



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 335 994**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04738962 .2**

96 Fecha de presentación : **30.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1644030**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2006**

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

30 Prioridad: **01.07.2003 DK 2003 00995**
07.07.2003 US 485334 P
18.03.2004 PCT/DK2004/000181

73 Titular/es: **Novo Nordisk Health Care AG.**
Andreasstrasse 15
8050 Zürich, CH

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.04.2010

72 Inventor/es: **Jensen, Michael, Bech;**
Hansen, Birthe, Lykkegaard;
Kornfelt, Troels y
Jakobsen, Kirsten, Kramer

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.04.2010

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 335 994 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica líquida, acuosa de polipéptidos Factor VII.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas acuosas líquidas que contienen polipéptidos factor VII, y métodos para preparar y usar composiciones de este tipo, así como recipientes que contienen composiciones de este tipo, y el uso de composiciones de este tipo en el tratamiento de un síndrome sensible al factor VII. Más particularmente, la invención se refiere a composiciones líquidas estabilizadas contra la degradación química y/o física.

Antecedentes de la invención

Una variedad de factores implicados en el proceso de coagulación de la sangre ha sido identificada, incluyendo el factor VII (FVII), una glicoproteína de plasma. La hemostasis es iniciada por la formación de un complejo entre el factor tisular (TF) estando expuesto a la sangre circulante tras una herida en la pared vascular, y el FVIIa que está presente en la circulación en una cantidad correspondiente a aproximadamente un 1% de la masa de proteína FVII total. FVII existe en el plasma principalmente como un zimógeno monocaténario que se divide por FXa en su forma activada bicatenaria, FVIIa. El factor VIIa activado recombinante (rFVIIa) ha sido desarrollado como un agente prohemostático. La administración de rFVIIa ofrece una respuesta prohemostática rápida y altamente eficaz en sujetos hemofílicos con sangrados que no pueden ser tratados con otros productos de factor de coagulación debido a la formación de anticuerpos. También el sangrado en sujetos con una deficiencia de factor VII o sujetos con un sistema de coagulación normal, pero que experimentan un sangrado excesivo pueden ser tratados exitosamente con FVIIa.

Es deseable tener formas de administración del factor VIIa adecuadas tanto para el almacenamiento como para la entrega. De forma ideal, el fármaco es almacenado y administrado como un líquido. Alternativamente, el fármaco es liofilizado, es decir, deshidratado por congelación, y después reconstituido mediante la adición de un diluyente adecuado antes de que el paciente lo use. De forma ideal, el fármaco tiene una estabilidad suficiente para ser almacenado a largo plazo, es decir, más de seis meses.

La decisión bien de mantener el fármaco final como un líquido o de deshidratarlo por congelación normalmente está basada en la estabilidad del fármaco proteico en estas formas. La estabilidad de la proteína puede ser afectada entre otras cosas por factores tales como la fuerza iónica, el pH, la temperatura, ciclos repetidos de congelación/descongelación, y exposiciones a esfuerzos de cizalla. La proteína activa puede perderse como resultado de inestabilidades físicas, incluyendo la desnaturalización y la agregación (la formación de agregados tanto solubles como insolubles), así como por inestabilidades químicas, incluyendo, por ejemplo, la hidrólisis, la desamidación, y la oxidación, por nombrar sólo unos pocos. Para una revisión general de la estabilidad de fármacos proteicos, véase, por ejemplo, Manning, *et al.*, Pharmaceutical Research (Investigación Farmacéutica) 6: 903-918 (1989).

Puesto que la incidencia posible de inestabilidades de proteína es estimada ampliamente, es imposible predecir problemas de inestabilidad particulares de una proteína particular. Cualquiera de estas inestabilidades puede resultar en la formación de un subproducto de la proteína, o un derivado con actividad reducida, toxicidad aumentada, y/o inmunogenicidad aumentada. De hecho, la precipitación de la proteína puede llevar a una trombosis, a una no homogeneidad de la forma y la cantidad de la dosificación, así como a la obstrucción de jeringas. Además, las modificaciones postraduccionales tales como, por ejemplo, la gamma-carboxilación de residuos determinados de ácido glutámico en el N-término y la adición de cadenas laterales de carbohidrato proporcionan sitios potenciales que pueden ser susceptibles de modificación tras el almacenamiento. También, específicamente para el factor VIIa, siendo una serina proteasa, puede tener lugar una fragmentación debido a la autocatálisis (degradación enzimática). Así, la seguridad y la eficacia de cualquier composición de una proteína están directamente relacionadas con su estabilidad. Mantener la estabilidad en una forma líquida es generalmente diferente a mantener la estabilidad en una forma liofilizada debido al potencial altamente aumentado para el movimiento molecular y de este modo la probabilidad aumentada de interacciones moleculares. Mantener la estabilidad en una forma concentrada también es diferente a lo anterior, debido a la propensión a agregar la formación a concentraciones de proteína aumentadas.

En el desarrollo de una composición líquida, muchos factores se toman en consideración. La estabilidad líquida a corto plazo, es decir, menos de seis meses, generalmente depende de evitar grandes cambios estructurales, tales como la desnaturalización y la agregación. Estos procesos son descritos en la bibliografía para una serie de proteínas, y muchos ejemplos de agentes estabilizantes existentes. Es bien conocido que un agente eficaz a la hora de estabilizar una proteína en realidad actúa para desestabilizar otra. Tan pronto como la proteína ha sido estabilizada contra grandes cambios estructurales, el desarrollo de una composición líquida para una estabilidad a largo plazo (p. ej., de más de seis meses) depende de estabilizar aún más la proteína a partir de tipos de degradación específicos de esta proteína. Tipos más específicos de degradación pueden incluir, por ejemplo, la aleatorización del enlace de disulfuro, la oxidación de residuos determinados, la desamidación, la ciclización. Aunque no siempre es posible identificar las especies individuales de degradación, se desarrollan ensayos para controlar cambios sutiles así como para controlar la capacidad de excipientes específicos para estabilizar únicamente la proteína de interés.

Es deseable que el pH de la composición esté en un rango fisiológicamente adecuado tras la inyección/infusión, de lo contrario puede resultar en dolor e incomodidad para el paciente.

Para una revisión general de composiciones de proteínas, véase, por ejemplo, Cleland *et al.*: The development of stable protein compositions (El desarrollo de composiciones proteicas estables): A closer look at protein aggregation, deamidation and oxidation, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 1993, 10(4): 307-377 (Una mirada más cercana a la agregación de proteína, la desamidación y la oxidación, Revisiones Criticas en Sistemas Portadores de Fármacos Terapéuticos); y Wang *et al.*, Parental compositions of proteins and peptides: Stability and stabilizers, Journal of Parental Science and Technology 1988 (Supplement), 42 (2S) (Composiciones parentales de proteínas y péptidos: Estabilidad y estabilizadores, Revista de Ciencia Parental y Tecnología 1988 (Suplemento), 42 (2S)).

El factor VIIa se somete a varias vías degradativas, especialmente a agregación (dimerización), oxidación, y rotura autolítica (recorte del esqueleto peptídico o “degradación de cadena pesada”). Además, puede ocurrir una precipitación. Muchas de estas reacciones pueden ser desaceleradas significativamente retirando el agua de la proteína. No obstante, el desarrollo de una composición acuosa para el factor VIIa tiene las ventajas de eliminar errores de reconstitución, aumentando de este modo la exactitud de la dosificación, así como simplificando el uso del producto clínicamente, aumentando de este modo la adaptabilidad del paciente. De forma ideal, las composiciones del factor VIIa deberían ser estables durante más de 6 meses en un amplio rango de concentraciones de proteína. Ésto permite la flexibilidad en métodos de administración. Generalmente, formas más altamente concentradas permiten la administración de volúmenes inferiores, lo que es altamente deseable desde el punto de vista del paciente. Composiciones líquidas pueden tener muchas ventajas sobre productos deshidratados por congelación con respecto a la facilidad de administración y uso.

Hoy, la única composición de polipéptido FVII hecha de forma recombinante comercialmente disponible, es un producto de factor FVIIa deshidratado por congelación que es reconstituido antes de su uso; contiene una concentración de factor VIIa relativamente baja, p. ej., de aproximadamente 0,6 mg/ml. Un frasco (1,2 mg) de NovoSeven® (Novo Nordisk A/S, Dinamarca) contiene 1,2 mg de factor humano VIIa recombinante, 5,84 mg de NaCl, 2,94 mg de CaCl₂, 2 H₂O, 2,64 mg de glicil-glicina (Gli-Gli), 0,14 mg de polisorbato 80, y 60,0 mg de manitol; está reconstruido para un pH 5.5 por 2,0 ml de agua para inyección (WFI). Una vez reconstituida, la solución de proteína es estable para el uso durante 24 horas. Así, actualmente no hay ningún producto líquido de factor VII listo para su uso o concentrado disponible comercialmente.

US 2004/115590 A expone composiciones líquidas acuosas de factor VIIa. Se ha propuesto que la formulación se estabilice con calcio, u otros iones de metal bivalentes, p. ej. zinc para mantener la actividad del factor VIIa.

WO 94/22905 A expone la purificación de factor VII implicando una serie de fases de purificación cromatográfica, donde Zn⁺⁺ está presente en al menos una de las fases de purificación.

Por consiguiente, es un objetivo de esta invención proporcionar una composición líquida farmacéutica acuosa de polipéptido factor VII que proporcione un control aceptable de productos de degradación química y/o física tales como productos de degradación enzimática o de autocatálisis.

Resumen de la invención

Los inventores presentes han descubierto que el factor VII o sus análogos (“polipéptidos factor VII”), al formularse como composiciones farmacéuticas acuosas líquidas junto con al menos un agente conteniendo metal donde dicho metal es seleccionado del grupo que consiste en cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, y cobre del estado oxidante +II exhiben una estabilidad mejorada y de ese modo permiten el almacenamiento prolongado antes del uso real.

Así, un aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica líquida acuosa comprendiendo un polipéptido factor VII (i); un agente amortiguador (ii) adecuado para mantener el pH en el rango de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 9.0; al menos un agente conteniendo metal (iii), donde dicho metal sea seleccionado del grupo que consiste en cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, y cobre del estado oxidante +II; y un tensioactivo no iónico (iv).

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar una composición farmacéutica líquida acuosa de un polipéptido factor VII comprendiendo la fase de suministro del polipéptido factor VII (i) en una solución comprendiendo un agente amortiguador (ii) adecuado para mantener el pH en el rango de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 9.0; al menos un agente conteniendo metal (iii), donde dicho metal sea seleccionado del grupo que consiste en cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, y cobre del estado oxidante +II; y un tensioactivo no iónico (iv).

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

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

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a un método para tratar un síndrome sensible al factor VII, comprendiendo el método la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica líquida acuosa a un sujeto necesitado de la misma.

Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a un contenedor hermético conteniendo la composición farmacéutica líquida acuosa y opcionalmente un gas inerte.

