



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114903978 A

(43) 申请公布日 2022.08.16

(21) 申请号 202210473373.5

A61K 47/54 (2017.01)

(22) 申请日 2019.07.02

A61K 47/18 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 9/08 (2006.01)

62/693,847 2018.07.03 US

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201980055755.2 2019.07.02

(71) 申请人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 T·帕姆 M·霍斯萨维

S·帕特克

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 47/60 (2017.01)

权利要求书1页 说明书64页

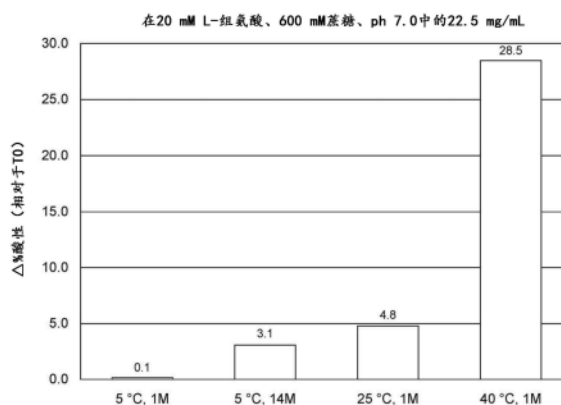
序列表3页 附图9页

(54) 发明名称

FGF-21配制品

(57) 摘要

本申请提供了药物配制品,所述药物配制品包含FGF-21多肽,例如修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21,以及一种或多种稳定剂如螯合剂DPTA。所述配制品可以通过包括表面活性剂如聚山梨醇酯80和/或将pH调节至约7.1来进一步稳定化。还提供了制造方法、治疗方法和试剂盒。



1. 一种药物配制品,所述药物配制品包含聚乙二醇化的成纤维细胞生长因子21 (FGF-21) 多肽和氨基多羧酸阳离子螯合剂,其中所述氨基多羧酸阳离子螯合剂包括二乙烯三胺五乙酸 (DTPA)。
2. 根据权利要求1所述的药物配制品,其中所述聚乙二醇化的FGF-21多肽包含SEQ ID NO:2中所示的序列 (PEG-FGF-21)。
3. 根据权利要求1所述的药物配制品,其中所述聚乙二醇化的FGF-21多肽以约1mg/ml和约40mg/ml之间的浓度存在。
4. 根据权利要求3所述的药物配制品,其中所述聚乙二醇化的FGF-21多肽以约10mg/ml或约20mg/ml的浓度存在。
5. 根据权利要求1所述的药物配制品,其中DTPA以约25 μ M和约75 μ M之间DTPA的量存在。
6. 根据权利要求5所述的药物配制品,其中DTPA以约50 μ M的量存在。
7. 根据权利要求1所述的药物配制品,其中所述pH在约6.7和约7.5之间。
8. 根据权利要求1所述的药物配制品,其进一步包含:
 - (a) 氨基酸缓冲剂;
 - (b) 渗透调节剂;
 - (c) 非阴离子表面活性剂;或
 - (d) 其组合。
9. 根据权利要求8所述的药物配制品,其中所述氨基酸缓冲剂包含组氨酸。
10. 根据权利要求9所述的药物配制品,其中所述组氨酸缓冲剂以约10mM至约100mM组氨酸的量存在。

FGF-21配制品

本申请是申请日为2019800557552的中国专利申请(申请日:2019年7月2日,发明名称:FGF-21配制品)的分案申请。

对经由EFS-WEB电子提交的序列表的引用

[0001] 随本申请提交的电子提交的序列表(名称:3338_133PC01_Se qListing.txt;大小:5,532字节;以及创建日期:2019年6月26日)的内容通过引用以其整体并入本文。

背景

技术领域

[0002] 本申请尤其涉及包含FGF-21多肽例如修饰的FGF-21多肽的配置品,所述配制品使用螯合剂(例如,DTPA)、表面活性剂(例如,PS80)稳定化,并且具有特定pH范围(例如,约7.1),所述配制品用于经由各种途径施用,包括例如皮下施用。

背景技术

[0003] 成纤维细胞生长因子(FGF)是在发育和成人组织中广泛表达的多肽(Baird等人,Cancer Cells,3:239-243,1991),所述多肽在多种生理功能中起关键作用(McKeehan等人,Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.59:135-176,1998;Burgess,W.H.等人,Annu.Rev.Biochem.58:575-606(1989)。根据文献,FGF家族由至少22个成员组成(Reuss等人,Cell Tissue Res.313:139-157(2003))。

