

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480011374.8

[51] Int. Cl.

A61K 38/36 (2006.01)

A61J 1/06 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

[43] 公开日 2006年5月31日

[11] 公开号 CN 1780637A

[22] 申请日 2004.3.18

[21] 申请号 200480011374.8

[30] 优先权

[32] 2003.3.18 [33] DK [31] PA200300413

[32] 2003.5.23 [33] DK [31] PA200300788

[32] 2003.6.25 [33] DK [31] PA200300959

[32] 2003.7.1 [33] DK [31] PA200300995

[32] 2003.8.14 [33] DK [31] PA200301161

[86] 国际申请 PCT/DK2004/000181 2004.3.18

[87] 国际公布 WO2004/082708 英 2004.9.30

[85] 进入国家阶段日期 2005.10.27

[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 M·B·詹森 B·L·汉森

T·科恩费尔特 K·K·雅克布森

J·科拉鲁普 E·佩尔松

A·K·佩特森 A·N·鲍勒

[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 刘晓东

权利要求书 10 页 说明书 39 页

[54] 发明名称

因子VII多肽类的含水液体药物组合物

[57] 摘要

本发明涉及包括因子VII多肽(例如人因子 VIIa)和缓冲剂的含水液体药物组合物;其中未配位的钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )与因子 VII 多肽的摩尔浓度比小于 0.5。该组合物可以进一步包括稳定剂(例如铜或镁离子、苄脒或胍)、非离子型表面活性剂、张力调节剂、抗氧化剂和防腐剂。该组合物可用于治疗因子 VII-反应性综合征,诸如出血障碍,包括:那些因凝血因子缺乏导致的障碍(例如 A 型血友病、B 型血友病、凝固因子 XI 缺乏、凝固因子 VII 缺乏)、血小板减少或维勒布兰德病或凝血因子抑制剂导致的出血障碍;和脑内出血或因任何原因导致的过量出血。这些制剂还可以与手术或其它创伤疗法结合对患者给药或对接受抗凝疗法的患者给药。

1. 含水液体药物组合物, 其中包含:  
因子 VII 多肽 (i); 和  
适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围内的缓冲剂 (ii);  
其中未配位的钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。
2. 权利要求 1 所述的组合物, 其中未配位的钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 与因子 VII 多肽的摩尔比在 0.001-0.499 的范围。
3. 上述权利要求中任意一项所述的组合物, 其中进一步包含稳定剂 (iii)。
4. 权利要求 3 所述的组合物, 其中稳定剂 (iii) 包括至少一种含有金属的试剂 (iiia), 其中所述的金属选自氧化态+II 的第一族过渡金属组成的组。
5. 权利要求 4 所述的组合物, 其中含有金属的试剂中的金属选自铬、锰、铁、钴、镍、铜和锌组成的组。
6. 权利要求 4-5 中任意一项所述的组合物, 其中含有金属的试剂 (iiia) 为选自氯化铬 (II)、氯化锰 (II)、氯化铁 (II)、氯化钴 (II)、氯化镍 (II) 和氯化铜 (II) 中的至少一种。
7. 权利要求 4-6 中任意一项所述的组合物, 其中含有金属的试剂 (iiia) 中的金属选自铜和锰组成的组。
8. 权利要求 7 所述的组合物, 其中含有金属的试剂 (iiia) 选自氯化铜 (II) 和氯化锰 (II) 组成的组。

9. 权利要求 4-8 中任意一项所述的组合物, 其中含有金属的试剂 (iiia) 的浓度至少为 1  $\mu\text{M}$ 。

10. 权利要求 4-9 中任意一项所述的组合物, 其中含有金属的试剂 (iiia) 中的金属为铜, 并且所述试剂的浓度至少为 5  $\mu\text{M}$ 。

11. 权利要求 4-9 中任意一项所述的组合物, 其中含有金属的试剂 (iiia) 中的金属为锰, 并且所述试剂的浓度至少为 100  $\mu\text{M}$ 。

12. 权利要求 3-11 中任意一项所述的组合物, 其中稳定剂包括至少一种含有  $-\text{C}(=\text{N}-\text{Z}^1-\text{R}^1)-\text{NH}-\text{Z}^2-\text{R}^2$  基元的试剂 (iiib), 其中:

$\text{Z}^1$  和  $\text{Z}^2$  独立地选自  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NR}^{\text{H}}-$  和单键组成的组, 其中  $\text{R}^{\text{H}}$  选自氢、 $\text{C}_{1-4}$ -烷基、芳基和芳基甲基组成的组, 并且  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  独立地选自氢、可选取代的  $\text{C}_{1-6}$ -烷基、可选取代的  $\text{C}_{2-6}$ -烯基、可选取代的芳基、可选取代的杂环基组成的组; 或

$\text{Z}^2$  和  $\text{R}^2$  如上所述, 并且  $-\text{C}=\text{N}-\text{Z}^1-\text{R}^1$  形成杂环的组成部分; 或

$\text{Z}^1$  和  $\text{R}^1$  如上所述, 并且  $-\text{C}-\text{NH}-\text{Z}^2-\text{R}^2$  形成杂环的组成部分; 或

$-\text{C}(=\text{N}-\text{Z}^1-\text{R}^1)-\text{NH}-\text{Z}^2-\text{R}^2$  形成杂环, 其中  $-\text{Z}^1-\text{R}^1-\text{R}^2-\text{Z}^2-$  为二价基。

13. 权利要求 12 所述的组合物, 其中  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  中至少一个为氢。

14. 权利要求 12-13 中任意一项所述的组合物, 其中  $\text{Z}^1$  和  $\text{Z}^2$  中至少一个为单键。

15. 权利要求 12 所述的组合物, 其中  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  均为氢且  $\text{Z}^1$  和  $\text{Z}^2$  均为单键。

16. 权利要求 12-15 中任意一项所述的组合物, 其中稳定剂

(iiib) 为选自下列化合物组成的组中的至少一种：含有  $-C-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$  基元的脘化合物和含有  $>N-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$  基元的胍类化合物。

17. 权利要求 16 所述的组合物，其中稳定剂 (iiib) 为选自由含有基元  $-C_6H_4-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$  的苜脘类组成之组中的至少一种脘化合物，其中  $C_6H_4$  表示可选取代的苯环。

18. 权利要求 17 所述的组合物，其中苜脘类含有基元  $>N-C_6H_4-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$ ，其中  $C_6H_4$  表示可选取代的苯环。

19. 权利要求 16 所述的组合物，其中稳定剂 (iiib) 为选自由含有  $-CH_2-NH-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$  基元的胍类化合物组成之组中的至少一种胍化合物。

20. 权利要求 19 所述的组合物，其中胍化合物选自由精氨酸、精氨酸衍生物和含有至少一个精氨酸残基的 2-5 个氨基酸残基的肽类组成的组。

21. 权利要求 12-20 中任意一项所述的组合物，其中稳定剂具有通式  $Y-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$ ，其中 Y 为有机基团。

22. 权利要求 12-21 中任意一项所述的组合物，其中稳定剂的分子量最高为 1000 Da。

23. 权利要求 12-22 中任意一项所述的组合物，其中稳定剂 (iiib) 的浓度至少为 1  $\mu$ M。

24. 权利要求 23 所述的组合物，其中稳定剂 (iiib) 为苜脘，并且

所述试剂的浓度至少为 0.5 mM。

25. 权利要求 23 所述的组合物，其中稳定剂 (iiib) 为精氨酸，并且所述试剂的浓度至少为 2 mM。

26. 上述权利要求中任意一项所述的组合物，其中进一步包含非离子型表面活性剂 (iv)。

27. 权利要求 26 所述的组合物，其中非离子型表面活性剂 (iv) 为选自聚山梨酸酯类、伯洛沙姆类、聚氧乙烯烷基醚类、聚乙烯/聚丙烯嵌段共聚物、聚乙二醇 (PEG)、聚氧乙烯硬脂酸酯和聚氧乙烯蓖麻油组成之组中的至少一种。

28. 权利要求 26-27 中任意一项所述的组合物，其中非离子型表面活性剂的存在量按重量计为 0.005-2.0%。

29. 上述权利要求中任意一项所述的组合物，其中进一步包含张力调节剂 (v)。

30. 权利要求 29 所述的组合物，其中张力调节剂 (v) 为选自由中性盐、氨基酸、2-5 个氨基酸残基的肽类、单糖类、二糖类、多糖类和糖醇类组成之组中的至少一种。

31. 权利要求 30 所述的组合物，其中至少一种张力调节剂 (v) 为选自由钠盐、钾盐和镁盐组成之组中的中性盐。

32. 权利要求 30-31 中任意一项所述的组合物，其中张力调节剂 (v) 为氯化钠与选自氯化镁和乙酸镁中的至少一种的组合。

33. 权利要求 29-32 中任意一项所述的组合物，其中张力调节剂 (v) 的存在浓度至少为 1 mM。

34. 权利要求 29-33 中任意一项所述的组合物，其中至少一种张力调节剂 (v) 为离子强度调节剂 (v/a)。

35. 上述权利要求中任意一项所述的组合物，其具有的离子强度至少为 50。

36. 权利要求 35 所述的组合物，其具有的离子强度至少为 200。

37. 权利要求 36 所述的组合物，其具有的离子强度至少为 400。

38. 上述权利要求中任意一项所述的组合物，其具有的重量克分子渗透浓度为  $300 \pm 50$  毫渗透分子/kg。

39. 上述权利要求中任意一项所述的组合物，其中缓冲剂 (ii) 包含至少一种选自下述的成分：MES、PIPES、ACES、BES、TES、HEPES、TRIS、组氨酸、咪唑、甘氨酸、甘氨酸甘氨酸、甘氨酸胺、磷酸、乙酸、乳酸、戊二酸、柠檬酸、酒石酸、苹果酸、马来酸和琥珀酸的酸和盐。

40. 权利要求 39 所述的组合物，其中缓冲剂 (ii) 的浓度为 1-100 mM。

41. 上述权利要求中任意一项所述的组合物，其具有的 pH 在约 5.0 - 约 8.0 的范围内。

42. 上述权利要求中任意一项所述的组合物，其中进一步包含抗

氧化剂(vi)。

43. 权利要求 42 所述的组合物, 其中抗氧化剂(vi)选自下组中: L-甲硫氨酸、D-甲硫氨酸、甲硫氨酸类似物、含甲硫氨酸的肽类、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。

44. 权利要求 42-43 中任意一项所述的组合物, 其中抗氧化剂(vi)的存在浓度为 0.1-5.0 mg/mL。

45. 上述权利要求中任意一项所述的组合物, 其中进一步包含防腐剂(vii)。

46. 权利要求 45 所述的组合物, 其中防腐剂(vii)选自下组中: 苯酚、苜醇、邻-甲酚、间-甲酚、对-甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯扎氯铵和苜索氯铵。

47. 上述权利要求中任意一项所述的组合物, 其中因子 VII 多肽为人因子 VIIa。

48. 上述权利要求中任意一项所述的组合物, 其中因子 VII 多肽为因子 VII 序列变体。

49. 权利要求 48 所述的组合物, 其中当在如本文所述的"体外蛋白水解试验"中测试时, 因子 VII 多肽的活性与天然人因子 VIIa(野生型 FVIIa)的活性之比至少为 1.25。

50. 上述权利要求中任意一项所述的组合物, 其中因子 VII 多肽的存在浓度为 0.1-10 mg/mL。

51. 权利要求 1-50 中任意一项所述的含水液体药物组合物, 其中包含:

0.1-10 mg/mL 的因子 VII 多肽 (i);  
适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围内的缓冲剂 (ii); 和  
浓度至少为 5 mM 的张力调节剂 (v),  
其中未配位的钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。

52. 权利要求 1-50 中任意一项所述的含水液体药物组合物, 其中包含:

0.1-10 mg/mL 的因子 VII 多肽 (i);  
适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围内的缓冲剂 (ii);  
非离子型表面活性剂 (iv); 和  
浓度至少为 5 mM 的张力调节剂 (v),  
其中未配位的钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。

53. 权利要求 1-50 中任意一项所述的含水液体药物组合物, 其中包含:

0.1-10 mg/mL 的因子 VII 多肽 (i);  
适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围内的缓冲剂 (ii);  
浓度至少为 5  $\mu\text{M}$  的含铜试剂 (iiia) 和/或浓度至少为 100  $\mu\text{M}$  的含锰试剂 (iiia);  
非离子型表面活性剂 (iv); 和  
浓度至少为 5 mM 的张力调节剂 (v),  
其中未配位的钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。

54. 权利要求 1-50 中任意一项所述的含水液体药物组合物, 其中包含:

0.1-10 mg/mL 的因子 VII 多肽 (i);



适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围内的缓冲剂 (ii);  
含有基元  $-C_6H_4-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$  的浓度至少为 5  $\mu$ M 的至少一种稳定剂 (iiib) 和/或含有基元  $-CH_2-NH-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$  的浓度至少为 500  $\mu$ M 的至少一种稳定剂 (iiib);  
非离子型表面活性剂 (iv); 和  
浓度至少为 5 mM 的张力调节剂 (v),  
其中未配位的钙离子 ( $Ca^{2+}$ ) 与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。

55. 上述权利要求中任意一项所述的组合物, 其适合于非肠道给药。

56. 权利要求 55 所述的组合物, 其适合于皮下、肌内或静脉内注射。

57. 制备因子 VII 多肽的含水液体药物组合物的方法, 其中包括下列步骤: 提供在溶液中的因子 VII 多肽 (i), 该溶液包含适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围内的缓冲剂 (ii); 同时确保在最终组合物中, 未配位的钙离子 ( $Ca^{2+}$ ) 与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。

58. 权利要求 57 所述的方法, 其中该方法包括下列步骤: 提供在溶液中的因子 VII 多肽 (i), 该溶液包含: 适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围内的缓冲剂 (ii); 至少一种含金属的试剂 (iii), 其中所述的金属选自由氧化态 +II 的第一族过渡金属组成的组; 和非离子型表面活性剂 (iv); 同时确保在最终组合物中, 未配位的钙离子 ( $Ca^{2+}$ ) 与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。

59. 权利要求 57 所述的方法, 其中该方法包括下列步骤: 提供在溶液中的浓度至少为 0.01 mg/mL 的因子 VII 多肽 (i), 该溶液包含:  
适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围内的缓冲剂 (ii);

和至少一种含有 $-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$ 基元的稳定剂(iii b), 其中

$Z^1$ 和 $Z^2$ 独立地选自 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR^H-$ 和单键组成的组, 其中 $R^H$ 选自由氢、 $C_{1-4}$ -烷基、芳基和芳基甲基组成的组, 并且 $R^1$ 和 $R^2$ 独立地选自由氢、可选取代的 $C_{1-6}$ -烷基、可选取代的 $C_{2-6}$ -链烯基、可选取代的芳基、可选取代的杂环基组成的组; 或

$Z^2$ 和 $R^2$ 如上所述, 并且 $-C=N-Z^1-R^1$ 形成杂环的组成部分; 或

$Z^1$ 和 $R^1$ 如上所述, 并且 $-C-NH-Z^2-R^2$ 形成杂环的组成部分; 或

$-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$ 形成杂环, 其中 $-Z^1-R^1-R^2-Z^2-$ 为二价基;

同时确保在最终组合物中, 未配位的钙离子( $Ca^{2+}$ )与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。

60. 如权利要求 1-56 中任意一项所定义的含水液体药物组合物, 其用作药物。

61. 如权利要求 1-56 中任意一项所定义的含水液体药物组合物在制备用于治疗因子 VII-反应性综合征的药物中的应用。

62. 治疗因子 VII-反应性综合征的方法, 该方法包括对有此需要的受试者给予有效量的如权利要求 1-56 中任意项所定义的含水液体药物组合物。

63. 含有如权利要求 1-56 中任意项所定义的含水液体药物组合物和可选地惰性气体的密闭的至少部分充满的容器, 所述的容器包括 (i) 壁部分和 (ii) 不构成所述壁部分的组成部分的一种或多种封闭部件。

64. 权利要求 63 所述的容器, 其中所述的组合物不包含防腐剂(vii)。

65. 权利要求 63-64 中任意一项所述的容器，其中该容器内壁材料为选自由二氧化硅涂敷的玻璃、硅氧烷涂敷的玻璃、非环烯类聚合物、环烯聚合物和环烯炔/直链烯炔共聚物组成之组中的材料。

66. 权利要求 63-65 中任意一项所述的容器，其中所述的容器为小瓶或药筒，其中包含含有针头可透入的自我封闭式弹性隔片的封闭部件。

67. 权利要求 66 所述的容器，其中所述的容器为包括可移动活塞部件的药筒，由此可以从所述容器中排出所述容器内存在的液体。

## 因子 VII 多肽类的含水液体药物组合物

### 发明领域

本发明涉及含有因子 VII 多肽类的含水液体药物组合物和这类组合物的制备和使用方法，以及含有这类组合物的容器和这类组合物在治疗因子 VII-反应性综合征中的应用。更具体地说，本发明涉及针对化学和/或物理降解进行了稳定化的液体组合物。

### 发明背景

已经鉴定了涉及凝血过程的各种因子，包括因子 VII (FVII)，一种血浆糖蛋白。通过在损伤血管壁后暴露于血液循环的组织因子 (TF) 与以相当于总 FVII 蛋白质质量约 1% 的量存在于循环中的 FVIIa 之间形成复合物而启动凝血。FVII 主要作为单链酶原存在于血浆中，它可以被 Fxa 裂解成双链活化形式 FVIIa。已经将重组活化的因子 VIIa (rFVIIa) 开发为前-止血剂。给予 rFVIIa 在存在出血的血友病受试者中提供了快速和高度有效的前-止血反应，该血友病受试者因抗体形成而不能用其它凝固因子产品治疗。还可以用 FVIIa 成功地治疗因子 VII 缺乏的受试者或存在正常凝固系统、但发生过量出血的受试者中的出血。

需要拥有适合于储存和递送的因子 VIIa 的给药剂型。理想的情况是，将药物产品作为液体储存和给药。或者，将药物产品冻干，即冷冻干燥，然后在患者使用前通过添加合适的稀释剂再溶解。理想的情况是，药物产品在长期储存过程中保持足够的稳定性，即 6 个月以上。

维持药物成品作为液体或将其冻干的决定通常基于的是蛋白质药物在那些剂型中的稳定性。蛋白质的稳定性特别可以受到诸如离子强度、pH、温度、重复冷冻/融化和接触剪切力这类因素的影响。举几个例子来说，由于包括变性和聚集(可溶性和不溶性聚集物形成)在内的

物理不稳定性和包括例如水解、脱酰氨化、异构化和氧化在内的化学不稳定性，可以导致活性蛋白质损耗。蛋白质药物稳定性的一般综述参见例如 Manning 等，《药物研究》(Pharmaceutical Research) 6: 903-918 (1989)。

尽管已经广泛认识到蛋白质可能存在不稳定性，但是不能预计特定蛋白质的特定不稳定性问题。任意这些不稳定性可以导致形成具有降低的活性、增加的毒性和/或增加的免疫原性的蛋白质副产物或衍生物。实际上，蛋白质沉淀可以导致血栓形成、剂型和量的不均匀性以及注射器阻塞。此外，翻译后修饰，诸如 N-末端上某些谷氨酸残基的  $\gamma$  羧化和碳水化合物侧链的添加提供了在储存时易于修饰的可能位点。此外，因子 VIIa 作为一种丝氨酸蛋白酶，可能会由于自我催化而发生片段化(酶促降解)。因此，蛋白质的任意组合物的安全性和功效与其稳定性直接相关。维持液体形式的稳定性一般不同于维持冻干形式的稳定性，这是因分子运动的可能性高度增加、由此分子相互作用的可能性增加所致。维持浓缩形式的稳定性也不同于上述情况，因为在蛋白质浓度增加时有聚集物形成倾向。

当研发液体组合物时，要考虑许多因素。短期(即 6 个月以下)的液体稳定性一般取决于避免宏观的结构改变，诸如变性和聚集。这些过程被描述在许多蛋白质文献中，并且有许多稳定剂的实例。众所周知，有效地使一种蛋白质稳定的试剂可能会使另一种蛋白质不稳定。一旦该蛋白质针对宏观结构改变实现了稳定化，那么研发长期稳定性(例如 6 个月以上)的液体组合物就取决于进一步使蛋白质稳定化而免于对该蛋白质具有特异性的降解类型。更具体类型的降解可以包括：例如二硫键无规则性、某些残基氧化、脱氨基化、环化。尽管始终不能准确地确定各降解种类，但已研发出了试验方法，用于监测微小的改变，以便监测具体赋形剂独特地使目的蛋白质稳定化的能力。

理想的是组合物的 pH 在注射/输注时在生理上合适的范围内，否则就可能使患者产生疼痛和不适。

有关蛋白质组合物的一般性综述参见例如：Cleland 等：“稳定蛋

白质组合物的研发：蛋白质聚集、脱氨基和氧化上的密切关注”( The development of stable protein compositions: A closer look at protein aggregation, deamidation 和 oxidation) - 《治疗药物载体系统的关键综述》(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems) 1993, 10(4): 307-377; 和 Wang 等“蛋白质和肽类的非肠道组合物：稳定性和稳定剂”( Parenteral compositions of proteins and peptides: Stability and stabilizers) - 《非肠道科学和技术杂志》(Journal of Parenteral Science and Technology) 1988 (增刊), 42 (2S)。

因子 VIIa 通过几种途径降解，尤其是聚集(二聚化)、氧化和自溶裂解(肽主链剪切)。此外，可能发生沉淀。可以通过从蛋白质中除去水而显著减缓许多这些反应。然而，研发因子 VIIa 的含水组合物具有消除再溶解误差的优点，由此可增加给药精确性，简化产品的临床应用，从而增加患者的顺应性。理想的情况是，因子 VIIa 的组合物应在广泛的蛋白质浓度范围内稳定 6 个月以上。这样就可能使给药方法比较灵活。一般来说，更高浓度的剂型允许给予较低的体积，这从患者观点来看是非常理想的。液体组合物在给药和使用的便利性方面可以具有许多超过冻干产品的优点。

目前，仅有的可商购型重组制备型 FVII 多肽组合物为冷冻干燥的因子 FVIIa 产品，它在使用前再溶解；它含有相对低浓度的因子 VIIa，例如约 0.6 mg/mL。一个 NovoSeven® 小瓶(1.2 mg) (Novo Nordisk A/S, Denmark) 含有 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 聚山梨酸酯 80 和 60.0 mg 甘露糖醇；用 2.0 mL 注射用水(WFI) 将其再溶解至 pH5.5。当再溶解时，该蛋白质溶液可稳定使用 24 小时。因此，目前尚无商购的随时可用的液体或浓缩因子 VII 产品。

WO 03/055512 中公开了含水液体药物组合物，其中包括因子 VII 多肽、缓冲剂和选自钙盐、镁盐及其混合物(特别是钙盐)的试剂，其浓度至少为 15 mM。钙/镁盐为含水液体组合物提供了稳定性。

鉴于上述原因，本发明的目的在于进一步提供含水液体因子 VII 多肽药物组合物，它提供了可接受的对化学和/或物理降解产物，诸如酶促降解或自我催化产物的控制。

## 发明概述

本发明者已经发现，尽管许多现有技术参考文献中建议在纯化步骤和用于储存因子 VII 多肽的含水液体中应用相对高浓度的钙离子，但是也有可能通过确保钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )与因子 VII 多肽的相对比例极低而获得因子 VII 多肽类的含水液体药物组合物的极佳储存稳定性。

因此，本发明的一个方面涉及含水液体药物组合物，其中包括因子 VII 多肽 (i) 和适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围的缓冲剂 (ii)；其中未配位的钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。

本发明的第二个方面涉及制备因子 VII 多肽的含水液体药物组合物的方法，包括下列步骤：提供在溶液中的因子 VII 多肽 (i)，该溶液中包含适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围内的缓冲剂 (ii)；同时确保在最终组合物中，未配位的钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。

本发明的第三个方面涉及如上所述的含水液体药物组合物用作药物。

本发明的第四个方面涉及如上所述的含水液体药物组合物在制备用于治疗因子 VII-反应性综合征的药物中的应用。

本发明的第五个方面涉及治疗因子 VII-反应性综合征的方法，该方法包括对此需要的受试者给予有效量的如上所述的含水液体药物组合物。

本发明的第六个方面涉及含有如上所述的含水液体药物组合物、并可选地含有惰性气体的密闭的至少部分充满的容器，所述的容器包括 (i) 壁部分和 (ii) 不构成所述壁部分的组成部分的一种或多种封闭部件。

## 发明详述

如上所述，本发明涉及研发新的包含因子 VII 多肽的稳定化含水液体药物组合物。更具体地说，该含水液体药物组合物包含因子 VII 多肽 (i) 和适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围的缓冲剂 (ii)；其中未配位的钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。

本文所用的术语“未配位的钙离子的浓度”用以指钙离子总浓度与和钙螯合剂结合的钙浓度之差。在这方面，尽管预计钙在某些条件下将结合因子 VII 多肽或与之相关联，但不将因子 VII 多肽看作“钙螯合剂”。