Un séptimo aspecto de la presente invención se refiere a un método para la reducción de la concentración iónica metálica en una composición farmacéutica líquida acuosa, comprendiendo dicho método la fase de poner en contacto la composición farmacéutica líquida acuosa con un material de intercambio catiónico.

Descripción detallada de la invención

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención reside en el desarrollo de una nueva composición farmacéutica líquida acuosa estabilizada comprendiendo un polipéptido factor VII. Más específicamente, la composición farmacéutica líquida acuosa comprende un polipéptido factor VII (i); un agente amortiguador (ii) adecuado para mantener el pH en el rango de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 9.0; al menos un agente conteniendo metal (iii), donde dicho metal es seleccionado del grupo - que consiste en cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, y cobre del estado oxidante +II; y un tensioactivo no iónico (iv).

Los presentes inventores tienen la impresión de que los primeros metales de la serie de transición del estado oxidante +II, excepto el zinc, no han sido utilizados previamente como estabilizantes en relación con composiciones farmacéuticas listas para el uso.

Usado aquí, el término “primeros metales de la serie de transición del estado oxidante +II, excepto el zinc” se destina a abarcar los metales titanio, vanadio, cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel y cobre. Como se describe en varios libros de texto (p. ej. en “Basic Inorganic Chemistry” (Química Inorgánica Básica), 2ª ed. Cotton, A. *et al.*, John Wiley & Sons, New York, 1987, capítulos 2-5, página 53), tanto el zinc como el cadmio y el mercurio tienen propiedades diferentes de los metales restantes de la serie de metales de transición. Por esta razón, el zinc no es considerado útil en relación con la presente invención.

El/Los metal(es) son seleccionados entre cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, y cobre. Ejemplos ilustrativos de agentes que contienen metal (iii) correspondientes a estos metales son cloruro de cromo(II), cloruro de manganeso (II), cloruro de hierro(II), cloruro de cobalto(II), cloruro de níquel(II), y cloruro de cobre(II). Debe ser entendido que el agente que contiene metal (iii) puede comprender dos o más metales, p. ej. dos o más primeros metales de la serie de transición seleccionados de entre cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel y cobre. Así en algunos casos, dos o más de los agentes mencionados anteriormente pueden ser usados en combinación.

Hasta ahora, los metales más prometedores son el cobre y el manganeso. Ejemplos ilustrativos de agentes correspondientes que contienen metal (iii) son el cloruro de cobre(II) y el cloruro de manganeso(II).

La concentración del agente (o los agentes) conteniendo metal (iii) es típicamente de al menos 1 μM . La concentración deseable (o necesaria) depende típicamente del agente (o agentes) seleccionado(s) que contiene(n) metal, más específicamente de la afinidad de enlace del metal seleccionado del estado oxidante +II con el polipéptido factor VII.

En formas de realización diferentes, el agente que contiene metal (iii) está presente en una concentración de al menos 5 μM , al menos 25 μM , al menos 50 μM , al menos 100 μM , al menos 200 μM , al menos 400 μM , al menos 500 μM , al menos 800 μM , al menos 900 μM , al menos 1000 μM , al menos 5 mM, al menos 25 mM, al menos 50 mM, al menos 100 mM, al menos 200 mM, al menos 400 mM, al menos 800 mM, al menos 900 mM, o al menos 1000 mM.

En una forma de realización particular, el metal del agente que contiene metal (iii) es cobre y la concentración de dicho agente es de al menos 5 μM , así como de al menos 10 μM , al menos 15 μM , al menos 25 μM , o al menos 50 μM .

En otra forma de realización particular, el metal del agente que contiene metal (iii) es manganeso y la concentración de dicho agente es de al menos 100 μM , así como de al menos 500 μM , al menos 1 mM, o al menos 5 mM.

En varias formas de realización, la proporción molar entre el agente que contiene metal (iii) (Me^{2+}) y el polipéptido FVII es: superior a 0,5; superior a 1; superior a 2; superior a 4; superior a 5; superior a 10; superior a 25; superior a 100; superior a 150; tal como, p. ej., en la gama de 0,5-250, tal como 0,5-150, 0,5-100, 0,5-25, 1-250, 1-100, 1-25, 1-10.

En una forma de realización, la composición contiene además calcio (Ca^{2+}) y/o magnesio (Mg^{2+}), tales como, por ejemplo, seleccionados de una lista de: cloruro de calcio, acetato de calcio, gluconato de calcio, levulinato de calcio, cloruro de magnesio, acetato de magnesio, sulfato de magnesio, gluconato de magnesio, levulinato de magnesio, sales de magnesio de ácidos fuertes, o sus mezclas.

En una forma de realización, el calcio (Ca^{2+}) y/o el magnesio (Mg^{2+}) está presente en una concentración de al menos aproximadamente 0,1 μM , tal como, p. ej., de al menos aproximadamente 0,5 μM , al menos aproximadamente 1 μM , al menos aproximadamente 5 μM , al menos aproximadamente 10 μM , al menos aproximadamente 50 μM , al menos aproximadamente 100 μM , al menos aproximadamente 1 mM, al menos aproximadamente 2 mM, al menos aproximadamente 5 mM, o al menos aproximadamente 10 mM. En una forma de realización particular la composición comprende al menos 2 mM de Ca^{2+} .

En diversas formas de realización, la proporción molar entre el calcio (Ca^{2+}) y/o los iones de magnesio (Mg^{2+}) y el polipéptido FVII es: 0,01-750; 0,001-250; 0,001-100; 0,001-10; 0,001-1,0; 0,001-0,5; 0,5-750; 0,5-250; 0,5-100; 0,5-10; 0,5-1,0; 0,001-0,4999; 0,005-0,050.

5 En una forma de realización de la presente invención, la proporción molar de calcio no complejo (Ca^{2+}) y/o magnesio (Mg^{2+}) con respecto al polipéptido del factor VII es inferior al 0,5, p. ej. en el rango de 0,001-0,499, tal como 0,005-0,050, o en el rango de 0,000-0,499, tal como en el rango de 0,000-0,050, o aproximadamente 0,000. En una forma de realización de la presente invención, la proporción molar de calcio no complejo (Ca^{2+}) con respecto al polipéptido factor VII, es inferior al 0,5, p. ej. en el rango de 0,001-0,499, tal como 0,005-0,050, o en el rango de 0,000-0,499, tal como en el rango de 0,000-0,050, o aproximadamente 0,000.

En otra forma de realización, la proporción molar de calcio no complejo y/o iones de magnesio con respecto al polipéptido del factor VII es superior al 0,5. En otra forma de realización, la proporción molar de iones de calcio no complejos con respecto al polipéptido factor VII es superior al 0,5.

15 Para obtener la baja proporción relativa entre iones de calcio y/o de magnesio (Ca^{2+}) y el polipéptido factor VII, puede ser necesario o deseable eliminar exceso de calcio y/o de iones de magnesio, p. ej., poniendo en contacto la composición con un material de intercambio de iones bajo condiciones adecuadas para la eliminación del Ca^{2+} y/o el Mg^{2+} sin eliminar los agentes que contienen metal (iii). Ésto es particularmente pertinente donde la proporción entre iones de magnesio y/o calcio y el polipéptido factor VII en una solución de una fase de proceso precedente a la fase de formulación excede el límite declarado anteriormente.

El efecto biológico de la composición farmacéutica es principalmente asignado a la presencia del polipéptido factor VII.

25 Según se utiliza en este caso, el término “polipéptido factor VII” engloba el factor VII de tipo salvaje (es decir un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en la Patente U.S. nº. 4.784.950), así como variantes de factor VII que exhiben sustancialmente la misma o una actividad biológica mejorada en relación con el factor VII de tipo salvaje. El término “factor VII” va destinado a englobar polipéptidos del factor VII en su forma no dividida (de zimógeno), así como los que han sido procesados proteolíticamente para producir sus respectivas formas bioactivas, lo que puede ser designado como factor VIIa. Típicamente, el factor VII es dividido entre los residuos 152 y 153 para producir el factor VIIa. El término “polipéptido factor VII” también engloba polipéptidos, incluyendo las variantes, en los que la actividad biológica del factor VIIa ha sido sustancialmente modificada o reducida de alguna manera en relación a la actividad del factor VIIa de tipo salvaje. Estos polipéptidos incluyen, sin limitación, el factor VII o el factor VIIa en el cual han sido introducidas alteraciones específicas de secuencia de aminoácidos que modifican o disgregan la bioactividad del polipéptido.

La actividad biológica del factor VIIa en la coagulación de la sangre deriva de su capacidad de (i) enlazar con el factor tisular (TF) y (ii) catalizar la rotura proteolítica del factor IX o factor X para producir el factor activado IX o X (factor IXa o Xa, respectivamente).

35 Para los objetivos de la invención, la actividad biológica de los polipéptidos factor VII (“actividad biológica del factor VII”) puede ser cuantificada midiendo la capacidad de una preparación para estimular la coagulación de la sangre usando el plasma y la tromboplastina deficientes del factor VII, como se describe, p. ej., en la Patente U.S. nº. 5.997.864 o WO 92/15686, o como se describe en el Ensayo 4 de la presente especificación (véase abajo). Alternativamente, la actividad biológica del factor VIIa puede ser cuantificada por (i) la medición de la capacidad del factor VIIa o de un polipéptido relacionado con el factor VII para producir el factor activado X (factor Xa) en un sistema comprendiendo TF introducido en una membrana lipídica y factor X. (Persson *et al.*, J. Biol. Chem. 272:19919-19924, 1997); (ii) la medición de la hidrólisis del factor X en un sistema acuoso (“*In Vitro* Proteolysis Assay” (Ensayo de Proteolisis *In Vitro*), Ensayo 2 abajo); (iii) la medición de la unión física del factor VIIa o un polipéptido relacionado con el factor VII al TF usando un instrumento basado en la resonancia de plasmón superficial (Persson, FEBS Letts. 413:359-363, 1997); (iv) la medición de la hidrólisis de un sustrato sintético mediante factor VIIa y/o un polipéptido relacionado con el factor VII (“*In Vitro* Hydrolysis Assay” (Ensayo de Hidrólisis *In Vitro*), Ensayo 1 abajo); o (v) la medición de la generación de trombina en un sistema *in vitro* independiente de TF (Ensayo 3 abajo).

55 Variantes del factor VII teniendo sustancialmente la misma actividad biológica o mejorada en relación al factor VIIa de tipo salvaje engloban las que exhiben al menos aproximadamente un 25%, preferiblemente al menos aproximadamente un 50%, más preferiblemente al menos aproximadamente un 75% y lo más preferiblemente al menos aproximadamente un 90% de la actividad específica del factor VIIa que ha sido producida en el mismo tipo de células al ser analizadas en uno o más de un ensayo de coagulación, ensayo de proteolisis, o ensayo de enlace con TF como se ha descrito anteriormente. Variantes del factor VII teniendo una actividad biológica sustancialmente reducida en relación al factor VIIa de tipo salvaje son las que exhiben menos de aproximadamente un 25%, tal como, p. ej., menos de aproximadamente un 10%, o menos de aproximadamente un 5% de la actividad específica del factor VIIa de tipo salvaje que ha sido producida en el mismo tipo de células al ser analizadas en uno o más de un ensayo de coagulación, ensayo de proteolisis, o ensayo de enlace al TF como se ha descrito anteriormente. Variantes del factor VII teniendo una actividad biológica sustancialmente modificada en relación al factor VII de tipo salvaje incluyen, sin limitación, variantes del factor VII que exhiben actividad proteolítica de factor X independiente de TF y las que enlazan con TF pero no dividen el factor X.

