

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 449**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61P 7/04 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2010** **E 15175122 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019** **EP 2985033**

54 Título: **Composición de factor VII**

30 Prioridad:

26.06.2009 FR 0954390

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

24.09.2019

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)**

**3, Avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es:

**BARDAT, ANNIE y
POMPE, CORNELIUS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 725 449 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de factor VII

5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica estable que comprende factor VII (FVII).

Técnica anterior:

10 El fenómeno de la coagulación comprende una cascada de reacciones enzimáticas que implican los factores de la coagulación de los cuales la mayoría son proteasas que comprenden una serina a nivel de su sitio activo. La etapa final es la transformación del fibrinógeno soluble en filamentos de fibrina que cercan en sus mallas las células circundantes. Los factores de la coagulación se designan por números que van de I a XIII. A excepción del factor XIII que interviene en la última etapa de coagulación, los demás factores intervienen en orden inverso de su numeración; así el factor XII inicia la coagulación y el factor I la termina. Cada factor existe en forma de precursor inactivo y en
15 forma activada, indicada por la letra a.

La coagulación pone en juego dos vías, una intrínseca, otra extrínseca, que llevan a una vía final común. La combinación de los dos mecanismos asegura la formación de un coágulo de sangre sólido y flexible, resistente a la presión sanguínea al tiempo que garantiza una suficiente movilidad. Bajo la acción de la trombina, el fibrinógeno
20 sufre modificaciones químicas que llevan a la formación de la fibrina. La fibrina es necesaria para la formación del coágulo.

La vía intrínseca comprende los factores presentes en la circulación y el proceso de coagulación se inicia dentro mismo del vaso sanguíneo. En cuanto a la vía extrínseca, por su parte, pone en juego los factores tisulares no
25 presentes normalmente en la circulación y que se liberan durante una lesión vascular. Es durante la activación de esta vía cuando se produce una reacción en cadena, durante la cual un factor de coagulación activado provoca la activación del siguiente factor de coagulación. Esta vía implica la intervención del factor VII (FVII) presente en el plasma. El factor VII activado, igualmente llamado proconvertina, es uno de los factores de peso molecular de aproximadamente 50 kDa, implicado en el mecanismo de la coagulación sanguínea. Es una glucoproteína de la familia de las serinoproteasas, cuya síntesis en forma activada depende de la vitamina K. Para iniciar la cascada de coagulación, el FVII debe activarse en FVIIa. El FVIIa solo (no complejo) presenta una baja actividad proteolítica. Después, una vez activado, el FVIIa se compleja con el factor tisular (FT), proteína asociada a los fosfolípidos, que es liberada durante la lesión vascular. El complejo FVIIa-FT transforma a continuación el factor X en factor Xa en presencia de iones calcio. Este complejo actúa igualmente sobre la activación del factor FIX en FIXa, catalizando así
35 la vía intrínseca. Los factores IXa y Xa activan en cambio el factor VII activado. El factor Xa complejo con el factor FV activado y a la protrombinasa, transforma la protrombina en trombina. La trombina actúa entonces sobre el fibrinógeno para transformarlo en fibrina y permite igualmente la activación del FVIIIa y del FVa a partir respectivamente de FVIII y FV. Por su parte, cuando está en presencia de calcio, la trombina permite activar el factor XIIIa responsable de la consolidación del coágulo de fibrina.

40 Sin embargo, cuando falta el factor de la coagulación, la cascada de reacciones se interrumpe o es deficiente y se habla entonces de una coagulación anormal.

45 El factor VII activado actúa localmente en presencia de factor tisular liberado después de una lesión de tejidos que engendra hemorragias, incluso en ausencia de factor VIII o IX. Es por lo que el factor VII, preferentemente en forma activada, se utiliza desde hace mucho tiempo para el tratamiento de ciertos trastornos de la coagulación sanguínea, que se manifiestan por sangrados. El factor está implicado en numerosas patologías, como la hemofilia de tipo A o B en la que los pacientes presentan inhibidores de los factores VIII o IX, la hemofilia adquirida, el déficit congénito de factor VII, y como producto para la prevención de hemorragias que pueden tener lugar durante operaciones
50 quirúrgicas.

En la actualidad, se conoce un medicamento disponible en el mercado para el tratamiento de estos pacientes que sufren hemofilia o déficit congénito de factor VII. Se trata del NovoSeven® autorizado en el mercado europeo desde 1996 y autorizado en el mercado americano en 1999, producido por la compañía danesa NovoNordisk. El
55 NovoSeven® es un medicamento cuyo principio activo es el eptacog alfa (factor VII activado de la coagulación recombinante humana activada, producido por ingeniería genética a partir de células renales BHK de hámster recién nacidos). Este producto contiene, además, cloruro de sodio (2,92 g/l), cloruro de calcio dihidratado (1,47 g/l), glicilglicina (1,32 g/l), polisorbato 80 (0,07 g/l), manitol (30 g/l).

60 Existe también una variante de NovoSeven denominada NovoSeven® RT, que permite una conservación del producto a temperatura ambiente (25°C). Este segundo producto está constituido por cloruro de sodio (2,92 g/l), cloruro de calcio dihidratado (1,47 g/l), glicilglicina (1,32 g/l), polisorbato 80 (0,07 g/l), manitol (25 g/l), ácido clorhídrico e hidróxido de sodio para el ajuste del pH, y contiene también sacarosa (10 g/l) y metionina (0,5 g/l) (utilizada como antioxidante). La puesta en solución de este producto necesita agua para el preparado inyectable,
65 pero también histidina. El NovoSeven® RT fue aprobado en los mercados europeos y americano en 2008.

La principal indicación terapéutica para el FVIIa recombinante (rFVIIa) se refiere al tratamiento del sangrado espontáneo o quirúrgico de las hemofilias A que han desarrollado anticuerpos anti-factor VIII y las hemofilias B que han desarrollado anticuerpos anti-factores IX. En Europa está indicado también para su utilización en los pacientes con una deficiencia congénita de FVII y en los pacientes afectados por la trombastenia de Glanzmann. Además, numerosas publicaciones informan sobre la eficacia del rFVIIa en el control de la hemorragia durante intervenciones quirúrgicas en pacientes que no tienen ni déficit congénito de factor de la coagulación ni trombastenia.

Un artículo de Nedergaard *et al.*, 2008 [Nedergaard H. *et al.*, *In vitro* stability of lyophilized and reconstituted recombinant activated factor VII formulated for storage at room temperature. *Clinical Therapeutics*, vol 30, n° 7, p. 1309-1315, 2008] enseña que el NovoSeven® RT permanece estable durante un periodo de 24 meses a 25°C, 12 meses a 30°C, 6 meses a 40°C y 12 horas a 50°C y 60°C, en su forma liofilizada. Además, este producto es estable sólo durante seis horas después de su reconstitución líquida y, por consiguiente, se recomienda realizar la inyección en las tres horas siguientes de la reconstitución. Por lo tanto, por esta estabilidad, este producto presenta dificultades de manipulación y molestias a nivel de horarios de administración.

La patente EP 1 210 361 divulga el interés de utilizar glicilglicina para estabilizar una composición liofilizada de factor VII activado.

La solicitud de patente WO2004/000347 propone otros diversos agentes de estabilización.

La publicación de Soenderkaer S. *et al.*, 2004 [Soenderkaer S. *et al.*, Effects of sucrose on rFVIIa aggregation and methionine oxidation, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol 21, p. 597-606, 2004] describe la sacarosa como excipiente esencial para la estabilización contra la agregación y desnaturalización térmica del factor VII activado. Según esta enseñanza, la sacarosa permite que la proteína conserve su forma nativa en solución acuosa, excluyendo los azúcares de la superficie de las proteínas, lo que permite aumentar el potencial químico de la molécula. Por consiguiente y reduciendo su superficie, la proteína permanece en una conformación compacta. La presencia de sacarosa como excipiente permite estabilizar el factor VII activado en su forma liofilizada.