优选未配位的钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5，例如在 0.001-0.499 的范围内，诸如 0.005-0.050；或在 0.000-0.499 的范围内，诸如在 0.000-0.050 的范围内，或约 0.000。为了获得钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 与因子 VII 多肽之间的低相对比值，有必要或需要加入钙螯合剂以便结合（螯合）过量的钙离子。这对来自上述配制步骤的加工步骤的溶液中钙离子与因子 VII 多肽之比超出上述范围的情况特别合适。“钙螯合剂”的实例包括 EDTA、柠檬酸、NTA、DTPA、酒石酸、乳酸、苹果酸、琥珀酸、HIMDA、ADA 和类似化合物。

### 因子 VII 多肽 (i)

所述药物组合物的生物作用主要归因于存在因子 VII 多肽，不过可以与因子 VII 多肽一起包含其它活性组分。

本文所用的术语“因子 VII 多肽”包括野生型因子 VII (即具有美国专利 US4,784,950 中公开的氨基酸序列的多肽) 以及表现出与野生型因子 VII 基本上相同或有所改善的生物活性的因子 VII 变体。术语“因子 VII”用以包括未裂解 (酶原) 形式的因子 VII 多肽类以及已经蛋白水解加工成其相应生物活性形式 (可以被命名为因子 VIIa) 的那些因子 VII 多肽类。一般来说，因子 VII 在残基 152 与 153 之间被裂解，生成因子 VIIa。术语“因子 VII 多肽”还包括这样的多肽类，包括变体，其中因子 VIIa 生物活性与野生型因子 VIIa 的活性相比基本上得到改



变或在一定程度上得到降低。这些多肽包括，但不限于引入了改变或破坏所述多肽的生物活性的特定氨基酸序列改变的因子 VII 或因子 VIIa。

因子 VIIa 在凝血中的生物活性来源于其 (i) 结合组织因子 (TF) 和 (ii) 催化因子 IX 或因子 X 发生蛋白水解裂解而产生活化的因子 IX 或 X (分别为因子 IXa 或 Xa) 的能力。

为了本发明的目的，可以通过测定制剂促进凝血的能力来对因子 VII 多肽类的生物活性 (“因子 VII 生物活性”) 定量，参见本文所述的试验 4。在该试验中，将生物活性表示为与对照样品相比凝血时间的缩短，并通过与含有 1 单位/mL 因子 VII 活性的汇集人血清标准品相比较而将其转化成 “因子 VII 单位”。或者，可以通过下列方式对因子 VIIa 生物活性进行定量：(i) 测定因子 VIIa 或因子 VII-相关多肽在包含包埋在脂膜中的 TF 和因子 X 的系统中产生活化因子 X (因子 Xa) 的能力 (Persson 等 《生物化学杂志》 ( J. Biol. Chem. ) 272:19919-19924, 1997); (ii) 测定含水系统中因子 X 的水解 (“体外蛋白水解试验”，参见下文的试验 2); (iii) 使用基于表面胞质基因共振的仪器测定因子 VIIa 或因子 VII-相关多肽与 TF 的物理结合 (Persson 《FEBS 通讯》 ( FEBS Letts. ) 413: 359-363, 1997); (iv) 测定因子 VIIa 和/或因子 VII-相关多肽对合成底物的水解 (“体外水解试验”，参见下文的试验 1); 或 (v) 测定 TF-依赖性体外系统中凝血酶的产生 (参见下文的试验 3)。

与野生型因子 VIIa 相比具有基本上相同或改善的生物活性的因子 VII 变体包括在凝血试验 (试验 4)、蛋白水解试验 (试验 2) 或如上所述的 TF 结合试验中的一种或多种中测试时，表现出在相同细胞类型中已经产生的因子 VIIa 的比活性的至少约 25%，诸如至少约 50%，至少约 75% 或至少约 90% 的那些变体。与野生型因子 VIIa 相比具有基本上降低的生物活性的因子 VII 变体包括在凝血试验 (试验 4)、蛋白水解试验 (试验 2) 或如上所述的 TF 结合试验中的一种或多种中测试时，表现出在相同细胞类型中已经产生的野生型因子 VIIa 的比活性的约 25%

以下, 诸如约 10%以下或约 5%以下的那些变体。与野生型因子因子 VII 相比具有基本上改变的生物活性的 VII 变体包括, 但不限于表现出 TF 非依赖性因子 X 蛋白水解活性的因子 VII 变体以及结合 TF、但不裂解因子 X 的那些变体。

无论表现出与野生型因子 VII 基本上相同或更好的生物活性还是与野生型因子 VII 相比表现出基本上改变或降低的生物活性, 因子 VII 的变体均包括, 但不限于具有在一个或多个氨基酸的插入、缺失或取代方面不同于野生型因子 VII 序列的氨基酸序列的多肽类。

与野生型因子 VII 具有基本上相同生物活性的因子 VII 变体的非限制性实例包括: S52A-FVIIa、S60A-FVIIa (Lino 等《生物化学与生物物理学学报》(Arch. Biochem. Biophys.) 352: 182-192, 1998); 如美国专利 US5, 580, 560 中公开的表现出增加的蛋白水解稳定性的 FVIIa 变体; 在残基 290 与 291 或残基 315 与 316 之间已发生蛋白水解裂解的因子 VIIa (Mollerup 等《生物技术与生物工程》(Biotechnol. Bioeng.) 48: 501-505, 1995); 因子 VIIa 的氧化形式 (Kornfelt 等《生物化学与生物物理学学报》(Arch. Biochem. Biophys.) 363: 43-54, 1999); 如 PCT/DK02/00189 中公开的 FVII 变体; 和如 WO 02/38162 (Scripps Research Institute) 中公开的表现出增加的蛋白水解稳定性的 FVII 变体; 如 WO 99/20767 (University of Minnesota) 中公开的具有被修饰的 Gla-结构域并表现出增强的膜结合的 FVII 变体; 和如 WO 01/58935 (Maxygen ApS) 中公开的 FVII 变体。

与野生型 FVIIa 相比具有增加的生物活性的因子 VII 变体的非限制性实例包括如 WO 01/83725、WO 02/22776、WO 02/077218、WO 03/27147、WO 03/37932、WO 02/38162 (Scripps Research Institute) 中公开的 FVII 变体以及如 JP 2001061479 (Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.) 中公开的具有增强的活性的 FVIIa 变体。

与野生型因子 VII 相比具有基本上降低的或改变的生物活性的因子 VII 变体的非限制性实例包括 R152E-FVIIa (Wildgoose 等《生物化学》(Biochem) 29: 3413-3420, 1990)、S344A-FVIIa (Kazama 等《生

物化学杂志》(J. Biol. Chem.) 270: 66-72, 1995)、FFR-FVIIa (Holst 等《欧洲脉管系统和血管内手术杂志》(Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.) 15: 515-520, 1998)和缺乏 Gla 结构域的因子 VIIa (Nicolaissen 等《FEBS 通讯》(FEBS Letts.) 317: 245-249, 1993)。

因子 VII 多肽类的实例包括, 但不限于: 野生型因子

VII, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, and S336G-FVII, L305V/K337A-FVII, L305V/V158D-FVII, L305V/E296V-FVII, L305V/M298Q-FVII, L305V/V158T-FVII, L305V/K337A/V158T-FVII, L305V/K337A/M298Q-FVII, L305V/K337A/E296V-FVII, L305V/K337A/V158D-FVII, L305V/V158D/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V-FVII, L305V/V158T/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V-FVII, L305V/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/K316H-FVII, S314E/K316Q-FVII, S314E/L305V-FVII, S314E/K337A-FVII, S314E/V158D-FVII, S314E/E296V-FVII, S314E/M298Q-FVII, S314E/V158T-FVII, K316H/L305V-FVII, K316H/K337A-FVII, K316H/V158D-FVII, K316H/E296V-FVII, K316H/M298Q-FVII, K316H/V158T-FVII, K316Q/L305V-FVII, K316Q/K337A-FVII, K316Q/V158D-FVII, K316Q/E296V-FVII, K316Q/M298Q-FVII, K316Q/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D-FVII, S314E/L305V/E296V-FVII, S314E/L305V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/K337A/E296V-FVII, S314E/L305V/K337A/V158D-FVII, S314E/L305V/V158D/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V-FVII, S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V-FVII, S314E/L305V/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D-FVII, K316H/L305V/E296V-FVII, K316H/L305V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/K337A/E296V-FVII,

K316H/L305V/K337A/V158D-FVII, K316H/L305V/V158D/M298Q-FVII,  
K316H/L305V/V158D/E296V-FVII, K316H/L305V/V158T/M298Q-FVII,  
K316H/L305V/V158T/E296V-FVII, K316H/L305V/E296V/M298Q-FVII,  
K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII,  
K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII,  
K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/K337A -FVII,  
K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/K337A-FVII,  
K316Q/L305V/V158D-FVII, K316Q/L305V/E296V-FVII, K316Q/L305V/M298Q-FVII,  
K316Q/L305V/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158T-FVII,  
K316Q/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/K337A/E296V-FVII,  
K316Q/L305V/K337A/V158D-FVII, K316Q/L305V/V158D/M298Q-FVII,  
K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII, K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVII,  
K316Q/L305V/V158T/E296V-FVII, K316Q/L305V/E296V/M298Q-FVII,  
K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII,  
K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII,  
K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A -FVII,  
K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/K337A-FVII, F374Y/V158D-FVII,  
F374Y/E296V-FVII, F374Y/M298Q-FVII, F374Y/V158T-FVII, F374Y/S314E-FVII,  
F374Y/L305V-FVII, F374Y/L305V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D-FVII,  
F374Y/L305V/E296V-FVII, F374Y/L305V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T-FVII,  
F374Y/L305V/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII,  
F374Y/K337A/M298Q-FVII, F374Y/K337A/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D-FVII,  
F374Y/V158D/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q-FVII, F374Y/V158D/E296V-FVII,  
F374Y/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q-FVII, F374Y/V158T/E296V-FVII,  
F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/S314E/M298Q-FVII, F374Y/E296V/M298Q-FVII,  
F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII, F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII,  
F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII,  
F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII,  
F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII,  
F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII,  
F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII,  
F374Y/K337A/S314E/V158T-FVII, F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII,  
F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII,  
F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII, F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII,  
F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII,  
F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII,

F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII,  
F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII,  
F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII,  
F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A -FVII,  
F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A-FVII,  
F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII,  
F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-  
FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII,  
F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, S52A- 因子 VII, S60A- 因子  
VII;  
R152E- 因子 VII, S344A- 因子 VII, 缺乏 Gla 结构域的因子 VIIa; 和  
P11Q/K33E-FVII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII,  
G291N-FVII, R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII;

和在 233Thr - 240Asn 的氨基酸序列中具有取代、添加或缺失的 FVII、在 304Arg - 329Cys 的氨基酸序列中具有取代、添加或缺失的 FVII 以及在 Ile153-Arg223 的氨基酸序列中具有取代、缺失或添加的 FVII。

在某些实施方案中，因子 VII 多肽为人因子 VIIa (hFVIIa)，优选重组制备的人因子 VIIa (rhVIIa)。

在其它实施方案中，因子 VII 多肽为因子 VII 序列变体。

在某些实施方案中，因子 VII 多肽具有不同于野生型人因子 VII 的糖基化。

在不同实施方案中，例如在其中因子 VII 多肽为因子 VII-相关多肽或因子 VII 序列变体的那些实施方案中，当在如本说明书中所述的"体外蛋白水解试验"(试验 2)中测试时，因子 VII 多肽的活性与天然人因子 VIIa (野生型 FVIIa)的活性之比至少约为 1.25，优选至少约 2.0 或 4.0，最优选至少约 8.0。

在某些实施方案中，因子 VII 多肽类为因子 VII-相关多肽类，尤其是变体，其中当在"体外水解试验"(参见下文试验 1)中测试时，所述的因子 VII 多肽活性与天然人因子 VIIa (野生型 FVIIa)活性之比至少约为 1.25；在其它实施方案中，该比值至少约为 2.0；在其它实施方案中，该比值至少约为 4.0。

在药物组合物中，通常比较理想的是活性组分的浓度可使得单位剂量的施用不会对患者产生不必要的不适。因此，大于约 2-10 mL 的单位剂量通常不理想。为了本发明的目的，因子 VII 多肽类的浓度由此至少为 0.01 mg/mL。在不同实施方案中，因子 VII 多肽的存在浓度为：0.01-20 mg/mL；0.1-10 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；或 0.1-1.5 mg/mL。

