

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 38/36

//C07K14/745



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02825877.0

[43] 公开日 2005 年 4 月 20 日

[11] 公开号 CN 1607958A

[22] 申请日 2002.12.20 [21] 申请号 02825877.0

[30] 优先权

[32] 2001.12.21 [33] DK [31] PA200101948

[86] 国际申请 PCT/DK2002/000895 2002.12.20

[87] 国际公布 WO2003/055512 英 2003.7.10

[85] 进入国家阶段日期 2004.6.21

[71] 申请人 诺和诺德医疗保健公司

地址 瑞士苏黎士

[72] 发明人 B·L·汉森 M·B·延森

T·科恩费尔特

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商  
标事务所

代理人 赵艳华

权利要求书 3 页 说明书 24 页 附图 1 页

[54] 发明名称 因子 VII 多肽的液体组合物

[57] 摘要

一种液体含水组合物，其包含 (i) 因子 VII 多肽，(ii) 适合保持 pH 约 4.0 - 8.0 的试剂；(iii) 选自以下的试剂：钙盐、镁盐或其混合物，其中 (iii) 的浓度至少 15mM。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种液体含水组合物，其包含
  - (i) 因子VII多肽；
  - (ii) 适合保持pH在约4.0 – 约8.0范围内的试剂；
  - (iii) 选自以下的试剂：钙盐、镁盐或其混合物；其中(iii)的浓度至少 15 mM。
2. 权利要求1的组合物，其还包含(iv)离子强度改变剂。
3. 权利要求2的组合物，其中该离子强度改变剂(iv)选自：中性盐例如氯化钠；氨基酸；或小肽，或至少两种所述改变剂的混合物。
4. 权利要求3的组合物，其中该离子强度改变剂(iv)是氯化钠。
5. 权利要求1-4中任一项的组合物，其中试剂(iii)存在的浓度为至少约25 mM，例如至少约50 mM、100 mM、200 mM、400 mM或至少约800mM。
6. 权利要求2-5中任一项的组合物，其中试剂(iv)存在的浓度为至少约5 mM，例如至少约10 mM、20 mM、50 mM、100 mM、200 mM、400 mM、800 mM、1000 mM、1200 mM、1500 mM、1800 mM、2000 mM或至少约2200 mM。
7. 权利要求1-6中任一项的组合物，其中钙盐选自氯化钙、乙酸钙、葡萄糖酸钙和乙酰丙酸钙。
8. 权利要求1-7中任一项的组合物，其中镁盐选自氯化镁、乙酸镁、硫酸镁、葡萄糖酸镁和乙酰丙酸镁。
9. 权利要求6-8中任一项的组合物，其中试剂(iii)选自：氯化钙、乙酸钙、氯化镁、乙酸镁、硫酸镁或其混合物；并且其中该离子强度改变剂(iv)是氯化钠。
10. 权利要求1-9中任一项的组合物，其还包含(v)张力改变剂。
11. 权利要求10的组合物，其中该张力改变剂(v)选自：中性盐；单-、双-或多糖；糖醇；氨基酸；或小肽，或至少两种所述改变剂的混合物。

12. 权利要求10或11的组合物, 其中该张力改变剂(v)存在的浓度为1 mM - 500 mM。

13. 权利要求12的组合物, 其中所述浓度为10-250 mM。

14. 权利要求1-13中任一项的组合物, 其还包含(vi)非离子表面活性剂。

15. 权利要求14的组合物, 其中该非离子表面活性剂是聚山梨酯或泊洛沙姆或聚氧乙烯烷基醚, 例如泊洛沙姆188、泊洛沙姆407、聚山梨酯20、聚山梨酯80或聚氧23十二烷基醚。

16. 权利要求1-15中任一项的组合物, 其还包含(vii)抗氧化剂。

17. 权利要求16的组合物, 其中该抗氧化剂(vii)选自: L-或D-甲硫氨酸、甲硫氨酸类似物、包含甲硫氨酸的肽、甲硫氨酸同系物、抗坏血酸、半胱氨酸、高半胱氨酸、谷胱甘肽、胱氨酸和胱硫醚。

18. 权利要求17的组合物, 其中该抗氧化剂为L-甲硫氨酸。

19. 权利要求16-18中任一项的组合物, 其中该抗氧化剂存在的浓度为约0.1 - 约5.0mg/ml, 例如约0.1 - 约4mg/ml、约0.1 - 约3mg/ml、约0.1 - 约2 mg/ml、或约0.5 - 约2 mg/ml。

20. 权利要求1-19中任一项的组合物, 其中pH保持在约4.0 - 约7.0范围内, 如约4.5 - 约7.0、约5.0 - 约7.0、约5.5 - 约7.0、或约6.0 - 约7.0。

21. 权利要求1-20中任一项的组合物, 其中适于将pH保持在约4.0 - 约7.0范围内的试剂选自下列酸和其盐: 柠檬酸、乙酸、组氨酸、苹果酸、磷酸、酒石酸、琥珀酸、MES、HEPES、咪唑、TRIS、乳酸、glycylglycin、PIPES、glycin或至少两种所述试剂的混合物。

22. 权利要求21的组合物, 其中该试剂的浓度为约1 mM - 约50 mM。

23. 权利要求22的组合物, 其中缓冲液浓度约10 mM。

24. 权利要求1-23中任一项的组合物, 其还包含(viii)防腐剂, 例如苯酚、苯甲醇、邻甲酚、间甲酚、对甲酚、羟苯甲酸甲酯、对羟苯甲酸丙酯、benzalconium chloride或benzaethonium chloride。

25. 权利要求1-24中任一项的组合物，它是等渗的。
26. 权利要求1-25中任一项的组合物，它配制成用于给药。
27. 权利要求1-26中任一项的组合物，它在2-8 °C稳定至少6个月。
28. 权利要求1-27中任一项的组合物，其中因子VII多肽是人因子VIIa，优选重组制备的人因子VIIa。
29. 权利要求1-29中任一项的组合物，其中因子VII多肽是因子VII序列变体。
30. 权利要求29的组合物，按本说明书所述"体外蛋白水解分析"测试时，其中因子VII多肽活性与天然人因子VIIa(野生型FVIIa)活性之比为至少约1.25，优选至少约2.0或4.0，最优选至少约8.0。
31. 权利要求1-30中任一项的组合物，其中该因子VII多肽存在的浓度为约0.1 - 约10mg/ml，例如约0.5 - 约5.0 mg/ml、约0.6 - 约4.0 mg/ml、或约1.0 - 约4.0 mg/ml。
32. 制备因子VII多肽的液体含水组合物的方法，其包括提供在溶液中的因子VII多肽的步骤，该溶液包含(ii)适合保持pH在约4.0 - 约8.0范围内的试剂；(iii)选自以下的试剂：钙盐、镁盐或其混合物，其中(iii)的浓度为至少15 mM。
33. 权利要求1-31中任一项的组合物在制备用于治疗对因子VII有反应的综合征的药物中的用途。
34. 治疗对因子VII有反应的综合征的方法，该方法包括给予有此需要的受试者有效量的含水液体组合物，其包含(i)因子VII多肽，(ii)适合保持pH在约4.0 - 约8.0范围内的试剂；(iii)选自以下的试剂：钙盐、镁盐或其混合物，其中(iii)的浓度为至少15 mM。

## 因子 VII 多肽的液体组合物

### 发明领域

本发明涉及包含因子 VII 多肽的液体含水组合物以及制备和使用该组合物的方法。本发明更特别涉及对化学和/或物理降解稳定的液体组合物。

### 发明背景

已经鉴定了凝血过程涉及的多种因子，包括血浆糖蛋白因子 VII (FVII)。血管壁受损后，暴露于循环血中的组织因子(TF)与循环中存在的、相当于约 1% FVII 蛋白质总量的 FVIIa 之间形成复合物，从而启动止血。FVII 主要以单链酶原存在于血浆中，由 FXa 断裂成双链活化形式 FVIIa。重组的活化因子 VIIa (rFVIIa)已开发为前止血剂 (pro-haemostatic agent)。因抗体形成而不能利用其它凝血因子产品治疗的出血血友病受试者，给予 rFVIIa 可产生快速、高效的前止血反应 (pro-haemostatic response)。FVIIa 也可以成功治疗因子 VII 缺陷受试者、或凝血系统正常但过量流血的受试者的出血。