Variantes del factor VII, tanto si exhiben sustancialmente la misma bioactividad o mejor que el factor VII de tipo salvaje, o, alternatively, exhiben una bioactividad sustancialmente modificada o reducida en relación al factor VII de tipo salvaje, incluyen, sin limitación, polipéptidos con una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia del factor VII de tipo salvaje por la inserción, la delección, o la sustitución de uno o más aminoácidos.

Ejemplos no limitativos de variantes del factor VII que tienen sustancialmente la misma actividad biológica que el factor VII de tipo salvaje incluyen S52A-FVIIa, S60A-FVIIa (Lino *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 352: 182-192, 1998); variantes de FVIIa que exhiben una estabilidad proteolítica aumentada como se describe en la Patente U.S. n°. 5.580.560; factor VIIa que ha sido proteolíticamente dividido entre residuos 290 y 291 o entre residuos 315 y 316 (Mollerup *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 48:501-505, 1995); formas oxidadas de factor VIIa (Kornfelt *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 363:43-54, 1999); variantes de FVII como se describe en PCT/DK02/00189; y variantes de FVII que exhiben una estabilidad proteolítica aumentada como se describe en WO 02/38162 (Scripps Research Institute); variantes de FVII que tienen un dominio Gla modificado y que exhiben una unión de membrana mejorada como se describe en WO 99/20767 (Universidad de Minnesota); y variantes de FVII como se describe en WO 01/58935 (Maxigen ApS).

Ejemplos no limitativos de variantes del factor VII que tienen una actividad biológica aumentada en comparación con el FVIIa de tipo salvaje incluyen variantes de FVII como se describe en WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, WO 03/27147, WO 03/37932; WO 02/38162 (Scripps Research Institute); y variantes de FVIIa con una actividad mejorada como se describe en JP 2001061479 (Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.).

Ejemplos no limitativos de variantes de factor VII que tienen una actividad biológica sustancialmente reducida o modificada en relación al factor VII de tipo salvaje incluyen R152E-FVIIa (Wildgoose *et al.*, Biochem 29:3413-3420, 1990).

[illegible]

ES 2 335 994 T3

V158T/M298Q-FVII, F374Y/V158T/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/S314E/M298Q-FVII, F374Y/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII, F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII, F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII, F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII, F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII, F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII, F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/K337A-FVII, F374Y/V158D/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305VA/158D/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305VA/158D/E296V/S314E FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/K337A/S314E-FVII, F374YA/158T/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, S52A-Factor VII, S60A-Factor VII; R152E-Factor VII, S344A-Factor VII, Factor VIIa carente de dominio Gla; y P11Q/K33E-FVII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; y FVII teniendo sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos del 233Tr al 240Asn, FVII teniendo sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos del 304Arg al 329Cys, y FVII teniendo sustituciones, deleciones, o adiciones en la secuencia de aminoácidos Ile153-Arg223.

En algunas formas de realización, el polipéptido factor VII es el factor humano VIIa (hFVIIa), preferiblemente el factor humano VIIa producido recombinantemente (rhVIIa).

En otras formas de realización, el polipéptido factor VII es una variante de secuencia del factor VII.

En algunas formas de realización, el polipéptido factor VII tiene una glicosilación diferente al factor humano VII de tipo salvaje.

En varias formas de realización, p. ej. en las que el polipéptido factor VII es un polipéptido relacionado con el factor VII o una variante de secuencia del factor VII, la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del factor humano nativo VIIa (FVIIa de tipo salvaje) es de al menos aproximadamente 1,25, preferiblemente de al menos aproximadamente 2,0, o 4,0, lo más preferiblemente de al menos aproximadamente 8,0, al analizarse en el "Ensayo de Proteólisis *In Vitro*" como se describe en la presente especificación.

En algunas formas de realización, los polipéptidos factor VII son polipéptidos relacionados con el factor VII, en particular variantes, donde la proporción entre la actividad de dicho polipéptido factor VII y la actividad del factor humano nativo VIIa (FVIIa de tipo salvaje) es de al menos aproximadamente 1,25 al analizarse en el "Ensayo de Hidrólisis *In Vitro*" (véase "Ensayos", abajo); en otras formas de realización, la proporción es de al menos aproximadamente 2,0; en más formas de realización, la proporción es de al menos aproximadamente 4,0.

En diferentes formas de realización, el polipéptido factor VII está presente en una concentración de 0,1-15 mg/ml; 0,1-10,0 mg/ml; 0,5-5,0 mg/ml; 0,6-4,0 mg/ml; 1,0-4,0 mg/ml; 0,1-5 mg/ml; 0,1-4,0 mg/ml; 0,1-2 mg/ml; o 0,1-1,5 mg/ml.

La concentración del factor VIIa es convenientemente expresada en mg/ml o en IU/ml, con 1 mg normalmente representando 43000 - 56000 UI o más.

Para restituir la composición farmacéutica acuosa líquida útil para la administración parenteral directa a un mamífero tal como un humano, es normalmente requerido que el valor de pH de la composición se mantenga dentro de ciertos límites, tales como de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 9.0. Para asegurar un valor de pH adecuado según las condiciones dadas, la composición farmacéutica también comprende un agente amortiguador (ii) adecuado para mantener el pH en el rango de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 9.0.

ES 2 335 994 T3

El término “agente amortiguador” engloba los agentes o las combinaciones de agentes que mantienen la solución de pH en un rango aceptable de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 9.0. El término además engloba agentes o una combinación de agentes con una capacidad limitada adecuada para enlazar los iones de metal estabilizantes divalentes (es decir, una formación limitada de complejos metálicos con el primer metal de la serie de transición del estado oxidante +II según la invención). En una forma de realización los agentes amortiguadores o la combinación de agentes y los iones de metal divalentes en la composición muestran una afinidad de enlace de aproximadamente un 1% o menos en comparación con la afinidad de enlace de los iones de metal divalentes hacia el polipéptido factor VII.

En una forma de realización, el agente amortiguador (ii) es al menos un componente seleccionado a partir de los grupos que consisten en ácidos y sales de MES, PIPES, ACES, BES, TES, HEPES, TRIS, glicinamida, histidina (p. ej. L-histidina), imidazol, glicina, glicil-glicina, ácido glutárico, ácido cítrico (p. ej. citrato de potasio o sodio), ácido tartárico, ácido málico, ácido maleico, ácido fosfórico (p. ej. fosfato de potasio o sodio), ácido acético (p. ej. acetato de calcio, sodio o amonio), ácido láctico, y ácido succínico. Debe ser entendido que el agente amortiguador puede comprender una mezcla de dos o más componentes, donde la mezcla es capaz de proporcionar un valor de pH en el rango definido. Como ejemplos pueden ser mencionados el ácido acético y el acetato de sodio, el ácido acético y la histidina, etc.

La concentración del agente amortiguador se elige de manera que mantenga el pH preferido de la solución. En varias formas de realización, la concentración del agente amortiguador es de 1-100 mM; 1-50 mM; 1-25 mM; o 2-20 mM.

En una forma de realización, el pH de la composición se mantiene de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 9.0; tal como de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 9.0, de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 8.0, de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 7.5, de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 7.0; de aproximadamente 4.5 a aproximadamente 7.5; de aproximadamente 4.5 a aproximadamente 7.0; de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 7.5; de aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.0; de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.5; de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.0; de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7.5; de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7.0; de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 6.5; de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 7.5; de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 7.5; o de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 7.0; de aproximadamente 6.4 a aproximadamente 6.6, o aproximadamente 6.5, de aproximadamente 5.2 a aproximadamente 5.7, o aproximadamente 5.5.

La composición farmacéutica también incluye un tensioactivo no iónico. Los “Tensioactivos” (también conocidos como “detergentes”) generalmente incluyen los agentes que protegen la proteína de las tensiones inducidas por el aire/interacción con la solución y de las tensiones inducidas por la solución/superficie (p. ej. que resultan en la agregación de la proteína).

Tipos típicos de agentes tensioactivos no iónicos son polisorbatos, poloxámeros, éteres de alquilo de polioxietileno, copolímeros de bloque de polietileno/polipropileno, polietilenglicol (PEG), estearatos de polioxietileno, y aceites castóreos de polioxietileno.

Ejemplos ilustrativos de agentes tensioactivos no iónicos son Tween®, polisorbato 20, polisorbato 80; Brij-35 (éter de dodecilo de polioxietileno), poloxámero 188, poloxámero 407; PEG8000, Pluronic® polioles, polioxi 23 éter de lauril, Brij-35, Myrj 49, y Cremophor A.

En una forma de realización, el tensioactivo no iónico está presente en una cantidad del 0,005-2,0% en peso.

Además de los cuatro componentes obligatorios, la composición farmacéutica acuosa líquida puede comprender componentes adicionales provechosos para la preparación, la formulación, la estabilidad, o la administración de la composición.

También, la composición puede además comprender un agente modificador de tonicidad (v).

Como se utiliza en este caso, el término “agente modificador de tonicidad” incluye agentes que contribuyen a la osmolalidad de la solución. El agente modificador de tonicidad (v) incluye al menos uno seleccionado del grupo que consiste en sales neutrales, aminoácidos, péptidos de 2-5 residuos de aminoácidos, monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, y polialcoholes. En algunas formas de realización, la composición comprende dos o más agentes de este tipo en combinación.

Por “sal neutral” se entiende una sal que no es ni un ácido ni una base al disolverse en una solución acuosa.

En una forma de realización, al menos un agente modificador de tonicidad (v) es una sal neutral seleccionada a partir de los grupos que consisten en sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, y sales de magnesio, tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, acetato de calcio, gluconato de calcio, levulinato de calcio, cloruro de magnesio, acetato de magnesio, gluconato de magnesio, y levulinato de magnesio.

ES 2 335 994 T3

En otra forma de realización, el agente modificador de tonicidad (v) incluye cloruro de sodio en combinación con al menos uno seleccionado de los grupos que consisten en cloruro de calcio, acetato de calcio, cloruro de magnesio y acetato de magnesio.

- 5 En otra forma de realización más, el agente modificador de tonicidad (v) es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en cloruro de sodio, cloruro de calcio, sacarosa, glucosa, y manitol.