No obstante, la presencia de sacarosa tiene como consecuencia la inducción de compuestos antioxidantes en la formulación, los que lleva a problemas técnicos y reglamentarios asociados con la adición de este tipo de compuestos.

Por lo tanto, en la actualidad existe una necesidad real de desarrollar medicamentos que contengan factor VII, desprovistos de antioxidantes, estables química y físicamente a la temperatura ambiente, y fáciles de utilizar por pacientes afectados especialmente de hemofilia o de déficit congénito de factor VII.

Resumen de la invención:

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el factor VII, estando dicha composición desprovista de manitol, de cualquier azúcar, y de glicilglicina, y que comprende al menos la erginina y al menos un aminoácido hidrófobo.

Según un modo de realización preferido, la composición está desprovista, además, de cualquier agente antioxidante.

Según un modo de realización preferido, la composición de la invención comprende factor VII, al menos arginina, al menos un aminoácido hidrófobo, y una sal de metal alcalino, una sal de metal alcalinotérreo, o una sal de un metal de transición, estando dicha composición desprovista de manitol y de sacarosa.

De manera ventajosa, la composición en forma sólida puede estar en forma de polvo o de torta ("cake" o "plug"). La composición presenta preferentemente un grado de humedad inferior o igual al 3%. Según un modo de realización particular, la composición está en forma liofilizada.

Otro objeto de la invención es un procedimiento para la preparación de tal composición, comprendiendo dicho procedimiento la mezcla de FVII con una solución tampón, el ajuste del pH si fuera necesario, la filtración para obtener una forma líquida. Esta forma líquida puede sufrir a continuación una desecación para obtener la forma sólida.

El término "solución tampón" incluye al menos un aminoácido hidrófilo o que lleva una cadena lateral cargada positivamente, y una sal de metal alcalino, una sal de metal alcalinotérreo o una sal de un metal de transición.

Ventajosamente, la solución tampón comprende también al menos un aminoácido hidrófobo.

Otro objeto de la invención consiste en un procedimiento para la preparación de una formulación inyectable para uso terapéutico, comprendiendo dicho procedimiento la disolución de una composición sólida tal como se define aquí, en agua para preparados inyectables.

La tiene también como objetivo una formulación inyectable susceptible de obtenerse por este procedimiento.

Descripción detallada de la invención:

- 5 La solicitante proporciona composiciones de Factor VII química y físicamente estables a temperatura ambiente, y fáciles de utilizar para pacientes que padecen hemofilia o déficit congénito de factor VII, especialmente.

Especialmente, la nueva composición farmacéutica de la invención presenta una estabilidad en forma sólida superior a 24 meses a una temperatura inferior o igual a 25°C.

- 10 Por lo tanto, la composición puede conservarse a temperatura ambiente sin degradación sustancial del factor VII. Por temperatura ambiente, se entiende la temperatura en el interior de una estancia, normalmente comprendida entre 10°C hasta 30°C, preferentemente entre 15°C hasta 25°C.

- 15 El término "Factor VII" o "FVII" incluye los polipéptidos que comprenden la secuencia 1-406 del factor VII humano de tipo salvaje (como se describe en la patente U.S.4,784,950), o del FVII derivado de otra especie (por ejemplo bovina, porcina, canina, murina). Comprende además las variaciones alélicas naturales que pueden existir del factor VII, y cualquier forma o grado de glicosilación u otra modificación post-traducciona.

- 20 El término "Factor VII" incluye también las variantes del FVII que presentan la misma actividad biológica o una superior en relación a la actividad de la forma salvaje, incluyendo especialmente estas variantes los polipéptidos que difieren del FVIIa salvaje por inserción, delección o sustitución de uno o varios aminoácidos.

- 25 El "Factor VII" o "FVII" comprende el FVII no escindido (zimógeno) y el Factor VII activado. El factor VII se utiliza en la composición preferentemente en su forma activada.

- 30 El término "actividad biológica del factor VIIa" incluye la capacidad de generar trombina, por ejemplo en la superficie de las plaquetas activadas. La actividad del Factor VII en la composición se puede evaluar de diferentes maneras. Por ejemplo, se puede medir por la relación entre la cantidad de Factor VIIa determinada por un ensayo de coagulación y la cantidad de Factor VII determinada por inmunorreactividad con anticuerpos anti-FVII.

- 35 El término "composición estable" significa aquí que la formación de agregados (insolubles o solubles) se minimiza, y/o que la degradación química se reduce, el pH se mantiene y la conformación de la proteína no se ha modificado sustancialmente durante la producción o la conservación de las composiciones de la invención, de tal modo que se conserven la actividad biológica y la estabilidad de la proteína. Cuando las composiciones se someten a una liofilización, la estabilización de las composiciones implica una lioprotección y una crioprotección de la proteína.

- 40 El término "estabilidad física" del Factor VII se refiere a la reducción o la ausencia de formación de agregados insolubles o solubles de las formas diméricas, oligoméricas o poliméricas del Factor VII, así como a la reducción o la ausencia de cualquier desnaturalización estructural de la molécula.

- 45 El término "estabilidad química" se refiere a la reducción o la ausencia de cualquier modificación química del factor VII durante el almacenamiento, en estado sólido o en forma disuelta, en condiciones aceleradas. Por ejemplo, los fenómenos de hidrólisis, desaminación y/u oxidación se evitan o se retrasan. La oxidación de los aminoácidos que contienen azufre se limita.

- 50 Por ejemplo, las composiciones sólidas de la invención contienen bajos contenidos de formas oxidadas y de agregados al final del procedimiento de preparación y antes de la conservación, por ejemplo menos del 5% en peso, preferentemente menos del 4% o también menos del 3% o menos del 2% en peso de FVII se convierten en forma oxidada, y menos del 5% en peso, preferentemente menos del 4% o también menos del 3% o menos del 2% en peso de FVII se convierten en forma dimérica o polimérica. Durante la conservación, preferentemente menos del 10% en peso de FVII se convierten en forma oxidada, y menos del 10% en peso de FVII se convierten en forma dimérica o polimérica, después de la conservación a 30°C después de 24 meses en la oscuridad.

- 55 Una composición liofilizada según la invención presenta también una estabilidad estructural, es decir que es capaz de formar una torta ("cake" o "plug") que no se desmorona espontáneamente y que es fácilmente soluble en agua antes de su utilización.

- 60 La composición farmacéutica de la invención es una composición que comprende un factor VII, estando desprovista dicha composición de manitol, de cualquier azúcar y de glicilglicina, comprendiendo dicha composición arginina y un aminoácido hidrófobo.

- 65 El contenido de factor VII, preferentemente en forma de factor VIIa, en la composición de la invención puede ser el siguiente: entre 0,1 y 15 mg/ml, preferentemente entre 0,1 y 10 mg/ml, más preferentemente entre 0,2 y 5 mg/ml o también entre 0,2 y 2 mg/ml (medido en forma líquida, preferentemente antes de la desecación o eventualmente después de la reconstitución en forma de preparado inyectable).

Preferentemente, la composición está desprovista de cualquier azúcar, poliol o metionina.

5 Los azúcares a evitar incluyen especialmente, además de la sacarosa, los di- y tri-sacáridos y los polisacáridos tales como la dextrosa, lactosa, maltosa, trehalosa, las ciclodextrinas, las maltodextrinas y los dextranos.