希望有适合保存和输送的给药形式的因子 VIIa。理想上药物产品以液体保存和给药。或者，药物产品是冻干的，例如冷冻干燥，然后就在患者使用之前加入合适稀释剂重新溶解。理想上药物产品具有足够稳定性，可以长期保存，即 6 个月以上。

通常根据蛋白质药物在给药形式中的稳定性，来决定使最终药物产品保持液体抑或冻干。蛋白质稳定性特别受到以下因素影响，例如离子强度、pH、温度、冷冻/融化的重复循环以及受到剪切力。活性蛋白质可因物理不稳定性包括变性和凝聚(可溶性及不可溶性凝聚物形成)、以及化学不稳定性包括例如水解、脱酰胺作用和氧化作用而丧失，仅举几个例子。蛋白质药物稳定性的一般综述参见例如 Manning 等人, *Pharmaceutical Research* 6: 903-918 (1989)。

虽然广泛理解可能发生蛋白质不稳定性，但不可能预测特定蛋白质的特定不稳定性问题。以上任何不稳定性均可导致形成活性降低、毒性增加和/或免疫原性提高的蛋白质副产品、或衍生物。实际上，蛋白质沉淀可能引起血栓形成、剂量形式和数量的不均一性以及注射器阻塞。此外，翻译后修饰例如某些 N 端谷氨酸残基的  $\gamma$  羧基化以及添加糖侧链产生可能在保存期间对修饰敏感的潜在位点。因子 VIIa 特异性的丝氨酸蛋白酶也可能因自身催化而发生片段化(酶促降解)。因此，任何蛋白质组合物的安全和效率与其稳定性直接相关。液体形式保持稳定性通常与冻干形式不同，因其分子运动大大增加，从而提高了分子相互作用的几率。浓缩形式保持稳定性也不同，因为高蛋白质浓度易于形成凝聚物。

开发液体组合物时，要考虑很多因素。短期，即 6 个月以下，液体稳定性一般取决于避免总体结构性变化，例如变性和凝聚。文献中描述了针对许多蛋白质的这类方法，也存在许多稳定剂的例子。众所周知，有效稳定某一蛋白质的试剂实际上使另一种不稳定。一旦使蛋白质的总体结构性变化稳定，形成长期稳定(例如超过 6 个月)的液体组合物则取决于进一步稳定蛋白质不受特异性针对该蛋白质的各类降解。更特异性的各类降解可能包括，例如二硫键错乱、某些残基氧化、脱酰胺作用、环化。尽管未必可能确切指出各个降解种类，但发展了测定方法来监控精细变化，以便监控特定赋形剂独特稳定目的蛋白质的能力。

除了稳定性考虑之外，通常选择由各个世界医学管理机构批准的赋型剂。希望组合物的 pH 在注射/输注时位于生理合适范围内，否则可能引起疼痛和不适。

蛋白质组合物的综述参见例如 Cleland 等人: **The development of stable protein compositions: A closer look at protein aggregation, deamidation and oxidation, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 1993 (4): 307-377** 以及 Wang 等人, **Parenteral compositions of proteins and peptides: Stability and stabilizers,**

**Journal of Parenteral Science and Technology 1988 (增刊), 42(2S)。**

有关蛋白质稳定的其它出版物如下。

**U. S. 20010031721 A1 (American Home Products)**涉及高度浓缩、冻干及液体因子 IX 组合物。

**U. S. 5,770,700, 700 (Genetics Institute)**涉及液体 IX 组合物。

**WO 97/19687 (American Red Cross)**涉及血浆蛋白质的液体组合物，特别是因子 VIII 和因子 IX。

**U. S. 4,297,344, 344**公开了通过加入所选氨基酸例如甘氨酸、丙氨酸、羟脯氨酸、谷氨酰胺和氨基丁酸以及糖类例如单糖、寡糖或糖醇，使凝血因子 II 和 VIII、抗凝血酶 III 及纤溶酶原对热稳定。

因子 VIIa 经历若干降解途径，特别是聚集(二聚)、氧化和自溶型断裂(肽主链剪切)。此外，可能发生沉淀。从蛋白质中去除水分可以显著降低上述许多反应。然而，形成因子 VIIa 的含水组合物的好处在于，消除重新溶解失误而提高了给药准确性，并且简化了产品的临床使用，从而增加了患者合作。理想上因子 VIIa 组合物应在各种蛋白质浓度下稳定 6 个月以上。这提供了给药方法的灵活性。一般而言，较高度浓缩的形式可以给予较低的体积，从患者观点极其希望如此。液体组合物较之冷冻干燥产品在易于给药和使用方面具有很多优点。

如今，唯一商品化重组制备的 FVII 多肽组合物是冷冻干燥的因子 FVIIa 产品，在使用前重新溶解，包含相对较低的因子 VIIa 浓度，例如约 0.6 mg/ml。一瓶(1.2 mg) NovoSeven® (Novo Nordisk A/S, Denmark)包含 1.2 mg 重组人因子 VIIa、5.84 mg NaCl、2.94 mg CaCl<sub>2</sub>、2 H<sub>2</sub>O、2.64 mg GlyGly、0.14 mg 聚山梨酯(polysorbate)80 和 60.0 mg 甘露醇；利用 2.0 ml 注射用水(WFI)重新溶解到 pH 5.5。重新溶解后，蛋白质溶液稳定使用 24 小时。因此，目前没有商品化的液体即用型或浓缩的因子 VII 产品。

故而本领域需要提高因子 VII 多肽包括人因子 VIIa 稳定性(化学和/或物理稳定性)、增加浓度、保持活性水平以及提供适于保存的液体组合物的方法。因此，本发明目的在于提供含水因子 VII 多肽组合

物，对化学和/或物理降解产物例如酶促降解或自身催化产物提供合适控制。

### 发明概述

本发明人发现，因子 VII 或其类似物("因子 VII 多肽")与缓冲剂、浓度至少 15 mM 的钙或镁盐或其混合物一起配制成含水溶液时，在 pH 约 4 - 约 8 范围内稳定。

一方面，本发明提供了一种液体含水组合物，其包含(i)因子 VII 多肽，(ii)适于使 pH 保持在约 4.0 - 约 8.0 的试剂；(iii)选自以下的试剂：钙盐、镁盐或其混合物，其中(iii)的浓度为至少 15 mM。

在不同实施方案中，试剂(iii)存在的浓度为至少约 25 mM、50 mM、100 mM、200 mM、400 mM、800 mM、900 mM 或至少 1000 mM。

在另一实施方案中，该组合物另外包含(iv)离子强度改变剂。

在不同实施方案中，该离子强度改变剂选自：中性盐例如氯化钠；氨基酸；或小肽，或至少两种所述改变剂的混合物。在优选实施方案中，该离子强度改变剂是氯化钠。

在不同实施方案中，试剂(iv)存在的浓度为至少约 5 mM、10 mM、20 mM、50 mM、100 mM、200 mM、400 mM、800 mM、1000 mM、1200 mM、1500 mM、1800 mM、2000 mM 或至少 2200mM。

在一系列实施方案中，试剂(iii) (钙和/或镁盐)存在的浓度为约 15 mM - 约 1000 mM，例如约 25 mM - 约 1000 mM、约 50 mM - 约 1000 mM、约 100 mM - 约 1000 mM、约 200 mM - 约 1000 mM、约 300 mM - 约 1000 mM、约 400 mM - 约 1000 mM、约 500 mM - 约 1000 mM、约 600 mM - 约 1000 mM、约 700 mM - 约 1000 mM；约 15 mM - 约 800 mM、约 25 mM - 约 800 mM、约 50 mM - 约 800 mM、约 100 mM - 约 800 mM、约 200 mM - 约 800 mM、约 300 mM - 约 800 mM、约 400 mM - 约 800 mM、约 500 mM - 约 800 mM；约 15 mM - 约 600 mM、约 25 mM - 约 600 mM、约 50 mM - 约 600 mM、约 100 mM - 约 600 mM、约 200 mM - 约 600 mM、约 300 mM - 约 600 mM；约 15 mM - 约 400 mM、约 25 mM - 约 400 mM、约 50 mM - 约