[0004] FGF-21可用于治疗与纤维化相关的疾病和病症。“纤维化”是器官或组织中过量纤维结缔组织的形成。纤维组织的过量沉积与可能导致器官或组织功能受损的病理状况相关。受影响的器官可以包括肺(肺(lung)或肺部(pulmonary)纤维化)、肝脏(肝脏(liver)或肝(hepatic)纤维化)、肾脏(肾脏(kidney)或肾(renal)纤维化)和心脏(heart)(心脏性(cardiac)纤维化)。纤维化还可影响其他组织和器官,包括关节、皮肤、肠道、骨髓等。示例性纤维化病症或疾病包括但不限于影响肝脏的非酒精性脂肪性肝炎(NASH);影响肾脏的糖尿病肾脏疾病和糖尿病肾病;和影响心脏的代谢性心力衰竭。例如,NASH的特征是极少饮酒或不饮酒的人的肝脏中的脂肪堆积、炎症和损伤,并且所述疾病可导致肝硬化。NASH往往在超重或肥胖的中年人中诊断出,所述中年人常常具有升高的某些脂质的血液水平和糖尿病或前驱糖尿病。

[0005] 已经报道FGF-21具有在体内经受蛋白水解、在体外形成聚集体、并且经受脱酰胺化的倾向(Gimeno和Moller,Trends Endocrinol Metab.2014年6月;25(6):303-11;美国专利号8,361,963;Hecht等人,PLoS One.2012;7(11):e49345;美国专利公开号2007/0293430;WO 2006/0065582),从而潜在地限制了含有FGF-21的药物组合物的储存期限。治疗性多肽的聚集体和脱酰胺形式可能潜在地增加免疫原性(参见U.S.Department of Health and Human Services,“Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products,”2014年8月;Subramanyam(编辑),“Therapeutic Protein Immunogenicity Focus Group Newsletter,”American Association of Pharmaceutical Scientists,第1

卷,第3期(2011年12月))。

[0006] 本公开文本尤其解决了对药物配制品的需要,所述药物配制品解决与包含FGF-21多肽、且特别是修饰的FGF-21多肽的药物配制品的生产相关的问题。

发明内容

[0007] 本公开文本提供了药物配制品,所述药物配制品包含成纤维细胞生长因子21(FGF-21)多肽,例如修饰的FGF-21多肽,以及氨基多羧酸阳离子螯合剂,如二乙烯三胺五乙酸(也称为喷替酸或DTPA),其中所述配制品与不含有所述氨基多羧酸阳离子螯合剂的参考配制品相比具有改善的稳定性。这些药物配制品相对于本领域已知的替代性配制品展现出一种或多种增强作用,例如,例如当40℃下储存约一个月时的较低的脱酰胺化速率,和/或当例如在40℃下储存约一个月时的较低的高分子量(HMW)聚集速率。

[0008] 所公开的配制品中氨基多羧酸阳离子螯合剂的存在还缓和FGF-21多肽氧化、且特别是甲硫氨酸氧化。例如,配制品中DTPA的存在可以缓和或防止在25℃和/或40℃下对应于SEQ ID NO:3的氨基酸1和/或氨基酸169的一个或多个FGF-21甲硫氨酸(或SEQ ID NO:1和2中的相应甲硫氨酸)的氧化。

[0009] 在一些方面,所述DTPA阳离子螯合剂的存在量在约10μM与约100μM DTPA之间、在约20μM与约90μM DTPA之间、在约30μM与约80μM DTPA之间、在约25μM与约75μM DTPA之间、在约40μM与约60μM DTPA之间、在约30μM与约70μM DTPA之间、或在约40μM与约70μM DTPA之间。在其他方面,所述DTPA阳离子螯合剂的存在量为约40μM、约45μM、约50μM、约55μM、或约60μM DTPA。

[0010] 在本文公开的药物配制品的一些方面,所述配制品的pH高于6.5、高于6.6、高于6.7、高于6.8、高于6.9、高于7.0、高于7.1、高于7.2、高于7.3、高于7.4或高于7.5。