Los polioles a evitar incluyen en particular, además del manitol, el sorbitol y el xilol.

10 La composición está desprovista de glicilglicina.

Según un modo de realización preferido, la composición de la invención está desprovista, además, de cualquier agente antioxidante. Los antioxidantes incluyen por ejemplo uno o varios de los compuestos siguientes: homocisteína, cisteína, cistationina, metionina, glutatión.

15 La composición según la invención comprende arginina y al menos un aminoácido hidrófobo. Los aminoácidos hidrófilos (o polares) o los aminoácidos que llevan una cadena lateral cargada positivamente incluyen la lisina, la arginina, la histidina, la glicina, la serina, la treonina, la tirosina, la asparagina, la glutamina.

20 Entre los aminoácidos hidrófilos o que llevan una cadena lateral cargada positivamente, se puede utilizar preferiblemente la arginina, o una de sus sales derivados como la arginina clorhidrato o también la arginina fosfato.

Se pueden añadir ventajosamente unos aminoácidos tales como la glicina y/o la lisina, o una de sus sales derivadas como la lisina clorhidrato.

25 La adición de un aminoácido hidrófilo o que lleva una cadena lateral cargada positivamente tal como la arginina, y llegado el caso un aminoácido hidrófobo, incluso una sal de metal alcalino, alcalinotérreo o un metal de transición, favorece la estabilización del factor VII y la disolución de las formas liofilizadas.

30 Los aminoácidos hidrófobos (de cadena lateral apolar) incluyen especialmente los aminoácidos siguientes: alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptófano, prolina.

Preferentemente, el aminoácido hidrófobo en el ámbito de esta invención es la isoleucina, la leucina o una mezcla de los dos.

35 Preferiblemente, la composición de la invención comprende una sal de metal alcalino, una sal de metal alcalinotérreo, o una sal de un metal de transición. Se pueden citar especialmente el citrato trisódico, el cloruro de calcio o el cloruro de zinc. De manera preferida, la sal utilizada es preferiblemente el citrato de sodio o el cloruro de calcio.

40 Finalmente, la composición de la invención puede comprender uno o varios detergentes de tipo no iónico tales como los polisorbato, poloxámeros, polioxietilenaquíleteres, un bloque de copolímeros de etileno/polipropileno y polietilenglicol. Ventajosamente, los detergentes preferidos son el polisorbato 80 y el polisorbato 20.

En un ejemplo de realización, la composición comprende:

45 - factor VII, preferentemente en forma de factor VIIa;

- arginina, eventualmente en forma de clorhidrato;

50 - isoleucina;

- lisina;

- glicina;

55 - citrato trisódico o cloruro de calcio;

- y llegado el caso polisorbato 80 o polisorbato 20.

60 Más particularmente, la composición puede comprender

- factor VII, preferentemente en forma de factor VIIa;

- de 10 a 40 g/l de arginina, eventualmente en forma de clorhidrato;

65 - de 4,2 a 6,6 g/l de isoleucina;

- de 0,6 a 1,8 g/l de lisina;
- de 0,6 a 1,8 g/l de glicina;
- de 1 a 2 g/l de citrato trisódico dihidratado o de 0 a 0,2 g/l de cloruro de calcio dihidratado;
- y llegado el caso, de 0 a 0,5 g/l de polisorbato 80.

Según un ejemplo particular, la composición comprende

- factor VII (preferentemente en forma de factor VIIa) de 0,2 a 2 g/l,
- clorhidrato de arginina a 24 g/l,
- isoleucina a 6 g/l,
- citrato trisódico dihidratado a 1,5 g/l,
- glicina a 1,2 g/l,
- clorhidrato de lisina a 1,2 g/l,
- y/o polisorbato 80 a 0,07 g/l.

Según otro ejemplo particular, la composición comprende

- factor VII (preferentemente en forma de factor VIIa) de 0,2 a 2 g/l,
- clorhidrato de arginina a 34 g/l,
- cloruro de calcio dihidratado a 0,15 g/l,
- isoleucina a 6 g/l.

Las concentraciones se determinan frente a composiciones en forma líquida, antes de la desecación o después de la reconstitución en forma de preparado inyectable.

La solicitante ha eliminado de su composición para uso farmacéutico la sacarosa, así como el manitol, utilizándose estos ingredientes por lo tanto, de manera habitual como diluyentes o estabilizantes de las formulaciones farmacéuticas que comprenden factor VII

La ausencia de sacarosa y de manitol ofrece varias ventajas. Por una parte, se evita la presencia de elementos oxidantes o de endotoxinas, que pueden aportarse por la sacarosa.

De forma sorprendente, resultó que la ausencia de manitol en el transcurso de la liofilización permite evitar la formación de formas polimórficas de los cristales de manitol dentro de la composición, y limita el riesgo de impurezas, como especialmente la presencia de manosa en la composición.

Por otro lado, en contra de lo esperado, la ausencia de manitol y de sacarosa de la composición de la invención no perjudica la estabilidad de la composición. Por el contrario, se observa un aumento de la temperatura de transición vítrea de la composición en relación con las formulaciones disponibles, por ejemplo el NovoSeven® RT.

La transición vítrea es una transición de segundo orden, es decir una transición térmica que implica un cambio de capacidad calorífica, pero no de calor latente. Es característico de los líquidos sobreenfriados que se han enfriado a una temperatura suficientemente baja y de forma suficientemente rápida sin cristalizar y que se convierten en vidrio y en polímeros amorfos o en la parte amorfa de los polímeros cristalinos que pasan de un estado sólido a un estado viscoelástico. La temperatura de transición vítrea o Tg es la temperatura a la cual tiene lugar este cambio de estado. Cuando un producto líquido se refrigera por debajo de esta temperatura se vuelve sólido y quebradizo como el vidrio, se dice que está en estado vidrioso.

La movilidad de las moléculas es bloqueada cuando el producto está en estado vidrioso (sólo las funciones radicalarias poseen todavía una baja movilidad relativa), es ventajoso conservar los productos a temperaturas inferiores a su transición vítrea. Una temperatura de transición vítrea elevada favorece por lo tanto una mejor estabilidad de la composición liofilizada a temperaturas elevadas (>25°C) y disminuye así la reactividad del principio

activo [ikal *et al.*, The Effects of Formulation Variables on the Stability of Freeze-Dried Human Growth Hormone, Journal of Pharmaceutical Research, Vol. 8, p 427-436, 1991].

Además, gracias a su formulación, la composición para uso farmacéutico según la invención previene la agregación de la proteína.

En efecto, en presencia de manitol y de sacarosa, como en la formulación de NovoSeven® RT, la temperatura de transición vítrea es de 45°C. La temperatura de transición vítrea de la composición de la invención, libre de sacarosa y manitol, es superior a 60°C, y generalmente está comprendida entre 74 y 93°C, lo que permite considerar un almacenamiento fuera del refrigerador e incluso a temperaturas superiores a 25°C (véase la Figura 2).

El factor VII es generalmente un factor VII humano. Se puede obtener de diferentes maneras, por ejemplo a partir de la fracción no crioprecipitable del plasma humano, o por ingeniería genética a partir de células o también a partir de animales transgénicos.

De manera preferida, el factor VII (preferentemente en forma de factor VIIa) se produce especialmente en la leche del animal transgénico, permitiendo a la formulación de la invención que el factor VII conserve una actividad biológica satisfactoria después de su liofilización.

Según un modo de realización preferido, el factor VII humano se produce en la leche de mamíferos transgénicos no humanos, modificados genéticamente para producir esta proteína. Preferentemente, se trata de leche de una coneja o de una cabra transgénica.