400 mM 或约 100 mM - 约 400mM。

在一系列实施方案中,试剂(iv)(离子强度改变剂)存在的浓度为约 5 mM - 约 2200 mM, 例如约 25 mM - 约 2200 mM、约 50 mM - 约 2200 mM、约 100 mM - 约 2200 mM、约 200 mM - 约 2200 mM、约 400 mM - 约 2200 mM、约 600 mM - 约 2200 mM、约 800 mM - 约 2200 mM、约 1000 mM - 约 2200 mM、约 1200 mM - 约 2200 mM、约 1400 mM - 约 2200 mM、约 1600 mM - 约 2200 mM、约 1800 mM - 约 2200 mM 或约 2000 mM - 约 2200 mM; 约 5 mM - 约 1800 mM、约 25 mM - 约 1800 mM、约 50 mM - 约 1800 mM、约 100 mM - 约 1800 mM、约 200 mM - 约 1800 mM、约 400 mM - 约 1800 mM、约 600 mM - 约 1800 mM、约 800 mM - 约 1800 mM、约 1000 mM - 约 1800 mM、约 1200 mM - 约 1800 mM、约 1400 mM - 约 1800 mM、约 1600 mM - 约 1800 mM; 约 5 mM - 约 1500 mM、约 25 mM - 约 1400 mM、约 50 mM - 约 1500 mM、约 100 mM - 约 1500 mM、约 200 mM - 约 1500 mM、约 400 mM - 约 1500 mM、约 600 mM - 约 1500 mM、约 800 mM - 约 1500 mM、约 1000 mM - 约 1500 mM、约 1200 mM - 约 1500 mM; 约 5 mM - 约 1200 mM、约 25 mM - 约 1200 mM、约 50 mM - 约 1200 mM、约 100 mM - 约 1200 mM、约 200 mM - 约 1200 mM、约 400 mM - 约 1200 mM、约 600 mM - 约 1200 mM 或约 800 mM - 约 1200 mM。

在一个优选实施方案中,试剂(iii)和(iv)的总浓度为约 50 mM - 约 2500 mM, 例如约 100 mM - 约 2500 mM、约 200 mM - 约 2500 mM、约 400 mM - 约 2500 mM、约 600 mM - 约 2500 mM、约 800 mM - 约 2500 mM、约 1000 mM - 约 2500 mM、约 1200 mM - 约 2500 mM、约 1400 mM - 约 2500 mM、约 1600 mM - 约 2500 mM、约 1800 mM - 约 2500 mM 或约 2000 mM - 约 2500 mM; 约 50 mM - 约 2000 mM、约 100 mM - 约 2000 mM、约 200 mM - 约 2000 mM、约 400 mM - 约 2000 mM、约 600 mM - 约 2000 mM、约 800 mM - 约 2000 mM、约 1000 mM - 约 2000 mM、约 1200 mM - 约 2000 mM、约 1400 mM - 约

2000 mM 或约 1600 mM - 约 2000 mM; 约 50 mM - 约 1600 mM、约 100 mM - 约 1600 mM、约 200 mM - 约 1600 mM、约 400 mM - 约 1600 mM、约 600 mM - 约 1600 mM、约 800 mM - 约 1600 mM、约 1000 mM - 约 1600 mM 或约 1200 mM - 约 1600 mM。

在一个实施方案中, 试剂(iii)和(iv)存在的浓度为约 600 - 约 800mM 的(iii)以及 0 - 约 5 mM 的(iv); 在另一实施方案中, 试剂(iii)和(iv)存在的浓度为约 300 - 约 500 mM 的(iii)以及约 1100 - 约 1300 mM 的(iv); 在另一实施方案中, 试剂(iii)和(iv)存在的浓度为约 100 - 约 300 mM 的(iii)以及约 1500 - 约 1900 mM 的(iv); 在另一实施方案中, 试剂(iii)和(iv)存在的浓度为约 50 - 约 150mM 的(iii)以及约 1800 - 约 2300 mM 的(iv)。

在不同实施方案中, 该组合物的离子强度为至少 50, 例如至少 75、100、150、200、250、400、500、650、800、1000、1200、1600、2000、2400、2800 或至少 3200。

在不同实施方案中, 钙盐选自氯化钙、乙酸钙、葡萄糖酸钙和乙酰丙酸钙。在不同实施方案中, 镁盐选自氯化镁、乙酸镁、硫酸镁、葡萄糖酸镁、乙酰丙酸镁及强酸盐。

在优选实施方案中, 试剂(iii)选自氯化钙、乙酸钙、氯化镁、乙酸镁、硫酸镁或其混合物; 并且离子强度改变剂(iv)是氯化钠。

在另一实施方案中, 钙组合物另外包含(v)张力改变剂。

在不同实施方案中, 该张力改变剂(v)选自: 中性盐; 单-、双-或多糖; 糖醇; 氨基酸; 或小肽, 或至少两种所述改变剂的混合物。

在一个实施方案中, 该张力改变剂(v)存在的浓度为约 1 - 约 500 mM; 约 1 - 约 300 mM; 约 10 - 约 200 mM; 或约 20 - 约 150 mM。

在另一实施方案中, 该组合物另外包含(vi)非离子表面活性剂。在一个实施方案中, 该非离子表面活性剂存在的量为按重量约 0.005 - 约 2.0%。

在另一实施方案中, 该非离子表面活性剂是聚山梨酯、或泊洛沙姆(poloxamer)、或聚氧乙烯烷基醚, 优选泊洛沙姆 188、或泊洛沙姆

407、或聚山梨酯 20、或聚山梨酯 80、或聚氧 23 十二烷基醚。

在另一实施方案中，该组合物另外包含(vii)抗氧化剂。在不同实施方案中，该抗氧化剂是 D-或 L-甲硫氨酸；甲硫氨酸类似物；包含甲硫氨酸的肽；抗坏血酸；半胱氨酸；甲硫氨酸同系物，例如高半胱氨酸；谷胱甘肽。在一个优选实施方案中，该抗氧化剂是 L-甲硫氨酸。在一个实施方案中，该抗氧化剂存在的浓度为约 0.1 - 约 5.0 mg/ml。

在一个实施方案中，该组合物的 pH 保持在约 4.0 - 约 7.0；例如约 4.5 - 约 7.0；约 5.0 - 约 7.0；约 5.5 - 约 7.0；或约 6.0 - 约 7.0。

在一个实施方案中，适于将 pH 保持在约 4.0 - 约 8.0 的试剂是选自下列酸和其盐的缓冲剂：柠檬酸、乙酸、组氨酸、苹果酸、磷酸、酒石酸、琥珀酸、MES、HEPES、咪唑、TRIS、乳酸、glycylglycin、PIPES、glycin 或至少两种所述缓冲剂的混合物。

在一个实施方案中，该缓冲剂的浓度为约 1 mM to 100 mM；1 mM - 约 50 mM；约 1 mM - 约 25 mM；约 2 mM - 约 20 mM；或约 10 mM。

在另一实施方案中，该组合物还包含(viii)防腐剂。在一个实施方案中，该防腐剂选自苯酚、苯甲醇、邻甲酚(orto-cresol)、间甲酚、对甲酚、羟苯甲酸甲酯、对羟苯甲酸丙酯、benzalconium chloride 和 benzaethonium chloride。

在一个实施方案中，该组合物是等渗的；在另一实施方案中，它是高渗的。在一个实施方案中，该组合物配制成用于给药。在一个实施方案中，该组合物在 2-8 °C 稳定和/或稳定至少 6 个月。

在不同实施方案中，该因子 VII 多肽是人因子 VIIa；重组人因子 VIIa；因子 VII 相关多肽；因子 VII 序列变体；或因子 VII 多肽，其中在本说明书所述'体外蛋白质水解分析'的测试中，该因子 VII 多肽活性和天然人因子 VIIa 多肽(野生型 FVIIa)活性至少约 1.25，优选至少约 2.0 或 4.0，最优选至少约 8.0。在一个实施方案中，该因子 VII 多肽的糖基化不同于野生型人因子 VII。

在不同实施方案中，该因子 VII 多肽存在的浓度为约 0.1 mg/ml - 约 10 mg/ml；约 0.5 mg/ml - 约 5.0 mg/ml；约 0.6 mg/ml - 约 4.0

mg/ml; 约 1.0 mg/ml - 约 4.0 mg/ml; 约 0.1mg/ml - 约 5 mg/ml; 约 0.1 mg/ml - 约 4.0 mg/ml; 约 0.1 mg/ml - 约 2 mg/ml ; 或约.1 mg/ml - 约 1.5 mg/ml.