[0011] 在一些实施方案中,所述pH在约6.7与约7.5之间、在约6.8与约7.5之间、在约6.9与约7.4之间、在约7.0与约7.3之间、在约7.1与7.2之间、在约7.1与约7.3之间、在约7.1与约7.4之间或在约7.1与约7.5之间。在一些方面,所述pH是约6.7、约6.8、约6.9、约7.0、约7.1、约7.2、约7.3、约7.4或约7.5。在一些方面,所述药物配制品比pH为6.5的参考配制品更稳定。

[0012] 在一些方面,本文公开的药物配制品进一步包含表面活性剂,例如非离子表面活性剂。在一些方面,所述非阴离子表面活性剂是聚山梨醇酯,例如聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯(聚山梨醇酯80)。在一些方面,所述聚山梨醇酯80表面活性剂的存在量为约0.01%至约0.1%(w/v)、约0.02%至约0.09%(w/v)、约0.03%至约0.08%(w/v)、约0.04%至约0.07%(w/v)或约0.05%至约0.06%(w/v)。

[0013] 在一些方面,所述聚山梨醇酯80表面活性剂的存在量为至少约0.01%(w/v)、至少约0.02%(w/v)、至少约0.03%(w/v)、至少约0.04%(w/v)、至少约0.05%(w/v)、至少约0.06%(w/v)、至少约0.07%(w/v)、至少约0.08%(w/v)、至少约0.09%(w/v)或至少约0.1%(w/v)。在一些方面,例如当在振荡器上搅拌时,所述表面活性剂缓和微粒和/或空气泡形成。

[0014] 在一些方面,本文公开的药物配制品进一步包含氨基酸缓冲剂,例如组氨酸。在一些方面,所述组氨酸缓冲剂的存在量为约10mM至约100mM组氨酸、约20mM至约90mM组氨酸、

约30mM至约80mM组氨酸、约40mM至约70mM组氨酸、约10mM至约30mM组氨酸、约15mM至约25mM组氨酸、约17.5至约22.5组氨酸或约40mM至约60mM组氨酸。在一些方面,所述组氨酸缓冲剂的存在量为约10mM组氨酸、约15mM组氨酸、约20mM组氨酸、约25mM组氨酸、约30mM组氨酸、约35mM组氨酸、约40mM组氨酸、约45mM组氨酸或约50mM组氨酸。

[0015] 在一些方面,本文公开的药物配制品进一步包含渗透调节剂,例如糖。在一些方面,所述糖是蔗糖。在一些方面,所述蔗糖渗透调节剂的存在量为约100mM至约1M蔗糖、约200mM至约900mM蔗糖、约300mM至约800mM蔗糖、约400mM至约700mM蔗糖或约500mM至约600mM蔗糖。在一些方面,所述蔗糖渗透调节剂的存在量为约100mM蔗糖、约200mM蔗糖、约300mM蔗糖、约400mM蔗糖、约500mM蔗糖、约600mM蔗糖、约700mM蔗糖、约800mM蔗糖、约900mM蔗糖或约1M蔗糖。

[0016] 在本文公开的药物配制品的一些方面,所述FGF-21多肽包含修饰的FGF-21多肽、由其组成或基本上由其组成。在一些方面,所述修饰的FGF-21多肽包括与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%氨基酸序列同一性的多肽,其中所述多肽具有FGF-21活性。

[0017] 在一些方面,将所述修饰的FGF-21多肽连接至半衰期延长部分。在一些方面,将所述修饰的FGF-21多肽经由所述FGF-21多肽的序列中非天然编码氨基的侧链连接至所述半衰期延长部分。在一些方面,所述半衰期延长部分包括白蛋白、免疫球蛋白恒定区或其部分、免疫球蛋白结合多肽、免疫球蛋白G(IgG)、白蛋白结合多肽(ABP)、PAS化部分、HES化部分、XTEN、Fc区及其任何组合。在一些方面,所述半衰期延长部分包括水溶性聚合物。在一些方面,所述水溶性聚合物是聚乙二醇(PEG)。在一些方面,所述PEG具有约10kDa与约40kDa之间的平均分子量。在一些方面,所述PEG具有约30kDa的平均分子量。

[0018] 在本文公开的配制品的一些方面,所述非天然编码氨基酸是苯丙氨酸衍生物。在一些方面,所述苯丙氨酸衍生物是对乙酰基-L-苯丙氨酸。在一些方面,所述半衰期延长部分经由肽键连接至所述非天然编码氨基酸。在一些方面,所述非天然编码氨基酸替代SEQ ID NO:3的氨基酸谷氨酰胺109。