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

En una serie de formas de realización, el agente modificador de tonicidad (v) está presente en una concentración de 5-2200 mM, tal como de 25-2200 mM, 50-2200 mM, 100-2200 mM, 200-2200 mM, 400-2200 mM, 600-2200 mM,
15 800-2200 mM, 1000-2200 mM, 1200-2200 mM, 1400-2200 mM, 1600-2200 mM, 1800-2200 mM, o 2000-2200 mM; 5-1800 mM, 25-1800 mM, 50-1800 mM, 100-1800 mM, 200-1800 mM, 400-1800 mM, 600-1800 mM, 800-1800 mM, 1000-1800 mM, 1200-1800 mM, 1400-1800 mM, 1600-1800 mM; 5-1500 mM, 25-1400 mM, 50-1500 mM, 100-1500 mM, 200-1500 mM, 400-1500 mM, 600-1500 mM, 800-1500 mM, 1000-1500 mM, 1200-1500 mM; 5-1200 mM, 25-1200 mM, 50-1200 mM, 100-1200 mM, 200-1200 mM, 400-1200 mM, 600-1200 mM, o 800-1200 mM.

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

Como se utiliza en este caso, el término “agente modificador de fuerza iónica” incluye agentes que contribuyen a la fuerza iónica de la solución. Los agentes incluyen, pero no se limitan a, sales neutrales, aminoácidos, péptidos de de 2 a 5 residuos de aminoácidos. En algunas formas de realización, la composición comprende dos o más de agentes de este tipo en combinación.

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

El término “fuerza iónica” es la fuerza iónica de la solución (μ) que se define por la ecuación: $\mu = \frac{1}{2} \sum ([i](Z_i^2))$, donde μ es la fuerza iónica, $[i]$ es la concentración milimolar de un ión, y Z_i es la carga (+ o -) de este ión (véase, por ejemplo, Solomon, Journal of Chemical Education, 78(12): 1691-92, 2001; James Fritz y George Schenk: Quantitative Analytical Chemistry, 1979).

En formas de realización diferentes de la invención, la fuerza iónica de la composición es de al menos 50 mM, tal como de al menos 75 mM, al menos 100 mM, al menos 150 mM, al menos 200 mM, al menos 250 mM, al menos
40 400 mM, al menos 500 mM, al menos 650 mM, al menos 800 mM, al menos 1000 mM, al menos 1200 mM, al menos 1600 mM, al menos 2000 mM, al menos 2400 mM, al menos 2800 mM, o al menos 3200 mM.

En algunas formas de realización específicas, la concentración total del agente modificador de tonicidad (v) y del agente modificador de fuerza iónica (v/a) está en el rango de 1-1000 mM, tal como 1-500 mM, 1-300 mM, 10-200 mM, o 20-150 mM; o tal como 100-1000 mM, 200-800 mM, o 500-800 mM, dependiendo del efecto que cualquier otro ingrediente pueda ejercer en la tonicidad y la fuerza iónica.

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

50 El término “isotónico” significa “isotónico con suero”, es decir a aproximadamente 300 ± 50 miliosmol/kg. La tonicidad tiene la función de ser una medida de osmolalidad de la solución antes de la administración. El término “hipertónico” tiene la función de designar niveles de osmolalidad superiores al nivel fisiológico del suero, tales como niveles superiores a 300 ± 50 miliosmol/kg.

55 También, una forma de realización particular de la presente invención se refiere a la combinación del agente que contiene metal (iii) con una concentración bastante alta de un agente modificador de fuerza iónica (v/a) seleccionado del grupo que consiste en sales de sodio, sales de calcio y sales de magnesio. En esta forma de realización, el agente modificador de fuerza iónica (v/a), es decir la sal de sodio, la sal de calcio y/o la sal de magnesio, está presente en una concentración de 15-1500 mM, tal como 15-1000 mM, 25-1000 mM, 50-1000 mM, 100-1000 mM, 200-1000 mM,
60 300-1000 mM, 400-1000 mM, 500-1000 mM, 600-1000 mM, 700-1000 mM; 15-800 mM, 25-800 mM, 50-800 mM, 100-800 mM, 200-800 mM, 300-800 mM, 400-800 mM, 500-800 mM; 15-600 mM, 25-600 mM, 50-600 mM, 100-600 mM, 200-600 mM, 300-600 mM; 15-400 mM, 25-400 mM, 50-400 mM, o 100-400 mM.

Dentro de estas formas de realización, la sal de sodio puede ser cloruro de sodio, la sal de calcio puede ser seleccionada del grupo que consiste en cloruro de calcio, acetato de calcio, gluconato de calcio, y levulinato de calcio, y la sal de magnesio puede ser seleccionada del grupo que consiste en cloruro de magnesio, acetato de magnesio, gluconato de magnesio, levulinato de magnesio, y sales de magnesio de ácidos fuertes. En una forma de realización más específica, una sal de calcio y/o una sal de magnesio es/son usada(s) en combinación con cloruro de sodio.

ES 2 335 994 T3

En otra forma de realización, la composición además comprende (vi) un antioxidante. En formas de realización diferentes, el antioxidante es seleccionado del grupo que consiste en L-metionina, D-metionina, análogos de metionina, péptidos que contienen metionina, homólogos de metionina, ácido ascórbico, cisteína, homocisteína, glutathione, cistina, y cistationina. En una forma de realización preferida, el antioxidante es L-metionina.

La concentración del antioxidante es típicamente de 0,1-5,0 mg/ml, tal como 0,1-4,0 mg/ml, 0,1-3,0 mg/ml, 0,1-2,0 mg/ml, o 0,5-2,0 mg/ml.

Aunque los ejemplos de antioxidantes anteriores son aplicables en la presente invención, está previsto que una serie de compuestos específicos, p. ej. metionina, puede formar complejos con los iones de metal del/de los agente(s) que contiene(n) metal (iii). Esto puede resultar en una concentración un poco menos eficaz del/de los agente(s) que contiene(n) metal (iii).

Por esta razón, en formas de realización particulares la composición no incluye un antioxidante; en cambio la susceptibilidad del polipéptido factor VII a la oxidación se controla mediante la exclusión del aire atmosférico. El uso de un antioxidante también puede por supuesto ser combinado con la exclusión controlada del aire atmosférico.

Así, la presente invención también proporciona un contenedor hermético (p. ej. un frasco o un cartucho (tal como un cartucho para un aplicador de pluma o conjunto de jeringuilla)) conteniendo una composición farmacéutica acuosa líquida tal como se define aquí, y opcionalmente un gas inerte.

El gas inerte puede ser seleccionado de los grupos que consisten en nitrógeno, argón, etc. El contenedor (p. ej. frasco o cartucho) está típicamente hecho de vidrio o de plástico, en particular de vidrio, opcionalmente cerrado por un tabique de goma u otros medios de cierre lo que permite la penetración conservando la integridad de la composición farmacéutica. En una forma de realización particular de lo mismo, la composición no comprende un antioxidante (vi). En otra forma de realización, el contenedor es un frasco o cartucho metido en una bolsa sellada, p. ej. una bolsa de plástico sellada, tal como un laminado (p. ej. una bolsa de plástico laminada de metal (tal como aluminio)).

Además de los componentes obligatorios, del agente modificador de tonicidad (v) y del antioxidante opcional (vi), la composición farmacéutica puede adicionalmente comprender un conservante (vii).

Un conservante puede ser incluido en la composición para retardar el crecimiento microbiano y de ese modo permitir el empaquetamiento de “uso múltiple” de los polipéptidos FVII. Ejemplos de conservantes incluyen fenol, alcohol bencílico, orto-cresol, meta-cresol, para-cresol, metil paraben, propil paraben, cloruro de benzalconio, y cloruro de bencetonio. El conservante es normalmente incluido en una concentración de 0,1-20 mg/ml dependiendo del margen de pH y del tipo de conservante.

Aún más, la composición también puede incluir uno o más agentes capaces de inhibir la desamidación y la isomerización.

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

0,1-15 mg/ml de un polipéptido factor VII (i);

un agente amortiguador (ii) adecuado para mantener el pH en el rango de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 9.0;

un agente que contiene cobre (iii) en una concentración de al menos 5 μ M;

un tensioactivo no iónico (iv); y

un agente modificador de tonicidad (v) en una concentración de al menos 5 mM.

En otra forma de realización, la composición farmacéutica acuosa líquida comprende:

0,1-15 mg/ml de un polipéptido factor VII (i);

un agente amortiguador (ii) adecuado para mantener el pH en el rango de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 9.0;

un agente que contiene manganeso (iii) en una concentración de al menos 100 μ M;

un tensioactivo no iónico (iv); y

al menos un agente modificador de tonicidad (v) en una concentración de al menos 5 mM.

Como se utiliza en este caso, de valores de pH especificados como “aproximadamente” se entiende que son ± 0.1 , p. ej. aproximadamente un pH 8.0 incluye un pH 8.0 ± 0.1 .

ES 2 335 994 T3

Son ambos porcentajes (peso/peso) cuando se hace referencia a sólidos disueltos en una solución y líquidos mezclados en soluciones. Por ejemplo, para Tween, es el peso del 100% masa/peso de la solución.

Las composiciones según la presente invención son útiles como composiciones de polipéptidos factor VII estables y preferiblemente listas para su uso. Además, se cree que los principios, las pautas y las formas de realización específicas dados aquí son igualmente aplicables para el almacenamiento a granel de los polipéptidos factor VII, *mutatis mutandis*. Las composiciones son típicamente estables durante al menos seis meses, y preferiblemente hasta 36 meses; al almacenarse a temperaturas que varían entre 2°C y 8°C. Las composiciones son químicamente y/o físicamente estables, en particular químicamente estables, al almacenarse durante al menos 6 meses a entre 2°C y 8°C.

El término “estable” pretende significar que (i) después del almacenamiento durante 6 meses a entre 2°C y 8°C la composición retiene al menos un 50% de su actividad biológica inicial, p. ej., siendo medida mediante un ensayo de coagulación de una única fase esencialmente como se describe en el Ensayo 4 de la presente especificación; o (ii) después del almacenamiento durante 6 meses a entre 2°C y 8°C el aumento en el contenido de productos de degradación de cadena pesada está en más del 40% (p/p) del contenido inicial del polipéptido factor VII.

El término “contenido inicial” se refiere a la cantidad de polipéptidos factor VII añadidos a una composición después de la preparación de la composición.

En varias formas de realización, la composición estable retiene al menos 70%, tal como al menos 80%, o al menos 85%, o al menos 90%, o al menos 95%, de su actividad biológica inicial después del almacenamiento durante 6 meses a de 2 a 8°C.

En varias formas de realización el aumento en el contenido de productos de degradación de cadena pesada en composiciones estables no es más de aproximadamente el 30% (p/p), no más de aproximadamente el 25% (p/p), no más de aproximadamente el 20% (p/p), no más de aproximadamente el 15% (p/p), no más de aproximadamente el 10% (p/p), no más de aproximadamente el 5% (p/p), o no más de aproximadamente el 3% (p/p) del contenido inicial del polipéptido factor VII.

