

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 550**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/40** (2006.01)

**A61K 38/36** (2006.01)

**A61P 7/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2014 PCT/KR2014/012403**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15093819**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2014 E 14871697 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3085384**

54 Título: **Composición farmacéutica con estabilidad mejorada que contiene la proteína de fusión de factor VII**

30 Prioridad:

**16.12.2013 KR 20130156740**

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

**23.01.2020**

73 Titular/es:

**TIUMBIO CO., LTD. (100.0%)  
5th floor, 310 Pangyo-ro, Bundang-gu  
Seongnam-si, Gyeonggi-do 13494, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, HONG-KEE;  
SHIN, HO CHUL;  
LEE, YOON-JUNG;  
LEE, HO SOON;  
LEE, JI-HYE;  
KANG, SEOK-CHAN y  
KIM, HUN-TAEK**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 738 550 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica con estabilidad mejorada que contiene la proteína de fusión de factor VII

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

10 **[0001]** La presente invención se refiere a una composición farmacéutica con estabilidad mejorada, que contiene una proteína de fusión del factor VII (FVII), y más particularmente, se refiere a una composición farmacéutica con estabilidad mejorada, que contiene una proteína de fusión de FVII y transferrina, como un ingrediente activo, y trehalosa o glicina como agente de carga, y en el que la composición farmacéutica no comprende un poliol.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 **[0002]** El fenómeno de coagulación de la sangre incluye una serie de reacciones enzimáticas en las que están implicados factores de la coagulación, y muchos de los factores de coagulación son proteasas que contienen serina en el sitio activo. El FVII activado, también llamado proconvertina, es uno de los factores anteriores, que tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kDa, y está involucrado en el mecanismo de coagulación de la sangre. Es una glicoproteína de la familia de la serina proteasa, y la síntesis de su forma activa depende de la vitamina K.

20 **[0003]** FVII activado opera localmente en presencia de factores tisulares en libertad después de la lesión del tejido que causa hemorragia, incluso en ausencia del factor VIII o factor IX. Por esta razón, el factor VII, preferiblemente su forma activada, se ha utilizado durante mucho tiempo para el tratamiento de trastornos de la coagulación de la sangre específicos que se manifiestan por sangrado.

25 **[0004]** En la actualidad, los medicamentos para el tratamiento de pacientes que sufren de hemofilia o la deficiencia congénita de FVII están disponibles comercialmente. NovoSeven® producido por NovoNordisk ha sido aprobado en el mercado europeo desde 1996 y fue aprobado en el mercado de los EE.UU. en 1999. NovoSeven® es un medicamento cuyo ingrediente activo es eptacog alfa (FVII de coagulación activada recombinante humana producida a partir de células de riñón de hámster BHK por ingeniería genética). El medicamento también contiene cloruro de sodio (2,92 g/L), cloruro de calcio dihidrato (1,47 g/L), glicilglicina (1,32 g/L), polisorbato 80 (0,07 g/L) y manitol (30 g/L).

30 **[0005]** Además, no es una variante de NovoSeven (llamado NovoSeven® RT), que puede ser almacenada a temperatura ambiente (25°C). Este segundo producto está compuesto por cloruro de sodio (2,92 g/L), cloruro de calcio dihidrato (1,47 g/L), glicilglicina (1,32 g/L), polisorbato 80 (0,07 g/L), manitol (25 g/L) y ácido clorhídrico e hidróxido de sodio para ajustar el pH, y también contiene sacarosa (10 g/L) y metionina (0,5 g/L) (utilizado como antioxidante). Para devolver este producto a una solución, se requiere agua para inyección e histidina. NovoSeven® RT fue aprobado en los mercados europeos y estadounidenses en 2008.

35 **[0006]** Un artículo publicado en 2008 por Nedergaard y sus colegas [Nedergaard H. et al., La estabilidad in vitro de recombinante liofilizado y reconstituido activa FVII formulado para su almacenamiento a temperatura ambiente, Clinical Therapeutics, Vol 30, N° 7, p1309-1315, 2008] informó que NovoSeven® RT podría mantenerse de forma estable en su forma liofilizada durante 24 meses a 25°C, durante 12 meses a 30°C, durante 6 meses a 40°C, y durante 12 horas a 50°C y 60°C. Además, estos productos fueron estables durante solo 6 horas después de la reconstitución del líquido, y por lo tanto, se recomienda inyectar dicho producto dentro de las 3 horas posteriores a la reconstitución.

40 **[0007]** Mientras tanto, se ha informado que la vida media de FVII en plasma es de alrededor de 4 horas (3-6 horas), mientras que la de FVIIa es aproximadamente 2,5 horas. Debido a la corta vida media, el FVIIa debe administrarse mediante inyecciones intravenosas múltiples o inyección continua para la hemostasia. Sin embargo, esto limitaría seriamente los usos terapéuticos de FVIIa en términos de altos gastos de tratamiento y la incomodidad del paciente. Para superar estos problemas, se han proporcionado métodos para preparar proteínas de fusión que comprenden FVII y un compañero de fusión vinculado a ellas, pero las proteínas resultantes tuvieron el problema de perder sus actividades biológicas, aunque la corta vida media in vivo mejoró un poco en comparación con la proteína no fusionada. En consecuencia, los presentes inventores han desarrollado una proteína de fusión en la que la transferrina está unida al término C del FVII, y demostraron que esta proteína de fusión retiene una alta actividad biológica del FVII al tiempo que exhibe una mayor vida media in vivo en comparación con el FVII natural. (Ver Patente Coreana N° 10-1331101).

45 **[0008]** Sin embargo, se ha encontrado que la proteína de fusión anterior muestra una estabilidad significativamente reducida cuando se formula en una composición convencionalmente conocida (por ejemplo, formulación NovoSeven® RT). Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar una composición que tenga una excelente estabilidad, sea fácil de manejar y se pueda usar convenientemente para los pacientes que padecen hemofilia o deficiencia congénita de FVII.

65

**SUMARIO DE LA INVENCION**

**[0009]** Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica con estabilidad mejorada, que contiene una proteína de fusión de FVII.