La secreción de factor VII por las glándulas mamarias, que permiten su secreción en la leche del mamífero transgénico, implica el control de la expresión del factor VII de manera dependiente del tejido. Tales métodos de control son bien conocidos por el experto en la materia. El control de la expresión se efectúa gracias a las secuencias que permiten la expresión de la proteína en un tejido particular del animal. Se trata especialmente de secuencias promotoras WAP, beta-caseína, beta-lactoglobulina y de las secuencias de péptidos señal. El procedimiento de extracción de proteínas de interés a partir de la leche de animales transgénicos se describe en la patente EP0 264 166.

La composición de la invención se puede obtener utilizando cualquier técnica habitual.

Especialmente, la composición de la invención se puede obtener usando un procedimiento que comprende la mezcla del factor VII con una solución tampón, el ajuste del pH si fuera necesario, la filtración para la obtención de una forma líquida, después, si fuera necesario desecación para la obtención de una forma sólida.

Preferentemente, el pH de la solución antes de la desecación está comprendido entre 4,0 y 9,0, más particularmente en los intervalos 4,0 y 8,0; 4,0 y 7,5; 4,5 y 7,5; 5,0 y 7,5; 5,5 y 7,0; 6,0 y 7,5; 6,5 y 7,5.

La desecación es un procedimiento de eliminación del agua en un estado avanzado. Se trata de una deshidratación que pretende eliminar tanta agua como sea posible. Este fenómeno puede ser natural o forzado. Esta desecación se puede realizar con ayuda de técnicas de liofilización, de atomización o de criatomización. El modo preferido de obtención de la forma sólida de la composición para uso farmacéutico según la invención es la liofilización.

Los métodos de liofilización se conocen bien por el experto en la materia, véase por ejemplo [Wang *et al.*, Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals, International Journal of Pharmaceutics, vol 203, p. 1-60, 2000].

Se pueden considerar otros procedimientos adecuados para reducir el grado de humedad o el contenido de agua de la composición. Preferentemente, el grado de humedad es inferior o igual al 3% en peso, preferentemente inferior o igual al 2,5%, preferentemente inferior o igual al 2%, preferentemente inferior o igual al 1,5%.

La composición según la invención se puede someter ventajosamente a un método de eliminación o de inactivación de los agentes infecciosos, por ejemplo por calentamiento en seco del liofilizado.

La composición sólida según la invención, preferentemente en forma liofilizada, se puede disolver en agua para preparaciones inyectables (o "water for injection o WFI"), para obtener una formulación de uso terapéutico.

De manera preferida, la disolución del factor VII se puede realizar en agua pura, lo que es ventajoso en relación con los disolventes de reconstitución más complejos, como el disolvente con histidina utilizado en el producto NovoSeven® RT.

La composición líquida (antes de la desecación) según la invención posee una estabilidad química o física de al menos 3 días entre 2 y 8°C.

La composición sólida según la invención posee una estabilidad química o física en forma sólida superior a 24 meses, y generalmente hasta al menos 36 meses, a una temperatura inferior o igual a 25°C. La formulación inyectable reconstituida es también muy estable, siendo su estabilidad química y física en forma líquida superior a 6 horas a 25°C, preferentemente superior a 12 horas, preferentemente superior a 24h, más preferentemente superior a una semana.

La composición farmacéutica en forma líquida o en forma sólida o la formulación inyectable es útil para el tratamiento de diversas patologías.

Un objeto de la invención es una composición farmacéutica o formulación inyectable tal como se ha definido anteriormente, para una utilización en el tratamiento de una hemofilia o de un déficit congénito de factor VII.

Se ha descrito también la utilización de la composición en un método de tratamiento de una hemofilia o de un déficit congénito de factor VII, en la cual se administra a un paciente que necesita tal tratamiento una cantidad eficaz de la formulación inyectable descrita.

La hemofilia puede ser de tipo A o de tipo B. La hemofilia de tipo A se caracteriza por un déficit de factor VIII, mientras que la hemofilia de tipo B, por su parte, procede de un déficit de factor IX. El déficit congénito de factor VII es una enfermedad hemorrágica hereditaria de transmisión autosómica recesiva rara, debida a la disminución o la ausencia del factor VII de la coagulación.

La formulación inyectable se puede administrar por vía parenteral (intravenosa, subcutánea, intramuscular), en una cantidad estimada por el práctico. No se excluye la administración de la forma líquida (antes de la desecación) o de la forma sólida, por cualquier vía y cualquier medio apropiado.

Los ejemplos y figuras siguientes ilustran la invención, sin limitar no obstante su alcance.

Leyenda de las figuras:

La figura 1 es una gráfica que muestra que la actividad del FVIIa procedente de la formulación F3 se preserva después de su reconstitución en forma líquida, después de un almacenamiento de 6 días a 25°C.

La figura 2 es una gráfica que muestra que las formulaciones F3, F4 y F7 en forma sólida permiten preservar la actividad de la proteína (FVIIa) (expresada por la relación de FVIIa/FVII:Ag) durante un almacenamiento a 40°C durante 1 mes.

Ejemplos:

El FVII utilizado en los ejemplos se obtiene a partir de leche de conejas transgénicas, como se describe en la solicitud de patente WO 2008099077. Se trata del factor VII humano que se activa durante su purificación.

Ejemplo 1: Preparación de las formulaciones:

1.1: Preparación de las formulaciones líquidas F1 a F7:

Se dializó el factor VII purificado y activado (10-20 ml) a una concentración aproximada de 0,6 mg/ml (formulaciones F1 a F5) y 0,4 mg/ml (formulaciones F6 y F7), respectivamente, durante 12 horas frente a 2 litros de solución tampón, tal como se define en la línea correspondiente de la Tabla 1. Se ajustó el pH ($6,0 \pm 0,2$) o bien con NaOH 1M o bien con HCl 1M. Las soluciones formuladas de FVIIa se filtraron y se repartieron en frascos a razón de 0,5 ml por frasco. A continuación, los frascos se pre-taparon utilizando tapones de bromobutilo.

1.2: Preparación de las formulaciones liofilizadas procedentes de las formulaciones líquidas F1 a F7 preparadas en el punto 1.1 anterior:

Los frascos se liofilizaron según un ciclo predefinido. Para permitir la detección del final de la desecación, el liofilizador se equipó con un captador de humedad de capacitancia. Al final del ciclo de liofilización, los frascos se taparon a vacío y se sellaron con cápsulas de aluminio.

1.3: Preparación de la formulación líquida F8:

Se ha formulado el factor VII purificado y activado (0,4 mg/ml) por intercambio de tampón en una columna de gel de filtración Superdex 200. La columna se equilibró inicialmente con una solución tampón que comprende citrato trisódico (1,0 g/l), clorhidrato de arginina (30 g/l) e isoleucina (6,0 g/l) (véase la tabla: F8). Se ajustó el pH ($7,0 \pm 0,2$). La concentración del eluato se determinó a aproximadamente 0,4 mg/ml.

La solución de FVIIa formulada se filtró y se repartió en frascos a razón de 0,5 ml por frasco. Después, los frascos se pre-taparon utilizando tapones de bromobutilo.

1.4: Preparación de la formulación liofilizada procedente de la formulación líquida F8 preparada en el punto 1.3 anterior:

Se liofilizaron los frascos según un ciclo predefinido. Para detectar el fin de la desecación, el liofilizador se equipó con un captador de humedad de capacitancia. Al final del ciclo de liofilización, los frascos se taparon a vacío y se sellaron con cápsulas de aluminio.