可以将因子 VIIa 浓度简便地表示为 mg/mL 或 IU/mL，其中 1 mg 通常表示 43,000 - 56,000 IU 或更高。

### 缓冲剂 (ii)

为了使所述含水液体药物组合物可用于直接对哺乳动物，诸如人进行非肠道给药，通常需要将组合物的 pH 值保持在合理界限范围内，诸如约 5.0 - 约 9.0。为了确保在指定条件下有合适 pH 值，该药物组合物中还包含适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围内的缓冲剂 (ii)。

术语“缓冲剂”包括那些将溶液 pH 维持在约 5.0 - 约 9.0 的可接受范围内的试剂或试剂组合。

在一个实施方案中，缓冲剂 (ii) 为选自下列组中的至少一种成分：MES、PIPES、ACES、BES、TES、HEPES、TRIS、组氨酸、咪唑、甘氨酸、甘氨酸酐、甘氨酸酐、磷酸、乙酸（例如乙酸钠）、乳酸、戊二酸、柠檬酸、酒石酸、苹果酸、马来酸和琥珀酸的酸和盐。应理解缓冲剂可以包括两种或多种成分的混合物，其中所述的混合物能够提供指定范围内的 pH 值。作为实例，可以提及的有乙酸和乙酸钠等。

由于该组合物中包含极少量钙这一事实，所以能够使用基于磷酸的缓冲系统，即磷酸盐缓冲剂，而没有不需要的磷酸钙沉淀。因此，在一个有意义的实施方案中，缓冲剂为磷酸盐缓冲剂。

选择缓冲剂的浓度以便维持溶液的优选 pH。在不同实施方案中，缓冲剂的浓度为：1-100 mM；1-50 mM；1-25 mM；或 2-20 mM。

在一个实施方案中，将组合物的 pH 保持在：约 5.0 - 约 8.0；诸如约 5.0 - 约 7.5；约 5.0 - 约 7.0；约 5.0 - 约 6.5，约 5.0 - 约 6.0，约 5.5 - 约 7.0；约 5.5 - 约 6.5，约 6.0 - 约 7.0，约 6.4 - 约 6.6，或约 5.2 - 约 5.7。

在本文中，以“约”形容的 pH 值应理解为  $\pm 0.1$ ，例如约 pH 8.0 包括 pH  $8.0 \pm 0.1$ 。

### 稳定剂 (iii)

在目前优选的实施方案中，组合物中进一步包含稳定剂 (iii)。

在包含稳定剂 (iii) 时, 它一般的存在浓度至少为 5  $\mu\text{M}$ 、至少为 25  $\mu\text{M}$ 、至少为 50  $\mu\text{M}$ 、至少为 100  $\mu\text{M}$ 、至少为 200  $\mu\text{M}$ 、至少为 400  $\mu\text{M}$ 、至少为 500  $\mu\text{M}$ 、至少为 800  $\mu\text{M}$ 、至少为 900  $\mu\text{M}$ 、至少为 1000  $\mu\text{M}$ 、至少为 5 mM, 诸如 20-2000  $\mu\text{M}$ 、50-5000  $\mu\text{M}$ 、0.1-10 mM、0.2-20 mM 或 0.5-50 mM。

### 二价金属类稳定剂 (iia)

在一个实施方案中, 稳定剂 (iii) 包括至少一种含金属的试剂 (iia), 其中所述的金属选自氧化态+II 的第一族过渡金属组成的组。

本发明者认为氧化态+II 的第一族过渡金属以前尚未用作随时可用的药物组合物中的稳定剂。

本文所用的术语“氧化态+II 的第一族过渡金属”用以包括金属钛、钒、铬、锰、铁、钴、镍、铜和锌。

尽管钛和钒可以在水性环境中以氧化态+II 存在, 但是更典型的是在铬、锰、铁、钴、镍、铜和锌中选择所述金属。对应于这些金属的含金属试剂 (iia) 的解释性实例为氯化铬 (II)、氯化锰 (II)、氯化铁 (II)、氯化钴 (II)、氯化镍 (II) 和氯化铜 (II)。应理解含金属试剂 (iia) 可以包含两种或多种金属, 例如两种或多种第一族过渡金属。因此, 在某些情况中, 可以组合使用上述试剂中的两种或多种。

迄今为止, 最有希望的金属为铜和锰。相应的含金属试剂 (iia) 的解释性实例为氯化铜 (II) 和氯化锰 (II)。

含金属的试剂 (或多种试剂) (iia) 的浓度一般至少为 1  $\mu\text{M}$ 。理想 (或必要) 的浓度一般取决于所选择的含金属试剂 (或多种试剂), 更具体地说, 取决于所选择的氧化态+II 金属对因子 VII 多肽的结合亲和性。

在不同实施方案中, 含金属试剂 (iia) 的存在浓度至少为 5  $\mu\text{M}$ 、至少为 25  $\mu\text{M}$ 、至少为 50  $\mu\text{M}$ 、至少为 100  $\mu\text{M}$ 、至少为 200  $\mu\text{M}$ 、至少为 400  $\mu\text{M}$ 、至少为 500  $\mu\text{M}$ 、至少为 800  $\mu\text{M}$ 、至少为 900  $\mu\text{M}$ 、至少为 1000  $\mu\text{M}$ 、至少为 5 mM、至少为 25 mM、至少为 50 mM、至少为



100 mM、至少为 200 mM、至少为 400 mM、至少为 800 mM、至少为 900 mM 或至少为 1000 mM。

在一个特定实施方案中，含金属试剂 (iia) 的金属为铜，并且所述试剂的浓度至少为 5  $\mu\text{M}$ ，诸如至少为 10  $\mu\text{M}$ ，或至少为 15  $\mu\text{M}$ 。

在另一个特定的实施方案中，含金属试剂 (iia) 的金属为锰，并且所述试剂的浓度至少为 100  $\mu\text{M}$ ，诸如至少为 500  $\mu\text{M}$ ，或至少为 1 mM。

### 胍/精氨酸类稳定剂 (iib)

在另一个实施方案中，稳定剂包括至少一种含有  $-\text{C}(=\text{N}-\text{Z}^1-\text{R}^1)-\text{NH}-\text{Z}^2-\text{R}^2$  基元的试剂 (iib)，其中

$\text{Z}^1$  和  $\text{Z}^2$  独立地选自  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NR}^{\text{H}}-$  和单键组成的组，其中  $\text{R}^{\text{H}}$  选自氢、 $\text{C}_{1-4}$ -烷基、芳基和芳基甲基组成的组，并且  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  独立地选自氢、可选取代的  $\text{C}_{1-6}$ -烷基、可选取代的  $\text{C}_{2-6}$ -链烯基、可选取代的芳基、可选取代的杂环基组成的组；或

$\text{Z}^2$  和  $\text{R}^2$  如上所述，并且  $-\text{C}=\text{N}-\text{Z}^1-\text{R}^1$  形成杂环的组成部分；或

$\text{Z}^1$  和  $\text{R}^1$  如上所述，并且  $-\text{C}-\text{NH}-\text{Z}^2-\text{R}^2$  形成杂环的组成部分；或

$-\text{C}(=\text{N}-\text{Z}^1-\text{R}^1)-\text{NH}-\text{Z}^2-\text{R}^2$  形成杂环，其中  $-\text{Z}^1-\text{R}^1-\text{R}^2-\text{Z}^2-$  为二价基 (biradical)。

术语“ $\text{C}_{1-6}$ -烷基”用以包括含有 1-6 个碳原子、并且可以为直链或支链的无环和环状饱和烃基。具体实例为甲基、乙基、正丙基、异丙基、环丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、环丙基甲基、正戊基、异戊基、正己基等。类似地，术语“ $\text{C}_{1-4}$ -烷基”包括含有 1-4 个碳原子、并且可以为直链或支链的无环和环状饱和烃基。

类似地，术语“ $\text{C}_{2-6}$ -烯基”用以包括含有 2-6 个碳原子且包括一个不饱和键、可以为直链或支链的无环和环状烃基。 $\text{C}_{2-6}$ -烯基的实例为乙烯基、烯丙基、丁-1-烯-1-基、丁-2-烯-1-基、戊-1-烯-1-基和己-1-烯-1-基。

术语“可选取代的”与  $\text{C}_{1-6}$ -烷基和  $\text{C}_{2-6}$ -烯基结合使用时表示所述的基团可以被选自下述的基团取代 1 次或多次，优选 1-3 次：羟基、 $\text{C}_{1-6}$ -

烷氧基(即  $C_{1-6}$ -烷基-氧基)、 $C_{2-6}$ -烯氧基、氧代(形成酮基或醛官能基)、芳基、芳氧基、芳基羰基、杂环基、杂环氧基、杂环基羰基、氨基、一-和二( $C_{1-6}$ -烷基)氨基、卤素,其中任意的芳基和杂环基可以被取代,如下文对可选取代的芳基和杂环基具体所述。

"卤素"包括氟、氯、溴和碘。

本文所用的术语"芳基"用以表示完全或部分芳族碳环或环系,例如苯基、萘基、1,2,3,4-四氢萘基、蒽基、菲基、芘基、苯并芘基、芴基和咕吨基,其中苯基是优选的实例。

术语"杂环基"用以表示饱和、部分未饱和、部分芳族或完全芳族碳环或环系,其中一个或多个碳原子被杂原子取代,所述杂原子例如氮(=N-或-NH)、硫(-S-)和/或氧(-O-)原子。这类杂环基的实例为噁唑基、噁唑啉基、噁唑烷基、异噁唑基、异噁唑啉基、异噁唑烷基、噁二唑基、噁二唑啉基、噁二唑烷基、噻唑基、异噻唑基、吡咯基、吡咯啉基、吡咯烷基、咪唑基、咪唑啉基、咪唑烷基、吡唑基、吡啶基、吡嗪基、哒嗪基、哌啶基、香豆基、呋喃基、喹啉基、苯并噻唑基、苯并三唑基、苯并二唑基、苯并噁唑基(benzoxozolyl)、二唑基、二唑啉基、二唑烷基、三唑基、三唑啉基、三唑烷基、四唑等。优选的杂环基为5-、6-或7-元单环基团,诸如异噁唑基、异噁唑啉基、噁二唑基、噁二唑啉基、吡咯基、吡咯啉基、二唑基、二唑啉基、三唑基、三唑啉基、咪唑基、咪唑啉基等。

术语"杂环"用以指相当于"杂环基"条目下定义的那些环。

与术语"芳基"、"杂环基"和"杂环"结合使用的术语"可选取代的"用以表示所述的基团可以被选自下述组中的基团取代一次或几次,优选1-3次:羟基(当存在于烯醇系统上时可以以互变酮基形式表示)、 $C_{1-6}$ -烷基、 $C_{2-6}$ -烯基、苯基、苄基、 $C_{1-6}$ -烷氧基、氧代(可以以互变烯醇形式表示)、羰基、 $C_{1-6}$ -烷氧羰基、 $C_{1-6}$ -烷基羰基、氨基、一-和二( $C_{1-6}$ -烷基)氨基、二卤代- $C_{1-4}$ -烷基、三卤代- $C_{1-4}$ -烷基和卤素。取代基最典型的实例为羟基、 $C_{1-4}$ -烷基、苯基、苄基、 $C_{1-4}$ -烷氧基、氧代、氨基、一-和二甲基氨基和卤素。

除  $R^1$  和  $R^2$  可以独立地选自氢、可选取代的  $C_{1-6}$ -烷基、可选取代的  $C_{2-6}$ -烯基、可选取代的芳基、可选取代的杂环基组成的组外，还可能的情况是  $-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$  基元的部分可以为杂环的组成部分，而该基元的其它部分具有分别针对  $Z^1$ 、 $Z^2$ 、 $R^1$  和  $R^2$  所定义的含义。在某些关注的实施方案中， $-C(=N-Z^1-R^1)$  可以形成杂环的组成部分，所述的杂环选自 1,2-二唑环、异噁唑环、1,2,4-三唑环和 1,2,4-噁二唑环组成的组；或者  $-C-NH-Z^2-R^2$  可以形成杂环的组成部分，所述的杂环选自 1,2-二唑啉环、异噁唑啉环、1,2,4-三唑啉环和 1,2,4-噁二唑啉环。这类杂环可以如上所述被取代。

在某些实施方案中， $R^1$  和  $R^2$  中至少一个为氢，例如两者均为氢。此外，在某些可以与上述实施方案组合的实施方案中， $Z^1$  和  $Z^2$  中至少一个为单键，例如两者均为单键。在特殊实施方案中， $R^1$  和  $R^2$  两者均为氢且  $Z^1$  和  $Z^2$  均为单键。

