aproximadamente 100:1 a 1:50, preferiblemente de aproximadamente 50:1 a 1:10; de 20:1 a 1:5; de 10:1 a 1:2; de 6:1 a 1:2; de 4:1 a 1:1; o de aproximadamente 4:1 a 3:2.

14. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, que comprende además un agente adecuado para mantener el pH de dicha composición en el intervalo de 3 a 9 cuando se disuelve en un disolvente acuoso, preferiblemente el pH está en el intervalo de 4 a 7, más preferido en el intervalo de 4,5 a 6,5, aún más preferido en el intervalo de 5 a 6.

15. La composición según el aspecto 14, en donde dicho agente se selecciona a partir del grupo que consiste en citrato, acetato, histidina, malato, fosfato, ácido tartárico, ácido succínico, MES, HEPES, PIPES, imidazol, TRIS, lactato, glutamato y glicilglicina.

16. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, que comprende además un modificador de la tonicidad.

17. La composición según el aspecto 16, en donde el modificador de la tonicidad se selecciona a partir del grupo que consiste en acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio y cloruro de calcio.

18. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, que comprende además un tensioactivo.

19. La composición según el aspecto 18, en donde el tensioactivo se selecciona a partir del grupo que consiste en polisorbatos, tales como polisorbato 20 u 80; éteres alquílicos de polioxietileno tales como Brij 35® o poloxámeros tales como Poloxámero 188 o 407; y otros copolímeros en bloque de etileno/propileno o polietilenglicol (PEG) tal como PEG8000.

20. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, que comprende además otros excipientes farmacéuticos que actúan como un agente volumétrico.

21. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, en donde el sacárido es sacarosa.

22. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, en donde el poliol es manitol.

23. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, en donde el polipéptido del Factor VII se selecciona a partir del grupo que consiste en Factor VIIa humano, Factor VIIa humano recombinante y una variante de la secuencia del Factor VII.

24. La composición según el aspecto 23, en donde el polipéptido del Factor VII es Factor VIIa humano o Factor VIIa humano recombinante.

25. La composición según uno cualquiera de los aspectos 1-23, en donde el polipéptido del Factor VII es un polipéptido relacionado con el Factor VII en donde la relación entre la actividad de dicho polipéptido relacionado con el Factor VII y del Factor VII de tipo silvestre es al menos de 1,25 cuando se somete a ensayo en uno o más de entre el "Ensayo de Proteólisis in vitro" y el "Ensayo de Hidrólisis in vitro" tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

26. La composición según uno cualquiera de los aspectos 23 a 25, en donde el polipéptido del Factor VII está presente en una concentración de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 10,0 mg/ml, tal como de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 6 mg/ml, de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml o de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml.

27. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicho contenido en humedad no es superior a aproximadamente el 2,5% p/p, preferiblemente no es superior a aproximadamente el 2% p/p, más preferiblemente no es superior a aproximadamente el 1,5% p/p.

28. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, en donde la composición es una torta liofilizada.

29. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, en donde la composición comprende: polipéptido del Factor VIIa, manitol, sacarosa y un tensioactivo seleccionado a partir de un polisorbato o un poloxámero, tal como Tween 80® o Poloxámero 188®.

30. La composición según el aspecto 29, que contiene además metionina.

31. La composición según uno cualquiera de los aspectos 29 o 30, que contiene además L-histidina.

32. La composición según uno cualquiera de los aspectos 29 a 31, que contiene además uno o varios componentes seleccionados a partir de la lista de: CaCl2, NaCl y glicilglicina.

33. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, en donde la composición se selecciona a partir de la lista de formulaciones A a D:

Compuesto	**Formulación A**	**Formulación B**	**Formulación C**	**Formulación D**
Polipéptido FVII	0,6 a 10 mg/ml	0,6 a 10 mg/ml	0,6 a 10 mg/ml	0,6 a 10 mg/ml
$CaCl_2$ x $2H_2O$	5 a 20 mM	5 a 20 mM	5 a 20 mM	5 a 20 mM
NaCl	0 - 50 mM	0 - 50 mM	0 - 50 mM	0 - 50 mM
Glicilglicina	0 - 15 mM	0 - 15 mM	0 - 15 mM	0 - 15 mM
L-Histidina	0 - 20 mM	0 - 20 mM	0 - 20 mM	0 - 20 mM
Manitol	20 a 40 mg/ml	20 a 40 mg/ml	20 a 40 mg/ml	20 a 40 mg/ml
Sacarosa	5 a 20 mg/ml	-	-	5 a 20 mg/ml
Metionina	0 - 1 mg/ml	0 - 1 mg/ml	0 - 1 mg/ml	0 - 1 mg/ml
Tween 80	0,05 a 0,15 mg/ml	0,05 a 0,15 mg/ml		
Poloxámero 188	-	-	0,5 - 3 mg/ml	0,5 - 3 mg/ml
pH	5,0 a 7,0	5,0 a 7,0	5,0 a 7,0	5,0 a 7,0

34. La composición según uno cualquiera de los aspectos precedentes, en donde la composición se selecciona a partir de la lista de formulaciones Ex a Lx:

Compuesto	Formulación Ex	Formulación Fx	Formulación Gx	Formulación Hx
Polipéptido FVII	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml
$CaCl_2$ x $2H_2O$	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
NaCl	39 mM	39 mM	39 mM	39 mM
Glicilglicina	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
Manitol	25 mg/ml	25 mg/ml	25 mg/ml	25 mg/ml
Sacarosa	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml
Metionina	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml
Tween 80	0,1 mg/ml	-	0,1 mg/ml	-
Poloxámero 188	-	1,0 mg/ml		1,0 mg/ml
L-Histidina	-	-	10 mM	10 mM
pH	5,5 a 6,0	5,5 a 6,0	5,5 a 6,0	5,5 a 6,0

Compuesto	Formulación Ix	Formulación Jx	Formulación Kx	Formulación Lx
Polipéptido FVII	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml
$CaCl_2$ x $2H_2O$	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
NaCl	39 mM	39 mM	39 mM	39 mM
Glicilglicina	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
Manitol	25 mg/ml	25 mg/ml	25 mg/ml	25 mg/ml
Sacarosa	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml
Metionina	-	-	-	-
Tween 80	0,1 mg/ml	-	0,1 mg/ml	-
Poloxámero 188	-	1,0 mg/ml		1,0 mg/ml
L-Histidina	-	-	10 mM	10 mM
pH	5,5 a 6,0	5,5 a 6,0	5,5 a 6,0	5,5 a 6,0

35. Las composiciones según uno cualquiera de los aspectos 29 a 34, en donde el polipéptido del Factor VII es Factor VIIa humano.

36. Un método para preparar un polipéptido del Factor VII estable que comprende las etapas de:

i) proporcionar dicho polipéptido del Factor VII en una solución que comprende al menos un agente estabilizante seleccionado del grupo que consiste en

a) una combinación de un antioxidante y manitol;

b) una combinación de metionina y un poliol;

c) una combinación de un sacárido y manitol;

d) una combinación de sacarosa y un poliol; y

e) metionina,

ii) procesar dicha solución para obtener una composición sólida con un contenido en humedad no superior a aproximadamente el 3% p/p.

37. El método según el aspecto 36, en donde el antioxidante se selecciona a partir del grupo que consiste en homocisteína, cisteína, cistationina, metionina, glutatión, y péptidos que contienen uno cualquiera entre homocisteína, cisteína, cistationina, metionina y glutatión.

38. El método según el aspecto 36 o aspecto 37, en donde el sacárido se selecciona a partir del grupo que consiste en sacarosa, dextrosa, lactosa, maltosa, trealosa, ciclodextrinas, maltodextrinas y dextranos.