[0019] 在本文公开的配制品的一些方面,所述FGF-21多肽的存在浓度在约1mg/ml与约40mg/ml之间。在一些方面,所述FGF-21多肽的存在浓度为约10mg/ml或约20mg/ml。在一些方面,所述FGF-21多肽的存在量在约1mg/剂量与约40mg/剂量之间。在一些方面,所述FGF-21多肽的存在量为约1mg/剂量、约5mg/剂量、约10mg/剂量、约20mg/剂量或约40mg/剂量。

[0020] 在一些方面,所述配制品被配制用于皮下施用。在一些方面,所述配制品被配制用于使用安全性注射器的皮下施用。在一些方面,所述配制品被配制用于每日或每周施用。在一些方面,所述配制品是水性配制品。在本文公开的配制品的一些方面,所述FGF-21多肽是PEG-FGF-21(SEQ ID NO:2)。

[0021] 本公开文本提供了药物配制品,所述药物配制品包含(i) FGF-21多肽;(ii) 浓度在约10mM与约50mM之间的组氨酸;(iii) 浓度在约100mM与约1M之间的蔗糖;(iv) 浓度在约0.01%与约0.1%(w/v)之间的聚山梨醇酯80;以及(v) 浓度在约10 μ M与约100 μ M之间的DTPA;其中所述配制品的pH在约6.7与约7.5之间。

[0022] 本公开文本还提供了药物配制品,所述药物配制品包含(i) FGF-21多肽;(ii) 浓度为约20mM的组氨酸;(iii) 浓度为约600mM的蔗糖;(iv) 浓度为约0.05%(w/v)的聚山梨醇酯

80; 以及 (v) 浓度为约50 μ M的DTPA; 其中所述pH是约7.1。还提供了药物配制品, 所述药物配制品包含 (i) FGF-21多肽; (ii) 浓度为20mM的组氨酸; (iii) 浓度为600mM的蔗糖; (iv) 浓度为0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80; 以及 (v) 浓度为50 μ M的DTPA; 其中所述pH是7.1。

[0023] 本公开文本还提供了药物配制品, 所述药物配制品包含 (i) FGF-21多肽; (ii) 浓度为约20mM的组氨酸; 以及 (iii) 浓度为约600mM的蔗糖; 其中所述pH是约7.0。还提供了药物配制品, 所述药物配制品包含 (i) FGF-21多肽; (ii) 浓度为20mM的组氨酸; 以及 (iii) 浓度为600mM的蔗糖; 其中所述pH是7.0。

[0024] 还提供了药物配制品, 所述药物配制品包含 (i) 浓度为约10mg/mL的PEG-FGF-21; (ii) 浓度为约20mM的组氨酸; (iii) 浓度为约600mM的蔗糖; (iv) 浓度为约0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80; 以及 (v) 浓度为约50 μ M的DTPA; 其中所述pH是约7.1。

[0025] 还提供了药物配制品, 所述药物配制品包含 (i) 浓度为约20mg/mL的PEG-FGF-21; (ii) 浓度为约20mM的组氨酸; (iii) 浓度为约600mM的蔗糖; (iv) 浓度为约0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80; 以及 (v) 浓度为约50 μ M的DTPA; 其中所述pH是约7.1。

[0026] 还提供了药物配制品, 所述药物配制品包含 (i) 浓度为10mg/mL的PEG-FGF-21; (ii) 浓度为20mM的组氨酸; (iii) 浓度为600mM的蔗糖; (iv) 浓度为0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80; 以及 (v) 浓度为50 μ M的DTPA; 其中所述pH是7.1。

[0027] 还提供了药物配制品, 所述药物配制品包含 (i) 浓度为20mg/mL的PEG-FGF21; (ii) 浓度为20mM的组氨酸; (iii) 浓度为600mM的蔗糖; (iv) 浓度为0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80; 以及 (v) 浓度为50 μ M的DTPA; 其中所述pH是7.1。