5 **[0010]** De acuerdo con un objeto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica con estabilidad mejorada, que comprende una proteína de fusión que comprende FVII y transferrina, como ingrediente activo, en el que la transferrina está vinculada a C-terminal del factor VII; y trehalosa o glicina como agente de carga, y en donde la composición no comprende un poliol. La invención se define en las reivindicaciones. Ya que una  
10 composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención contiene glicina o trehalosa como un agente de carga a diferencia de otras formulaciones convencionales, la proteína de fusión de FVII puede almacenarse de manera estable a temperatura ambiente durante un largo período de tiempo. Por lo tanto, se puede utilizar como un agente terapéutico útil para los pacientes que padecen hemofilia o deficiencia congénita de FVII.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS.**

15 **[0011]**

La Fig. 1 es un diagrama esquemático que muestra un proceso para preparar el vector de expresión FVII-Tf a partir de un vector que contiene un ADNc que codifica FVII y un vector que contiene un ADNc que codifica transferrina (Tf).

20 La Fig. 2 es una gráfica que muestra el resultado de medir la cantidad de aumento (%) de agregados de alto peso molecular formados en condiciones de esfuerzo de cizallamiento, con respecto a las composiciones líquidas de los Ejemplos 5 y 6, y el Ejemplo Comparativo 5.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

25 **[0012]** La presente invención proporciona una composición farmacéutica con estabilidad mejorada, que comprende una proteína de fusión que comprende FVII y transferrina, como ingrediente activo, en el que la transferrina está vinculada a C-terminal del factor VII; y trehalosa o glicina como agente de carga.

30 **[0013]** En una composición farmacéutica de la presente invención, la proteína de fusión de FVII se puede almacenar de forma estable a temperatura ambiente durante un largo período de tiempo sin reducción de la actividad de la proteína de fusión de FVII. Como se usa en el presente documento, el término "temperatura ambiente" se refiere generalmente a una temperatura ambiente entre 10°C y 30°C, preferiblemente, entre 15°C y 25°C. Específicamente, una composición farmacéutica de la presente invención puede reducir significativamente la cantidad de agregados de alto peso molecular (HMW) formados durante el proceso de liofilización o almacenamiento. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar presentes en estado liofilizado o líquido, preferiblemente en estado liofilizado.

40 **[0014]** La proteína de fusión de FVII como se usa en el presente documento es una proteína de fusión que comprende FVII y transferrina, y la transferrina está unida al C-terminal de FVII. Una proteína de fusión unida en el orden de transferrina FVII muestra un efecto superior como agente terapéutico en comparación con una proteína de fusión unida en el orden de transferrina-FVII, debido a la exposición del extremo N del FVII.

45 **[0015]** El FVII y de transferrina de la proteína de fusión anteriormente puede ser derivada de cualquier mamífero, preferiblemente FVII humano y transferrina humana. Más preferiblemente, el FVII y la transferrina pueden tener al menos un 95% de homología de secuencia con las de proteínas naturales encontradas en la sangre humana, respectivamente. Lo más preferiblemente, FVII tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y la transferrina tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

50 **[0016]** Además, la proteína de fusión anterior puede abarcar un equivalente funcional o derivado que tiene sustancialmente actividad funcional equivalente. Los equivalentes funcionales ejemplares incluyen variantes preparadas por delección, inserción o sustitución no conservativa o conservativa de cualquier residuo de aminoácido, o una combinación de los mismos en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente, en las que tales cambios no alteran sustancialmente los sitios o dominios activos que ofrecen  
55 actividades biológicas a FVII.

60 **[0017]** En algunos casos, la proteína de fusión puede ser modificado, por ejemplo, por fosforilación, sulfatación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación, etc., para el aumento o la reducción de sus propiedades físicas o químicas, y tales los derivados funcionales también caen dentro del alcance de la presente invención siempre que la actividad de FVII se mantenga sustancialmente por tal modificación.

65 **[0018]** Una proteína de fusión de la presente invención puede contener además la(s) secuencia(s) de reconocimiento para una enzima de restricción entre FVII y la transferrina con el fin de facilitar la inserción de un enlazador se describe a continuación. La secuencia de reconocimiento del enzima de restricción puede ser cualquier secuencia conocida en la técnica, y la secuencia de reconocimiento de la *edad* I (A/CCGGT) se puede usar preferiblemente. En otras palabras, las proteínas de fusión, en las que una secuencia de reconocimiento de enzimas

de restricción está vinculada al término C del FVII y la transferrina está vinculada a dicha secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción, se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

5 **[0019]** Una proteína de fusión de la presente invención pueden contener un enlazador entre FVII y transferrina. El enlazador puede tener de 1 a 100 aminoácidos, preferiblemente de 1 a 75 aminoácidos, más preferiblemente de 5 a 25 aminoácidos, y puede ser cualquier péptido que pueda separar el FVII y la transferrina. Un enlazador puede tener una estructura secundaria estable, como una hélice, o puede originarse a partir de la región bisagra de la IgG.

10 **[0020]** Preferiblemente, un enlazador puede girar libremente en una solución acuosa y no tiene una estructura fija, y, por lo tanto, sería no inmunogénico y aumentaría actividades de FVII de proteínas de fusión al minimizar la interferencia potencial entre dos parejas de fusión. Además, dicho enlazador flexible puede contener glicina (G) y serina(s) en un patrón repetido o aleatorio. Por ejemplo, un enlazador puede comprender (GGGGS)<sub>N</sub> en donde N es un número entero de 1 a 20. Además, las secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80% de homología con el enlazador anterior, preferiblemente que tienen al menos el 85%, también pueden utilizarse como un enlazador  
15 para una proteína de fusión de la presente invención.

**[0021]** Se puede encontrar más información sobre la proteína de fusión en la Patente Coreana N° 10-1331101.

20 **[0022]** Como se usa en el presente documento, el término "composición con estabilidad mejorada" o "composición estable" se refiere a la minimización de la formación de agregados (insoluble o soluble) para mantener la actividad biológica y la estabilidad de la proteína durante la producción o el almacenamiento de una composición de la presente invención, y/o la reducción de la degradación química o el mantenimiento del pH sin una modificación sustancial de la proteína. En caso de liofilización de la composición, la estabilización de la composición abarca la lioprotección y la crioprotección de la proteína.

25 **[0023]** La "estabilidad física" de la proteína de fusión FVII se refiere a la reducción o ausencia de la formación de agregados diméricos, oligoméricos o polímeros (insolubles o solubles) del factor VII, y la reducción o ausencia de la modificación estructural arbitraria de las moléculas.

30 **[0024]** El término "estabilidad química" se refiere a la ausencia o reducción de cualquier modificación química de la proteína de fusión de FVII bajo las condiciones aceleradas durante el almacenamiento. Por ejemplo, se previenen o retrasan los fenómenos de hidrólisis, desaminación y/o oxidación. Además, la oxidación de un aminoácido que contiene azufre es limitada.