39. El método según uno cualquiera de los aspectos 36 a 38, en donde el poliol se selecciona a partir del grupo que consiste en manitol, sorbitol y xilitol.

40. El método según uno cualquiera de los aspectos 36 a 39, en donde dicho poliol está presente en una cantidad que varía de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 75 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 2 a 45 mg/ml, tal como de aproximadamente 5 mg/ml a 45 mg/ml, de aproximadamente 5 a 35 mg/ml, de aproximadamente 5 a 25 mg/ml, de 5 a 20 mg/ml, de 20 a 40 mg/ml o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 mg/ml.

41. El método según uno cualquiera de los aspectos 36 a 40, en donde dicha sacarosa está presente en una cantidad que varía de aproximadamente 0,5 a 75 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 2 a 45 mg/ml, tal como de aproximadamente 5 mg/ml a 45 mg/ml, de aproximadamente 5 a 35 mg/ml, de aproximadamente 5 a 25 mg/ml o de aproximadamente 5 a 20 mg/ml.

42. El método según uno cualquiera de los aspectos 36 a 41, en donde dicho antioxidante se encuentra en una cantidad que varía de aproximadamente 0,05 a 10 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 5 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg/ml a 2,5 mg/ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 2 mg/ml, lo más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 1 mg/ml.

43. El método según uno cualquiera de los aspectos 36 a 42, en donde el sacárido es sacarosa.

44. El método según uno cualquiera de los aspectos 36 a 43, en donde el antioxidante es metionina.

45. El método según uno cualquiera de los aspectos 36 a 43, en donde el poliol es manitol.

46. El método según uno cualquiera de los aspectos 36 a 45, en donde dicho proceso comprende secado por congelación.

47. Un método para tratar un síndrome sensible al Factor VII que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una composición que comprende un polipéptido del Factor VII y al menos un agente estabilizante seleccionado a partir del grupo que consiste en

a) una combinación de un antioxidante y manitol;

b) una combinación de metionina y un poliol;

c) una combinación de un sacárido y manitol;

d) una combinación de sacarosa y un poliol; y

e) metionina,

teniendo dicha composición un contenido en humedad no superior a aproximadamente el 3%.

48. El método según el aspecto 47, en donde dicho síndrome se selecciona a partir del grupo que consiste en hemofilia A, hemofilia B, carencia de Factor XI, carencia de Factor VII, trombocitopenia, enfermedad de von Willebrand, presencia de un inhibidor del factor de coagulación, cirugía, traumatismo, coagulopatía dilucional y terapia anticoagulante.

49. El método según uno cualquiera de los aspectos 47 o 48, que comprende la etapa de disolver la composición en un líquido adecuado antes de las etapas de administración.

50. El método según uno cualquiera de los aspectos 47 a 49, en donde la composición es según se define en uno cualquiera de los aspectos 1 a 33.

51. Uso del polipéptido del Factor VII para la preparación de un medicamento para tratar un síndrome sensible al Factor VII, en donde dicho medicamento comprende una composición que comprende:

un polipéptido del Factor VII y al menos un agente estabilizante seleccionado a partir del grupo que consiste en

a) una combinación de un antioxidante y manitol;

b) una combinación de metionina y un poliol;

c) una combinación de un sacárido y manitol;

d) una combinación de sacarosa y un poliol; y

e) metionina,

teniendo dicha composición un contenido en humedad no superior a aproximadamente el 3%.

52. El uso según el aspecto 51, en donde dicho síndrome se selecciona a partir del grupo que consiste en hemofilia A, hemofilia B, carencia de Factor XI, carencia de Factor VII, trombocitopenia, enfermedad de von Willebrand, presencia de un inhibidor del factor de coagulación, cirugía, traumatismo y terapia anticoagulante.