认为  $-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$  基元对稳定剂 (iiib) 的稳定作用而言特别重要。特别地，认为  $-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$  基元模拟因子 VII 多肽底物的精氨酸部分。

在更具体的实施方案中，稳定剂 (iiib) 为选自含有  $-C-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$  基元的脘化合物和含有  $>N-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$  基元的胍类化合物组成的组中的至少一种。在某些实施方案中，稳定剂 (iiib) 为至少一种脘化合物，该脘化合物选自含有基元  $-C_6H_4-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$  的苄脘类组成的组，其中  $C_6H_4$  表示可选取代的苯环，其中苄脘 ( $R^1$  和  $R^2$  为氢和  $Z^1$  和  $Z^2$  为单键) 构成具体的实施方案。

在其它具体实施方案中，苄脘类含有基元  $>N-C_6H_4-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$ ，其中  $C_6H_4$  表示可选取代的苯环，即邻-氨基-苄脘、间-氨基-苄脘或、对-氨基-苄脘，其中对-氨基-苄脘类，诸如对-氨基-苄脘是目前最有前景的。

对-氨基-苄脘类的其它解释性实例由下列文献公开：Aventis, EP 1 162 194 A1, 特别参见其中权利要求 1-6 和部分 [0009]-[0052];

以及 EP 1 270 551 A1, 特别参见权利要求 1 和 2 和部分 [0010]-[0032]。

在另一个实施方案中, 稳定剂 (iiib) 为选自含有  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{N}-\text{Z}^1-\text{R}^1)-\text{NH}-\text{Z}^2-\text{R}^2$  基元的胍类化合物组成的组中的至少一种胍化合物。胍化合物的实例为选自精氨酸、精氨酸衍生物和含有至少一个精氨酸残基的 2-5 个氨基酸残基的肽类中的那些。精氨酸构成具体的实施方案。

术语“精氨酸衍生物”用以包括精氨酸同系物、N-末端官能化的精氨酸(例如 N-甲基化和 N-酰化(例如乙酰化)衍生物)、C-末端官能化的精氨酸(例如 C-酰胺化、C-烷基酰胺化和 C-烷基化衍生物)及其组合。

如上所述, 稳定剂的一种重要基元为  $-\text{C}(=\text{N}-\text{Z}^1-\text{R}^1)-\text{NH}-\text{Z}^2-\text{R}^2$ 。稳定剂的其它部分也可能是重要的, 特别是在稳定作用最优化和患者的耐受性方面。一般来说, 稳定剂具有通式  $\text{Y}-\text{C}(=\text{N}-\text{Z}^1-\text{R}^1)-\text{NH}-\text{Z}^2-\text{R}^2$ , 其中 Y 为有机基团。通常将基团 Y 选择成可以改善稳定作用的功效。此外, 基团 Y 可以含有一个或多个其它通式  $-\text{C}(=\text{N}-\text{Z}^1-\text{R}^1)-\text{NH}-\text{Z}^2-\text{R}^2$  的基元。

稳定剂的分子量一般至多为 1000 Da, 诸如至多为 500 Da。

稳定剂(或多种稳定剂) (iiib) 的浓度一般至少为 1  $\mu\text{M}$ 。理想(或必要)的浓度一般取决于所选择的稳定剂(或多种稳定剂), 更具体地说是取决于所选择的稳定剂对因子 VII 多肽的结合亲和性。

在不同的实施方案中, 稳定剂 (iiib) 的存在浓度至少为 5  $\mu\text{M}$ 、至少为 10  $\mu\text{M}$ 、至少为 20  $\mu\text{M}$ 、至少为 50  $\mu\text{M}$ 、至少为 100  $\mu\text{M}$ 、至少为 150  $\mu\text{M}$ 、至少为 250  $\mu\text{M}$ 、至少为 500  $\mu\text{M}$ 、至少为 1 mM、至少为 2 mM、至少为 4 mM、至少为 5 mM、至少为 8 mM、至少为 9 mM、至少为 10 mM、至少为 15 mM、至少为 20 mM, 诸如 20-2000  $\mu\text{M}$ 、50-5000  $\mu\text{M}$ 、0.1-10 mM、0.2-20 mM 或 0.5-50 mM。

在一个实施方案中, 稳定剂 (iiib) 为苺脒, 并且所述试剂的浓度至少为 0.5 mM, 诸如至少为 2 mM, 不过, 预计取代的苺脒类可能更为有效, 因而它们可以以较低浓度加入。

在一个实施方案中，稳定剂(iii b)为精氨酸，并且所述试剂的浓度至少为 2 mM，诸如至少为 10 mM。

应理解可以将一种或多种含金属的试剂(iii a)和一种或多种稳定剂(iii b)组合使用。

#### 非离子型表面活性剂(iv)

在可以与涉及存在稳定剂(iii) (例如含金属的试剂(iii a)或试剂(iii b))的上述实施方案组合的另一个实施方案中所述组合物中包含非离子型表面活性剂(iv)。表面活性剂(也称作去污剂)一般包括那些防止蛋白质接触空气/溶液界面诱导的应力和溶液/表面诱导的应力(例如导致蛋白质聚集)的试剂。

一般来说，非离子型表面活性剂(iv)为选自聚山梨酸酯类、伯洛沙姆类、聚氧乙烯烷基醚类、聚乙烯/聚丙烯嵌段共聚物、聚乙二醇(PEG)、聚氧乙烯硬脂酸酯类和聚氧乙烯蓖麻油中的至少一种。

非离子型表面活性剂的解释性实例为 Tween<sup>®</sup>、聚山梨酸酯 20，聚山梨酸酯 80、Brij-35 (聚氧乙烯十二烷基醚)、伯洛沙姆 188、伯洛沙姆 407、PEG8000、Pluronic<sup>®</sup>多元醇类、聚氧基-23-月桂基醚、Myr j 49、Solutol HS15 和克列莫佛 A。

在一个实施方案中，非离子型表面活性剂的存在量按重量计为 0.005-2.0%。

#### 张力调节剂 - 高离子强度

在可以与涉及存在稳定剂(iii) (例如含金属的试剂(iii a)或试剂(iii b))和/或非离子型表面活性剂(iv)的上述实施方案相组合的另一个实施方案中，组合物中可以包含张力调节剂(v)。

本文所用的术语"张力调节剂"包括提供溶液重量克分子渗透压浓度的试剂。张力调节剂(v)包括选自下列试剂组成的组中的至少一种：中性盐、氨基酸、2-5 个氨基酸残基的肽类、单糖类、二糖类、多糖类和糖醇类。在某些实施方案中，组合物中包含这类试剂中两种或多

种的组合。

所谓“中性盐”指的是在溶于水性溶液时既非酸、也非碱的盐。

在一个实施方案中，至少一种张力调节剂为选自钠盐、钾盐和镁盐的中性盐，诸如氯化钠、氯化钾、氯化镁、乙酸镁、葡萄糖酸镁和乙酰丙酸镁。

在另一个实施方案中，张力调节剂(v)包括氯化钠与选自氯化镁和乙酸镁中的至少一种的组合。

在另一个实施方案中，张力调节剂(v)为选自氯化钠、蔗糖、葡萄糖和甘露糖醇中的至少一种。

在不同的实施方案中，张力调节剂(v)的存在浓度至少为 1 mM、至少为 5 mM、至少为 10 mM、至少为 20 mM、至少为 50 mM、至少为 100 mM、至少为 200 mM、至少为 400 mM、至少为 800 mM、至少为 1000 mM、至少为 1200 mM、至少为 1500 mM、至少为 1800 mM、至少为 2000 mM 或至少为 2200 mM。

在一系列实施方案中，张力调节剂(v)的存在浓度为：5-2200 mM，诸如 25-2200 mM、50-2200 mM、100-2200 mM、200-2200 mM、400-2200 mM、600-2200 mM、800-2200 mM、1000-2200 mM、1200-2200 mM、1400-2200 mM、1600-2200 mM、1800-2200 mM 或 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 或 800-1200 mM。

在本发明优选的实施方案中，至少一种张力调节剂(v)为离子强度调节剂(v/a)。

本文所用的术语“离子强度调节剂”包括提供溶液离子强度的试剂。这些试剂包括，但不限于中性盐、氨基酸、2-5个氨基酸残基的

肽类。在某些实施方案中，组合物中包含这类试剂中的两种或多种的组合。

优选的离子强度调节剂(v/a)的实例为中性盐，诸如氯化钠、氯化钾和氯化镁。优选的试剂(v/a)为氯化钠。

术语“离子强度”为由下列等式定义的溶液的离子强度( $\mu$ ):  $\mu = \frac{1}{2} \sum ([i] (Z_i^2))$ , 其中 $\mu$ 为离子强度,  $[i]$ 为离子的毫摩尔浓度, 且 $Z_i$ 为该离子的电荷(+或-)"(例如, 参见 Solomon 《化学教育杂志》(Journal of Chemical Education), 78(12):1691-92, 2001; James Fritz 和 George Schenk: 《定量分析化学》(Quantitative Analytical Chemistry), 1979)。

在本发明的不同实施方案中, 组合物的离子强度至少为 50, 诸如至少为 75、至少为 100、至少为 150、至少为 200、至少为 250、至少为 400、至少为 500、至少为 650、至少为 800、至少为 1000、至少为 1200、至少为 1600、至少为 2000、至少为 2400、至少为 2800 或至少为 3200。

在某些具体的实施方案中, 张力调节剂(v)和离子强度调节剂(v/a)的总浓度在 1-500 mM 的范围内, 诸如 1-300 mM 或 10-200 mM 或 20-150 mM, 这取决于任意其它组分对张力和离子强度可能产生的影响。

在一个实施方案中, 组合物为等渗的; 在另一个实施方案中, 组合物为高渗的。术语“等渗”指的是“与血清等渗”, 即在约  $300 \pm 50$  毫渗克分子/kg (milliosmol/kg)。张力指的是给药前溶液的重量克分子渗透浓度的度量值。术语“高渗”指的是表示高于血清生理水平的重量克分子渗透浓度的水平, 诸如高于  $300 \pm 50$  毫渗克分子/kg 的水平。

此外, 本发明的具体实施方案涉及稳定剂(iii)与适当高浓度的选自钠盐和镁盐中的离子强度调节剂(v/a)的组合。在该实施方案中, 离子强度调节剂(v/a), 即钠盐和/或镁盐的存在浓度为: 15-1000 mM, 诸如 25-1000 mM、50-1000 mM、100-1000 mM、200-1000 mM、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 或 100-400 mM。

在这些实施方案中，钠盐可以为氯化钠，镁盐可以选自氯化镁、乙酸镁、葡萄糖酸镁、乙酰丙酸镁和强酸的镁盐。在更具体的实施方案中，镁盐可以与氯化钠联用。

在一个目前优选的实施方案中，组合物中包含一种或多种选自镁( $Mg^{3+}$ )盐的离子强度调节剂，例如一种或多种选自氯化镁、乙酸镁、硫酸镁、葡萄糖酸镁、乙酰丙酸镁、强酸的镁盐中的盐。在本文的一个实施方案中，镁( $Mg^{3+}$ )盐的浓度至少为 2 mM，诸如至少为 5 mM 或约 10 mM。

### 其它组分

除上述成分之外，所述的含水液体药物组合物可以包含有益于该组合物的制备、配制、稳定性或给药的额外成分。

因此，组合物可以进一步包括抗氧化剂(vi)。在不同的实施方案中，抗氧化剂选自 L-甲硫氨酸、D-甲硫氨酸、甲硫氨酸类似物、含甲硫氨酸的肽类、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(cystathionine)组成的组。在优选的实施方案中，抗氧化剂为 L-甲硫氨酸。

抗氧化剂的浓度一般为 0.1-5.0 mg/mL，诸如 0.1-4.0 mg/mL、0.1-3.0 mg/mL、0.1-2.0 mg/mL 或 0.5-2.0 mg/mL。

在具体的实施方案中，组合物中不包括抗氧化剂；相反，因子 VII 多肽对氧化的敏感性通过排除空气来控制。抗氧化剂的应用当然也可以与排除空气相联用。

因此，本发明还提供了含有本文所述的含水液体药物组合物和可选地惰性气体的密闭容器(例如小瓶或药筒(诸如用于笔型涂药器的药筒))。下文进一步讨论该方面。



除强制性成分稳定剂 (iii)、非离子型表面活性剂 (iv)、张力调节剂 (v) 和可选的抗氧化剂 (vi) 外, 药物组合物中还可以进一步包括防腐剂 (vii)。

组合物中可以包括防腐剂以阻止微生物生长, 由此允许因子 VII 多肽类的"多用途"包装。防腐剂的实例包括苯酚、苜醇、邻-甲酚、间-甲酚、对-甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯扎氯铵和苜索氯铵。防腐剂的存在浓度一般为 0.1-20 mg/mL, 这取决于 pH 范围和防腐剂类型。