在另一方面, 本发明还提供了制备因子 VII 多肽的液体含水组合物的方法, 其包含提供因子 VII 多肽溶液的步骤, 该溶液包含(i)因子 VII 多肽; (ii)适合保持 pH 在约 4.0 - 约 8.0 的试剂; (iii)选自以下的试剂: 钙盐、镁盐或其混合物; 其中(iii)的浓度为至少 15 mM.

在另一方面, 本发明还涉及该组合物在制备用于治疗对因子 VII 有反应的综合征的药物中的用途。

在另一方面, 本发明涉及治疗对因子 VII 有反应的综合征的方法, 该方法包含在引起出血减少和/或凝血增加的情况下, 给予有此需要的受试者有效量的含水液体组合物, 其包含(i)因子 VII 多肽, (ii)适合保持 pH 在约 4.0 - 约 8.0 的试剂; (iii)选自以下的试剂: 钙盐、镁盐或其混合物; 其中(iii)的浓度为至少 15 mM.

在不同实施方案中, 该综合症选自血友病 A、血友病 B、因子 XI 缺陷、因子 FVII 缺陷、血小板减少、血管性血友病(von Willebrand's disease)、存在凝血因子抑制剂、手术、脑内出血、创伤和抗凝剂治疗。

#### 发明详述

本发明的组合物可用作因子 VII 多肽的稳定、优选即用型组合物。在 2 - 8°C 温度下保存时, 该组合物可稳定至少 6 个月, 优选高达 36 个月。在 2 - 8°C 保存至少 6 个月时, 该组合物化学和/或物理稳定, 特别是化学稳定。

"稳定"是指该组合物在 2 - 8°C 保存至少 6 个月后, 按基本如 WO 92/15686 (实施例 II)所述一段式凝结分析(one-stage clot assay)测定, 保持至少 50%最初的生物活性。简言之, 在 50 mM Tris (pH 7.5)、0.1% BSA 中稀释待测样品, 将 100  $\mu$ l 样品与 100  $\mu$ l 因子 VII 缺陷血浆和 200  $\mu$ l 包含 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  的促凝血酶原激酶 C 温育。测定凝结时间, 与使用系列稀释的参考标准或柠檬酸抗凝的正常人血浆混合物的标准曲线作比较。

优选在 2 - 8°C 保存至少 6 个月以后,该稳定组合物保持至少 80% 的最初活性。

术语"使稳定"可能与"相对稳定"交互使用,是指在 2 - 8°C 保存至少 6 个月以后,相对于在类似条件下保存类似时间的重新溶解的 NovoSeven® 产品溶液所包含的对应降解产物的数量,该组合物包含较低数量的至少一种下列降解产物:(i)酶促降解产物,(ii)凝聚物(二聚物、寡聚物和多聚物),(iii)氧化形式,(iv)脱酰胺形式。

术语"物理上稳定"是用来指保持视觉上澄清的组合物。该组合物在不同温度下保存不同时间以后,利用视觉检查和混浊度的方法,评价该组合物的物理稳定性。在黑背景下清晰聚焦的光线中进行组合物的视觉检查。组合物显示视觉可见的混浊则定为物理上不稳定。

因子 VII 多肽的术语"物理稳定性"涉及在形成二聚、寡聚和多聚形式的因子 VII 多肽的不可溶性和/或可溶性凝聚物以及该分子的任何结构性破坏和变性。

术语"化学上稳定"是用来指该组合物在 2 - 8°C 保存 6 个月以后,按基本如 WO 92/15686 所述一段式凝结分析测定,保持至少 50% 最初生物活性。

术语"化学稳定性"是用来涉及溶液在加速(accelerated)条件下保存时形成因子 VII 多肽的任何化学变化。例如导致因子 VII 多肽片段形成的水解、脱酰胺和氧化以及酶促降解。特别是含硫氨基酸倾向于氧化形成相应的亚砷。

该组合物包含因子 VII 多肽、钙和/或镁离子、缓冲剂并任选其它可进一步稳定因子 VII 多肽的赋形剂,包括离子强度改变剂和张力改变剂。因子 VII 多肽浓度为约 0.1 - 约 10 mg/mL。

此处所用术语"离子强度改变剂"包括影响溶液离子强度的试剂。该试剂包括但不限于中性盐,例如氯化钠或氯化钾;氨基酸;小肽(例如具有 2 - 5 个氨基酸残基,例如甘氨酸甘氨酸),或至少两种所述改变剂的混合物。优选试剂为氯化钠。该离子强度改变剂的存在浓度至少约 5 mM、10 mM、20 mM、50 mM、100 mM、200 mM、400 mM、

800 mM、1000 mM、1200 mM、1500 mM、1800 mM、2000 mM 或至少 2200 mM。

此处所用术语"张力改变剂"包括有助于溶液的重量摩尔渗透压浓度(osmolality)的试剂。张力改变剂包括但不限于氨基酸;小肽(例如具有 2-5 个氨基酸残基);中性盐;单-或二糖;多糖;糖醇,或至少两种所述改变剂的混合物。张力改变剂的例子包括但不限于氯化钠、氯化钾、乙酸钠、蔗糖、葡萄糖、甘氨酸、甘氨酸和甘露醇。通常,该改变剂存在浓度为约 1 - 约 500 mM;约 1 - 约 300 mM;约 10 - 约 200 mM;或约 20 - 约 150 mM,取决于存在的其它成分。可能使用中性盐例如氯化钠或氯化钾。

"中性盐"是指溶解于溶液中时既非酸性也非碱性的盐。

术语"适合保持 pH 为约 4.0 - 约 8.0 的试剂"包括使溶液 pH 保持在约 4.0 - 约 8.0(例如约 4.0 - 约 7.0、约 4.5 - 约 7.0、约 5.0 - 约 7.0、约 5.0 - 约 6.5、约 5.5 - 约 7.0、约 5.5 - 约 6.5、约 6.0 - 约 7.0、约 5.0 - 约 6.0、约 6.4 - 约 6.6、或约 6.5、约 5.2 - 约 5.7、或约 5.5)合适范围内的试剂。该术语可能与"缓冲剂"交互使用。其可能包括但不限于酸和其盐:柠檬酸(钠或钾)、乙酸(铵、钠或钙)、组氨酸(L-组氨酸)、苹果酸、磷酸(钠或钾)、酒石酸、琥珀酸、MES、HEPES、咪唑、TRIS、乳酸、谷氨酸、glycylglycin、PIPES、glycin 或至少两种所述缓冲剂的混合物。选择缓冲剂浓度范围,以保持溶液的优选 pH。缓冲剂也可能是至少两种缓冲剂的混合物,其中该混合物能够提供特定范围的 pH 值。在另选实施方案中,该缓冲剂的浓度范围为约 1 mM-100 mM;1 mM - 约 50 mM;约 1 mM - 约 25 mM;约 2 mM - 约 20 mM;或约 10 mM。

任选该组合物还可能包含表面活性剂或去污剂。"表面活性剂"或"去污剂"通常包括保护蛋白质防止空气/溶液界面所致应力以及溶液/表面所致应力(例如引起蛋白质凝聚)的试剂。去污剂优选非离子去污剂,包括但不限于聚山梨酯(例如 Tween®),例如聚山梨酯 20 或 80;聚乙烯烷基醚或泊洛沙姆,例如泊洛沙姆 188 或 407 (例如 Pluronic®)

多元醇)及其它乙烯/聚丙烯嵌段聚合物, 或聚乙二醇(PEG)例如 PEG8000。表面活性剂的存在量为约 0.005 - 约 2.0%。

任选该组合物可能包括抗氧化剂。抗氧化剂包括但不限于抗坏血酸、半胱氨酸、高半胱氨酸、胱氨酸、胱硫醚(cystathionine)、甲硫氨酸、谷胱甘肽及其它包含半胱氨酸或甲硫氨酸的肽, 特别是具有 2 - 5 个氨基酸残基的肽, 其中至少一个残基是甲硫氨酸或半胱氨酸残基; 优选甲硫氨酸、特别是 L-甲硫氨酸。包含抗氧化剂的浓度为 0.1 - 5 mg/ml, 例如 0.1 - 4、0.1 - 3、0.1 - 2 或 0.5 - 2 mg/ml。