35 **[0025]** De aquí en adelante, los ingredientes utilizados en una composición de la presente invención se describen en detalle.

40 **[0026]** La composición de la presente invención comprende como ingrediente activo, una proteína de fusión que comprende FVII y la transferrina. La proteína de fusión FVII se describe anteriormente. La proteína de fusión FVII puede estar comprendida en una cantidad de 0,1 a 1000 mg/ml, preferiblemente de 0,1 a 100 mg/ml, más preferiblemente de 0,2 a 50 mg/ml, lo más preferiblemente de 0,2 a 10 mg/ml en base al peso total de composición, pero no se limita a la misma.

45 **[0027]** Una composición de la presente invención comprende trehalosa o glicina como agente de carga. Una composición de la presente invención no comprende un poliol como agente de carga, pero contiene trehalosa o glicina en lugar de un poliol, mientras que el NovoSeven® RT convencional de NovoNordisk comprende manitol, un poliol, como agente de carga. Un ejemplo de poliol que no se usa en la presente invención es el manitol.

50 **[0028]** De acuerdo con el resultado experimental de la presente invención, una formulación que emplea trehalosa o glicina muestra significativamente mayor estabilidad de almacenamiento en comparación con una formulación usando el manitol como agente de carga.

55 **[0029]** Como un agente de carga, la trehalosa puede estar comprendida en una cantidad de 0,1 a 20% en peso en base al peso total de la composición, y la glicina puede estar comprendida en una cantidad de 0,1 a 20% en peso basado en el peso total de la composición, pero no limitada a la misma.

**[0030]** En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención comprende, además, polisorbato 20 o poloxámero 188 como tensioactivo.

60 **[0031]** Mientras que el NovoSeven® RT convencional de NovoNordisk comprende polisorbato 80 como tensioactivo, una composición de la presente invención comprende polisorbato 20 o poloxámero 188 como tensioactivo en lugar de polisorbato 80.

65 **[0032]** De acuerdo con el resultado experimental de la presente invención, una formulación que emplea polisorbato 20 o poloxámero 188 muestra una estabilidad de almacenamiento significativamente mayor en comparación con una formulación que usa polisorbato 80 como agente tensioactivo.

**[0033]** Como un tensioactivo, polisorbato 20 puede estar comprendido en una cantidad 0,0005 a 2,5% en peso basado en el peso total de la composición, y poloxámero 188 pueden estar comprendidos en una cantidad de 0,05 a 2,5% en peso basado en el peso total de la composición, pero no limitado a los mismos.

**[0034]** En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además, como un estabilizador, al menos uno seleccionado del grupo que consiste de cloruro de sodio, cloruro de calcio, trehalosa, sacarosa y treonina. En otra realización, una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además L-histidina como un tampón. En otra realización, una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además metionina como un antioxidante.

**[0035]** El estabilizador descrito anteriormente juega un papel en la prevención de la proteína de despliegue durante la liofilización, y trehalosa o sacarosa se utiliza frecuentemente convencionalmente [Ver Rationale design of stable lyophilized protein formulations: theory and practice, in Rationale Design of Stable Protein Formulations-Theory and Practice, 2002].

**[0036]** En particular, la trehalosa utilizada como estabilizador se puede solapar con trehalosa utilizada como un agente de carga, pero puesto que la cantidad de trehalosa utilizada como un estabilizador es muy pequeña en la composición en comparación con la trehalosa se utiliza como un agente de carga, la trehalosa también puede funcionar como un estabilizador en una composición donde la trehalosa se emplea como agente de carga pero no como estabilizador. Por otro lado, la trehalosa no puede funcionar como un agente de carga en una composición donde la trehalosa se usa como estabilizador pero no como agente de carga.

**[0037]** Además, de acuerdo con el resultado experimental de la presente invención, una composición que emplea 6% de trehalosa como agente de carga mostraron formación de la torta durante la liofilización, que apoya que la trehalosa funcionaba como un agente de carga. Además, una composición que usa glicina como agente de carga (sin trehalosa) y trehalosa como estabilizador también mostró formación de torta, lo que apoya que la glicina utilizada en grandes cantidades funcionó como agente de carga y la trehalosa funcionó como estabilizador.

**[0038]** Una composición de la presente invención comprende, como estabilizador, al menos uno seleccionado del grupo que consiste de cloruro de sodio, cloruro de calcio, trehalosa, sacarosa y treonina, mientras que la NovoSeven® RT convencional de NovoNordisk comprende todo el cloruro de sodio, cloruro de calcio dihidrato, sacarosa y glicilglicina como estabilizantes. Además, la composición de la presente invención no contiene glicilglicina.

**[0039]** De acuerdo con el resultado experimental de la presente invención, una formulación que comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste de cloruro de sodio, cloruro de calcio, trehalosa, sacarosa y treonina como un estabilizador mostraron significativamente mayor estabilidad de almacenamiento en comparación con una formulación que comprende cloruro de sodio, cloruro de calcio dihidrato, sacarosa y glicilglicina como estabilizantes. El cloruro de sodio, el cloruro de calcio, la trehalosa, la sacarosa y la treonina pueden estar comprendidos en cantidades de 0,01 a 20% en peso, de 0,01 a 10% en peso, de 0,1 a 10% en peso, de 0,1 a 10% en peso y de 0,1 a 45% en peso, en base al peso total de la composición, respectivamente.

**[0040]** La L-histidina utilizada como tampón en la composición de la presente invención se puede usar en una cantidad de 0,5 a 1000 mM en base al peso total de la composición, pero no se limita a esto.

**[0041]** La metionina se utiliza como un antioxidante en la composición de la presente invención se puede usar en una cantidad de 0,01 a 50% en peso basado en el peso total de la composición, pero no se limita a ello.

**[0042]** La composición de la presente invención puede usarse para el tratamiento de la hemofilia o congénita deficiencia de FVII, y una cantidad eficaz de la formulación inyectable se administra a los pacientes en necesidad de tal tratamiento.

**[0043]** La hemofilia puede ser de tipo A o B. La hemofilia A es causada por deficiencia de factor VIII, mientras que la hemofilia B es causada por la deficiencia de factor IX. La deficiencia congénita de FVII es una enfermedad hemorrágica hereditaria rara (transmisión autosómica recesiva) causada por la disminución o ausencia de coagulación FVII.

**[0044]** La formulación inyectable se puede administrar por vía parenteral, intravenosa, subcutánea, o intramuscular en una cantidad evaluada por un médico. Puede administrarse a través de cualquier vía y medio adecuado.