1.5: Preparación de la formulación líquida F9 y liofilización:

Se ha formulado el factor VII purificado y activado (0,4 mg/ml aproximadamente) por intercambio de tampón en una columna de gel de filtración Superdex 200. La columna se equilibró inicialmente con una solución tampón que comprende citrato trisódico (1,0 g/l), clorhidrato de arginina (30 g/l) e isoleucina (6,0 g/l) (véase la tabla: F9). Se ajustó el pH ($7,0 \pm 0,2$). Se añadieron glicina (1,2 mg/ml) e clorhidrato de lisina (1,2 mg/ml). La solución de FVIIa formulada se filtró y se repartió en frascos a razón de 1,0 ml por frasco. Después, los frascos se pre-taparon utilizando tapones de bromobutilo.

Los frascos se liofilizaron después de la misma manera que anteriormente y se almacenaron a 40°C durante 6 meses.

1.6: Preparación de las formulaciones líquidas F10 y F11 y liofilización:

El factor VII purificado y activado a una concentración aproximada de 1,0 mg/ml (F10) y 0,8 mg/ml (F11), respectivamente, se formuló por diálisis en bolsa con el tampón tal como se define en las tablas 3 y 4 (véanse las tablas: F10 y F11). Se ajustó el pH ($7,0 \pm 0,2$).

Las soluciones formuladas de FVIIa se filtraron y repartieron en frascos a razón de 1,0 ml por frasco. Después, los frascos se pre-taparon utilizando tapones de bromobutilo.

Los frascos se liofilizaron a continuación de la misma manera que anteriormente.

La formulación F10 se conservó en las condiciones siguientes:

- líquida a 5°C durante 144 horas, después a 25°C durante 6 horas,
- ciclo de congelación y descongelación (4 ciclos consecutivos),
- liofilizada y almacenada a 25°C y 40°C durante 6 meses,
- congelada a $< -70^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses.

La formulación F11 se conservó en las condiciones siguientes:

- líquida durante 72 horas a 5°C más 6 horas suplementarias a 25°C,
- liofilizada y almacenada a 25°C y 40°C,
- congelada a $< -70^{\circ}\text{C}$ en el tampón antes de la etapa de diálisis: trometamol (2,42 mg/ml), NaCl (8,77 mg/ml) y manitol (30 mg/ml).

Ejemplo 2: ensayos de formulación

Materiales y métodos:

2.1. Mediciones de difusión dinámica de la luz, (Dynamic Light Scattering), a continuación "DLS".

Se colocaron 500 microlitros de cada muestra procedente de la liofilización en una microcubeta (Plastibrand®, Wertheim, Alemania) que fue transferida a un aparato Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Este aparato funciona con un láser a 633 nm He-Ne 4 mW, y una técnica no invasiva de retrodifusión "Non-Invasive Backscatter" o NIBS.

La distribución de tamaño de las poblaciones monoméricas de la proteína por intensidad y volumen se calculó a partir del programa informático Dispersión Technology Software de Malvern (versión 4.00). Los índices de refracción del material y del dispersante se definieron a 1,33 y 1,45 respectivamente. La temperatura durante las mediciones se

controló y se fijó a 20°C. Los parámetros de calidad de las formulaciones ensayadas incluyen el diámetro de la población de proteínas en forma de monómeros y la intensidad de difusión de la población de proteínas.

2.2. Inspección visual de las formulaciones reconstituidas.

La formulación a ensayar se reconstituyó a partir de la formulación liofilizada con 0,5 g de agua para preparados inyectables. El disolvente se inyectó en el frasco del liofilizado con la ayuda de una jeringa a través del tapón.

Después de la disolución completa de la torta, el producto reconstituido se examinó según el método de inspección visual relativo a la Farmacopea Europea (Methods of Analysis - Pharmaceutical Technical Procedures - Particulate contamination-visible particules - párrafo 2.9.20).

Las formulaciones ensayadas se clasificaron de manera semicuantitativa, según su grado de contaminación por partículas visibles:

- = ninguna partícula visible

ε = algunas partículas raras visibles

+ = partículas visibles en pequeña cantidad de partículas visibles

++ = gran cantidad de partículas visibles

+++ = cantidad muy grande de partículas visibles

Todos los ensayos se llevaron a cabo de manera independiente, y por tres operarios diferentes.

2.3. Ensayo sobre filtro para la detección de agregados.

El método utilizado se ha extraído del artículo [Li *et al.*, A simple method for the detection of insoluble aggregates in protein formulations, Journal of Pharmaceutical Sciences, vol 96 (7), p 1840-1843, 2007].

Un filtro de membrana estéril Millex® GV 0,2 μm se aclaró con 3 ml de agua, después con el mismo volumen de solución tampón. A continuación, sobre este filtro se filtraron 0,5 ml de solución proteica (FVIIa) a analizar. Después, el filtro se aclaró de nuevo con volúmenes iguales de agua (3 ml) para preparados inyectables, después de solución tampón (3 ml). Las fracciones de proteínas retenidas por el filtro se colorearon por adición de 2 ml de solución de coloración ("Reversible Protein Detection KIT" de SIGMA). La solución de coloración se mantuvo en contacto con la membrana de filtración durante 5 min. antes del vertido. Después, la membrana se aclaró de nuevo como se ha descrito anteriormente. Las formulaciones ensayadas se clasificaron de manera semicuantitativa, según su grado de partículas coloreadas observadas sobre el filtro, procedentes de las proteínas:

- = ninguna partícula visible detectada, procedente de las proteínas,

ε = algunas partículas raras visibles detectadas, procedentes de las proteínas,

+ = partículas visibles detectadas en pequeña cantidad, procedentes de las proteínas

++ = partículas visibles detectadas en gran cantidad, procedentes de las proteínas

+++ = partículas visibles detectadas en cantidad muy grande, procedentes de las proteínas

2.4. Determinación de la temperatura de transición vítrea (Tg).

La temperatura de transición vítrea se determinó mediante un termoanalizador diferencial de barrido DSC 7 (Perkin Elmer) calibrado con la ayuda de indio (de temperatura de fusión (Tm) 156,6°C) y de n-octadecano (Tm 38,2°C). Las muestras se sometieron a temperaturas de -50 a 138°C a la velocidad de 20°C/min. El helio se utilizó para llevar a cabo los experimentos a una temperatura inferior a la temperatura ambiente. La temperatura de transición vítrea se tomó en el punto medio del cambio endotérmico en el calor específico aparente. Se realizaron dos mediciones, y la media da la Tg.

2.5. Determinación de la relación FVIIa/FVII: Ag

Se evalúa la actividad del Factor VII en la composición por la relación entre la cantidad de Factor VIIa determinada por un ensayo de coagulación y la cantidad de Factor VII determinada por inmunorreactividad con los anticuerpos anti-FVII.

Evaluación del Factor VII (designado aquí "Factor VII antígeno" o "FVIIAg"):

Se evaluó el FVII mediante el método inmunoenzimático (ELISA) con reactivos comerciales (Diagnostica Stago). Brevemente, el Factor VII a dosificar es captado por un anticuerpo anti-Factor VII humano inmovilizado sobre una fase sólida. El Factor VII fijado es reconocido después por un inmunoconjugado de peroxidasa. El porcentaje de peroxidasa ligada se mide por su actividad sobre el sustrato orto-fenilendiamina en presencia de agua oxigenada. La intensidad de la coloración, después de detener la reacción por un ácido fuerte, es función de la cantidad de factor VII presente inicialmente en la muestra.