该组合物中可能包括防腐剂, 以阻止微生物生长, 从而提供 FVII 多肽的"多次使用"包装。防腐剂包括酚、苯甲醇、邻甲酚、间甲酚、对甲酚、羟苯甲酸甲酯、对羟苯甲酸丙酯、benzalconium chloride 或 benzaethonium chloride。一般包含防腐剂的浓度为 0.1 - 20 mg/ml, 取决于 pH 范围和防腐剂类型。任选该组合物也可能包括能够抑制脱酰胺作用的试剂。

此处所用的特定量可理解为 $\pm$  约 10%, 例如约 50 mM 包括 50 mM  $\pm$  5 mM; 例如 4% 包括 4%  $\pm$  0.4% 等。

涉及溶于溶液中的固体以及混入溶液中的液体时, 均为百分比(重量/重量)。例如, 对于 Tween, 即为 100% 储液重量/溶液重量。

术语"离子强度"为溶液的离子强度( $\mu$ ), 由下式定义:  $\mu = 1/2 \sum ([i](Z_i^2))$ ,

其中  $\mu$  是离子强度,  $[i]$  是某一离子的摩尔浓度,  $Z_i$  是该离子的电荷(+或-) (James Fritz and George Schenk: Quantitative Analytical Chemistry, 1979)。在本发明不同实施方案中, 该组合物的离子强度为至少 50, 例如至少 75、100 150、200、250、400、500、650、800、1000、1200、1600、2000、2400、2800 或至少 3200。

术语"等渗"是指"与血清等渗", 即约 300  $\pm$  50 毫渗 (milliosmol)/kg。张力是指测定给药前溶液的重量摩尔渗透压浓度。术语"高渗"是指高于血清生理水平的重量摩尔渗透压浓度水平, 例如高于 300  $\pm$  50 毫渗/kg 的水平。

术语"药物有效量"或"有效量"是由有资格的专业人员(qualified practitioner)确定的有效剂量,他可能滴定以获得所需反应的剂量。剂量的考虑因素包括效力、生物利用度、所需药代动力学/药效学特征、治疗条件、患者相关因素(例如重量、健康、年龄等)、存在共同给予的药剂(例如抗凝剂)、给药时间或医学专业人员已知的其它因素。

术语"治疗"定义为,为了对抗疾病、病态或紊乱而处理和照料受试者,例如哺乳动物,特别是人,包括给予因子 VII 多肽,以防止症状或并发症发作,或减轻症状或并发症,或消除疾病、病态或紊乱。本发明包含因子 VII 多肽的药物组合物可能经非肠道途径给予需要该治疗的受试者。可能利用注射器、可选笔式注射器,通过皮下、肌肉或静脉内注射进行非肠道给药。或者,利用输注泵进行非肠道给药。

因子 VIIa 的浓度以 mg/mL 或 IU/mL 表示,1 mg 通常代表 43000 - 56000 IU 或以上。

#### 使用方法:

本发明的制剂可能用于治疗任何对因子 VII 有反应的综合征,例如出血性疾病,包括而非限制,由凝血因子缺陷(例如血友病 A 和 B,或凝血因子 XI 或 VII 缺陷)、血小板减少或血管性血友病、或凝血因子抑制剂、或任何原因的过量出血所致出血性疾病。该制剂也可能给予与手术或其它创伤有关的患者,或给予接受抗凝剂治疗的患者。

#### 根据本发明配制的因子 VII 多肽:

术语"人因子 VII"或"rFVII"表示利用包括天然来源提取和纯化、以及重组细胞培养系统在内的方法产生的人因子 VII。其序列和特征如例如美国专利 4,784,950 所述。该术语也包括生物学活性的人因子 VII 等价物,例如全序列中的一个或多个氨基酸不同。此外,本申请所用术语是用来包括因子 VII 的置换、缺失和插入氨基酸变体、或翻译后修饰。此处所用"因子 VII 多肽"包括而非限制,因子 VII 以及因子 VII 相关多肽。因子 VII 相关多肽包括而非限制,具有相对于人因子 VII 化学修饰的、和/或包含一个或多个相对于人因子 VII 的氨基酸

序列改变(即因子 VII 变体)、和/或包含相对于人因子 VII 的截短的氨基酸序列(即因子 VII 片段)的因子 VII 多肽。该因子 VII 相关多肽可能具有相对于人因子 VII 的不同性质,包括稳定性、磷脂结合、改变的比活性等。

术语"因子 VII"是用来包括未断裂(酶原)形式的因子 VII 多肽,以及经过蛋白水解加工产生相应生物活性形式的因子 VII 多肽,可能称作因子 VIIa。因子 VII 典型在残基 152 和 153 之间断裂,产生因子 VIIa。术语"因子 VII"还用来包括而非限制,具有野生型人因子 VII(如美国专利 4,784,950 公开)1-406 氨基酸序列的多肽,以及来源于其它物种的野生型因子 VII,例如牛、猪、犬、鼠和鲑鱼的因子 VII。另外包括可能在个体之间存在和发生的因子 VII 的天然等位基因变体。并且,糖基化或其它翻译后修饰的程度和定位可能因所选宿主细胞及宿主细胞环境的性质而改变。

此处所用"因子 VII 相关多肽"包括而非限制,表现与野生型人因子 VII 基本类似或提高的生物学活性的多肽。这些多肽包括而非限制,化学修饰的因子 VII 或因子 VIIa,以及因子 VII 变体,其中引入了可修饰或破坏该多肽生物活性的特定氨基酸序列改变。

其另外包括带有略微修饰的氨基酸序列的多肽,例如具有包括 N 端氨基酸缺失或添加的修饰 N 端的多肽,和/或相对于人因子 VIIa 化学修饰的多肽。

表现与野生型因子 VII 基本相同或更好生物活性的因子 VII 相关多肽、包括多肽变体,包括而非限制,通过插入、缺失或置换一个或多个氨基酸而具有不同于野生型因子 VII 的氨基酸序列的多肽。

具有与野生型因子 VIIa 基本相同或提高的生物学活性的因子 VII 相关多肽、包括变体,包括那些在本说明书所述一种或多种凝结分析、蛋白水解分析或 TF 结合分析中进行测试时,表现至少约 25%、优选至少约 50%、更优选至少约 75%、更优选至少约 100%、更优选至少约 110%、更优选至少约 120%、最优选至少约 130%的产生于相同类型细胞的野生型因子 VIIa 的比活性的变体。

在某些实施方案中，该因子 VII 多肽是因子 VII 相关多肽、特别是变体，其中在"体外蛋白水解分析"(参见下文"分析")中进行测试时，所述因子 VII 多肽的活性与天然人因子 VIIa(野生型 FVIIa)的活性之比至少约 1.25；在其它实施方案中，该比值至少约 2.0；在另外实施方案中，该比值至少约 4.0。在本发明某些实施方案中，该因子 VII 多肽是因子 VII 等价物、特别是变体，其中在"体外蛋白水解分析"(参见下文"分析")中进行测试时，所述因子 VII 多肽的活性与天然人因子 VIIa(野生型 FVIIa)的活性之比至少约 1.25；在其它实施方案中，该比值至少约 2.0；在另外实施方案中，该比值至少约 4.0；在另外实施方案中，该比值至少约 8.0。

在某些实施方案中，该因子 VII 多肽是人因子 VII，例如美国专利 4,784,950 所公开(野生型因子 VII)。在某些实施方案中，该因子 VII 多肽是人因子 VIIa。在一系列实施方案中，因子 VII 多肽包括表现至少约 90%、优选至少约 100%、优选至少约 120%、更优选至少约 140%、最优选至少约 160%的人因子 VIIa 的生物学比活性的多肽。