**[0045]** En lo sucesivo, la presente invención se describe más específicamente mediante los siguientes ejemplos, pero la presente invención no se limita a ello.

**Ejemplo de preparación 1: Preparación de la proteína de fusión de FVII y transferrina**

**[0046]** Se prepararon con referencia al método descrito en la patente coreana N° 10-1331101, proteínas de fusión

de FVII y transferrina como se describe a continuación. En resumen, después de preparar un vector de expresión de FVII-Tf, se dejó que el vector se expresara en una línea celular, seguido de la purificación de una proteína de fusión FVII-Tf.

#### 5 <1-1> Preparación del vector plasmídico FVII (pcADN3.1-higro-FVII)

10 [0047] El ARN purificado a partir de células Hep G2 (KCLB N° 88065) se utilizó como molde para la transcripción inversa. El transcrito complementario de ADN (ADNc) se amplificó mediante PCR utilizando cebadores específicos del gen FVII, FVII-F y FVII-R (SEQ ID NOs: 3 y 4) para obtener un marco de lectura abierto (ORF) del gen FVII humano. El ORF de FVII (FVII-ORF) se ligó al vector pcADN3.1-higro (Invitrogen). El vector ligado se verificó mediante digestión de restricción con *Apa* I, *Xba* I, *EcoR* I, *Nco* I y *Pst* I, y secuenciación de ADN. Este vector fue designado como "pcADN3.1-higro-FVII".

#### 15 <1-2> Preparación del vector de expresión FVII-Tf (pcADN3.1-higro-FVII-Tf)

20 [0048] El ADNc de FVII preparado en el Ejemplo 1 se unió a cADN de transferrina (Tf) humana para expresarse como un zimógeno único en una célula animal. El ADNc de la transferrina humana se adquirió de Origene (número de catálogo: SC322130) para asegurar un ADNc con una secuencia idéntica al número de acceso de GenBank: NM\_001063.2. La proteína de fusión tendría la siguiente estructura: (péptido líder)-(FVII maduro)-(Thr-Gly)-(Tf maduro) (el péptido líder consiste en un péptido señal (prepéptido) no presente en el FVII maduro y un propéptido para escindir-se por una enzima de procesamiento, que está compuesta por 38 aminoácidos y corresponde a los aminoácidos 1 a 38 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1).

25 [0049] Una estrategia de clonación para la vinculación de FVII ADNc y Tf ADNc se muestra en la Fig. 1. En primer lugar, FVII ADNc se amplificó a partir pcADN3.1-higro-FVII vector por PCR.

[0050] A continuación, se amplificó Tf usando cADN de transferrina humana como plantilla.

30 [0051] Los ADNc amplificados de FVII y Tf se unieron mediante una serie de digestión de restricción y ligadura. Cada ADN amplificado por PCR se trató con una enzima de restricción, que luego se purificó y se ligó. El ADN ligado se subclonó en el vector pcADN3.1-higro (Invitrogen) tratado con *Nhe*I/*Sho*I. El tamaño y la secuencia del inserto se verificaron adicionalmente mediante secuenciación de ADN.

#### 35 <1-3> Preparación de la proteína de fusión FVII-Tf

[0052] Una solución de cultivo se preparó mediante el uso de una línea celular que se transfectó con el vector de expresión de FVII-Tf preparado en el Ejemplo <1-2> a través del cultivo de biorreactor. Se usó un medio sin suero suplementado con glutamina (GIBCO, N° de Cat 25030-081) y vitamina K (Daihan Pharm. Co.) como medio de preparación.

#### 40 <1-4> Purificación de la proteína de fusión FVII-Tf

45 [0053] A fin de eliminar las células y los residuos celulares que quedan en el medio de cultivo obtenido a partir del cultivo matraz de agitación, el medio de cultivo se filtró a través de filtro de 0,22  $\mu$ m (Corning). El medio de cultivo filtrado se sometió a ultrafiltración utilizando una membrana de flujo tangencial (satorious, 30 KDa) y se concentró. El medio concentrado se aplicó a la columna XK16/20 (GE healthcare) rellena con resina Q-sefarosa Fast Flow (GE healthcare, 17 0510-01). Antes de aplicar el medio, la columna de flujo rápido de Q-sefarosa se equilibró con un volumen de columna de 5 veces o más de un tampón de equilibrio (Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 20 mM). Después de verter el medio concentrado, se vertió un volumen de columna de 5 veces o más del tampón de equilibrio para eliminar las impurezas. Luego, después de verter 3 veces el volumen de la columna de la solución de tampón de lavado (Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 191,5 mM) para eliminar la forma inactivada de FVII-Tf, la proteína de fusión FVII-Tf se eluyó con solución de tampón de elución (20 mM). Tris, pH 8,0, NaCl 1 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM).

#### 55 Ejemplos 1 a 4: Preparación de composiciones liofilizadas que comprenden glicina o trehalosa como agente de carga

60 [0054] De acuerdo con la composición de la Tabla 1 a continuación, se prepararon las composiciones liofilizadas (pH 7) de los Ejemplos 1 a 4 que comprende la proteína FVII-Tf de fusión obtenida en el Ejemplo de Preparación 1 y glicina o trehalosa como agente de carga.

65 [0055] Específicamente, la proteína de fusión de FVII-Tf se puso en una membrana semi-permeable (MWCO = 10 kD), y fue suficientemente dializada durante 24 horas contra las soluciones de acuerdo con las composiciones descritas en la Tabla 1, que contiene glicina o trehalosa como agente de carga. La temperatura se mantuvo en el estado frío de 2 ~ 8°C. Una vez completada la diálisis, cada formulación se esterilizó por filtración pasando a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m. Las formulaciones se pusieron en viales de vidrio en volúmenes iguales y se liofilizaron.

[Tabla 1]

Ingredientes		Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4
Ingrediente activo	FVII-Tf (mg/ml)	1	1	1	1
Agente de carga	Glicina (%)	2	2	2,5	-
	Trehalosa (%)	-	-	-	6
Surfactante	Poloxámero 188 (%)	0,1	0,1	0,1	0,1
Tampón	L-histidina (mM)	10	10	10	10
Estabilizador	Cloruro de sodio (%)	0,23	-	0,1	0,23
	Cloruro de calcio (%)	-	0,15	0,1	0,1
	Trehalosa (%)	-	-	1	-
	Sacarosa (%)	1	1	-	-
Anti-oxidante	Metionina (%)	-	-	0,05	0,05
pH		7	7	7	7

#### 20 Ejemplos comparativos 1 a 4: Preparación de composiciones liofilizadas que comprenden manitol como agente de carga

25 **[0056]** De acuerdo con la composición de la Tabla 2 a continuación, las composiciones liofilizadas (pH 7) de los Ejemplos Comparativos 1 a 4, que comprende proteína de fusión de FVII-Tf obtenida en el Ejemplo de Preparación 1 y manitol como agente de carga se prepararon. El proceso específico de preparación es el mismo que el método descrito en los Ejemplos 1 a 4.