此外, 组合物中还可以包括能够抑制脱氨基和异构化的试剂。

### 具体实施方案

本发明者目前已经确定了下列实施方案特别有利:

含水液体药物组合物, 其中包含:

0.1-10 mg/mL 的因子 VII 多肽 (i);

适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围内的缓冲剂 (ii); 和

浓度至少为 5 mM 的张力调节剂 (v),

其中未配位的钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。

含水液体药物组合物, 其中包含:

0.1-10 mg/mL 的因子 VII 多肽 (i);

适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围内的缓冲剂 (ii);

非离子型表面活性剂 (iv); 和

浓度至少为 5 mM 的张力调节剂 (v),

其中未配位的钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。

含水液体药物组合物, 其中包含:

0.1-10 mg/mL 的因子 VII 多肽 (i);

适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围内的缓冲剂 (ii);

稳定剂 (iii);

非离子型表面活性剂 (iv); 和

浓度至少为 5 mM 的张力调节剂 (v),

其中未配位的钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。

含水液体药物组合物, 其中包含:

0.1-10 mg/mL 的因子 VII 多肽 (i);

适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围内的缓冲剂 (ii);

浓度至少为 5  $\mu\text{M}$  的含铜试剂 (iiia) 和/或浓度至少为 100  $\mu\text{M}$  的含锰试剂 (iiia);

非离子型表面活性剂 (iv); 和

浓度至少为 5 mM 的张力调节剂 (v),

其中未配位的钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。

含水液体药物组合物, 其中包含:

0.1-10 mg/mL 的因子 VII 多肽 (i);

适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围内的缓冲剂 (ii);

含有基元  $-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}(=\text{N}-\text{Z}^1-\text{R}^1)-\text{NH}-\text{Z}^2-\text{R}^2$  的浓度至少为 5  $\mu\text{M}$  的至少一种稳定剂 (iiib) 和/或含有基元  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{N}-\text{Z}^1-\text{R}^1)-\text{NH}-\text{Z}^2-\text{R}^2$  的浓度至少为 500  $\mu\text{M}$  的至少一种稳定剂 (iiib);

非离子型表面活性剂 (iv); 和

浓度至少为 5 mM 的张力调节剂 (v),

其中未配位的钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。

在上述实施方案中, 所述缓冲剂优选包含磷酸。

### 本发明组合物的特性

本发明的组合物可用作稳定的、优选随时可用的因子 VII 多肽组合物。此外, 相信本文所述的原理、指导方针和具体实施方案同样可以应用于因子 VII 多肽类的批量储存, 只是需要在细节上作必要的修改。

当在  $2^\circ\text{C} - 8^\circ\text{C}$  范围的温度下储存时, 这些组合物一般可稳定至少 6 个月, 优选长达 36 个月。当在  $2^\circ\text{C} - 8^\circ\text{C}$  下储存至少 6 个月时, 这些组合物在化学和/或物理上是稳定的, 特别是在化学上稳定。

术语“稳定”用以表示: (i) 在  $2^\circ\text{C} - 8^\circ\text{C}$  下储存 6 个月后, 如一步

凝血试验(试验4)中所测定的,组合物中保持了至少50%的其起始生物活性;或(ii)在2°C-8°C下储存6个月后,假定起始样品中不含重链降解产物(即仅将因子VII多肽用于百分比计算),重链降解产物的含量至多为40%(w/w)。

为了如一步凝血试验(试验4)中所述测定生物活性的目的,在50 mM Tris (pH 7.5)、0.1% BSA中稀释测试样品,并将100  $\mu$ l与100  $\mu$ l因子VII缺陷血浆和200  $\mu$ l促凝血酶原激酶C(含有10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ )一起保温。测定凝血时间,并与使用参比标准品或系列稀释的含柠檬酸盐的人血浆汇集物的标准曲线相比较。

优选地,在2°C-8°C下储存6个月后,稳定的组合物保持其起始活性的至少70%,诸如至少80%或至少85%或至少90%或至少95%。

为测定重链降解产物含量的目的,使用颗粒大小为5  $\mu$ m且孔径为300Å的享有产权的4.5x250 mm丁基键合型二氧化硅柱进行反相HPLC。柱温:70°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。用从X到(X+13)% B的线性梯度在30分钟内洗脱柱。调节X,使得FVIIa以保留时间约为26分钟进行洗脱。流速:1.0 mL/分钟。检测:214 nm。上样量:25  $\mu$ g FVIIa。

术语“物理上稳定的”用以表示组合物在外观上保持澄清。通过在不同温度下储存不同时间期限后的视觉检查和浊度评价组合物的物理稳定性。在具有深色背景的锐利聚焦光中进行组合物的视觉检查。当它表现出视觉浊度时,将组合物分类为物理上不稳定的。

术语因子VII多肽类的“物理稳定性”涉及因子VII多肽类的二聚化、寡聚化和多聚化形式的不溶性和/或可溶性聚集体形成以及该分子的任意结构形变和变性。

术语“化学上稳定的”用以表示在2°C-8°C下储存6个月后,如一步凝血试验(试验4)中所测定的,组合物保持至少50%的其起始生物活性。

术语“化学稳定性”用以涉及在加速条件下在溶液中储存时,因子VII多肽类的任何化学改变的形成。实例为水解、脱酰氨化、异构化

和氧化以及导致形成因子 VII 多肽类片段的酶促降解。特别地，含硫的氨基酸易于氧化，形成相应的亚砷类。

### 本发明组合物的制备

本发明在另一个方面中还提供了制备本发明含水液体药物组合物的方法。

因此，在一个实施方案中，制备因子 VII 多肽的含水液体药物组合物的方法包括下列步骤：提供在溶液中的因子 VII 多肽 (i)，该溶液中包含适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围内的缓冲剂 (ii)；同时确保在最终组合物中，未配位的钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。

因此，在另一个实施方案中，制备因子 VII 多肽的含水液体药物组合物的方法包括下列步骤：提供在溶液中的因子 VII 多肽 (i)，该溶液中包含：适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围内的缓冲剂 (ii)；至少一种含金属的试剂 (iii)，其中所述的金属选自氧化态 +II 的第一族过渡金属组成的组；和非离子型表面活性剂 (iv)；同时确保在最终组合物中，未配位的钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。

因此，在又一个实施方案中，制备因子 VII 多肽的含水液体药物组合物的方法包括下列步骤：提供在溶液中的浓度至少为 0.01 mg/mL 的因子 VII 多肽 (i)，该溶液中包含：

适合于将 pH 保持在约 5.0 - 约 9.0 范围内的缓冲剂 (ii)；

和至少一种含有  $-\text{C}(=\text{N}-\text{Z}^1-\text{R}^1)-\text{NH}-\text{Z}^2-\text{R}^2$  基元的稳定剂 (iiib)，其中

$\text{Z}^1$  和  $\text{Z}^2$  独立地选自  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NR}^{\text{H}}$ - 和单键组成的组，其中  $\text{R}^{\text{H}}$  选自氢、 $\text{C}_{1-4}$ -烷基、芳基和芳基甲基组成的组，并且  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  独立地选自氢、可选取代的  $\text{C}_{1-6}$ -烷基、可选取代的  $\text{C}_{2-6}$ -链烯基、可选取代的芳基、可选取代的杂环基组成的组；或者

$\text{Z}^2$  和  $\text{R}^2$  如上所述，并且  $-\text{C}=\text{N}-\text{Z}^1-\text{R}^1$  形成杂环的组成部分；或者

$\text{Z}^1$  和  $\text{R}^1$  如上所述，并且  $-\text{C}-\text{NH}-\text{Z}^2-\text{R}^2$  形成杂环的组成部分；或者

$-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$  形成杂环, 其中  $-Z^1-R^1-R^2-Z^2-$  为二价基;

同时确保在最终组合物中, 未配位的钙离子 ( $Ca^{2+}$ ) 与因子 VII 多肽的摩尔比小于 0.5。

应理解可以通过选择合适的原料, 其中“游离”(即未配位的)钙离子的浓度极低, 或者通过添加钙螯合剂以便结合钙离子, 从而使未配位的钙离子 ( $Ca^{2+}$ ) 与因子 VII 多肽的摩尔比保持在小于 0.5。在后一种情况中, 钙螯合剂的一般添加量约相当于“游离”钙离子的浓度。

### 使用方法

在药物领域中, 可以将本文定义的含水液体药物组合物作为随时可用的组合物或用于制备随时可用的组合物的母溶液使用。因此, 本发明特别提供了本文定义的、用作药物(更具体地说是用作治疗因子 VII-反应性综合征的药物)的含水液体药物组合物。

因此, 本发明还提供了如本文定义的含水液体药物组合物在制备用于治疗因子 VII-反应性综合征的药物中的应用, 以及治疗因子 VII-反应性综合征的方法, 该方法包括对有此需要的受试者给予有效量的如本文定义的含水液体药物组合物。本发明的制剂可以用于治疗任何因子 VII-反应性综合征, 诸如: 出血障碍, 包括: 那些因凝血因子缺乏导致的障碍(例如 A 型血友病、B 型血友病、凝血因子 XI 缺乏、凝血因子 VII 缺乏); 血小板减少或维勒布兰德病或凝血因子抑制剂导致的出血障碍; 和脑内出血或因任何原因导致的过量出血。这些制剂还可以与手术或其它创伤疗法相结合对患者给药或对接受抗凝疗法的患者给药。

术语“有效量”为可以由有资格的医务工作者确定的有效剂量, 该医务工作者可以逐步确定剂量以获得所需反应。对于剂量需考虑的因素包括功效、生物利用度、所需药动学/药效学特性、治疗的疾病、与患者相关的因素(例如体重、健康状况、年龄等)、共同给予的药物(例如抗凝药)的存在情况、给药时间或医务工作者公知的其它因素。

将术语“治疗”定义为控制和护理受试者, 例如哺乳动物, 特别是

人，目的在于抗疾病、病症或障碍，包括给予因子 VII 多肽以防止症状或并发症发作，或者缓解症状或并发症，或者消除疾病、病症或障碍。可以通过非肠道途径对需要这类治疗的受试者给予含有因子 VII 多肽的本发明药物组合物。可以经注射器，可选笔形注射器，通过皮下、肌内或静脉内注射而进行非肠道给药。或者，可以通过输注泵进行非肠道给药。

在重要的实施方案中，所述的药物组合物适合于按照本领域中公知的方法进行皮下、肌内或静脉内注射。在本文定义的药物组合物中可能存在的金属离子(特别是含金属的试剂(iia)的二价金属离子)高浓度对某类患者可能不利。本发明由此还提供了降低含水液体药物组合物中金属离子浓度的使用前方法，其中所述的方法包括使本文定义的含水液体药物组合物接触阳离子交换物质的步骤。

阳离子交换物质的实例有 Chelex-100 (Fluka-Riedel/Sigma-Aldrich)。阳离子交换物质，例如 Chelex-100，优选包含在无菌容器内，例如玻璃或塑料药筒内。

预计在使用前立即通过例如经过含有阳离子交换物质的药筒使所述含水液体药物组合物接触阳离子交换物质。在具体的实施方案中，所述的药筒为注射器装配的主要部分。

### 用于药物组合物的合适容器

如上所述，本发明还提供了含有如本文所述的含水液体药物组合物以及可选地惰性气体的密闭容器(例如小瓶或药筒(诸如用于笔形涂药器的药筒))。所述惰性气体可以选自氮、氩等组成的组。该容器(例如小瓶或药筒)一般由玻璃或塑料(特别是玻璃)制成，可选用橡胶隔片或其它具有保护药物组合物完整性的允许穿透的封闭部件封闭。在本文的具体实施方案中，该组合物不含防腐剂(vii)。在另一个实施方案中，所述容器为包封在密闭袋中的小瓶或药筒，例如密封塑料袋，诸如分层的(例如金属(诸如铝)薄塑料袋)。更具体地说，密闭的、至少为部分充满的容器中含有如本文所述的含水液体药物组合物以及可

选地惰性气体，所述的容器包括(i) 壁部分和(ii) 不构成所述壁部分的一种或多种封闭部件。优选所述的药物组合物不含防腐剂(vii)。

特别地，容器内壁材料为选自二氧化硅涂敷的玻璃、硅氧烷(silicone)涂敷的玻璃、非环烯类聚合物、环烯聚合物和环烯烃/直链烯烃共聚物组成的组中的材料。

在一种变化形式中，容器的内壁包括不同级别/类型的涂布了二氧化硅涂层(二氧化硅,  $\text{SiO}_2$ )的玻璃；一种这类极为合适的材料称作涂敷了二氧化硅的“I型”玻璃(如欧洲药典 Ph. Eur. 所定义)。有关 I 型玻璃和其它类型的药物上可接受的玻璃(II、III 和 IV 型)的定义和表征试验，参见例如 Ph. Eur. 中的 3.2.1 部分，其国际互联网网址如下：<http://online.pheur.org/404TER/ep404.dll?f=templates&fn=main-h.htm&2.0>。