Con el propósito de determinar el contenido de los productos de degradación de cadena pesada, un HPLC en fase inversa fue ejecutado en una columna especial de sílice butilo de 4,5x250 mM con un tamaño de partícula de 5 µM y un tamaño de poro de 300Å. Temperatura de la columna: 70°C. Amortiguador A: 0,1% v/v de ácido trifluoracético. Amortiguador B: 0,09% v/v de ácido trifluoracético, 80% v/v de acetonitrilo. La columna fue eluida con un gradiente lineal de X a (X+13)% de B en 30 minutos. X fue ajustado de modo que FVIIa eluye con un tiempo de retención de aproximadamente 26 minutos. Velocidad de flujo: 1,0 ml/min. Detección: 214 nm. Carga: 25 µg de FVIIa.

El término “estabilidad física” de polipéptidos factor VII se refiere a la formación de agregados insolubles y/o solubles en forma de formas dimericas, oligoméricas y poliméricas de polipéptidos factor VII así como cualquier deformación estructural y desnaturalización de la molécula. La composición físicamente estable engloba composiciones que permanecen visualmente claro. La estabilidad física de las composiciones es frecuentemente evaluada mediante inspección visual y turbidez después del almacenamiento de la composición a temperaturas diferentes durante diferentes períodos de tiempo. La inspección visual de las composiciones se realiza bajo una luz bien enfocada con un fondo oscuro. Una composición es clasificada como físicamente inestable, cuando muestra una turbidez visual.

El término “químicamente estable” pretende englobar una composición que retenga al menos un 50% de su actividad biológica inicial después del almacenamiento durante 6 meses a entre 2 y 8°C, p. ej., siendo medida por un ensayo de coagulación de una única fase esencialmente como se describe en el Ensayo 4 de la presente especificación.

El término “estabilidad química” pretende referirse a la formación de cualquier cambio químico en los polipéptidos factor VII después del almacenamiento en una solución en condiciones aceleradas. Son ejemplos la hidrólisis, la desamidación y la oxidación así como la degradación enzimática que resulta en la formación de fragmentos de polipéptidos factor VII. En particular, los aminoácidos que contienen azufre son propensos a la oxidación con la formación de los sulfóxidos correspondientes.

En otro aspecto, la invención también proporciona un método para preparar una composición farmacéutica acuosa líquida de un polipéptido factor VII, que comprende la fase suministrar el polipéptido factor VII (i) en una solución que comprende un agente amortiguador (ii) adecuado para mantener el pH en el rango de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 9.0; al menos un agente que contiene metal (iii), donde dicho metal es seleccionado del grupo que consiste en cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, y cobre del estado oxidante +II; y un tensioactivo no iónico (IV).

Métodos de uso

Como será entendido, las composiciones farmacéuticas acuosas líquidas definidas aquí pueden ser usadas en el campo de la medicina. Así, la presente invención en particular proporciona las composiciones farmacéuticas acuosas líquidas definidas aquí para su uso como medicamento, más particularmente para su uso como medicamento para tratar un síndrome sensible al factor VII.

Consecuentemente, la presente invención también proporciona el uso de la composición farmacéutica acuosa líquida tal como se define aquí para la preparación de un medicamento para tratar un síndrome sensible al factor VII, así como un método para tratar un síndrome sensible al factor VII, comprendiendo el método la administración a un sujeto necesitado del mismo de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica acuosa líquida tal como se define aquí.

Las preparaciones de la presente invención pueden ser usadas para tratar cualquier síndrome sensible al factor VII, tal como, p. ej., un trastorno de sangrado, incluyendo los provocados por deficiencias del factor de coagulación (p. ej., p. ej. hemofilia A, hemofilia B, deficiencia del factor de coagulación XI, deficiencia del factor de coagulación VII); por la trombocitopenia o la enfermedad de von Willebrand, o por inhibidores del factor de coagulación, y la hemorragia intra cerebral, o el desangramiento por cualquier causa. Las preparaciones también pueden ser administradas a pacientes en sujetos a cirugía u otros traumatismos o a pacientes que reciben una terapia anticoagulante.

El término “cantidad eficaz” es la dosis efectiva que debe ser determinada por un profesional calificado que pueda valorar dosificaciones para conseguir la respuesta deseada. Factores de la dosis a considerar incluirán la potencia, la biodisponibilidad, los perfiles farmacocinéticos/farmacodinámicos deseados, la condición del tratamiento, factores relacionados con el paciente (p. ej. peso, salud, edad, etc.), la presencia de medicaciones coadministradas (p. ej., anticoagulantes), el tiempo de la administración, u otros factores conocidos para un médico profesional.

El término “tratamiento” es definido como la gestión y el cuidado hacia un sujeto, p. ej. un mamífero, en particular un humano, con motivo de combatir la enfermedad, la condición, o el trastorno e incluye la administración de un polipéptido factor VII para prevenir la aparición de los síntomas o las complicaciones, o aliviar los síntomas o las complicaciones, o eliminar la enfermedad, la condición, o el trastorno. Composiciones farmacéuticas según la presente invención que contienen un polipéptido factor VII pueden ser administradas parenteralmente a sujetos necesitados de tal tratamiento. La administración parenteral puede ser realizada por la inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa mediante una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral puede ser realizada mediante una bomba de infusión.

En formas de realización importantes, la composición farmacéutica es adaptada a la inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa según métodos conocidos en la técnica.

La concentración posiblemente alta de sales en las composiciones farmacéuticas definidas aquí puede ser desventajosa para ciertos grupos de pacientes. En consecuencia la presente invención también proporciona un método anterior al uso para la reducción de la concentración de sal en una composición farmacéutica acuosa líquida, donde dicho método comprende la fase de poner en contacto la composición farmacéutica acuosa líquida definida aquí con un material de intercambio de iones, un material adecuado para la desalación, y/o la fase de dilución de la composición.

La concentración posiblemente alta de iones de metal en las composiciones farmacéuticas definidas aquí puede ser desventajosa para ciertos grupos de pacientes. En consecuencia la presente invención también proporciona un método anterior al uso para la reducción de la concentración de iones de metal en una composición farmacéutica acuosa líquida, donde dicho método comprende la fase de poner en contacto la composición farmacéutica acuosa líquida definida aquí con un material de intercambio de catión.

Un ejemplo de un material de intercambio de catión es Chelex-100 (Fluka-Riedel/Sigma-Aldrich). El material de intercambio de catión, p. ej. Chelex-100, es preferiblemente contenido en un contenedor estéril, p. ej. en un cartucho de vidrio o de plástico.

Está previsto que la composición farmacéutica acuosa líquida se ponga en contacto con el material de intercambio de catión, p. ej. pasando a través de un cartucho que contiene el material de intercambio de catión, inmediatamente antes del uso. En una forma de realización particular, está previsto que el cartucho sea una parte integral de un conjunto de jeringuilla.

Experimentos

Métodos generales

Ensayos adecuados para determinar la actividad biológica de polipéptidos factor VII

Polipéptidos factor VII útiles conforme a la presente invención pueden ser seleccionados por ensayos adecuados que pueden ser realizados como pruebas *in vitro* preliminares simples. Así, la presente especificación expone una prueba simple (titulada “Ensayo de Hidrólisis *In Vitro*”) para la actividad de polipéptidos factor VII.

*Ensayo de Hidrólisis *In Vitro* (Ensayo 1)*

Los polipéptidos nativos (de tipo salvaje) factor VIIa y factor VII (ambos referidos de aquí en adelante como “factor VIIa”) pueden ser evaluados para actividades específicas. También pueden ser evaluados en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo es realizado en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). El sustrato cromogénico D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilida (S-2288, Chromogenix, Suecia), en su concentración

ES 2 335 994 T3

final 1 mM, se añade al factor VIIa (concentración final 100 nm) en 50 de mM HEPES, a pH 7.4, conteniendo 0,1 m de NaCl, 5 mM de CaCl₂ y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino. La absorbencia a 405 nm se mide continuamente en un lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EEUU). La absorbencia desarrollada durante una incubación de 20 minutos, después de la sustracción de la absorbencia en una caja blanca que sin contenido de enzimas, se usa para calcular la proporción entre las actividades del polipéptido factor VII y del factor VIIa de tipo salvaje:

$$\text{Proporción} = (\text{A405 nm de polipéptido factor VII})/(\text{A405 nm de factor VIIa de tipo salvaje}).$$

Basado en ésto, pueden ser identificados polipéptidos factor VII con una actividad inferior a, comparable a, o superior al factor VIIa nativo, tales como, por ejemplo, polipéptidos factor VII donde la proporción entre la actividad del polipéptido factor VII y la actividad del factor VII nativo (FVII de tipo salvaje) es de aproximadamente 1,0 en comparación con el 1,0 de arriba.

La actividad de los polipéptidos factor VII también puede ser medida usando un sustrato fisiológico tal como factor X (“Ensayo de Proteolisis *In Vitro*”), adecuadamente en una concentración de 100-1000 nm, donde el factor Xa generado es medido después de la adición de un sustrato cromogénico adecuado (por ejemplo S-2765). Además, el ensayo de la actividad puede ser ejecutado a temperatura fisiológica.

Ensayo de Proteolisis In Vitro (Ensayo 2)

El polipéptido factor VIIa nativo (de tipo salvaje) y del factor VII (ambos de ahora en adelante referidos como “factor VIIa”) son evaluados en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se realiza en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). El factor VIIa (10 nm) y el factor X (0.8 microM) en 100 µl 50 mM de HEPES, a pH 7.4, conteniendo 0,1 m de NaCl, 5 mM de CaCl₂ y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, son incubados durante 15 min. La división del factor X es detenida entonces por la adición de 50 µl 50 mM de HEPES, a pH 7.4, conteniendo 0,1 m de NaCl, 20 mM de EDTA y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino. La cantidad de Factor Xa generada se mide por la adición del sustrato cromogénico Z-D-Arg-Gly-Arg-p-nitroanilida (S-2765, Chromogenix, Suecia), en una concentración final de 0,5 mM. La absorbencia a 405 nm se mide continuamente en un lector de placa SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EEUU). La absorbencia desarrollada durante 10 minutos, después de la sustracción de la absorbencia en una caja blanca sin contenido de FVIIa, se usa para calcular la proporción entre las actividades proteolíticas del polipéptido factor VII y del factor VIIa de tipo salvaje:

$$\text{Proporción} = (\text{A405 nm de polipéptido factor VII})/(\text{A405 nm de factor VIIa de tipo salvaje}).$$

En base a ésto, puede ser identificado un polipéptido factor VII con una actividad inferior a, comparable a, o superior al factor VIIa nativo, tal como, por ejemplo, polipéptidos factor VII donde la proporción entre la actividad del polipéptido factor VII y la actividad del factor VII nativo (de tipo salvaje FVII) es de aproximadamente 1,0 en comparación con el 1.0 de arriba.

La capacidad de los polipéptidos factor VIIa o del factor VII para generar trombina también puede ser medida en un ensayo (Ensayo 3) comprendiendo todos los factores de coagulación pertinentes e inhibidores en concentraciones fisiológicas (menos el factor VIII al imitar las condiciones de la hemofilia A) y plaquetas activadas (como está descrito en la p. 543 de Monroe *et al.* (1997) Brit. J. Haematol. 99, 542-547).