53. El uso según uno cualquiera de los aspectos 51 o 52, en donde el medicamento es adecuado para ser disuelto.

54. El uso según uno cualquiera de los aspectos 51 a 53, en donde la composición es según se define en uno cualquiera de los aspectos 1 a 35.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un polipéptido del Factor VII activado y una combinación de manitol y un sacárido seleccionado a partir del grupo que consiste en sacarosa, dextrosa, lactosa, maltosa, trealosa, ciclodextrinas, maltodextrinas y dextranos; teniendo dicha composición un contenido en humedad no superior al 3%;

en donde el polipéptido del Factor VII activado está presente en una concentración de 0,6 mg/ml a 10,0 mg/ml; el manitol está presente en una concentración de 5 mg/ml a 55 mg/ml; el sacárido está presente en una concentración de 5 mg/ml a 55 mg/ml; y la relación en peso entre el manitol y el sacárido (manitol:sacárido) es de 20:1 a 1:5.

2. La composición según la reivindicación 1, en donde la combinación de un sacárido y manitol comprende además metionina en una concentración de 0,05 a 10 mg/ml.

3. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho manitol está presente en una concentración de 8 a 45 mg/ml, o de 10 a 40 mg/ml, o de 10 a 30 mg/ml, o de 5 mg/ml a 45 mg/ml, o de 5 a 35 mg/ml, o de 5 a 25 mg/ml, o de 5 a 20 mg/ml, o de 20 a 40 mg/ml, o de 20 a 30 mg/ml.

4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho manitol está presente en una relación en peso respecto a dicho sacárido que varía de 10:1 a 1:2, o de 6:1 a 1:2, o de 4:1 a 1:1 o de 4:1 a 3:2.

5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un agente adecuado para mantener el pH de dicha composición en el intervalo de 3 a 9 cuando se disuelve en un disolvente acuoso, en donde dicho agente se selecciona a partir del grupo que consiste en citrato, acetato, histidina, malato, fosfato, ácido tartárico, ácido succínico, MES, HEPES, PIPES, imidazol, TRIS, lactato, glutamato y glicilglicina.

6. La composición según la reivindicación 5, en donde el pH se encuentra en el intervalo de 4 a 7, o en el intervalo de 4,5 a 6,5, o en el intervalo de 5 a 6.

7. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un modificador de la tonicidad seleccionado a partir del grupo que consiste en acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio y cloruro de calcio.

8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un tensioactivo seleccionado a partir del grupo que consiste en polisorbatos; éteres alquílicos de polioxietileno o poloxámeros; y otros copolímeros en bloque de etileno/propileno o polietilenglicol (PEG).

9. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el polipéptido del Factor VII activado se selecciona a partir del grupo que consiste en Factor VIIa humano, Factor VIIa humano recombinante y una variante de la secuencia del Factor VII.

10. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el polipéptido del Factor VII activado es FVIIa de tipo salvaje o un polipéptido del FVIIa que exhibe la misma actividad o una actividad mejorada respecto al FVIIa humano de tipo salvaje, cuando se somete a ensayo en un ensayo de coagulación.

11. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el polipéptido del Factor VII activado está presente en una concentración de 0,6 mg/ml a 6 mg/ml o de 0,6 mg/ml a 5 mg/ml o de 0,6 mg/ml 4 mg/ml.

12. Un método para preparar un polipéptido del Factor VII activado estable que comprende las etapas de:

i) proporcionar dicho polipéptido del Factor VII activado en una solución que comprende una combinación de manitol y un sacárido seleccionado a partir del grupo que consiste en sacarosa, dextrosa, lactosa, maltosa, trealosa, ciclodextrinas, maltodextrinas y dextranos;

en donde el polipéptido del Factor VII activado está presente en una concentración de 0,6 mg/ml a 10,0 mg/ml; el manitol está presente en una concentración de 5 mg/ml a 55 mg/ml; el sacárido está presente en una concentración de 5 mg/ml a 55 mg/ml; y la relación en peso entre el manitol y el sacárido (manitol:sacárido) es de 20:1 a 1:5;

ii) procesar dicha solución para obtener una composición sólida con un contenido en humedad no superior al 3% p/p, en donde dicho procesamiento comprende secado por congelación.