[Tabla 2]

Ingredientes		Ejemplo comparativo 1	Ejemplo comparativo 2	Ejemplo comparativo 3	Ejemplo comparativo 4
Ingrediente activo	FVII-Tf (mg/ml)	1	1	1	1
Agente de carga	Manitol (%)	4	4	2,5	2,5
Surfactante	Poloxámero 188 (%)	0,1	0,1	0,1	0,1
Tampón	L-histidina (mM)	10	10	10	10
Estabilizador	Cloruro de sodio (%)	0,23	-	0,5	0,23
	Cloruro de calcio	-	0,15	0,1	0,1
	Trehalosa (%)	-	-	1	1
	Sacarosa (%)	1	1	-	-
Antioxidante	Metionina (%)	-	-	0,05	0,05
pH		7	7	7	7

#### Ejemplo experimental 1: Análisis de estabilidad de composiciones según el tipo de agente de carga

55 <1-1> Análisis de la cantidad de formación de agregados de alto peso molecular y capacidad de formación de pigmento

60 **[0057]** Con el fin de comparar la estabilidad de las composiciones que comprenden proteína de fusión FVII-Tf de acuerdo con el tipo de un agente de carga, las composiciones liofilizadas de los Ejemplos 1 y 2 y Ejemplos Comparativos 1 y 2 fueron disueltos en 0,5 ml de agua destilada, y el agregado de alto peso molecular (agregado HMW) formado durante la liofilización se analizó mediante GP-HPLC. Para el análisis de GP-HPLC, se utilizó la columna Waters Protein Pak 300 SW (7,5 x 300 mm, 10 µm); se utilizó fosfato sódico 50 mM (pH 7,0) que contenía cloruro sódico 300 mM como fase móvil; y el resultado se detectó a un caudal de 0,5 ml/min a una longitud de onda de 215 nm. El contenido del agregado se representó como un porcentaje de la cantidad inicial de FVII en la composición, y los agregados se recuperaron en forma de un dímero, un oligómero y un multímero del factor VII.

65

**[0058]** Además, con el fin de evaluar el cambio de actividad de proteína de fusión de FVII según el tipo de un agente de carga, las actividades de FVII proteínas de fusión con respecto a las composiciones liofilizadas de Ejemplo 2 y el Ejemplo Comparativo 2 se midieron utilizando la prueba COASET kit (Chromogenix, # 821900-63) por ensayo cromogénico.

**[0059]** Los resultados del análisis de la cantidad de agregado de alto peso molecular y capacidad de formación de pigmento se muestran en las Tablas 3 y 4 a continuación.

[Tabla 3]

	Cantidad de agregado de alto peso molecular formado durante el proceso de liofilización (%)
Ejemplo 1	1,43
Ejemplo 2	0,83
Ejemplo comparativo 1	3,19
Ejemplo comparativo 2	2,09

[Tabla 4]

	Actividad post-liofilización (%)
Ejemplo 2	76
Ejemplo comparativo 2	69

**[0060]** Como se muestra en la Tabla 3, se constató que las composiciones de los Ejemplos 1 y 2, que comprende glicina como agente de carga mostraron pequeña cantidad de la formación de agregados durante el proceso de liofilización, mientras que las composiciones de los Ejemplos comparativos 1 y 2 que comprenden manitol como un agente de carga mostró una cantidad relativamente grande de formación de agregados. Además, como se muestra en la Tabla 4, se encontró que la composición del Ejemplo 2 mostraba una mayor actividad posterior a la liofilización que la composición del Ejemplo Comparativo 2.

**[0061]** Estos resultados indican que el uso de glicina como agente de carga es eficaz en términos de la estabilidad de la proteína de fusión FVII-Tf.

<1-2> Análisis de la estabilidad de almacenamiento a temperatura ambiente.

**[0062]** Con respecto a las composiciones del Ejemplo 3 y del Ejemplo Comparativo 3, las estabilidades de almacenamiento a temperatura ambiente se compararon mediante la medición de las temperaturas de transición vítrea (Tg').

**[0063]** La temperatura de transición vítrea es un buen parámetro para evaluar las estabilidades de almacenamiento a temperatura ambiente. Ya que la temperatura de transición vítrea es más alta, se determina que la formulación es la más estable.

**[0064]** La temperatura de transición vítrea se midió por análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC). En cuanto al dispositivo de medición, se utilizó Pyris Diamond DSC con un intercooler. Las muestras liofilizadas del Ejemplo 3 y el Ejemplo Comparativo 3 se colocaron en bandejas de aluminio y se enfriaron a 0°C. Luego, las muestras se calentaron hasta 100°C a una velocidad de rampa de 5°C/min, y se registró el flujo de calor durante el proceso anterior. Del registro, se observaron señales que incluían la temperatura de transición vítrea (Tg'). Las temperaturas de transición vítrea medidas (Tg') se muestran en la Tabla 5 a continuación.

**[0065]** Además, las composiciones liofilizadas de Ejemplo 3 y el Ejemplo Comparativo 3 se almacenaron durante 6 meses a 40°C, y luego se analizaron las actividades cromogénicas de las proteínas de fusión de FVII como se describe en el Ejemplo Experimental <1-1>. Las relaciones de cambio de actividad (%) (aumento o disminución) de las proteínas de fusión FVII se evaluaron en comparación con aquellas antes del almacenamiento. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 5.

[Tabla 5]

	Temperatura de transición vítrea (Tg')	Cambio en la relación de actividad después del almacenamiento.
Ejemplo 3	≥ 44°C	- 6,1%
Ejemplo Comparativo 3	35°C	- 77,8%

5  
10 [0066] Como se muestra en la Tabla 5, la composición del Ejemplo 3 que comprende glicina como agente de carga mostraron mayor temperatura de transición vítrea de la composición del Ejemplo Comparativo 3 que comprende manitol como agente de carga. Además, la composición del Ejemplo Comparativo 3 mostró una disminución de la actividad de no menos del 77,8% después del almacenamiento durante 6 meses a 40°C, mientras que la composición del Ejemplo 3 mostró una disminución de la actividad de no más del 6,1%.