La actividad biológica de los polipéptidos factor VII también puede ser medida usando un ensayo de coagulación de una única fase (Ensayo 4). Para este propósito, la muestra que debe evaluarse se diluye en 50 mM del amortiguador de Pipes (a pH 7.5), 0,1% de BSA y 40 µl se incuba con 40 µl de plasma deficitario de factor VII y 80 µl de factor tisular recombinante humano conteniendo 10 mM de Ca²⁺ y fosfolípidos sintéticos. Los tiempos de coagulación son medidos y comparados con una curva estándar usando un estándar de referencia en un ensayo paralelo.

Preparación y purificación de polipéptidos factor VII

El factor VIIa humano purificado adecuado para su uso en la presente invención está hecho preferiblemente por la tecnología recombinante de ADN, p. ej. como se ha descrito por Hagen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 83: 2412-2416, 1986, o como está descrito en la patente europea n°. 0 200 421 (ZymoGenetics, Inc.).

El factor VII también puede ser producido por los métodos descritos por Broze y Majerus, J. Biol. Chem. 255 (4): 1242-1247, 1980 y Hedner y Kisiel, J. Clin. Invest. 71: 1836-1841, 1983. Estos métodos producen el factor VII sin cantidades detectables de otros factores de coagulación sanguínea. Una preparación del factor VII aún más purificada puede ser obtenida mediante la inclusión de una filtración en gel adicional como fase de purificación final. El factor VII es convertido entonces en el factor VIIa activado por medios conocidos, p. ej. por diferentes proteínas plasmáticas, tal como el factor XIIa, IXa o Xa. Alternativamente, como se ha descrito por Bjoern *et al.* (Research Disclosure, 269 septiembre de 1986, págs. 564-565), el factor VII puede ser activado pasándolo a través de una columna de cromatografía de intercambio de iones, tal como Mono Q® (Farmacia fine Chemicals) o uno semejante, o por la autoactivación en solución.

Pueden ser producidos polipéptidos relacionados con el factor VII por la modificación del factor VII de tipo salvaje o por la tecnología recombinante. Pueden ser producidos polipéptidos relacionados con el Factor VII con una secuencia de aminoácidos alterada al compararlos con el factor VII de tipo salvaje modificando la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el factor VII de tipo salvaje bien alterando los codones de aminoácido o bien retirando algunos de los codones de aminoácido en el ácido nucleico que codifica el factor natural VII por medios conocidos, p. ej. por una mutagénesis dirigida.

Les parecerá a los expertos en la técnica que las sustituciones pueden ser hechas fuera de las regiones críticas a la función de la molécula del factor VIIa y además resultar en un polipéptido activo. Pueden ser identificados residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido factor VII, y en consecuencia preferiblemente no sujetos a sustitución, según los procedimientos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida o la mutagénesis mediante alanina (véase, p. ej., Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En la última técnica, son introducidas mutaciones en cada residuo cargado positivamente en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes son evaluadas por la actividad coagulante, respectivamente de reticulación para identificar los residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Los sitios de interacción de enzimas del sustrato también pueden ser determinados por el análisis de la estructura tridimensional como se ha determinado por tales técnicas como el análisis de resonancia magnética nuclear, la cristalografía o el etiquetado de fotoafinidad (véase, p. ej., de Vos *et al.*, 1992, Science 255: 306-312; Smith *et al.*, 1992, Journal of Molecular Biology 224: 899-904; Wlodaver *et al.*, 1992, FEBS Letters 309: 59-64).

La introducción de una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos para intercambiar un nucleótido por otro nucleótido puede ser realizada por mutagénesis dirigida usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Es particularmente útil el procedimiento que utiliza un vector de ADN de doble cadena superenrollado con un inserto de interés y dos cebadores sintéticos que contienen la mutación deseada. Los cebadores oligonucleótidos, cada uno complementario a los hilos opuestos del vector, se extienden durante una variación cíclica de la temperatura mediante la polimerasa de ADN Pfu. Durante la incorporación de los cebadores, es generado un plásmido mutado conteniendo cortes en bisel. Tras la variación cíclica de la temperatura, el producto se trata con DpnI que es específico para el ADN metilado y hemimetilado para digerir el molde del ADN parental y para seleccionar el ADN sintetizado que contiene la mutación. También pueden ser usados otros procedimientos conocidos en la técnica para crear, identificar y aislar las variantes, tales como, por ejemplo, la transposición de genes o técnicas de exposición en fago.

La separación de polipéptidos de su célula de origen puede ser conseguida por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, la extracción del medio de cultivo celular que contiene el producto deseado de un cultivo celular adherente; el centrifugado o la filtración para retirar células no adherentes; y similares.

Opcionalmente, los polipéptidos factor VII pueden purificarse más. La purificación puede ser conseguida usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, la cromatografía de afinidad, tal como, p. ej., en una columna de anticuerpos de anti-factor VII (véase, p. ej., Wakabayashi *et al.*, J. Biol. Chem. 261:11097, 1986; y Thim *et al.*, Biochem. 27:7785, 1988); la cromatografía de interacción hidrofóbica; la cromatografía de intercambio de iones; la cromatografía por exclusión de tamaño; los procedimientos electroforéticos (p. ej., el isoelectroenfoque preparatorio (IEF), la solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico), o la extracción y similares. Véase, generalmente, Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, Nueva York, 1982; y Protein Purification, J.C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989. A continuación de la purificación, la preparación contiene preferiblemente menos del 10% en peso, más preferiblemente menos del 5% y lo más preferiblemente menos del 1%, de los polipéptidos que no sean factor VII derivados de la célula huésped.

Los polipéptidos factor VII pueden ser activados por la división proteolítica, usando proteasas de factor XIIa u otras teniendo una especificidad de tipo tripsina, tales como, p. ej., el factor IXa, la kalikreína, el factor Xa, y la trombina. Véase, p. ej., Osterud *et al.*, Biochem. 11: 2853 (1972); Thomas, Patente U.S.nº. 4,456,591; y Hedner *et al.*, J. Clin. Invest. 71:1836 (1983). Alternativamente, los polipéptidos factor VII pueden ser activados pasándolos a través de una columna de cromatografía de intercambio de iones, tal como Mono Q® (Pharmacia) o similares, o por autoactivación en solución. El polipéptido del factor VII activado resultante puede ser entonces formulado y administrado como se describe en la aplicación presente.

Los ejemplos siguientes ilustran la práctica de la invención.

60 Ejemplos de funcionamiento

Ejemplo 1

El efecto de la adición de agentes que contienen cobre y manganeso en soluciones de rFVIIa acuosas en la degradación de cadena pesada (división autocatalítica).

ES 2 335 994 T3

Para indagar el efecto de los iones de metal en el rFVIIa, se siguió el procedimiento siguiente:

el rFVIIa fue transferido a las soluciones siguientes por la desalación en una columna PD-10 (Amersham Biosciences):

rFVIIa	1.0 mg/ml
Cloruro de sodio	2.92 mg/ml (50 mM)
Cloruro de calcio 2 H ₂ O	1.47 mg/ml (10 mM)
PIPES	15.12 mg/ml (50 mM)
1 M de NaOH	añadido a pH 6.5.

Fueron preparadas dos soluciones de agentes conteniendo metal:

Cloruro de cobre(II), 2 H ₂ O	10 mM
Cloruro de manganeso, 2 H ₂ O	2 M.

Los agentes conteniendo cobre y manganeso, respectivamente, fueron añadidos a la solución desalada de rFVIIa para alcanzar las concentraciones perfiladas en la Tabla 1. El pH fue ajustado a 6.5. Las formulaciones fueron almacenadas a una temperatura de 5°C y los análisis fueron realizados en los tiempos indicados en la Tabla 1.

TABLA 1

El contenido de productos de degradación de cadena pesada (%) en formulaciones de rFVIIa que contienen Cu(II) o Mn(II)

	Almacenamiento a 5°C				
	T = 0	T = _ mes	T = 1 mes	T = 2 meses	T = 3 meses
Referencia*	10.2	n.a.	17.0	23.8	30.4
[Cu(II)] = 20 µM	11.6	14.6	15.7	22.2	n.a.
[Cu(II)] = 80 µM	11.5	12.7	13.3	16.9	18.1
[Mn(II)] = 2 mM	11.6	13.4	14.2	18.7	21.2
[Mn(II)] = 10 mM	11.5	12.9	13.6	17.4	19.8
* La referencia contuvo 1,0 mg/ml de rFVIIa, 10 mM de histidina, 10 mM de acetato de sodio, 10 mM de glicil-glicina, 50 mM de cloruro de sodio, 10 mM de cloruro de calcio, a pH 6.5.					

Como se puede ver en la Tabla 1, el aumento en el contenido de productos de degradación de cadena pesada en la formulación de referencia dio un total del 20,2%-puntos, mientras que el aumento en el contenido de productos de degradación de cadena pesada en las composiciones ilustrativas ha sido del 6,6%-puntos ([Cu(II)] = 80 µM) y del 8,3%-puntos ([Mn(II)] = 10 mM), respectivamente.

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

El HPLC en fase inversa fue ejecutado en una columna especial de sílice butilo de 4.5x250 mM con un tamaño de partícula de 5 µM y un tamaño de poro 300Å. Temperatura de columna: 70°C. Amortiguador A: 0,1% v/v de ácido trifluoracético. Amortiguador B: 0,09% v/v de ácido trifluoracético, 80% v/v de acetonitrilo. La columna fue eluida con un gradiente lineal de X a un (X+13)% de B en 30 minutos. X fue ajustado de modo que FVIIa eluye con un tiempo de retención de aproximadamente 26 minutos. Velocidad de flujo: 1,0 ml/min. Detección: 214 nm. Carga: 25 µg de FVIIa.

ES 2 335 994 T3

Ejemplo 2

La adición de agentes que contienen cobre y manganeso y para soluciones de rFVIIa acuosas a una fuerza iónica alta

Para indagar el efecto de los iones de metal y de la fuerza iónica alta en la estabilidad de rFVIIa, puede seguirse el procedimiento siguiente:

El rFVIIa se transfiere a las soluciones siguientes por la desalación en una columna PD-10 (Amersham Biosciences):

Cloruro de sodio	2.92 mg/ml (50 mM)
Cloruro de calcio 2 H ₂ O	29.4 mg/ml (200 mM)
PIPES	15.12 mg/ml (50 mM)
Poloxámero 188	1.0 mg/ml
Metionina	0.5 mg/ml
1 M NaOH/1 M HCl	añadido a pH 6.5

y/o

Cloruro de sodio	29.2 mg/ml (500 mM)
Cloruro de calcio 2 H ₂ O	1.47 mg/ml (10 mM)
PIPES	15.12 mg/ml (50 mM)
Poloxámero 188	1.0 mg/ml
Metionina	0.5 mg/ml
1 M NaOH/1 M HCl	añadido a pH 6.5

En ambas soluciones la concentración de factor VIIa (rFVIIa) es de 1,0 mg/ml.