I 型玻璃容器在 Ph. Eur. (第 4 版，在线)第 3.2.1 部分中描述如下：“它们属于中性玻璃，并且因玻璃自身的化学组成而具有高度耐水解性”，本文对中性玻璃定义如下：“中性玻璃是含有大量氧化硼、铝或碱土金属氧化物的硼硅酸盐玻璃。中性玻璃因其组成而具有高度耐热骤变性和极高的耐水解性”。

这种类型的容器内壁上的二氧化硅涂层优选具有基本上均匀的至少约为  $0.05 \mu\text{m}$  的厚度，不过，相信基本上均匀的约  $0.1 \mu\text{m}$  - 约  $0.2 \mu\text{m}$  的厚度一般更为理想。化学气相沉积 (Chemical Vapour Deposition, CVD) 看起来是极为适合于将这类基本上均匀厚度的二氧化硅涂层涂布在玻璃和 I 型玻璃容器(例如小瓶)表面的技术，其中用 CVD 技术沉积在容器内表面上的、并且极为适合于本发明上下文中的二氧化硅涂层在市场上有售，例如的购自 Schott Glaskontor, Müllheim/Baden, Germany 的 Schott Type I plus™ 容器。有关 CVD 技术的描述可参阅例如下列国际互联网上的论文：<http://www.azom.com/details.asp?ArticleID=1552>。

另外，如上所述，用于容器内壁的其它优选材料包括通常在开始洗涤或在浸入水或另一种含水介质中以除去水可滤去物质或种类后涂

敷了硅氧烷的各种等级/类型的玻璃。如上所述,在这方面优选类型的玻璃为 I 型玻璃(Ph. Eur.)。

术语“硅氧烷”在本文中不仅广泛用于表示硅氧烷类本身,它们一般为聚合的二烷基化、二芳基化或一烷基化+一芳基化硅氧烷类,而且还可以是包括硅氧烷链段和其它聚合物材料片段的嵌段和接枝共聚物,诸如聚苯乙烯、聚烯烃类、聚酰胺类或聚氨基甲酸酯。

涂层材料可以适当为聚(二烷基-硅氧烷)油或共聚物,以及适当类型的聚(二烷基-硅氧烷),在这方面包括聚(二甲基-硅氧烷)(PDMS)、聚(二丙基-硅氧烷)和聚(二己基-硅氧烷)。

油的粘度在施用于所述部件时可能比较重要性,对于消除例如在所述容器为包括用于从该容器中排出液体(蛋白质制剂)的可置换柱塞的药筒等时可能产生的滑动-粘附现象可能更是如此。粘性越大,则滑动-粘附现象的风险越低,由此柱塞的平滑运动受阻。在一个实施方案中,涂层材料包括直链或支链亲水化的聚(二烷基-硅氧烷)油。在施用于部件时,油的粘度优选高于 200,000 厘沱,诸如高于 500,000 厘沱。

硅氧烷涂层材料还可以包括交联或凝胶化硅油,诸如亲水化的聚(二烷基-硅氧烷)油或者交联和非交联油的混合物。通过使用交联或凝胶化油,油的移动能力显著降低,可以将涂层视为固体物质。

一般通过应用带有用于在随后步骤中交联涂层材料的反应性官能基的直链或支链硅油获得交联或熟化的硅油。有许多不同的交联方法可供利用,例如通过用 UV 光照射熟化;通过在升温下加热熟化和在有水存在下熟化。还可以通过首先涂布直链或支链硅油、然后用高能辐射源(例如电子源或 X 线源)照射而获得交联的硅油。可交联的硅油适当地可以为医用级,例如 Dow Corning 提供的 MDX™ (MDX4-4159 Fluid); 其它合适类型包括如作为约 35%含水乳剂提供的 Wacker E2 硅油。

在另一个实施方案中,硅氧烷涂层包括亲水化的聚(二烷基-硅氧烷)嵌段和接枝共聚物。该共聚物可以为包含聚(二烷基-硅氧烷)的聚合区段的任意嵌段和接枝共聚物,诸如 PDMS。例如,可以将所述的聚



合区段与聚苯乙烯、聚烯烃类、聚酰胺类或聚氨基甲酸酯相组合形成所需共聚物。可以通过任意合适的已知方法，例如通过依次阴离子聚合或各种接枝步骤制备所述的共聚物。

可以通过任意合适的方法实现硅氧烷涂层的亲水性，例如通过将涂层在涂布在玻璃表面后进行氧化处理，诸如等离子处理或电晕处理。还可以通过用亲水基团或链区段使聚合物封端而获得亲水性。亲水基团例如可以为带负电荷的化学基团或磷酸胆碱(PC)基团，链区段例如可以为聚环氧乙烷(PEO)或聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯)(pHEMA)。

可以通过亲水性聚合物区段或官能基的偶联而对经等离子处理的表面进行修饰，以便减少蛋白质吸附。这些聚合物区段或官能基的种类可以与上述种类相同，并且可以进一步与在等离子处理过程中产生的官能基偶联。

硅氧烷涂层的厚度取决于具体的涂层，优选为 0.005 - 10  $\mu\text{m}$ ，更优选 0.01 - 1  $\mu\text{m}$ 。最佳厚度取决于容器的尺寸、形状和类型，并且易于由本领域技术人员确定。例如，就带有可移动的柱塞或活塞部件的药筒而言，如果涂层过薄，那么在使用中可能开裂，由此增加柱塞与壁部分之间的摩擦。当涂层厚度已经达到一定平台值时，摩擦力近似恒定，甚至在厚度进一步增加时也保持恒定。就任意的涂层组合物而言，涂层优选应尽可能地薄，以降低成本。这类薄涂层适当地可以具有 0.005 - 0.4  $\mu\text{m}$  的厚度，诸如 0.015 - 0.25  $\mu\text{m}$ ，更优选约 0.2  $\mu\text{m}$ 。

随硅氧烷涂层移动能力的不同，涂层上的亲水基团趋向于进入涂层，从而由于周围空气的疏水性而导致表面具有疏水性。就将充入因子 VII 多肽的含水液体药物组合物的容器而言，为了使蛋白质在其含水液体制剂中吸附在容器内表面上的任何趋向减小到最低限度，需要涂层在储存过程中保持亲水性，直到将液体蛋白质制剂导入容器内为止。这可以通过在涂敷过程完成后不久立即向容器充入蛋白质制剂而简单地完成。

如上所述，本发明上下文中用作容器内壁的其它优选材料包括无环(即直链-或支链)烯烃类的聚合物，即聚烯烃类。在这类材料中，来

源于单一单体的有用的聚合物包括聚乙烯和聚丙烯，它们为在结构上为部分结晶的众多等级。无环烯烃类的共聚物[例如乙烯(ethene)和丙烯(propene)的共聚物]作为本发明上下文中的内壁材料同样有意义。

如上所述，用于容器内壁的其它优选材料包括环烯聚合物，其合适的类型包括那些由基本上100%的5-7元脂族环烯环组成的聚合物。由环烯聚合物材料制成的合适的商购容器包括由购自Daikyo Seiko Ltd., Tokyo, Japan的CZ™树脂制成的容器。这种类型的其它相关聚合物材料包括Zeonor™和Zeonex™，两者均来自Nippon Zeon Co. Ltd. Tokyo, Japan。

合适类型的环烯烃/直链烯烃共聚物包括具有无定形结构的材料，诸如高度透明的Topas™类共聚物(可获自Ticona GmbH, Frankfurt am Main, Germany)，可以以各种等级获得它们(例如Topas™ 8007、Topas™ 5013、Topas™ 6013、Topas™ 6015和Topas™ 6017)。

在一种变化形式中，具有固相材料作为容器内壁材料的容器在不超过40°C的温度下接触水或pH约3-约8的水溶液而保温至少24个月时，将至多约3 μM三价金属离子释放入溶液；该容器包括(i)壁部分和(ii)一种或多种不构成壁部分的封闭部件。

尽管认为(如上所述)三价金属离子的释放水平/浓度的可接受上限约为3 μM(即释放水平≤约3 μM)，但是至多约2.5 μM(即≤约2.5 μM)，更理想的是至多约1 μM(即≤约1 μM)，诸如至多约0.5 μM(即≤约0.5 μM)的释放水平看起来是有利的。

就本发明后两方面情形中的三价金属离子而言，Al<sup>3+</sup>的释放看起来特别不理想；Fe<sup>3+</sup>构成应避免释放入溶液的三价金属离子的另一个实例。除避免使三价金属离子释放入溶液外，还认为需要避免将某些二价金属离子，特别是Zn<sup>2+</sup>释放入溶液。在这方面，释放水平很可能应不超过约3 μM(即释放水平≤约3 μM)，更优选约1 μM(即释放水平≤约1 μM)，诸如至多约0.5 μM(即≤约0.5 μM)。

在这点上可以提及的是，尽管涂敷的玻璃材料，特别是二氧化硅

涂敷的玻璃(特别是二氧化硅涂覆的 I 型玻璃)和硅氧烷涂敷的玻璃(特别是硅氧烷涂敷的 I 型玻璃)属于本发明各方面中的优选内壁材料,但是为了在三价或二价离子释放入溶液方面符合上述标准,在某些实施方案中使用玻璃、特别是 I 型(Ph. Eur.)玻璃就足够了,它已经进行了降低玻璃表面内/上存在的可提取的三价和二价金属离子水平的洗涤或提取处理。这类处理包括浸入热(优选至少为 90°C)水(用其提取)或另一种含水介质,例如硫酸铵溶液。

在另一个实施方案中,所述的容器为包括封闭部件的小瓶或药筒,所述的封闭部件包括针头可透入的自身封闭的弹性隔片。特别地,所述的容器为还包括可移动活塞的药筒,由此可以从所述容器中排出所述容器中存在的液体。

## 实验

### 一般方法

百分比在提及溶于溶液的固体和混入溶液的液体时均是(重量/重量)。例如,就 Tween 而言,它为 100%原料重量/溶液重量。

### 适合于测定因子 VII 多肽类的生物活性的试验

可以通过合适的试验选择可用于本发明的因子 VII 多肽类,所述的试验可以作为简单的体外预试验进行。因此,本说明书中公开了因子 VII 多肽类活性的简单试验(称作"体外水解试验")。

#### 体外水解试验(试验 1)

可以检测天然(野生型)因子 VIIa 和因子 VII 多肽(下文一起称作"因子 VIIa")的比活性。也可以平行检测它们以直接比较其比活性。该试验在微量滴定板(MaxiSorp, Nunc, Denmark)中进行。将终浓度为 1 mM 的显色底物 D-Ile-Pro-Arg-P-nitroanilide(S-2288, Chromogenix, Sweden)加入到在含有 0.1 M NaCl、5 mM CaCl<sub>2</sub>和 1 mg/mL 牛血清蛋白的 50 mM HEPES (pH 7.4)中的因子 VIIa(终浓度 100 nM)中。用 SpectraMax™ 340 平板读出器(Molecular Devices, USA)连续

测定 405 nm 处的吸光度。在减去不含酶的空白孔中的吸光度后，将 20 分钟温育过程中显示的吸光度用于计算因子 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 野生型因子 VIIa)。

基于上述公式，可以鉴定出具有比天然因子 VIIa 更低、相当或更高的活性的因子 VII 多肽类，例如，因子 VII 多肽的活性与天然因子 VII (野生型 FVII) 的活性之比约为 1.0 - 高于 1.0 的因子 VII 多肽类。

还可以使用浓度适当在 100-1000 nM 的生理底物，诸如因子 X (“体外蛋白水解试验”) 测定因子 VII 多肽类的活性，其中在加入合适的显色底物 (例如 S-2765) 后测定产生的因子 Xa。此外，可以在生理温度下进行活性试验。