15 [0067] Estos resultados indican que el uso de glicina como agente de carga es eficaz en términos de la estabilidad de la proteína de fusión FVII-Tf.

<1-3> Comparación de composiciones que comprenden manitol o trehalosa como agente de carga

20 [0068] Con respecto a la composición del Ejemplo 4 que comprende trehalosa como un agente de carga, se compararon los contenidos de agregados de alto peso molecular y la estabilidad de almacenamiento a temperatura ambiente. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 6.

[Tabla 6]

	Cantidad de agregado de alto peso molecular formado durante el proceso de liofilización (%)	Relación de cambio de la cantidad de agregado de alto peso molecular después del almacenamiento (%)	Cambio en la relación de actividad después del almacenamiento (%)
Ejemplo 4	0,5%	- 0,8%	- 7,9%
Ejemplo comparativo 4	1,0%	- 4,8%	-43,7%

25  
30 [0069] Como se muestra en la Tabla anterior, se encontró que la cantidad de agregado de alto peso molecular formada durante el proceso de liofilización, la relación de cambio de la cantidad del agregado, y la actividad después de un almacenamiento durante 6 meses a 40°C fueron bajas en la composición del Ejemplo 4 que comprende trehalosa como agente de carga, mientras que la relación de cambio de la cantidad del agregado y la actividad después del almacenamiento durante 6 meses a 40°C fueron muy altas en la composición de Ejemplo Comparativo 4 que comprende manitol como agente de carga.

35 [0070] Estos resultados indican que el uso de trehalosa como un agente de carga es eficaz en términos de la estabilidad de la proteína de fusión de FVII-Tf.

45 **Ejemplos 5 y 6, y Ejemplo Comparativo 5: Preparación de la composición líquida con diferentes tipos de sustancias coadyuvantes.**

50 [0071] De acuerdo con las composiciones de la Tabla 7 a continuación, las composiciones líquidas (pH 8) que comprende proteína de fusión de FVII-Tf se prepararon mediante la adición de diversos tensioactivos a las proteínas de fusión de FVII-TF obtenidas en el Ejemplo de Preparación 1.

55

60

65

[Tabla 7]

Ingredientes		Ejemplo 5	Ejemplo 6	Ejemplo Comparativo 5
Ingrediente activo	FVII-Tf (mg/ml)	1	1	1
Surfactante	Poloxámero 188 (%)	0,1	-	-
	Polisorbato 20 (%)	-	0,01	-
	Polisorbato 80 (%)	-	-	0,1
Tampón	Tris (mM)	20	20	20
Estabilizador	Cloruro de sodio (M)	1	1	1
	Cloruro de calcio (mM)	5	5	5
pH		8	8	8

### Ejemplo experimental 2: Análisis de la estabilidad de composiciones líquidas según el tipo de tensioactivo

**[0072]** Con respecto a las composiciones líquidas de los ejemplos 5 y 6 y el Ejemplo Comparativo 5, la capacidad de supresión de la formación de agregados de alto peso molecular se midió mediante la medición de la cantidad de la formación de agregados de alto peso molecular bajo la condición de tensión de cizallamiento. Particularmente, las composiciones líquidas se sometieron a una tensión de cizallamiento agitándolas a una velocidad constante durante 4 horas a temperatura ambiente. Luego, la cantidad de agregados de alto peso molecular se midió por HPLC, y se compararon los niveles de aumento de los agregados de alto peso molecular en comparación con los que se dejaron sin agitar. El resultado del análisis comparativo se muestra en la Fig. 2.

**[0073]** Como se muestra en la Fig. 2, el Ejemplo Comparativo 5 que comprende polisorbato 80 no mostró una supresión suficiente de la formación de agregados de alto peso molecular, mientras que las composiciones de los Ejemplos 5 y 6 que comprenden poloxámero 188 o polisorbato 20, mostró alto nivel de supresión de agregados de alto peso molecular. Específicamente, la composición de los Ejemplos 5 que comprende poloxámero 188, mostró una supresión casi completa en la formación de agregados de alto peso molecular.

**[0074]** Estos resultados indican que el uso de poloxámero 188 o polisorbato 20 como agente tensioactivo es preferible en términos de la estabilidad de la proteína de fusión de FVII-Tf.

### Ejemplos 7 a 13: Preparación de composiciones liofilizadas en las que se combinan el agente de carga y el surfactante.

**[0075]** Según las composiciones de la Tabla 8 a continuación, las composiciones liofilizadas que comprenden la proteína de fusión FVII-Tf se prepararon combinando glicina o trehalosa como agente de carga, con poloxámero 188 o polisorbato 20 como surfactante.

[Tabla 8]

Ingredientes		Ejemplo 7	Ejemplo 8	Ejemplo 9	Ejemplo 10	Ejemplo 11	Ejemplo 12	Ejemplo 13
Ingrediente activo	FVII-Tf (mg/ml)	1	1	1	1	1	1	1
Agente de carga	Glicina (%)	2.5	2.5	-	-	-	-	-
	Trehalosa (%)	-	-	6	6	6	3	6
Surfactante	Poloxámero 188 (%)	0.1	-	0.1	0.1	0.1	0.1	-
	Polisorbato 20 (%)	-	0.01	-	-	-	-	0.01
Tampón	L-histidina (mM)	10	10	10	10	10	10	10
Estabilizador	Cloruro de sodio (%)	0.1	0.1	0.23	0.23	0.1	0.23	0.23
	Cloruro de calcio (%)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Trehalosa (%)	1	1	-	-	-	-	-
Anti-oxidante	Sucrosa (%)	-	1	-	-	-	-	-
	Treonina (%)	-	-	-	-	-	2	-
	Metionina (%)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.02	0.05
pH		7	7	7	6.5	7	7	7

**Ejemplos comparativos 6 y 7: Preparación de composiciones liofilizadas en las que se combinan manitol y surfactante**

**[0076]** De acuerdo con las composiciones de la Tabla 9 a continuación, se prepararon los Ejemplos Comparativos 6 y 7, que contienen manitol como agente de carga y poloxámero 188 como tensioactivo.