13. El método según la reivindicación 12, en donde la solución del paso i) comprende además metionina en una concentración de 0,05 a 10 mg/ml.

14. Una composición según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para el uso en el tratamiento de un síndrome sensible al Factor VII, en donde dicho síndrome se selecciona a partir del grupo que consiste en hemofilia A, hemofilia B, carencia de Factor XI, carencia de Factor VII, trombocitopenia, enfermedad de von Willebrand, presencia de un inhibidor del factor de coagulación, cirugía, traumatismo y terapia anticoagulante.

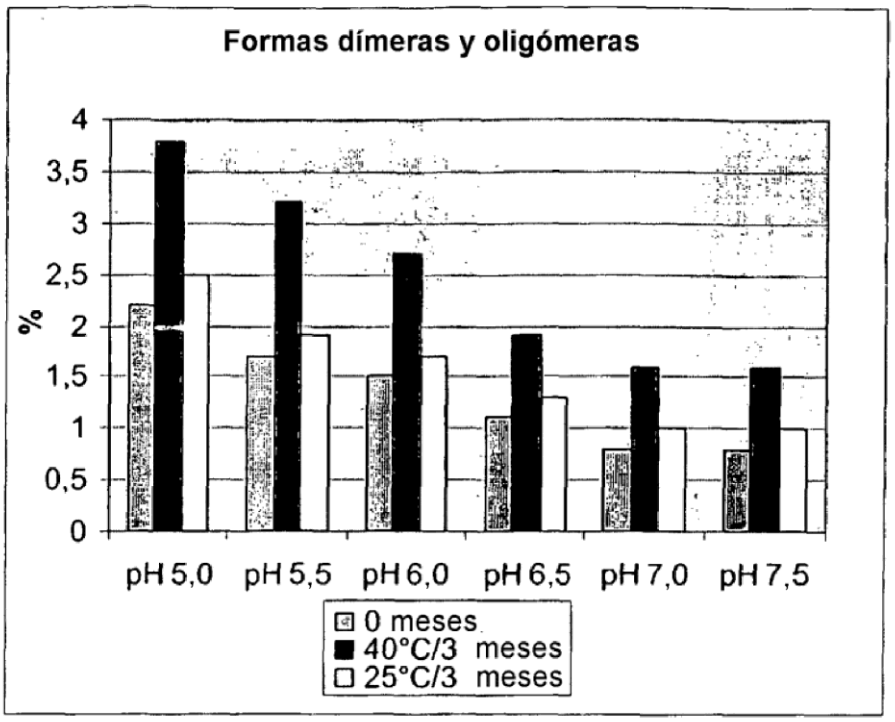
Formas dímeras y oligómeras
%
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
pH 5,0
pH 5,5
pH 6,0
pH 6,5
pH 7,0
pH 7,5
0 meses
40°C/3 meses
25°C/3 meses