Son preparadas dos soluciones de agentes que contienen metal:

Cloruro de cobre(II), 2H ₂ O	10 mM
Cloruro de manganeso, 2 H ₂ O	2 M

Los agentes que contienen cobre y manganeso, respectivamente, se agregan a la solución desalada de rFVIIa para alcanzar las concentraciones perfiladas en el Ejemplo 1. El pH se ajusta a 6.5. Las formulaciones son introducidas en un frasco y selladas, opcionalmente bajo un gas inerte. Además, el frasco puede ser colocado en una bolsa hermética para prevenir que entre aire atmosférico en el contenedor. Los frascos se almacenan a una temperatura de 5°C y los análisis son realizados según se describe y en los tiempos indicados en el Ejemplo 1.

Se verá que la adición de metal (cobre o manganeso) reduce la formación de productos de degradación de cadena pesada. Combinando metal (cobre o manganeso) con fuerza iónica alta se obtendrá el mínimo aumento.

Ejemplo 3

La adición de agentes conteniendo cobre a soluciones acuosas de rFVIIa con una fuerza iónica alta.

Para indagar el posible efecto sinérgico de iones de metal y de fuerza iónica alta en la estabilidad de rFVIIa, se siguió el procedimiento siguiente:

El rFVIIa fue transferido a diferentes soluciones (formulaciones) según está catalogado en la Tabla 1 de abajo en un proceso de dos fases:

Primero, el rFVIIa fue transferido a las diferentes soluciones sin cobre añadido por la desalación en una columna PD-10 (Amersham Biosciences). Después, el contenido de cobre se obtuvo en las soluciones 2 y 4 añadiendo una solución de 10 mM de cloruro de cobre (II), 2H₂O hasta que la concentración declarada fue alcanzada.

ES 2 335 994 T3

Después de que la solución de cobre hubiera sido añadida, el pH fue ajustado a 6.5 y las formulaciones fueron depositadas en cartuchos.

Los cartuchos fueron almacenados a una temperatura de 5°C y los análisis fueron realizados después de 0, 0,5, 1, 2, y 3 meses según está indicado en la Tabla 2.

TABLA 1

Formulaciones

Formulaciones	1	2	3	4
rFVIIa	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml
CaCl ₂ , 2H ₂ O	10mM	10mM	200mM	200mM
PIPES-di-Na	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
Cu(II)	-	80μM	-	80μM
pH	6.50	6.50	6.50	6.50

TABLA 2

Degradación de cadena pesada (%)

Formulación	Tiempo de almacenamiento (meses)				
	0	—	1	2	3
1	16.0	17.9	20.2	23.6	26.2
2	15.0	16.4	17.5	19.0	20.3
3	16.2	17.2	18.6	20.7	22.1
4	15.8	16.0	16.4	17.0	17.2

Se puede ver a partir de la Tabla 2 que la adición de cobre reduce la formación de productos de degradación de cadena pesada. Combinando cobre con fuerza iónica alta en la formulación 4 es obtenido el mínimo aumento.

Ejemplo 4

Está prevista la formulación de las siguientes composiciones farmacéuticas acuosas líquidas:

A)

rhFVIIa	1 mg/ml (aprox. 50,000 IU/ml)
PIPES	15.12 mg/ml (50 mM)
Cloruro de cobre(II)	80 μM
Poloxámero 188	1.0 mg/ml
Cloruro de sodio	2.92 mg/ml (50 mM)
Cloruro de calcio 2 H ₂ O	1.47 mg/ml (10 mM)
Metionina	0.5 mg/ml
1 M de NaOH/1 M de HCl	añadido a pH 6.5

ES 2 335 994 T3

B)

	rh FVIIa	1 mg/ml (aprox. 50,000 IU/ml)
5	PIPES	15.12 mg/ml (50 mM)
	Cloruro de manganeso(II)	10 mM
	Poloxámero 188	1.0 mg/ml
10	Cloruro de sodio	2.92 mg/ml (50 mM)
	Cloruro de calcio 2 H ₂ O	1.47 mg/ml (10 mM)
15	Metionina	0.5 mg/ml
	1 M NaOH/1 M HCl	añadido a pH 6.5

C)

	rhFVIIa	1 mg/ml (aprox. 50,000 IU/ml)
25	PIPES	15.12 mg/ml (50 mM)
	Cloruro de cobre(II)	80 μ M
	Poloxámero 188	1.0 mg/ml
30	Cloruro de sodio	2.92 mg/ml (50 mM)
	Cloruro de calcio 2 H ₂ O	1.47 mg/ml (10 mM)
35	1 M de NaOH/1 M de HCl	añadido a pH 6.5

D)

	rhFVIIa	1 mg/ml (aprox. 50,000 IU/ml)
	PIPES	15.12 mg/ml (50 mM)
45	Cloruro de manganeso(II)	10 mM
	Poloxámero 188	1.0 mg/ml
	Cloruro de sodio	2.92 mg/ml (50 mM)
50	Cloruro de calcio 2 H ₂ O	1.47 mg/ml (10 mM)
	1 M de NaOH/1 M de HCl	añadido a pH 6.5.

Composiciones farmacéuticas A-D pueden posteriormente ser transferidas a frascos o cartuchos estériles, opcionalmente enjuagadas con nitrógeno o argón.

Opcionalmente también pueden ser embaladas en bolsas plásticas herméticas laminadas de aluminio.

Ejemplo 5

La adición de agentes que contienen cobre a soluciones acuosas rFVIIa con una fuerza iónica alta.

ES 2 335 994 T3

Para indagar el posible efecto sinérgico de iones de metal y de la fuerza iónica alta en la estabilidad de rFVIIa, se siguió el procedimiento siguiente:

El rFVIIa fue transferido a diferentes soluciones (formulaciones) como se ha catalogado en la tabla 1 de abajo en un proceso de dos fases:

Primero, el rFVIIa fue transferido en las diferentes soluciones sin cobre añadido por la desalación en una columna PD-10 (Amersham Biosciences). Después, el contenido de cobre se obtuvo en las soluciones 2 y 4 añadiendo una solución de 10 mM de cloruro de cobre (II), 2H₂O hasta que la concentración declarada fue alcanzada.

Después de que la solución de cobre hubiera sido añadida, el pH fue ajustado a 6.5 y las formulaciones fueron depositadas en cartuchos. Los cartuchos fueron almacenados a una temperatura de 5°C y los análisis fueron realizados después de 0, 0,5, 1, 2, y 3 meses como se ha indicado en la tabla 2.

TABLA 1

Formulaciones

Formulaciones	1	2	3	4
rFVIIa	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml
CaCl ₂ , 2H ₂ O	10mM	10mM	200mM	200mM
NaCl	0 mM	0 mM	500 mM	500 mM
PIPES-di-Na	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
Cu(II)	-	80µM	-	80µM
pH	6.50	6.50	6.50	6.50

TABLA 2

Degradación de cadena pesada (%)

Formulación	Tiempo de almacenamiento (meses)					Aumento total
	0	0.5	1	2	3	
1	11.6	15.6	19.0	24.1	27.8	16.2
2	11.5	13.4	15.1	18.3	20.0	8.5
3	12.2	13.2	15.3	16.7	18.9	6.7
4	12.0	12.5	13.4	14.0	15.3	3.3

Se puede ver a partir de la tabla 2 que la adición de cobre a una solución con una fuerza iónica alta da el mínimo aumento en la formación de productos de degradación de cadena pesada.

Ejemplo 6

La adición de agentes conteniendo cobre a soluciones acuosas de rFVIIa con una fuerza iónica alta.

ES 2 335 994 T3

Para indagar el posible efecto sinérgico de iones de metal y de la fuerza iónica alta en la estabilidad de rFVIIa, se siguió el procedimiento siguiente:

El rFVIIa fue transferido a diferentes soluciones(formulaciones) como catalogado en la tabla 1 abajo en un proceso de dos fases:

Primero, el rFVIIa fue transferido a las diferentes soluciones sin cobre añadido por la desalación en una columna PD-10 (Amersham Biosciences). Después, el contenido de cobre se obtuvo en las soluciones 2 y 4 añadiendo una solución de 10 mM de cloruro de cobre (II), 2H₂O hasta que la concentración declarada fue alcanzada.

Después de que la solución de cobre hubiera sido añadida, el pH fue ajustado a 6.5 y las formulaciones fueron depositadas en cartuchos. Los cartuchos fueron almacenados a una temperatura de 5°C y los análisis fueron realizados después de 0, 3, 7, y 8 meses como se ha indicado en la tabla 2.

TABLA 1

Formulaciones

Formulaciones	1	2	3	4
rFVIIa	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml
CaCl ₂ , H ₂ O	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
NaCl	0 mM	0 mM	500mM	500mM
PIPES-di-Na	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
Cu(II)	-	80 µM	-	80uM
pH	6.50	6.50	6.50	6.50

La actividad de la coagulación fue evaluada en un ensayo de coagulación de una etapa esencialmente como se describe en el Ensayo 4 de la presente especificación.

TABLA 2

Actividad de coagulación (%)

Formulación	Tiempo de almacenamiento (meses)			
	0	3	7	8
1	100	87	68	68
2	100	91	78	78
3	100	91	82	83
4	100	92	89	92

Se puede ver a partir de la tabla 2 que la adición de cobre a una solución con una fuerza iónica alta da la formulación más estable con respecto a la actividad de coagulación.

ES 2 335 994 T3

Ejemplo 7

La adición de agentes que contienen cobalto y níquel a soluciones acuosas rFVIIa.

Para indagar el efecto posible de estos iones de metal en la estabilidad de rFVIIa, se siguió el procedimiento siguiente:

El rFVIIa fue transferido a diferentes soluciones (formulaciones) como se ha catalogado en la tabla 1 de abajo en un proceso de dos fases:

Primero, el rFVIIa fue transferido a las diferentes soluciones sin Co(II) y Ni(II) añadidos por la desalación en una columna PD-10 (Amersham Biosciences). Después, el contenido de Co(II) se obtuvo en las soluciones 2 y 3 añadiendo una solución de 2M de Co(II) Cl₂ y el contenido de Ni(II) se obtuvo en las soluciones 4 y 5 añadiendo una solución de 2M de Ni(II)Cl₂ hasta que la concentración declarada fue alcanzada.

Después de que la solución de Co(II) y de Ni(II) hubiera sido añadida, el pH fue ajustado a 6.5 y las formulaciones fueron depositadas en cartuchos. Los cartuchos fueron almacenados a una temperatura de 5°C y los análisis fueron realizados en los tiempos indicados en la tabla 2.