Evaluación del Factor FVII en forma activada:

El Factor FVII activado (FVIIa) se mide mediante el método cronométrico con reactivos comerciales (Diagnostica Stago). El Factor tisular soluble recombinante (rsTF) posee una función de cofactor del Factor VIIa y, en presencia de fosfolípidos y calcio, permite la coagulación del plasma. En este sistema, el tiempo de coagulación obtenido estará en función de la cantidad de Factor VII contenida en la muestra a ensayar. El rsTF no activa el Factor VII a factor VIIa; por consiguiente, el Factor VII contenido en el plasma no interfiere en la evaluación.

2.6: Distribución del tamaño molecular (DTM):

La determinación de la distribución del tamaño molecular se efectúa gracias a un sistema de cromatografía equipado con una bomba, un inyector termostatzado, un detector UV, un sistema informático de adquisición de datos utilizando una columna Superdex Tricorn 200 10/300 GL (GE Healthcare, ref. 17-5175-01). La fase móvil se compone de tampón fosfato 0,01 M, cloruro de sodio 0,138M y cloruro de potasio 0,0027M a pH 7,4. Su caudal alcanza 0,4 ml/min. Para el análisis se inyectan 100 µl de la muestra. La detección por UV se realiza a 280 nm.

2.7: SDS-PAGE (reducido/no reducido):

La calidad de las muestras a nivel del porcentaje de agregados covalentes y de fragmentos se evaluó por análisis de las diferencias relacionadas con la masa de las proteínas por migración electroforética SDS-PAGE, en condiciones no reductoras y en condiciones reductoras en un sistema Novex utilizando geles en tampón de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico o MES (Invitrogen). Se depositó una cantidad correspondiente a 2 µg de proteína. El revelado de las proteínas se efectúa por coloración Coomassie azul y/o nitrato de plata.

2.8: IEF

La separación de las diversas isoformas del FVII según su punto isoelectrico se realizó por focalización isoelectrica (IEF). La migración se efectúa sobre un Focugel 3-10 ETC (Gelcompany) en un sistema Multiphor en condiciones nativas (no reductoras y no desnaturizantes). El producto se sometió a una desalación en una unidad de filtración (tamaño de exclusión 10 kDa). Después de determinar la concentración del producto por DO a 280 nm, se depositaron sobre el gel 30 µg. La comparación de las poblaciones contenidas en el producto con los dos diferentes estándares de pl (estándar pl 5,5-10,5 de GE y estándar pl 5,4-5,9-6,6 de Sigma, dispuestos como estándares individuales), después de una coloración por CBB-G250 (Coomassie Brilliant Blue G250), permitió la identificación del pl de las isoformas del FVII (cuantificación por el programa Quantity one, BioRad).

Resultados:

1. Formulaciones F1 a F8

En la tabla 1 siguiente, las formulaciones F1, F2 se dan a título comparativo.

Entre las composiciones según la invención (F3 a F8), se prefieren las formulaciones F3, F4 y F7.

Según esta tabla, las formulaciones F4, F5 y F7 muestran un porcentaje de intensidad de la población monomérica de proteína (respectivamente un 58%, un 61% y un 55%) superior a las obtenidas en las formulaciones NovoSeven® (F1) (9%) y NovoSeven RT® (F2) (27%). Estos resultados reflejan un aumento de la estabilidad del producto en forma sólida y la presencia de monómeros permite disminuir los riesgos de reacciones inmunológicas.

En lo que se refiere a la relación FVIIa/FVII:Ag, las formulaciones F3, F4 y F8 presentan relaciones FVIIa/FVII:Ag antes de la liofilización y después de la reconstitución en forma líquida más elevadas que las obtenidas con las formulaciones tales como las de NovoSeven® (F1) y de NovoSeven RT® (F2), lo que se traduce en que la proteína (FVIIa) contenida en la composición según la invención es más activa. Se puede observar una relación FVIIa/FVII:Ag antes de la liofilización de 17 para F3 y 23 para F8, frente a 14 para las obtenidas con las formulaciones NovoSeven® (F1) y NovoSeven RT®, así como una relación FVIIa/FVII:Ag después de la reconstitución en forma líquida de 19 para F3 y 20 para F8, frente a 15 para las obtenidas con las formulaciones NovoSeven® (F1) y NovoSeven RT®.

En lo que se refiere a los experimentos realizados sobre la temperatura de transición vítrea (Tg), las formulaciones F3 a F8 según la invención muestran un aumento de la temperatura de transición vítrea. Especialmente para la formulación F3, se obtiene una temperatura de transición vítrea igual a 75°C, y de 93°C para la formulación F7. Estos resultados muestran que la proteína (FVIIa) es ventajosamente estable en estas formulaciones. Efectivamente, una Tg elevada permite una estabilidad mejorada de la proteína reduciendo la movilidad y la reactividad del principio activo. Además, estos resultados demuestran bien que los productos según la invención se pueden conservar fuera del refrigerador contrariamente al producto NovoSeven® de la compañía NovoNordisk.

En lo que se refiere al ensayo sobre filtro para la detección de agregados, los resultados indican que las formulaciones F3 a F8 según la invención presentan pocos agregados, incluso una ausencia total de agregados para las formulaciones F4, F7 y F8.

Como lo muestra la Figura 1, la actividad de FVII procedente de la formulación F3 (en forma líquida después de la reconstitución) es aún satisfactoria al cabo de 6 días, con una actividad de al menos un 80%.

Como lo muestra la Figura 2, la actividad del FVII procedente de la formulación F3 (en forma sólida) es aún satisfactoria al cabo de un mes, con una actividad de al menos un 80% para la formulación F3, al menos un 90% para la formulación F4.

TABLA 1: Características de las composiciones preparadas (F1 a F8) (comparativo).

Identificación de la formulación	Composición de la solución tampón	Concentración de FVIIa	Aspecto visual obtenido según el método de Farmacopea Europea		Tamaño y % de intensidad después de la liofilización de la población monomérica de la proteína*		Relación U/ml FVIIa/FVII:Ag		TG (°C)	Ensayo de detección de los agregados
			Antes de la liofilización	Después de la reconstitución en forma líquida	Diámetro (nm)*	% de intensidad*	Antes de la liofilización	Después de la reconstitución en forma líquida		
F1 Formulación similar a Novoseven	Glicilglicina (1,32 g/l) CaCl ₂ ·2H ₂ O (1,47 g/l) NaCl (2,92 g/l) Manitol (30 g/l) Polisorbato 80 (0,07g/l)	0,6 mg/ml			7	9	14	15	45	++
F2 Formulación similar a Novoseven RT	Metionina (0,5 g/l) Glicilglicina (1,32 g/l) CaCl ₂ ·2H ₂ O (1,47 g/l) NaCl (2,92 g/l) Sacarosa (10 g/l) Manitol (25 g/l) Polisorbato 80 (0,07g/l)	0,6 mg/ml			6	27	14	15 (histidina) 15 (agua)	41	++
F3	Glicina (1,2 g/l) Lisina, HCl (1,2 g/l) Citrato trisódico, 2H ₂ O (1,5 g/l) Isoleucina (6 g/l) Arginina, HCl (24 g/l)	0,6 mg/ml			7	39	17	19	75	+
F4	Glicina (1,2 g/l) Lisina, HCl (1,2 g/l) Citrato trisódico, 2H ₂ O (1,5 g/l) Isoleucina (6 g/l) Arginina, HCl (24 g/l) Polisorbato 80 (0,07g/l)	0,6 mg/ml			7	58	16	17	74	ε

F5	Glicina (1,2 g/l) Lisina, HCl (1,2 g/l) Citrato trisódico, 2H ₂ O (1,5 g/l) Arginina, HCl (30 g/l) Polisorbato 80 (0,07g/l)	0,6 mg/ml				7	61	14	13	78	€
F6	CaCl ₂ , 2H ₂ O (0,15 g/l) Arginina, HCl (40 g/l)	0,4 mg/ml	-	-		7	21	13	13	84	+
F7	CaCl ₂ , 2H ₂ O (0,15 g/l) Arginina, HCl (34 g/l) Isoleucina (6 g/l)	0,4 mg/ml				7	55	14	14	93	€
F8	Citrato trisódico, 2H ₂ O (1 g/l) Arginina, HCl (30 g/l) Isoleucina (6 g/l)	0,4 mg/ml				7	23	23	20	91	€

• tamaño determinado por DLS.