[0028] 本公开文本还提供了用于改善包含FGF-21多肽的药物配制品的稳定性的方法, 所述方法包括掺和氨基多羧酸阳离子螯合剂, 其中所述配制品与不含有所述氨基多羧酸阳离子螯合剂的参考配制品相比具有改善的稳定性。在一方面, 所述稳定性的改善包括 (i) 物理稳定性的增加, (ii) 化学稳定性的增加, 或 (iii) 其组合。在一方面, 所述物理稳定性的增加包括 (i) 防止或减少多肽聚集, (ii) 防止或减少多肽片段化, 或 (iii) 其组合。在一些方面, 所述化学稳定性的增加包括 (i) 防止或减少脱酰胺化, (ii) 防止或减少氧化, 或 (iii) 其组合。在一些方面, 所述稳定性的改善包括以下中的一项或多项:

(a) 相对于所述参考配制品, 当在40 $^{\circ}$ C下储存约一个月时较低的脱酰胺化速率;

(b) 相对于所述参考配制品, 当在40 $^{\circ}$ C下储存约一个月时较低的高分子量 (HMW) 聚集速率; 或者

(c) (a) 和 (b) 两者。

[0029] 在本文公开的用于改善药物配制品的稳定性的方法的一些方面, 所述氨基多羧酸阳离子螯合剂缓和在25 $^{\circ}$ C和/或40 $^{\circ}$ C下对应于SEQ ID NO:3的氨基酸1和/或氨基酸169的一个或多个甲硫氨酸 (或SEQ ID:1或SEQ ID NO:2或其他修饰的FGF-21多肽中的相应甲硫氨酸) 的氧化。在一些方面, 所述氨基多羧酸阳离子螯合剂是DTPA。在一些方面, 所述DTPA阳离子螯合剂的存在量在约10 μ M与约100 μ M DTPA之间、在约20 μ M与约90 μ M DTPA之间、在约25 μ M与约75 μ M DTPA之间、在约40 μ M与约60 μ M DTPA之间、在约30 μ M与约70 μ M DTPA之间、在约30 μ M与约80 μ M DTPA之间、或在约40 μ M与约70 μ M DTPA之间。在一些方面, 所述DTPA阳离子螯合剂的存在量为约40 μ M、约45 μ M、约50 μ M、约55 μ M、或约60 μ M DTPA。

[0030] 在一些方面, 本文公开的用于改善药物配制品的稳定性的方法进一步包括将所述

配制品的pH调整为高于6.5、高于6.6、高于6.7、高于6.8、高于6.9或高于7.0。在一些实施方案中,将所述pH调整至在约6.8与约7.5之间、或约6.9与约7.4之间、或约7.0与约7.3之间、或约7.1与7.2之间、或约7.1与约7.3之间、或约7.1与约7.4之间或约7.1与约7.5之间的pH值。在一些方面,所述调整过的pH是约6.8、约6.9、约7.0、约7.1、约7.2、约7.3、约7.4或约7.5。在一些方面,所述pH调整过的配制品比pH为6.5的参考配制品(即,具有相同浓度下的相同组分但具有不同pH的配制品)更稳定。

[0031] 在一些方面,本文公开的用于改善药物配制品的稳定性的方法进一步包括掺和表面活性剂。在一些方面,所述表面活性剂是非离子表面活性剂,例如聚山梨醇酯。在一些方面,所述聚山梨醇酯是聚山梨醇酯80。在一些方面,所述聚山梨醇酯80表面活性剂的掺和量为约0.01%至约0.1% (w/v)、约0.02%至约0.09% (w/v)、约0.03%至约0.08% (w/v)、约0.04%至约0.07% (w/v) 或约0.05%至约0.06% (w/v)。在一些方面,所述聚山梨醇酯80表面活性剂的掺和量为至少约0.01% (w/v)、至少约0.02% (w/v)、至少约0.03% (w/v)、至少约0.04% (w/v)、至少约0.05% (w/v)、至少约0.06% (w/v)、至少约0.07% (w/v)、至少约0.08% (w/v)、至少约0.09% (w/v) 或至少约0.1% (w/v)。在一些方面,当所述配制品例如在振荡器上搅拌时,所述表面活性剂缓和微粒和/或空气泡形成。

[0032] 在一些方面,本文公开的用于改善药物配制品的稳定性的方法进一步包括掺和氨基酸缓冲剂,例如组氨酸。在一些方面,所述组氨酸缓冲剂的掺和量为约10mM至约100mM组氨酸、约20mM至约90mM组氨酸、约30mM至约80mM组氨酸、约40mM至约70mM组氨酸、约10mM至约30mM组氨酸、约15mM至约25mM组氨酸、约17.5mM至约22.5组氨酸或约40mM至约60mM组氨酸。在一些方面,所述组氨酸缓冲剂的掺和量为约10mM组氨酸、约15mM组氨酸、约20mM组氨酸、约25mM组氨酸、约30mM组氨酸、约35mM组氨酸、约40mM组氨酸、约45mM组氨酸或约50mM组氨酸。