TABLA 1

Formulaciones

Formulaciones	1 referencia	2	3	4	5
rFVIIa	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml
NaCl	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
CaCl ₂ , 2H ₂ O	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM
PIPES	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
Co(II)	-	2mM	4mM	-	-
Ni(II)	-	-	-	6 mM	12 mM
pH	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50

TABLA 2

Degradación de cadena pesada (%)

Formulación	Tiempo de almacenamiento (meses)					Aumento total
	0	1	2	3		
1	11.9	14.9	16.2	22.6	26.9	12.0
2	11.4	12.4	12.9	15.2	16.6	5.2
3	11.6	12.2	12.4	13.8	15.0	3.4
4	11.6	11.6	11.6	12.3	12.7	1.1
5	11.5	11.5	11.5	11.9	12.0	0.5

Se puede ver a partir de la tabla 2 que la adición de cobalto o níquel a una solución da el mínimo aumento en la formación de productos de degradación de cadena pesada.

Documentos citados en la descripción

Esta lista de documentos citados por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector y no forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de patente citados en la descripción

- 10 - US 2004115590 A [0011] - WO 0158935 A [0044]
- WO 9422905 A [0012] - WO 0183725 A [0045]
- US 4784950 A [0039] - WO 0222776 A [0045]
- 15 - US 5997864 A [0041] - WO 02077218 A [0045]
- WO 9215686 A [0041] - WO 0327147 A [0045]
- US 5580560 A [0044] - WO 0337932 A [0045]
- 20 - DK 0200189 W [0044] - JP 2001061479 B [0045]
- WO 0238162 A [0044] [0045] - EP 0200421 A [0124]
- 25 - WO 9920767 A [0044] - US 4456591 A, Thomas [0131]

Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- 30 - **Manning** *et al.* *Pharmaceutical Research*, 1989, vol. 6, 903-918 [0004]
- **Cleland** *et al.* The development of stable protein compositions: A closer look at protein aggregation, deamidation and oxidation. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1993, vol. 10, no. 4. 307-377 [0008]
- 35 - **Wang** *et al.* Parenteral compositions of proteins and peptides: Stability and stabilizers *Journal of Parenteral Science and Technology*, 1988, vol. 42, no. 2S. [0008]
- Basic Inorganic Chemistry *John Wiley & Sons* 1987. 53- [0024]
- 40 - **Persson** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 19919-19924 [0041]
- **Persson** *FEBS Letts.*, 1997, vol. 413, 359-363 [0041]
- **Lino** *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, vol. 352, 182-192 [0044]
- 45 - **Mollerup** *et al.* *Biotechnol. Bioeng.*, 1995, vol. 48, 501-505 [0044]
- **Kornfelt** *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, vol. 363, 43-54 [0044]
- **Wildgoose** *et al.* *Biochem*, 1990, vol. 29, 3413-3420 [0046]
- 50 - **Solomon** *Journal of Chemical Education*, 2001, vol. 78, no. 12. 1691-92 [0076]
- **James Fritz George Schenk** *Quantitative Analytical Chemistry*, 1979, [0076]
- 55 - **Monroe** *et al.* *Brit. J. Haematol.*, 1997, vol. 99, 542-547 [0122]
- **Hagen** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 2412-2416 [0124]
- **Broze Majerus** *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, no. 4. 1242-1247 [0125]
- 60 - **Hedner Kisiel** *J. Clin. Invest.*, 1983, vol. 71, 1836-1841 [0125]
- **Bjoern** *et al.* *Research Disclosure*, 1986, vol. 269, 564-565 [0125]
- 65 - **Cunningham Wells** *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0127]
- de **Vos** *et al.* *Science*, 1992, vol. 255, 306-312 [0127]

ES 2 335 994 T3

- **Smith** *et al. Journal of Molecular Biology*, 1992, vol. 224, 899-904 [0127]

- **Wlodaver** *et al. FEBS Letters*, 1992, vol. 309, 59-64 [0127]

5 - **Wakabayashi** *et al. J. Biol. Chem.*, 1986, vol. 261, 11097- [0130]

- **Thim** *et al. Biochem.*, 1988, vol. 27, 7785- [0130]

10 - **Scopes** Protein Purification *Springer-Verlag* 1982. [0130]

- Protein Purification *VCH Publishers* 1989. [0130]

- **Osterud** *et al. Biochem.*, 1972, vol. 11, 2853- [0131]

15 - **Hedner** *et al. J. Clin. Invest.*, 1983, vol. 71, 1836- [0131]

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica acuosa líquida comprendiendo

un polipéptido factor VII (i);

un agente amortiguador (ii) adecuado para mantener el pH en el rango de 4.0 a 9.0;

al menos un agente conteniendo metal (iii), donde dicho metal es seleccionado a partir del grupo consistente en cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, y cobre del estado oxidante +II; y

un tensioactivo no iónico (iv).

2. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el agente conteniendo metal (iii) es al menos uno seleccionado a partir del grupo consistente en cloruro de cromo(II), cloruro de manganeso(II), cloruro de hierro(II), cloruro de cobalto(II) cloruro de níquel(II), y cloruro de cobre(II).

3. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el metal del agente conteniendo metal (iii) es seleccionado a partir del grupo consistente en cobre y manganeso.

4. La composición según la reivindicación 3, donde el agente conteniendo metal (iii) es seleccionado a partir del grupo consistente en cloruro de cobre(II) y cloruro de manganeso(II).

5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la concentración del agente conteniendo metal (iii) es de al menos $1\ \mu\text{M}$.

6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el metal del agente conteniendo metal (iii) es cobre y la concentración de dicho agente es de al menos $5\ \mu\text{M}$.

7. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el metal del agente conteniendo metal (iii) es manganeso y la concentración de dicho agente es de al menos $100\ \mu\text{M}$.

8. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el polipéptido factor VII es el factor VIIa humano.

9. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el polipéptido factor VII es una variante de secuencia del factor VII.

10. La composición según la reivindicación 9, donde la proporción entre la actividad del polipéptido factor VII y la actividad del factor VIIa humano nativo (FVIIa de tipo salvaje) es de al menos 1,25 al analizarse en el "Ensayo de Proteólisis *In Vitro*" como se describe en este caso.

11. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el polipéptido del factor VII está presente en una concentración de 0,1-15 mg/ml.

12. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, la cual tiene un pH en el rango de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 8.0.

13. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el agente amortiguador (ii) comprende al menos un componente seleccionado a partir del grupo consistente en ácidos y sales de MES, PIPES, ACES, BES, TES, HEPES, TRIS, glicinamida, ácido fosfórico, ácido acético, ácido láctico, y ácido succínico.

14. La composición según la reivindicación 13, donde la concentración del agente amortiguador (ii) es de 1-100 mM.

15. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el tensioactivo no iónico (iv) es al menos uno seleccionado a partir del grupo consistente en polisorbatos, poloxámeros, éteres de alquilo de polioxietileno, copolímeros de bloque de etileno/polipropileno, polietilenglicol (PEG), estearatos de polioxietileno, y aceites castóreos de polioxietileno.

16. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo además un agente modificador de tonicidad (v).

17. La composición según la reivindicación 16, donde el agente modificador de tonicidad (v) es al menos uno seleccionado a partir del grupo consistente en sales neutrales, aminoácidos, péptidos de 2-5 residuos de aminoácidos, monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, y polialcoholes.

ES 2 335 994 T3

18. La composición según la reivindicación 17, donde al menos un agente modificador de tonicidad (v) es una sal neutral seleccionada del grupo que consiste en sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, y sales de magnesio.

19. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 17-18, donde el agente modificador de tonicidad (v) es cloruro de sodio en combinación con al menos uno seleccionado a partir del grupo consistente en cloruro de calcio, acetato de calcio, cloruro de magnesio y acetato de magnesio.

20. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el agente modificador de tonicidad (v) está presente en una concentración de al menos 1 mM.

21. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde al menos un agente modificador de tonicidad (v) es un agente modificador de fuerza iónica (v/a).

22. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, la cual tiene una fuerza iónica de al menos 50.

23. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, la cual tiene una osmolalidad de 300 ± 50 miliosmol/kg.

24. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes comprendiendo además un antioxidante (vi).

25. La composición según la reivindicación 24, donde el antioxidante (vi) se selecciona a partir de L-metionina, D-metionina, análogos de metionina, péptidos conteniendo metionina, homólogos de metionina, ácido ascórbico, cisteína, homocisteína, glutathiona, cistina, y cistationina.

26. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 24-25, donde el antioxidante (vi) está presente en una concentración de 0,1-5,0 mg/ml.

27. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes comprendiendo además un conservante (vii).

28. La composición según la reivindicación 27, donde el conservante (vii) es seleccionado a partir del grupo consistente en fenol, alcohol benzílico, orto-cresol, meta-cresol, para-cresol, metil paraben, propil paraben, cloruro de benzalconio, y cloruro de benzaetONIO.

29. La composición farmacéutica acuosa líquida según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende:

0,1-15 mg/ml de un polipéptido factor VII (i);

un agente amortiguador (II) adecuado para mantener el pH en el rango de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 9.0;

un agente conteniendo cobre (iii) en una concentración de al menos $5 \mu\text{M}$;

un tensioactivo no iónico (iv); y

un agente modificador de tonicidad (v) en una concentración de al menos 5 mM.

30. La composición farmacéutica acuosa líquida según cualquiera de las reivindicaciones 1-29, que comprende:

0,1-15 mg/ml de un polipéptido factor VII (i);

un agente amortiguador (ii) adecuado para mantener el pH en el rango de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 9.0;

un agente conteniendo manganeso (iii) en una concentración de al menos $100 \mu\text{M}$;

un tensioactivo no iónico (iv); y

al menos un agente modificador de tonicidad (v) en una concentración de al menos 5 mM.

31. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, la cual está adaptada para la administración parenteral.

32. La composición según la reivindicación 31, la cual está adaptada para la inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa.

ES 2 335 994 T3

33. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-32, comprendiendo además calcio (Ca^{2+}) y/o magnesio (Mg^{2+}), preferiblemente calcio, en una concentración de al menos aproximadamente 2 mM.

34. Un método para preparar una composición farmacéutica acuosa líquida de un polipéptido factor VII comprendiendo la fase de suministro del polipéptido factor VII (i) en una solución comprendiendo

un agente amortiguador (ii) adecuado para mantener el pH en el rango de 4.0 a 9.0;

al menos un agente conteniendo metal (iii), donde dicho metal es seleccionado a partir del grupo consistente en cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, y cobre del estado oxidante +II; y

un tensioactivo no iónico (iv).

35. Una composición farmacéutica acuosa líquida tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-33 para su uso como medicamento.

36. El uso de una composición farmacéutica acuosa líquida tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-33 para la preparación de un medicamento para tratar un síndrome sensible al factor VII.

37. Un contenedor hermético conteniendo una composición farmacéutica acuosa líquida tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-33, y opcionalmente un gas inerte.

38. El contenedor según la reivindicación 37, donde la composición no comprende un conservante (vii).

39. Un método para reducir la concentración iónica metálica en una composición farmacéutica acuosa líquida, comprendiendo dicho método la fase de poner en contacto una composición farmacéutica acuosa líquida según cualquiera de las reivindicaciones 1-33 con un material de intercambio de catión.