在某些实施方案中，该因子 VII 多肽通过插入、缺失或置换一个或多个氨基酸而具有不同于野生型因子 VII 的氨基酸序列。

在一系列实施方案中，因子 VII 多肽包括表现与野生型因子 VII(如美国专利 4,784,950 所公开)的序列至少约 70%、优选至少约 80%、更优选至少约 90%、最优选至少约 95%一致性的多肽。使用合适的供序列比对的计算机程序，例如 ClustalW 程序 1.8, 1999 版(Thompson 等人, 1994, *Nucleic Acid Research*, 22: 4673-4680)，可以从比对的序列中方便确定氨基酸序列的同源性/一致性。

具有与野生型因子 VII 基本相同或提高的生物学活性的因子 VII 变体的非限制性例子包括，S52A-FVII、S60A-FVII (Iino 等人, *Arch. Biochem. Biophys.* 352: 182-192, 1998)；L305V-FVII、L305V/M306D/D309S-FVII、L305I-FVII、L305T-FVII、F374PFVII、V158T/M298Q-FVII、V158D/E296V/M298Q-FVII、K337A-FVII、M298Q-FVII、V158D/M298Q-FVII、L305V/K337A-FVII、

V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII 、  
 V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII 、  
 V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII 、 K157A-FVII 、  
 E296V-FVII 、 E296V/M298Q-FVII 、 V158D/E296V-FVII 、  
 V158D/M298K-FVII 和 S336G-FVII; WO 01/83725 和 WO 02/22776  
 公开的表现提高的 TF 非依赖性活性的 FVIIa 变体;美国专利 5,580,560  
 公开的表现提高的蛋白水解稳定性的 FVIIa 变体; 在残基 290 和 291  
 之间或残基 315 和 316 之间经蛋白水解断裂的 Factor VIIa (Mollerup  
 等人, *Biotechnol. Bioeng.* 48:501-505, 1995); 以及氧化形式的 Factor  
 VIIa (Korn-felt 等人, *Arch. Biochem. Biophys.* 363:43-54, 1999)。

#### 因子 VII 多肽的生物学活性:

因子 VIIa 在凝血中的生物学活性来源于其能够(i) 结合组织因子 (TF)以及(ii) 催化因子 IX 或因子 X 的蛋白水解断裂,产生活化的因子 IX 或 X (分别为因子 IXa 或 Xa)。

为了本发明,可能使用因子 VII 缺陷血浆和促凝血酶原激酶,通过测定某一制剂促进凝血的能力,来定量因子 VII 多肽的生物学活性("因子 VII 生物学活性"),如美国专利 5,997,864 或 WO 92/15686 所述。在该分析中,将生物学活性表示为相比对照样品凝结时间的减少,并通过与包含 1 个单位/ml 因子 VII 活性的混合人血清标准作比较,转换为"因子 VII 单位"。或者,可能如下定量因子 VIIa 的生物学活性:

- 在包含 TF(包埋于脂膜中)和因子 X 的体系中,测定因子 VIIa 或因子 VII 相关多肽产生活化因子 X (因子 Xa)的能力(Persson 等人, *J. Biol. Chem.* 272:19919-19924, 1997);

- 在含水体系中测定因子 X 水解作用("体外蛋白水解分析",参见下文);

- 使用基于表面胞质基因共振(Surface plasmon resonance)的仪器,测定因子 VIIa 或因子 VII 相关多肽与 TF 的物理结合(Persson, *FEBS Letts.* 413:359-363, 1997); 以及

- 测定因子 VIIa 和/或因子 VII 相关多肽对合成底物的水解作用("

体外水解分析", 参见下文); 以及

- 在 TF 非依赖性体外系统中测定凝血酶的产生。

适于测定因子 VII 多肽生物学活性的分析:

通过简单初步的体外测试进行适当的分析, 可能选择用于本发明的因子 VII 多肽。因此, 本说明书公开了因子 VII 多肽活性的简单测试(名为"体外水解分析")。

体外水解分析(分析 1)

可能分析天然(野生型)因子 VIIa 和因子 VII 多肽(此处均称为"因子 VIIa")的比活性。也可能平行分析, 以直接比较其比活性。该分析在微孔板 (MaxiSorp, Nunc, Denmark) 中进行。将生色底物 D-Ile-Pro-Arg-对硝基酰苯胺 (p-nitroanilide)(S-2288, Chromogenix, Sweden) (终浓度 1 mM) 加入处于 50 mM HEPES, pH 7.4 (其中包含 0.1 M NaCl、5 mM CaCl<sub>2</sub> 和 1 mg/ml 牛血清白蛋白) 的因子 VIIa (终浓度 100 nM) 中。在 SpectraMax™ 340 平板读取仪 (Molecular Devices, USA) 中, 连续测定 405 nm 吸光度。使用温育 20 分钟产生的吸光度, 减去不含酶的空白孔的吸光度, 计算因子 VII 多肽与野生型因子 VIIa 的活性之比:

比值 = (A405 nm 因子 VII 多肽)/(A405 nm 因子 VIIa 野生型)

基于此, 可能鉴定活性低于、相当于或高于天然因子 VIIa 的因子 VII 多肽, 例如因子 VII 多肽与天然因子 VII(野生型 FVII)的活性比值为 1.0 上下的因子 VII 多肽。

使用生理学底物, 例如适当浓度 100-1000 nM 的因子 X("体外蛋白水解分析"), 在加入合适生色底物(例如 S-2765)之后测定所产生的因子 Xa, 也可能测定因子 VII 多肽活性。此外, 可能在生理温度下进行活性分析。

体外蛋白水解分析(分析 2)

可能平行分析天然(野生型)因子 VIIa 和因子 VII 多肽(此处均称为"因子 VIIa"), 直接比较其比活性。该分析在微孔板 (MaxiSorp, Nunc, Denmark) 中进行。将处于 100 μL 50 mM HEPES, pH 7.4(包含 0.1 M

NaCl、5 mM CaCl<sub>2</sub> 和 1 mg/ml 牛血清白蛋白)中的因子 VIIa (10 nM) 和因子 X (0.8 μM) 温育 15 分钟。然后通过加入含有 0.1 M NaCl、20 mM EDTA 和 1 mg/ml 牛血清白蛋白的 50 μL 50 mM HEPES, pH 7.4, 来终止因子 X 的断裂。通过加入生色底物 Z-D-Arg-Gly-Arg-对硝基酰苯胺 (S-2765, Chromogenix, Sweden) (终浓度 0.5 mM), 测定所产生的因子 Xa 的数量。在 SpectraMax™ 340 平板读取仪(Molecular Devices, USA) 中, 连续测定 405 nm 处吸光度。使用 10 分钟产生的吸光度, 减去不含 FVIIa 的空白孔的吸光度, 计算因子 VII 多肽与野生型因子 VIIa 的蛋白水解活性之比:

$$\text{比值} = (\text{A}_{405 \text{ nm}} \text{ 因子 VII 多肽}) / (\text{A}_{405 \text{ nm}} \text{ 因子 VIIa 野生型})$$

基于此, 可能鉴定活性低于、相当于或高于天然因子 VIIa 的因子 VII 多肽, 例如因子 VII 多肽与天然因子 VII(野生型 FVII)的活性比值为 1.0 上下的因子 VII 多肽。

在包含生理浓度的所有相关凝血因子和抑制剂(模拟血友病 A 状况时缺少因子 VIII)以及激活的血小板的分析中(分析 4), 也可以测定因子 VIIa 或因子 VII 多肽产生凝血酶的能力(如 Monroe 等人(1997) *Brit. J. Haematol.* 99, 542-547 中 543 页所述, 在此引入以供参考)。

使用基本如 WO 92/15686 或 US 5,997,864 所述一段式凝结分析(分析 4), 也可能测定因子 VII 多肽的活性。简言之, 在 50 mM Tris (pH 7.5)、0.1% BSA 中稀释待测样品, 将 100 μl 样品与 100 μl 因子 VII 缺陷血浆和 200 μl 包含 10 mM Ca<sup>2+</sup> 的促凝血酶原激酶 C 温育。测定凝结时间, 与使用系列稀释的参考标准或柠檬酸抗凝的正常人血浆混合物的标准曲线作比较。