[Tabla 9]

Ingrediente		Ejemplo comparativo 6	Ejemplo comparativo 7
Ingrediente activo	FVII-Tf (mg/ml)	1	1
Agente de carga	<b>Manitol (%)</b>	<b>2,5</b>	<b>2,5</b>
Surfactante	<b>Poloxámero 188 (%)</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>
Tampón	L-histidina (mM)	10	10
Estabilizador	Cloruro de sodio (%)	0,23	0,5
	Cloruro de calcio (%)	0,1	0,1
	Trehalosa (%)	1	1
Anti-oxidante	Metionina (%)	0,05	0,05
pH		7	7

**Ejemplo Experimental 3: Análisis de estabilidad de composiciones liofilizadas de acuerdo con la combinación de agente de carga y surfactante**

**[0077]** Con respecto a las composiciones liofilizadas de los Ejemplos 7, 8 y 10 a 13, y Ejemplos Comparativos 6 y 7, se analizó la estabilidad durante el almacenamiento. Particularmente, mientras almacenaba cada una de las composiciones liofilizadas durante 3 meses a 25°C y 40°C, las relaciones de cambio de las cantidades de agregados de alto peso molecular y las relaciones de cambio de la actividad de la proteína de fusión FVII-Tf se midieron cada mes. Los resultados se muestran en la Tabla 10 a continuación.

[Tabla 10]

5	Estabilidad de almacenamiento	1 mes de almacenamiento		2 meses de almacenamiento		3 meses de almacenamiento		
		25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C	
10	Ejemplo 7	Relación de cambio del agregado de alto peso molecular (%)	0,7	0,7	0,7	0,8	0,6	0,6
		Cambio de ratio de actividad (%)	-6,9	-2,2	1,0	3,7	3,7	-0,9
15	Ejemplo 8	Relación de cambio del agregado de alto peso molecular (%)	0,2	0,2	0,3	0,4	0,1	0,2
		Cambio de ratio de actividad (%)	No medido	No medido	No medido	No medido	-2,4	5,0
20	Ejemplo 10	Relación de cambio del agregado de alto peso molecular (%)	0,6	0,4	0,4	0,3	0,2	0,2
		Cambio de ratio de actividad (%)	No medido	No medido	-3,1	1,5	No medido	No medido
25	Ejemplo 11	Relación de cambio del agregado de alto peso molecular (%)	0,5	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3
		Cambio de ratio de actividad (%)	-3,6	0,6	6,0	3,7	3,2	-8,1
30	Ejemplo 12	Relación de cambio del agregado de alto peso molecular (%)	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,4
		Cambio de ratio de actividad (%)	-2,0	-1,2	-0,5	1,9	7,7	5,0
35	Ejemplo 13	Relación de cambio del agregado de alto peso molecular (%)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0
		Cambio de ratio de actividad (%)	3,2	-2,0	7,2	3,1	4,8	-0,2
40	Ejemplo comparativo 6	Relación de cambio del agregado de alto peso molecular (%)	0,3	0,4	0,3	0,5	0,2	0,5
		Cambio de ratio de actividad (%)	-6,8	-14,6	-12,9	-14,6	-5,4	-32,2
45	Ejemplo comparativo 7	Relación de cambio del agregado de alto peso molecular (%)	0,2	0,5	0,1	1,5	0,1	2,5
		Cambio de ratio de actividad (%)	5,8	-35,2	6,3	-44,8	9,8	-58,3

55 **[0078]** Como se muestra en la Tabla 10, se encontró que las relaciones de cambio de la cantidad de los agregados y las relaciones de cambio de la actividad eran bajas en las composiciones que comprenden glicina o trehalosa como un agente de carga, y poloxámero 188 o polisorbato 20 como una surfactante, mientras que aquellos eran altos en las composiciones de los Ejemplos Comparativos 6 y 7 que comprenden otros agentes de carga y surfactantes.

60 **[0079]** Estos resultados indican que una excelente estabilidad de almacenamiento se puede lograr mediante la combinación de glicina o trehalosa como un agente de carga, con poloxámero 188 o polisorbato 20 como agente tensioactivo.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

65 **[0080]**

<110> SK CHEMICALS CO., LTD.

<120> COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE TIENE ESTABILIDAD MEJORADA QUE COMPRENDE UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN DE FACTOR VII

5

<130> PCB412175SKM

<160> 4

10

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 444

<212> PRT

15

<213> Homo sapiens

<400> 1

20

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
1 5 10 15

25

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val  
20 25 30

30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro  
35 40 45

35

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu  
50 55 60

40

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile  
65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly  
85 90 95

45

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro  
100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile  
115 120 125

50

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr  
130 135 140

55

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala  
145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile  
165 170 175

60

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val  
180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu  
 195 200 205  
 5  
 Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile  
 210 215 220  
 10  
 Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg  
 225 230 235 240  
 15  
 Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly  
 245 250 255  
 20  
 Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr  
 260 265 270  
 25  
 Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln  
 275 280 285  
 30  
 Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg  
 290 295 300  
 35  
 Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser  
 305 310 315 320  
 40  
 Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met  
 325 330 335  
 45  
 Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser  
 340 345 350  
 50  
 Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala  
 355 360 365  
 55  
 Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly  
 370 375 380  
 60  
 Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val  
 385 390 395 400  
 65  
 Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr  
 405 410 415  
 70  
 Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu  
 420 425 430  
 75  
 Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 435 440

<210> 2  
 <211> 679  
 <212> PRT

ES 2 738 550 T3

<213> Homo sapiens

<400> 2

5 Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu His Glu Ala  
1 5 10 15

10 Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val Ile Pro Ser  
20 25 30

15 Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr Leu Asp Cys  
35 40 45

20 Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Ala  
50 55 60

25 Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu Lys Pro Val  
65 70 75 80

30 Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr Phe Tyr Tyr  
85 90 95

35 Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met Asn Gln Leu  
100 105 110

40 Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser Ala Gly Trp  
115 120 125

45 Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu Pro Arg Lys  
130 135 140

50 Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser Cys Ala Pro  
145 150 155 160

55 Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu Cys Pro Gly  
165 170 175

60 Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser Gly Ala Phe  
180 185 190

65 Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Ser  
195 200 205

70 Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu  
210 215 220

75 Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu Tyr Lys Asp  
225 230 235 240

80 Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala Arg Ser Met  
245 250 255

85 Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln Ala Gln Glu  
260 265 270

90 His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe Ser Ser Pro

ES 2 738 550 T3

	275	280	285
5	His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly Phe Leu Lys 290	295	300
10	Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr Glu Tyr Val 305	310	315 320
15	Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu Ala Pro Thr 325	330	335
20	Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His His Glu Arg 340	345	350
25	Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys Ile Glu Cys 355	360	365
30	Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile Met Asn Gly 370	375	380
35	Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr Ile Ala Gly 385	390	395 400
40	Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn Lys Ser Asp 405	410	415
45	Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val Ala Val Val 420	425	430
50	Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys Gly Lys Lys 435	440	445
55	Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met 450	455	460
60	Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp Glu Phe Phe 465	470	475 480
65	Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser Leu Cys Lys 485	490	495
70	Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn Asn Lys Glu 500	505	510
75	Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val Glu Lys Gly 515	520	525
80	Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn Thr Gly Gly 530	535	540
85	Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys Asp Tyr Glu 545	550	555 560
90	Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu Tyr Ala Asn		