Fig 1a

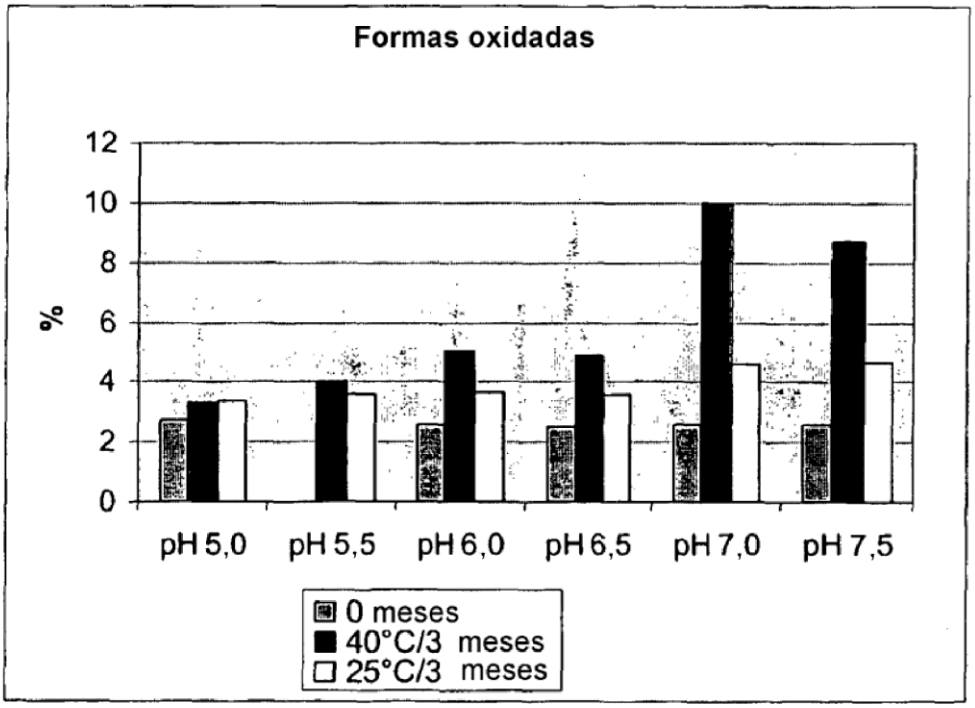
Formas oxidadas
%
12
10
8
6
4
2
0
pH 5,0
pH 5,5
pH 6,0
pH 6,5
pH 7,0
pH 7,5
0 meses
40°C/3 meses
25°C/3 meses

Fig 1b

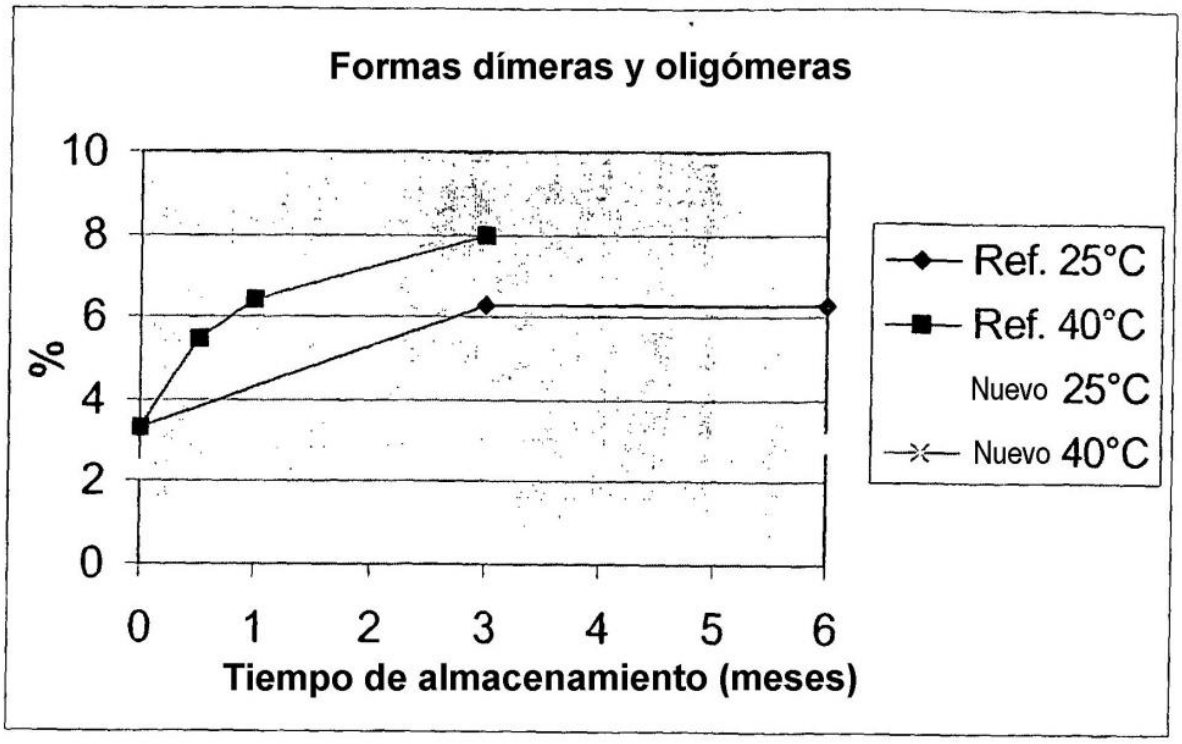
Formas dímeras y oligómeras
10
8
6
4
2
0
%
0
1
2
3
4
5
6
Tiempo de almacenamiento (meses)
Ref. 25°C
Ref. 40°C
Nuevo 25°C
Nuevo 40°C