#### 因子 VII 多肽的制备与纯化:

优选通过 DNA 重组技术, 例如 Hagen 等人, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 83: 2412-2416, 1986 或欧洲专利 200.421 (ZymoGenetics, Inc.) 所述, 制备适用于本发明的纯化的人因子 VIIa。也可能利用 Broze 和 Majerus, *J.Biol.Chem.* 255 (4): 1242-1247, 1980 以及 Hedner 和 Kisiel, *J.Clin.Invest.* 71: 1836-1841, 1983 所述方法制备因子 VII。这些方法产

生不含可检测量其它凝血因子的因子 VII。包括另外的凝胶过滤作为最后纯化步骤,可能获得甚至更纯的因子 VII 制剂。然后通过已知方法,例如利用若干不同的血浆蛋白质,诸如因子 XIIa、IXa 或 Xa,将因子 VII 转变为活化因子 VIIa。或者,如 Bjoern 等人(Research Disclosure, 269 September 1986, 564-565 页)所述,将其通过离子交换层析柱例如 Mono Q® (Pharmacia fine Chemicals)等、或在溶液中自身活化,可能活化因子 VII。

因子 VII 相关多肽也可能通过修饰野生型因子 VII、或通过重组技术而制备。利用已知方法,例如位点特异性诱变,通过在编码天然因子 VII 的核酸中改变氨基酸密码子或去除某些氨基酸密码子而修饰编码野生型因子 VII 的核酸序列,可能制备与野生型因子 VII 相比具有改变的氨基酸序列的因子 VII 相关多肽。

本领域技术人员显而易见,可以在因子 VIIa 分子的功能决定性区之外造成置换,而仍产生活性多肽。可能利用本领域已知的方法,例如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(参见例如 Cunningham 和 Wells, 1989, Science 244: 1081-1085),来鉴定为因子 VII 多肽活性所必需的氨基酸残基,从而优选不进行置换。后一技术在分子中的每一正电残基处引入突变,测试所得突变分子作为促凝剂的各自交联活性,以鉴定为该分子活性所必需的氨基酸残基。通过分析由诸如核磁共振分析、晶体学或光亲和标记技术所确定的三维结构(参见例如 de Vos 等人, 1992, Science 255: 306-312; Smith 等人, 1992, Journal of Molecular Biology 224: 899-904; Wlodaver 等人, 1992, FEBS Letters 309: 59-64),也可以测定底物-酶相互作用位点。

使用本领域已知的任何方法,可能通过定点诱变在核酸序列中引入突变,使一个核苷酸交换为另一核苷酸。特别有用的方法是利用带有目的插入序列的超螺旋双链 DNA 载体以及包含所需突变的两条合成引物。寡核苷酸引物分别与载体的相反链互补,利用 Pfu DNA 聚合酶在温度循环期间延伸。掺入引物后,产生包含交错切口的突变质粒。温度循环之后,利用特异性针对甲基化和半甲基化 DNA 的 DpnI 处理

产物，消化亲本 DNA 模板，选择包含突变的合成 DNA。也可能使用本领域已知的形成、鉴定和分离变体的其它方法，例如基因改组或噬菌体展示技术。

可能利用本领域已知的任何方法从其起源细胞中分离多肽，包括而非限制，从粘附细胞培养物中移出包含目的产物的细胞培养基；离心或过滤去除未粘附细胞等。

任选可能进一步纯化因子 VII 多肽。可能使用本领域已知的任何方法进行纯化，包括而非限制，亲和层析例如因子抗因子 VII 抗体柱(参见例如 Wakabayashi 等人, *J. Biol. Chem.* 261:11097, 1986; 以及 Thim 等人, *Biochem.* 27:7785, 1988); 疏水相互作用层析; 离子交换层析; 大小排阻层析; 电泳方法(例如制备型等电聚焦(IEF))、不同溶解度(例如硫酸铵沉淀)或提取等。通常参见 Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, New York, 1982 以及 *Protein Purification*, J.C. Janson 和 Lars Ryden 编者, VCH Publishers, New York, 1989。纯化以后，制备物优选包含按重量计少于约 10%、更优选少于约 5%、最优选少于约 1% 的来源于宿主细胞的非因子 VII 多肽。

可能使用因子 XIIa 或具有胰蛋白酶样特异性的其它蛋白酶，例如因子 IXa、激肽释放酶、因子 Xa 和凝血酶，通过蛋白水解断裂而活化因子 VII 多肽。参见例如 Osterud 等人, *Biochem.* 11:2853 (1972); Thomas, 美国专利 4,456,591; 以及 Hedner 等人, *J. Clin. Invest.* 71:1836 (1983)。或者，将其通过离子交换层析柱例如 Mono Q® (Pharmacia)等、或在溶液中自身活化，可能活化因子 VII 多肽。所得活化因子 VII 多肽然后可能如本申请所述配制和给药。

#### 附图描述

图 1 显示在 2-8°C 保存 3 个月以后，FVII 凝聚物和 FVII 片段的含量。

以下实施例说明本发明的实施。这些实施例仅为说明目的，并非意在以任何方式限制本发明所要求的范围。

#### 实验性实施例

### 实施例 1

#### 分析方法

利用非变性大小排阻 HPLC 测定凝聚物含量。由 RP-HPLC 测定氧化形式的含量。由 RP-HPLC 测定酶促降解形式的含量。

在 Waters Protein Pak 300 SW 柱 7,5x300 mm 上, 使用 0.2 M 硫酸铵、5% 2-丙醇 pH 7.0 为流动相, 进行非变性大小排阻层析。流速: 0.5 ml/分钟。检测: 215 nm。上样: 25 $\mu$ g FVIIa。

在粒子大小 5 $\mu$ m、孔径 300 $\text{\AA}$  的专利 4,5x250 mm 丁基键合硅柱上进行反相 HPLC。柱温: 70 $^{\circ}$ C。A-缓冲液: 0.1% v/v 三氟乙酸。B-缓冲液: 0.09% v/v 三氟乙酸、80% v/v 乙腈。利用 30 分钟内从 X 至 (X+13)% B 的线性梯度洗脱柱子。调整 X, 以便 FVIIa 在保留时间约 26 分钟洗脱。流速: 1.0 ml/分钟。检测: 214 nm。上样: 25  $\mu$ g FVIIa。

### 实施例 2

#### 组合物制备

一般而言, 通过凝胶过滤柱交换缓冲液, 从纯化的原液中制备供这些实验性实施例分析的含水 FVIIa 组合物样品。组合物添加剂按最终比例包含于洗脱缓冲液中、或加入洗脱物中。所得溶液使用无菌膜滤器(0.2  $\mu$ m 孔径或相当)无菌过滤, 装入无菌玻璃瓶, 利用丁基橡胶塞和 flip-off 型铝帽盖紧并密封。

### 实施例 3

#### pH 对化学/物理稳定性的作用

rFVIIa 含水组合物的小瓶包含 1.4 mg rFVIIa/mL、50 mM 氯化钠、10 mM 氯化钙以及调到 pH 3、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 和 9.0 的 10 mM 甘氨酸甘氨酸、乙酸和组氨酸混合物, 于温度 2-8  $^{\circ}$ C、或升高的保存温度 30  $^{\circ}$ C 下温育, 然后在不同时间点取出, 利用 RP-HPLC 和 GP-HPLC 分析 pH 和化学稳定性的变化。

2-8  $^{\circ}$ C 保存长达 3 个月之后, 该含水组合物显示 pH 变化不显著。对 2-8  $^{\circ}$ C 保存长达 3 个月的样品进行非变性大小排阻 HPLC, 显示该

药物产品在  $\text{pH} \geq 5.5$  未显著凝聚(图 1)。对这些样品进行 RP-HPLC, 显示在  $\text{pH} 4.5-5.5$  范围内该蛋白质的片段化或氧化未显著增加。

图 1 显示  $2-8\text{ }^\circ\text{C}$  保存 3 个月后的数据。开始的凝聚物含量约 0.5%, 开始的片段含量约 9%。

#### 实施例 4

##### 不同缓冲液的缓冲容量

rFVIIa 含水组合物的小瓶包含 1.4 mg rFVIIa/mL、50 mM 氯化钠、10 mM 氯化钙以及浓度为 10 mM 的一种下列缓冲物质: 甘氨酸、甘氨酸、苹果酸、组氨酸、谷氨酸和柠檬酸, 于温度  $2-8\text{ }^\circ\text{C}$ 、或升高的保存温度  $30\text{ }^\circ\text{C}$  下温育长达 3 个月。调整零时的 pH 为 5.5, 因该 pH 产生的降解产物量最低(图 1)。测定包含甘氨酸甘氨酸的组合物的 pH, 显示在保存期间升高到 6.2。其它组合物在同一时期显示  $5.5 \pm 0.1$  的稳定值。