ES 2 738 550 T3

	565	570	575
5	Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr Arg Lys Asp		
	580	585	590
	Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln His Leu Phe		
10	595	600	605
	Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu Phe Arg Ser		
	610	615	620
15	Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys Leu Ala Lys		
	625	630	635
	Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Val		
20	645	650	655
	Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser Leu Leu Glu		
	660	665	670
25	Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro		
	675		

30 <210> 3  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Cebador FVII-F

<400> 3  
 aggggcagca ctgcagagat tcat 25

40 <210> 4  
 <211> 25  
 <212> AND  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Cebador FVII-F

<400> 4  
 tatgggattt ggtgccagga cagtt 25

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5 **1.** Una composición farmacéutica con estabilidad mejorada, que comprende una proteína de fusión que comprende factor VII y transferrina, como ingrediente activo, en la que la transferrina está unida al extremo C del factor VII; y trehalosa o glicina como agente de carga y en la que la composición farmacéutica no comprende un poliol.
- 2.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además polisorbato 20 o poloxámero 188 como un surfactante
- 10 **3.** La composición farmacéutica según la reivindicación 1, que comprende además, como estabilizante, al menos uno seleccionado del grupo que consiste en cloruro de sodio, cloruro de calcio, trehalosa, sacarosa y treonina.
- 4.** La composición farmacéutica según la reivindicación 1, que comprende además L-histidina como tampón; o metionina como un antioxidante.
- 15 **5.** La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la proteína de fusión comprende una secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción entre el extremo C del factor VII y la transferrina.
- 20 **6.** La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la proteína de fusión comprende un enlazador entre el factor VII y la transferrina.
- 7.** La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el poliol es manitol.
- 25 **8.** La composición farmacéutica según la reivindicación 1, que no comprende glicilglicina.
- 9.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la trehalosa o glicina está comprendida en una cantidad de 0,1 a 20% en peso basado en el peso total de la composición.
- 30 **10.** La composición farmacéutica según la reivindicación 2, en la que el polisorbato 20 o el poloxámero 188 está comprendido en una cantidad de 0,0005 a 2,5% en peso o de 0,05 a 2,5% en peso basado en el peso total de la composición, respectivamente.

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

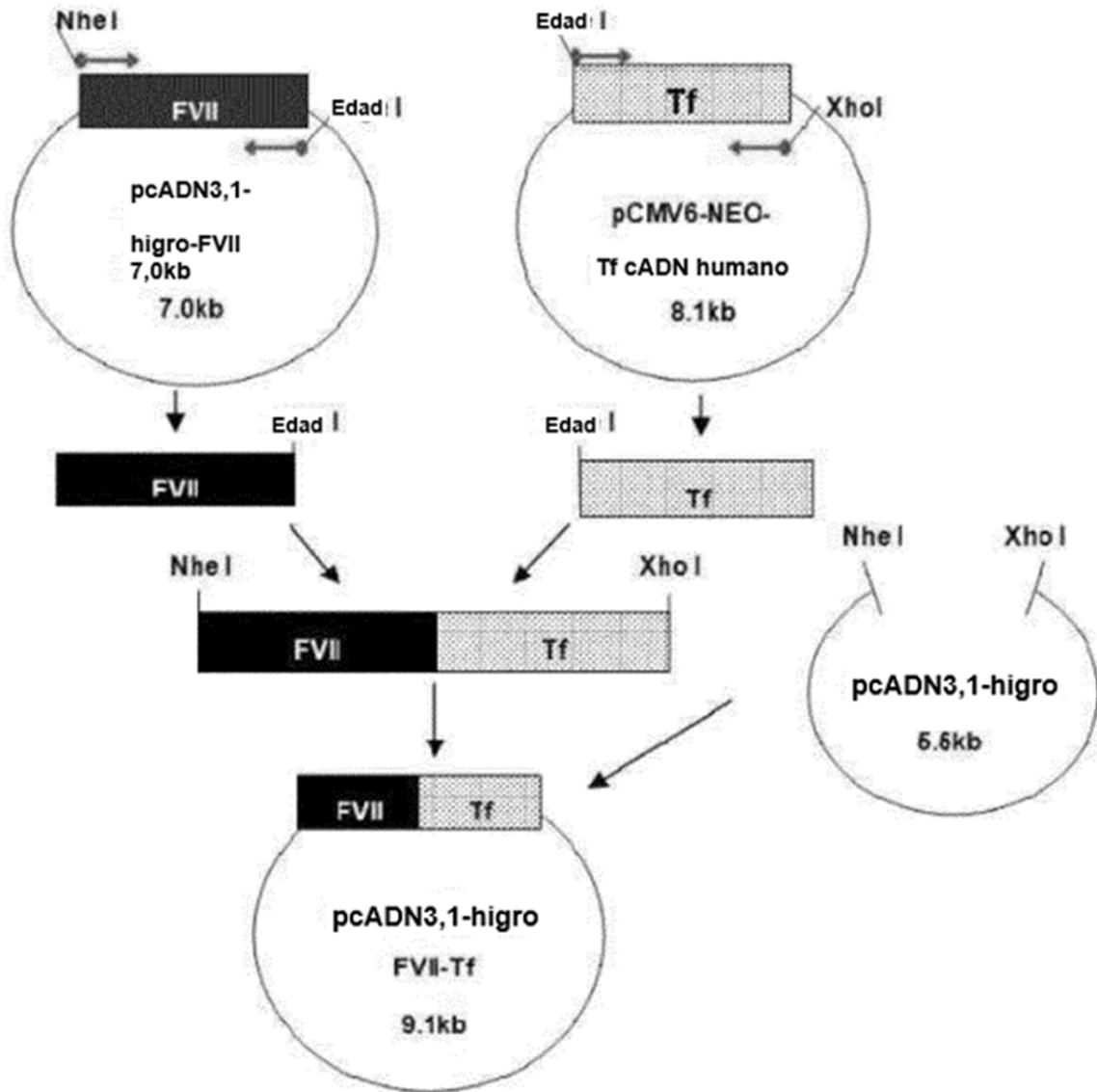


FIG. 2