#### 体外蛋白水解试验 (试验 2)

平行测试天然 (野生型) 因子 VIIa 和因子 VII 多肽 (下文均称作 “因子 VIIa”) 以直接比较其比活性。该试验在微量滴定板 (MaxiSorp, Nunc, Denmark) 中进行。将在含有 0.1 M NaCl、5 mM CaCl<sub>2</sub> 和 1 mg/mL 牛血清清蛋白的 100 μL 50 mM HEPES (pH 7.4) 中的因子 VIIa (10 nM) 和因子 X (0.8 μM) 保温 15 分钟。通过添加含有 0.1 M NaCl、20 mM EDTA 和 1 mg/mL 牛血清清蛋白的 50 μL 50 mM HEPES (pH 7.4) 终止因子 X 裂解。通过添加终浓度 0.5 mM 的显色底物 Z-D-Arg-Gly-Arg-P-nitroanilide (S-2765, Chromogenix, Sweden) 测定产生的因子 Xa 的量。用 SpectraMax™ 340 平板读出器 (Molecular Devices, USA) 连续测定 405 nm 处的吸光度。在减去不含 FVIIa 的空白孔中的吸光度后，将 10 分钟过程中显示的吸光度用于计算因子 VII 多肽与野生型因子 VIIa 的蛋白水解活性之比：

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

基于上述公式，可以鉴定出具有低于天然因子 VIIa 的活性、与之相当或高于其活性的因子 VII 多肽类，例如，因子 VII 多肽的活性与天然因子 VII (野生型 FVII) 的活性之比约为 1.0 - 高于 1.0 的因子 VII 多肽类。

### 凝血酶产生试验(试验 3)

还可以在一种试验(试验 3)中测定因子 VIIa 或因子 VII 多肽类产生凝血酶的能力, 该试验包括生理浓度的所有相关凝固因子和抑制剂(当模拟 A 型血友病时减去因子 VIII)和活化的血小板(如 Monroe 等(1997)在《英国血液学杂志》(Brit. J. Haematol.) 99, 542-547 的 543 页上所述, 将该文献引入本文作为参考)。

### 一步凝固试验(试验 4)

还可以使用一步凝固试验(试验 4)测定因子 VII 多肽类的生物活性。为了这一目的, 用 50 mM PIPES-缓冲液(pH 7.5), 0.1% BSA 稀释待测试样品, 并将 40  $\mu$ l 与 40  $\mu$ l 因子 VII 缺陷血浆和 80  $\mu$ l 含有 10 mM  $Ca^{2+}$ 和合成磷脂类的人重组组织因子一起保温。测定凝血时间, 并与在平行线性试验中使用参照标准品的标准曲线相比较。

### 因子 VII 多肽类的制备和纯化

优选通过 DNA 重组技术, 例如 Hagen 等在《美国国家科学院学报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 83: 2412-2416, 1986 中所述或如欧洲专利号 EP 0 200 421 (ZymoGenetics, Inc.)中所述制备适用于本发明的纯化人因子 VIIa。

还可以通过 Broze 和 Majerus 在《生物化学杂志》(J. Biol. Chem.) 255 (4): 1242-1247, 1980 和 Hedner 和 Kisiel 《临床研究杂志》(J. Clin. Invest.) 71: 1836-1841, 1983 中所述的方法生产因子 VII。这些方法产生了因子 VII 而没有可检测量的其它凝血因子。可以通过包括额外的凝胶过滤作为最终纯化步骤而获得甚至进一步纯化的因子 VII 制品。然后通过公知方式将因子 VII 转化成活化的因子 VIIa, 例如用几种不同的血浆蛋白, 诸如因子 XIIa、IX a 或 Xa。或者, 如 Bjoern 等(《研究公开》(Research Disclosure), 269, 1986 年 9 月, pp. 564-565)所述, 可以通过使因子 VII 经过离子交换色谱柱, 诸如 Mono Q<sup>®</sup> (Pharmacia fine Chemicals)等或通过溶液中自我活化来激活因子 VII。

可以通过修饰野生型因子 VII 或通过重组技术生产因子 VII-相关

多肽类。可以通过修饰编码野生型因子 VII 的核酸序列而生产与野生型因子 VII 相比具有改变的氨基酸序列的因子 VII-相关多肽类, 该核酸序列修饰可通过用公知方式, 例如通过位点特异性诱变, 改变编码天然因子 VII 的核酸中的氨基酸密码子或通过除去其中的一些氨基酸密码子来进行。

本领域技术人员显然清楚, 可以在对因子 VIIa 分子的功能而言关键的区域外进行取代, 仍然可以产生活性多肽。可以按照本领域中公知的步骤, 诸如定点诱变或丙氨酸-扫描诱变鉴定对因子 VII 多肽活性而言必需、因此优选不进行取代的氨基酸残基(例如, 参见 Cunningham 和 Wells, 1989, 《科学》(Science) 244: 1081-1085)。在后一种技术中, 在分子的每一带正电荷的残基处引入突变并测试所得突变分子的凝血活性, 即交联活性, 以鉴定对该分子活性而言关键的氨基酸残基。还可以通过用诸如核磁共振分析、结晶或光亲和标记这类技术分析三维结构来确定底物-酶相互作用位点(例如参见 de Vos 等, 1992, 《科学》(Science) 255: 306-312; Smith 等, 1992, 《分子生物学杂志》(Journal of Molecular Biology) 224: 899-904; Wlodaver 等, 1992, 《FEBS 通讯》(FEBS Letters) 309: 59-64)。

可以通过使用本领域中公知的任意方法进行定点诱变, 将突变引入核酸序列内, 以使用一种核苷酸交换另一种核苷酸。特别有用的是使用感兴趣的插入片段和两种含有所需突变的合成引物以及超螺旋双链 DNA 载体的操作。各自与该载体的相反链互补的寡核苷酸引物借助于 Pfu DNA 聚合酶在温度循环过程中延伸。在引入引物时, 将产生含有交错切口的突变质粒。在温度循环后, 用对甲基化和半-甲基化 DNA 具有特异性的 DpnI 处理产物, 以消化亲代 DNA 模板, 并选择出含有突变的合成 DNA。还可以使用本领域中公知用于生成、鉴定和分离变体的其它操作, 例如基因改组或噬菌体展示技术。

可以通过本领域中公知的任意方法将多肽从其细胞来源中分离, 包括、但不限于从粘附细胞培养物中取出含有所需产物的细胞培养基; 离心或过滤以除去未附着细胞等。

可选地，可以进一步纯化因子 VII 多肽类。可以使用本领域中公知的任意方法进行纯化，包括、但不限于：在例如抗-因子 VII 抗体柱上的亲和色谱法（例如，参见 Wakabayashi 等，《生物化学杂志》(J. Biol. Chem.) 261: 11097, 1986; 和 Thim 等，《生物化学》(Biochem.) 27: 7785, 1988); 疏水相互作用色谱法；离子交换色谱法；大小排阻色谱法；电泳法（例如制备型等电聚焦 (IEF)、差示溶解度（例如硫酸铵沉淀）或提取等。一般参见 Scopes, 《蛋白质纯化》(Protein Purification), Springer-Verlag, New York, 1982; 和《蛋白质纯化》(Protein Purification), J. C. Janson 和 Lars Ryden, 编辑, VCH Publishers, New York, 1989。在纯化后，制品中优选含有低于 10%重量，更优选低于 5%、最优选低于 1%的来源于宿主细胞的非-因子 VII 多肽类。

可以通过蛋白水解裂解，使用因子 XIIa 或具有胰蛋白酶类特异性的其它蛋白酶，例如因子 Ixa、激肽释放酶、因子 Xa 和凝血酶来活化因子 VII 多肽类。例如，参见 Osterud 等，《生物化学》(Biochem.) 11: 2853 (1972); Thomas, 美国专利 US4, 456, 591; 和 Hedner 等，《临床研究杂志》(J. Clin. Invest.) 71: 1836 (1983)。或者，可以通过使因子 VII 多肽类经过离子交换色谱柱，诸如 Mono Q<sup>®</sup> (Pharmacia) 等，或通过溶液中自我活化来激活因子 VII 多肽类。然后可以如本申请所述配制和施用所得的活化因子 VII 多肽。

下列实施例举例说明了本发明的实施。包括这些实施例仅是为了举例目的，而绝不以任何方式来限定所要求保护的本发明的范围。

### 操作实施例

#### 实施例 1 - rFVIIa 水溶液中钙的含量对重链降解的影响(自我催化裂解)

为了研究钙离子对 rFVIIa 的影响，进行如下操作：

通过用 PD-10 柱 (Amersham Biosciences) 脱盐而将 rFVIIa ( $M_w$  约 50, 000) 转入下列溶液内：

## 制品 1-1:

rFVIIa	1.0 mg/mL
PIPES-二-Na	17.32 mg/mL (50 mM)
1 M NaOH 或 1 M HCl	加入至 pH 6.5
Ca <sup>2+</sup> /FVII 比值	0

## 制品 1-2:

rFVIIa	1.0 mg/mL
氯化钙 2 H <sub>2</sub> O	1.47 mg/mL (10 mM)
氯化钠	2.92 mg/mL (50 mM)
甘氨酸甘氨酸	1.32 mg/mL (10 mM)
乙酸钠	0.82 mg/mL (10 mM)
组氨酸	1.55 mg/mL (10 mM)
1 M NaOH 或 1 M HCl	加入至 pH 6.5
Ca <sup>2+</sup> /FVII 比值	500

将制品分别储存在 5°C 或 25°C 温度下，并在表 1 中所示时间进行分析。

表 1 - rFVIIa 制品中重链降解产物的含量 (%)

	T = 0	T = 1 个月	T = 2 个月	T = 3 个月
制品 1-1, 5°C	9.6	9.8	9.8	10.6
制品 1-2, 5°C	10.2	17.0	23.8	30.4
制品 1-1, 25°C	9.6	9.7	9.7	10.3
制品 1-2, 30°C	10.2	18.5	23.5	n. d.

正如可以从表 1 中观察到的，重链降解产物在制品 1-2 中的含量增加远高于它在制品 1-1 中的含量增加。

如下所述通过 RP-HPLC 测定重链降解产物的含量:



使用享有产权的具有 5  $\mu\text{m}$  颗粒大小和 300 $\text{\AA}$  孔径的 4.5x250 mm 丁基键合型二氧化硅柱进行反相 HPLC。柱温: 70 $^{\circ}\text{C}$ 。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。用从 X 到 (X+13)% B 的线性梯度在 30 分钟内洗脱该柱。调整 X, 使得 FVIIa 洗脱物以保留时间约 26 分钟洗脱。流速: 1.0 mL/分钟。检测: 214 nm。上样量: 25  $\mu\text{g}$  FVIIa。

### 实施例 2 - rFVIIa 水溶液中钙和二价金属离子含量对重链降解的影响 (自我催化裂解)

为了研究钙离子和二价金属离子对 rFVIIa 的影响, 进行如下操作:

通过用 PD-10 柱 (Amersham Biosciences) 脱盐而将 rFVIIa 转入下列溶液中:

所有制品 (2-1 - 2-8) 包括

rFVIIa	1.0 mg/mL
氯化钙 2 H <sub>2</sub> O	1.47 mg/mL (10 mM)
氯化钠	2.92 mg/mL (50 mM)
甘氨酸甘氨酸	1.32 mg/mL (10 mM)
组氨酸	1.55 mg/mL (10 mM)
1 M NaOH 或 1 M HCl	加入至 pH 6.5

其中进一步包括如表 2 中所示的苄脒和 EDTA

表 2

制品号	苄脒 (mM)	EDTA (mM)	未配位的钙离子 (mM)	Ca <sup>2+</sup> /rFVII 比值
2-1	10	0	约 10	500
2-2	10	9.9	约 0.1	5
2-3	10	15	约 0.0	0.0
2-4	1	0	约 10	500
2-5	1	9.9	约 0.1	5
2.6	1	15	约 0.0	0.0
2.7	0	0	约 10	500

将所述制品储存在 5°C 温度下，并在表 3 中所示时间进行分析。

表 3 -rFVIIa 制品中重链降解产物的含量 (%)

	T=0	T=2 周	T=3 周	T=4 周	T=8 周
制品 2-1	7.2	8.0	8.9	-	9.9
制品 2-2	7.3	7.5	7.8	-	8.2
制品 2-3	7.3	7.3	7.6	-	7.9
制品 2-4	7.5	10.7	12.8	-	19.3
制品 2-5	7.4	8.2	8.7	-	10.3
制品 2-6	7.2	7.7	8.1	-	8.7
制品 2-7	8.1	-	-	16.3	-

正如可以从表 2 中观察到的，未配位的钙离子的含量对 rFVII 的重链降解具有显著影响。结果还表明稳定剂(苜蓿)在未配位的钙离子浓度降低时是更有效的稳定剂。因此，估计可以在苜蓿浓度和未配位的钙离子浓度同时降低时获得几乎相同的稳定性(比较制品 2-3 与 2-6)。

如实施例 1 中所述通过 RP-HPLC 测定重链降解产物的含量。