#### 实施例 5

##### 包含不同去污剂的含水组合物物理稳定性

制备了 12 种不同的组合物。该组合物为:

rFVIIa	0.75 mg/ml
NaCl	2.92 mg/ml
CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	1.47 mg/ml
甘氨酸甘氨酸	1.32 mg/ml
去污剂/溶解剂	x mg/ml
pH	5.5

所测试的去污剂/溶解剂(solubiliser)的浓度如下表所述。

从 rFVIIa 的液体原液中制备该组合物。在包含上述浓度的 NaCl、CaCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O 和甘氨酸甘氨酸的缓冲液中制备去污剂/溶解剂的储液。将 rFVIIa 原液和去污剂溶液混合, 调整溶液 pH 到 5.5。将组合物过滤( $0.2\text{ }\mu\text{m}$ ), 并装入小瓶(1 ml 溶液/瓶)。

通过视觉检查测定组合物外观, 并测定组合物 400 nm 处吸光度。然后小瓶在室温下振摇 19 小时(800/分钟)。振摇完成后, 测定外观及

400 nm 处吸光度。结果如下表所列。

去污剂类型	浓度 (mg/ml)	外观		吸光度(400nm)		
		之前	之后	之前	之后	升高
无(参照)	-	少数颗粒	极浑浊	0.0085	1.4386	1.4301
Tween® 80	0.1	极少颗粒	澄清、少数颗粒	0.0044	0.0036	- 0.0008
Tween® 20	0.1	极少颗粒	澄清、少数颗粒	0.0039	0.0101	0.0062
泊洛沙姆 188	1.0	极少颗粒	澄清、少数颗粒	0.0063	0.0027	- 0.0036
Pluronic® F127	1.0	极少颗粒	澄清、少数颗粒	0.0000	0.0048	0.0048
聚乙二醇 400	0.1	极少颗粒	浑浊	0.0076	1.5708	1.5632
聚乙二醇 4000	0.5	少数颗粒	极浑浊	0.0108	1.6624	1.6516
Brij® 35	0.1	极少颗粒	澄清、少数颗粒	0.0028	0.0015	- 0.0013
Myrj® 59	0.1	极少颗粒	澄清、少数颗粒	0.0002	0.1110	0.1108
Myrj® 52	0.1	极少颗粒	澄清、少数颗粒	0.0009	0.9390	0.9381
LPCM	0.1	极少颗粒	澄清、少数颗粒	0.0026	0.0012	- 0.0014
甘油	1.0	极少颗粒	浑浊	0.0040	1.4064	1.4024

"Part." = "颗粒"

该结果表明，参照(未加任何去污剂/溶解剂)在振摇时变得视觉可见的浑浊，观察到 400 nm 处吸光度显著升高。加入 Tween® 20 (= 聚山梨酯 20)、Tween® 80 (= 聚山梨酯 80)、泊洛沙姆 188、Pluronic® F127 (= 泊洛沙姆 407)、Brij® 35 (= 聚乙二醇 23 十二烷基醚)和 LPCM (=  $\alpha$ -十四烷酰溶血卵磷脂)几乎完全防止浊度和吸光度升高，观察到 Myrj® 59 (= 硬脂酸 100 聚羟基酯)和 Myrj® 52 (= 硬脂酸 40 聚羟基酯)的浊度略微升高(相比参照)。甘油、聚乙二醇 400 或聚乙二醇 4000 在本实验所用浓度下不能防止浊度升高。

**实施例 6****包含抗氧化剂甲硫氨酸的含水组合物的化学稳定性**

制备了 3 种不同的组合物。该组合物为：

rFVIIa	0.75 mg/ml
NaCl	2.92 mg/ml
CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	1.47 mg/ml
甘氨酸甘氨酸	1.32 mg/ml
甲硫氨酸	0 或 0.25 或 1.0 mg/ml
pH	6.5

从 rFVIIa 的液体原液中制备该组合物。将甲硫氨酸溶解于包含上述浓度 NaCl、CaCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O 和甘氨酸甘氨酸的缓冲液中。将 rFVIIa 原液和甲硫氨酸溶液混合, 调整溶液 pH 到 6.5。将组合物过滤(0.2 μm), 并装入小瓶(1 ml 溶液/瓶)。将小瓶保存于 5°C、25°C 和 40°C。取出样品, 在下表所述时间点分析其氧化形式的含量(利用 RP-HPLC)。下表显示氧化形式的含量(%)。

甲硫氨酸 (mg/ml)	零时	25°C 14 天	40°C 14 天	25°C 28 天	40°C 28 天	5°C 90 天
0 (参照)	2.4	4.4	7.5	4.4	12.8	3.1
0.25	1.7	2.4	5.3	2.8	9.9	1.9
1.0	1.6	2.3	5.0	2.6	9.6	1.3

该结果表明, 加入甲硫氨酸减慢了组合物的氧化速率。

**实施例 7****包含氯化钙的含水组合物的化学稳定性**

制备了 4 种不同的组合物。该组合物为：

rFVIIa	1.0 mg/ml
NaCl	2.92 mg/ml
CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	分别为 1.47 mg/ml (10mM)、29.4 mg/mL (200mM)、 58.8 mg/mL (400mM) 以及 117.6 mg/mL (800mM)
甘氨酸甘氨酸	1.32 mg/ml

**pH 7.0**

从 rFVIIa 的液体原液中制备该组合物。将氯化钙溶解于包含 NaCl 和甘氨酸甘氨酸的缓冲液中，在与 rFVIIa 原液混合后产生上述浓度。混合后调整溶液的 pH 到 7.0。将组合物过滤(0.2  $\mu\text{m}$ )，并装入小瓶(1 ml 溶液/瓶)。小瓶于 5°C 保存。

利用凝结分析测定因子 VII 活性(IU/ml)。

氯化钙的组合物浓度	0 mdr IU/ml	3 mdr IU/ml
		5°C
1 (10 mM)	54444	33623
2 (200 mM)	59917	46528
3 (400 mM)	54680	59370
4 (800 mM)	51773	52801

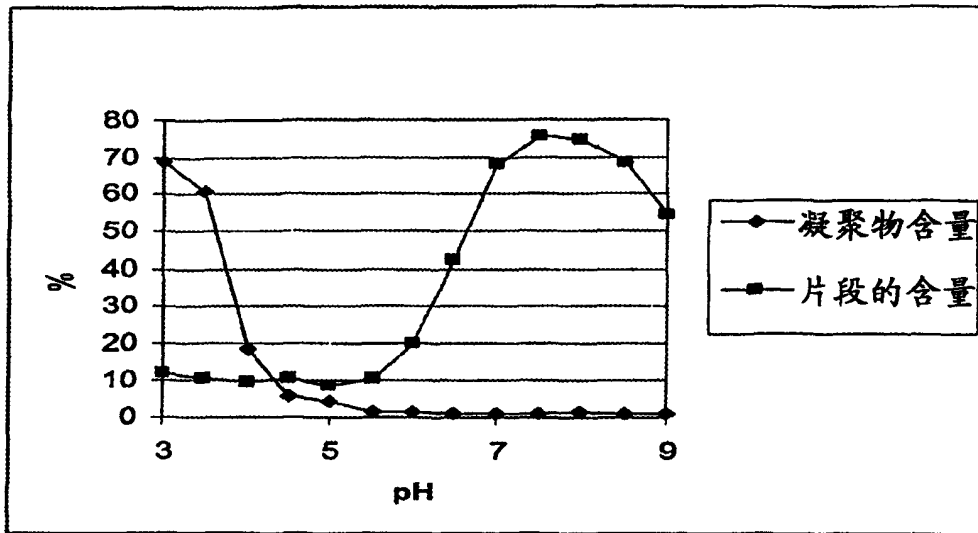


图1