Las composiciones F1 y F2 se dan a título comparativo y corresponden a las formulaciones NovoSeven® (F1) y NovoSeven RT® (F2)

2. Formulaciones F9 a F11 - Estudios de estabilidad

Los resultados de los ensayos realizados en estas formulaciones se presentan en las tablas 2 a 4 siguientes.

2.1 Estudio de estabilidad: Formulación F9

La formulación F9 permanece también estable después de 6 meses a 40°C, en forma liofilizada. Además, los resultados muestran que el FVII no presenta signo de degradación evidente después de 6 meses a 40°C.

2.2 Estudio de estabilidad: Formulación F10

Los estudios realizados en la formulación F10 (Tabla 3) permitieron mostrar que el FVIIa es estable durante 48 horas a 5°C, en forma líquida.

Como se puede ver también en la Tabla 2, la formulación F10 permanece estable después de cuatro ciclos de congelación/descongelación y los resultados obtenidos demuestran una ausencia de degradación del FVII.

La formulación F10 permanece también estable después de 6 meses a 25°C o a 40°C, en forma liofilizada. Los resultados de este estudio muestran que el FVII no ha sufrido ninguna degradación. La formulación F10 (no liofilizada) permanece también estable después de 6 meses, congelada a una temperatura inferior a -70°C. Los resultados obtenidos demuestran que el FVII no ha sufrido ninguna degradación.

2.3 Estudio de estabilidad: Formulación F11

La formulación F11 (Tabla 4) es estable después de 6 meses a 25°C o a 40°C, en forma liofilizada. Los resultados de este estudio demuestran que el FVII no ha sufrido ninguna degradación. La formulación F11 es también estable después de 6 meses, congelada a una temperatura inferior a -70°C, en forma liofilizada. Los resultados obtenidos demuestran que el FVII no ha sufrido ninguna degradación.

El estudio de estabilidad en forma líquida de la formulación F11 muestra que el FVII permanece estable durante las 72 horas a 5°C más las 6 horas a 25°C.

TABLA 2: Características de las composiciones preparadas (F9) (comparativo)

Formulación F9	Aspecto visual obtenido según el método de Farmacopea Europea		% de intensidad de la población que contiene la proteína en su forma monomérica (medir por DLS)		Relación U/ml FVIIa/FVII:Ag		Ensayo de detección de los agregados	Análisis DTM (% de monómeros)		SDS-PAGE e IEF
	T=0 (después de la liofilización)	T=6 meses	T=0 (después de la liofilización)	T=6 meses	T=0 (después de la liofilización)	T=6 meses		T=0	T=6 meses	
Liofilizada a 40°C	-	-	61%	52%	16	16	-	86%	90%	Perfiles comparables de T=0 y T=6 meses

TABLA 3: Características de las composiciones preparadas (F10) (comparativo)

Formulación F10	Aspecto visual obtenido según el método de Farmacopea Europea		% de intensidad de la colonia que contiene la proteína en su forma monomérica (medir por DLS)		Relación U/ml FVIIa/FVII:Ag		Ensayo de detección de los agregados	Análisis DTM (% de monómeros)		SDS-PAGE e IEF
	T=0	T=48h a 5°C	T=0	T=48h a 5°C	T=0	T=48h, a 5°C		T=0	T=48h a 5°C	
Líquida a 5°C	-	-	73%	70%	16	14	£	92%	88%	Perfiles comparables de T=0 y T=48h 5°C
	T=0 (después de la liofilización)	T=6 meses	T=0 (después de la liofilización)	T=6 meses	T=0 (después de la liofilización)	T=6 meses	T=6 meses	T=0	T=6 meses	
Liofilizada a 25°C	-	-	55%	71%	16	16	£	91%	93%	Perfiles comparables de T=0 y T=6 meses
Liofilizada a 40°C	-	-	55%	65%	16	15	£	91%	92%	Perfiles comparables de T=0 y T=6 meses
Congelación a <70°C	-	-	73%	87%	16	16	£	92%	92%	Perfiles comparables de T=0 y T=6 meses

	T=0	T=4 ciclos	T=0	T=4 ciclos	T=0	T=4 ciclos	T=0	T=4 ciclos	T=0	T=4 ciclos	
4 ciclos de congelación/ descongelación	-	-	73%	63%	16	13	92%	89%	Perfiles comparables de T=0 y T=4 ciclos		

TABLA 4: Características de las composiciones preparadas (F11) (comparativo)

Formulación F11	Aspecto visual obtenido según el método de Farmacopea Europea		% de intensidad de la colonia que contiene la proteína en su forma monomérica (medir por DLS)		Relación U/ml FVIIa/FVIIAg		Ensayo de detección de los agregados	Análisis DTM (% de monómeros)		SDS-PAGE e IEF
	T=0	T=72h a 5°C + 6h a 25°C	T=0	T=72h a 5°C + 6h a 25°C	T=0	T=72h a 5°C + 6h a 25°C		T=0	T=72h a 5°C + 6h a 25°C	
Líquida a 5°C	-	-	65%	66%	15	21	NR	NR	NR	NR
	T=0 (después de la liofilización)	T=6 meses	T=0 (después de la liofilización)	T=6 meses	T=0 (después de la liofilización)	T=6 meses	T=6 meses	T=0	T=6 meses	
Liofilizada a 25°C	-	-	65%	66%	19	20	£	98%	93%	Perfiles comparables de T=0 y T=6 meses
Liofilizada a 40°C	-	-	65%	55%	19	19	£	98%	97%	Perfiles comparables de T=0 y T=6 meses
Congelación a <-70°C	-	-	87%	87%	19	18	£	NR	97%	Perfiles comparables de T=0 y T=6 meses

NR = no realizado

La descripción divulga los objetos siguientes.

Objeto 1. Composición farmacéutica n forma líquida o en forma sólida, que comprende factor VII, estando dicha composición desprovista de manitol y de sacarosa.

Objeto 2. Composición farmacéutica según el objeto 1 en forma líquida, que comprende factor VII, estando dicha composición desprovista de manitol y de sacarosa.

Objeto 3. Composición farmacéutica según el objeto 1, en forma sólida, preferentemente liofilizada, que comprende el factor VII, estando dicha composición desprovista de manitol y de sacarosa.

Objeto 4. Composición según uno de los objetos 1 a 3, estando dicha composición desprovista de cualquier azúcar, poliol o metionina.

Objeto 5. Composición según uno de los objetos 1 a 4, estando dicha composición además desprovista de glicilglicina.

Objeto 6. Composición según uno de los objetos 1 a 5, en la que el factor VII está en forma activada (FVIIa).

Objeto 7. Composición según uno de los objetos 1 a 6, comprendiendo dicha composición además al menos un aminoácido hidrófilo o que lleva una cadena lateral cargada positivamente y eventualmente al menos un aminoácido hidrófobo.