Fig 2a

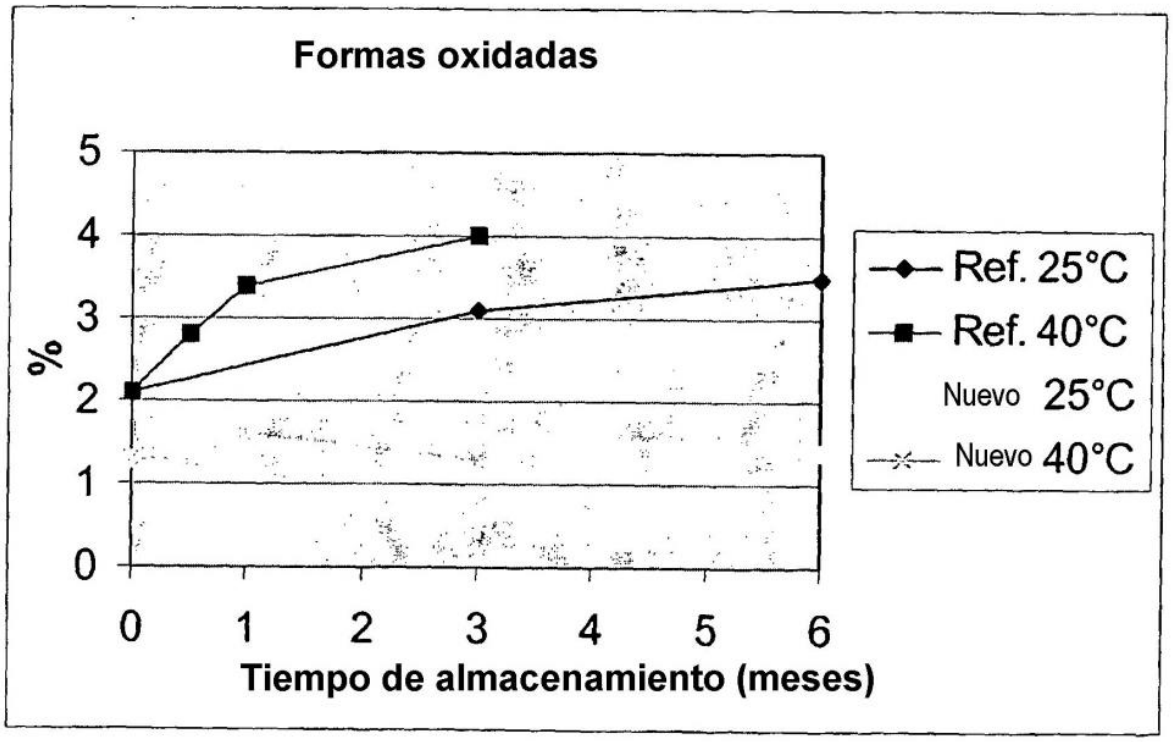
Formas oxidadas
5
4
3
2
1
0
%
0
1
2
3
4
5
6
Tiempo de almacenamiento (meses)
Ref. 25°C
Ref. 40°C
Nuevo 25°C
Nuevo 40°C

Fig 2b