Objeto 8. Composición según uno de los objetos 1 a 7, que comprende además una sal de metal alcalino, una sal de metal alcalinotérreo, o una sal de un metal de transición.

Objeto 9. Composición según uno de los objetos 1 a 8, que comprende:

- factor VII, preferentemente en forma de factor VIIa;

- arginina, eventualmente en forma de clorhidrato;

- isoleucina;

- lisina, eventualmente en forma de clorhidrato;

- glicina;

- citrato trisódico o cloruro de calcio;

- y llegado el caso polisorbato 80 o polisorbato 20.

Objeto 10. Composición según el objeto 9, que comprende:

- factor VII, preferentemente en forma de factor VIIa;

- de 10 a 40 g/l de arginina, eventualmente en forma de clorhidrato;

- de 4,2 a 6,6 g/l de isoleucina;

- de 0,6 a 1,8 g/l de lisina, eventualmente en forma de clorhidrato;

- de 0,6 a 1,8 g/l de glicina;

- de 1 a 2 g/l de citrato trisódico dihidratado o de 0 a 0,2 g/l de cloruro de calcio dihidratado;

- y llegado el caso, de 0 a 0,5 g/l de polisorbato 80.

Objeto 11. Composición según el objeto 10, que comprende

- factor VII, preferentemente en forma de factor VIIa, de 0,2 a 2 g/l,

- clorhidrato de arginina a 24 g/l,

- isoleucina a 6 g/l,

- citrato trisódico dihidratado a 1,5 g/l,

- glicina a 1,2 g/l,

5 - clorhidrato de lisina a 1,2 g/l,

- y/o polisorbato 80 a 0,07 g/l.

Objeto 12. Composición según el objeto 9, que comprende

10

- factor VII, preferentemente en forma de factor VIIa, de 0,2 a 2 g/l,

- clorhidrato de arginina a 34 g/l,

15 - cloruro de calcio dihidratado a 0,15 g/l,

- isoleucina a 6 g/l.

Objeto 13. Composición sólida liofilizada susceptible de obtenerse a partir de una composición según uno de los objetos 1 a 12.

20

Objeto 14. Procedimiento de preparación de una composición farmacéutica según uno de los objetos 1 a 13, comprendiendo dicho procedimiento la mezcla de FVII con una solución tampón, ajuste del pH si es necesario, filtración y después desecación si es necesario, para obtener la forma sólida.

25

Objeto 15. Procedimiento de preparación de una formulación inyectable par uso terapéutico, comprendiendo dicho procedimiento la disolución de una composición sólida tal como se define en uno de los objetos 1 a 13, en agua para preparación inyectable.

30 Objeto 16. Formulación inyectable susceptible de obtenerse por el procedimiento del objeto 15.

Objeto 17. Composición farmacéutica tal como se define en uno de los objetos 1 a 13, o formulación inyectable tal como se define en el objeto 16, para una utilización en el tratamiento de una hemofilia o de un déficit congénito en factor VII.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende factor VII, estando dicha composición desprovista de manitol, de cualquier azúcar y de glicilglicina, comprendiendo dicha composición i) al menos arginina y ii) al menos un aminoácido hidrófobo.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en forma líquida.
- 10 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en forma sólida, preferentemente liofilizada.
4. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 3, estando dicha composición desprovista de cualquier poliol o de metionina.
- 15 5. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el factor VII está en forma activada (FVIIa).
6. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el factor VII se obtiene por ingeniería genética a partir de células.
- 20 7. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una sal de metal alcalino, una sal de metal alcalinotérreo, o una sal de un metal de transición.
8. Procedimiento de preparación de una composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo dicho procedimiento la mezcla de FVII con una solución tampón, ajuste del pH si es necesario, filtración y después desecación si es necesario, para obtener la forma sólida.
- 25 9. Procedimiento de preparación de una formulación inyectable para uso terapéutico, comprendiendo dicho procedimiento la disolución de una composición sólida tal como se define en una de las reivindicaciones 3 a 8, en agua para preparación inyectable.
- 30 10. Composición farmacéutica tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 8, para una utilización en el tratamiento de una hemofilia o de un déficit congénito en factor VII.

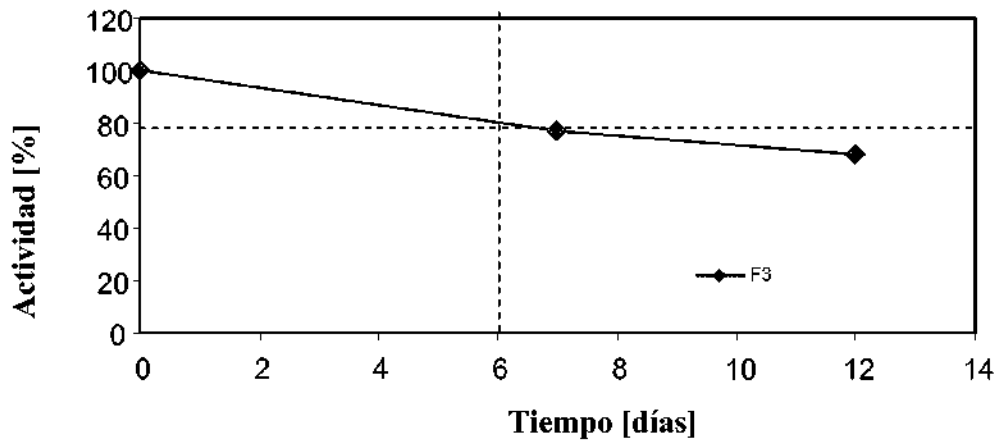


FIGURA 1

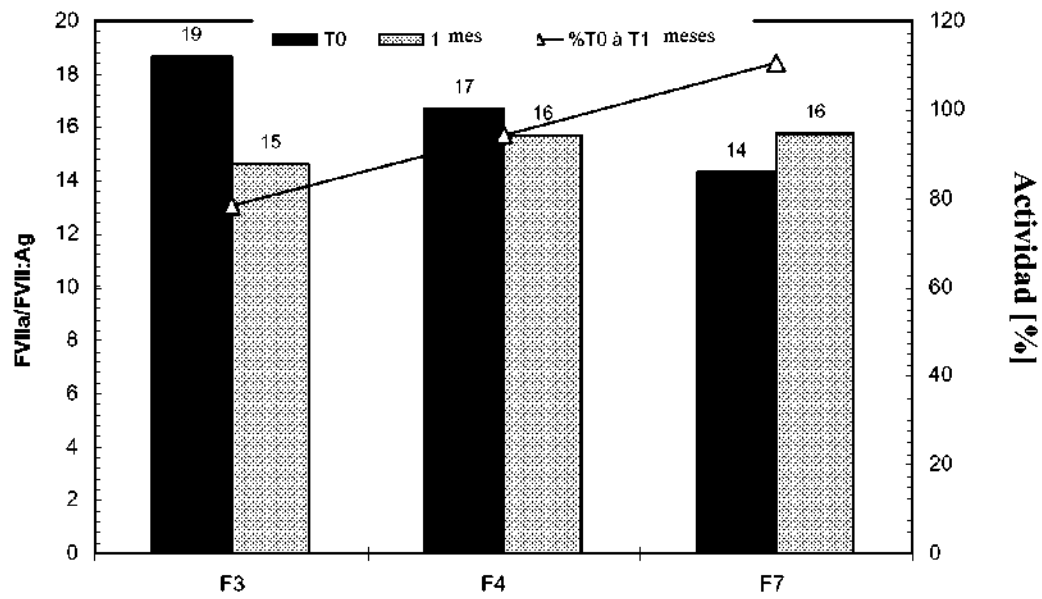


FIGURA 2