[0033] 在一些方面,本文公开的用于改善药物配制品的稳定性的方法进一步包括掺和渗透调节剂,例如糖。在一些方面,所述糖是蔗糖。在一些方面,所述蔗糖渗透调节剂的掺和量为约100mM至约1M蔗糖、约200mM至约900mM蔗糖、约300mM至约800mM蔗糖、约400mM至约700mM蔗糖或约500mM至约600mM蔗糖。在一些方面,所述蔗糖渗透调节剂的掺和量为约100mM蔗糖、约200mM蔗糖、约300mM蔗糖、约400mM蔗糖、约500mM蔗糖、约600mM蔗糖、约700mM蔗糖、约800mM蔗糖、约900mM蔗糖或约1M蔗糖。

[0034] 在本文公开的用于改善药物配制品的稳定性的方法的一些方面,所述FGF-21多肽是修饰的FGF-21多肽。在一些方面,所述修饰的FGF-21多肽包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%氨基酸序列同一性的FGF-21多肽序列,其中所述多肽具有FGF-21活性。在一些方面,将所述修饰的FGF-21多肽连接至半衰期延长部分。在一些方面,将修饰的FGF-21多肽经由所述FGF-21多肽的序列中非天然编码氨基的侧链连接至所述半衰期延长部分。

[0035] 在一些方面,所述半衰期延长部分包括例如白蛋白、免疫球蛋白恒定区或其部分、免疫球蛋白结合多肽、IgG、ABP、PAS化部分、HES化部分、XTEN、Fc区及其任何组合。在一些方面,所述半衰期延长部分包括水溶性聚合物。在一些方面,所述水溶性聚合物是PEG。在一些方面,所述PEG具有约10kDa与约40kDa之间的平均分子量。在一些方面,所述PEG具有约

30kDa的平均分子量。在一些方面,所述非天然编码氨基酸是苯丙氨酸衍生物。在一些方面,所述苯丙氨酸衍生物是对乙酰基-L-苯丙氨酸。在一些方面,所述半衰期延长部分经由肽键连接至所述非天然编码氨基酸。在一些方面,所述非天然编码氨基酸替代SEQ ID NO:3的氨基酸谷氨酰胺109。在一些方面,所述FGF-21多肽的存在浓度在约1mg/ml与约40mg/ml之间。在一些方面,所述FGF-21多肽的存在浓度为约10mg/ml或约20mg/ml。在一些方面,所述配制品是水性配制品。在本文公开的方法的一些方面,所述FGF-21多肽是PEG-FGF-21 (SEQ ID NO:2)。

[0036] 本公开文本还提供了用于改善包含FGF-21多肽的配制品的稳定性的方法,其中所述方法包括掺和(i)浓度在约10mM与约50mM之间的组氨酸;(ii)浓度在约100mM与约1M之间的蔗糖;(iii)浓度在约0.01%与约0.1% (w/v) 之间的聚山梨醇酯80;以及(iv)浓度在约10 μ M与约100 μ M之间的DTPA;其中所述配制品的pH在约6.7与约7.5之间。还提供了用于改善包含FGF-21多肽的配制品的稳定性的方法,其中所述方法包括掺和(i)浓度为约20mM的组氨酸;(ii)浓度为约600mM的蔗糖;(iii)浓度为约0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80;以及(iv)浓度为约50 μ M的DTPA;其中所述pH是约7.1。还提供了用于改善包含FGF-21多肽的配制品的稳定性的方法,其中所述方法包括掺和(i)浓度为20mM的组氨酸;(ii)浓度为600mM的蔗糖;(iii)浓度为0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80;以及(iv)浓度为50 μ M的DTPA;其中所述pH是7.1。

[0037] 本公开文本还提供了用于改善包含FGF-21多肽的配制品的稳定性的方法,其中所述方法包括掺和(i)浓度为约20mM的组氨酸;(ii)浓度为约600mM的蔗糖;其中所述pH是约7.0。本公开文本还提供了用于改善包含FGF-21多肽的配制品的稳定性的方法,其中所述方法包括掺和(i)浓度为20mM的组氨酸;(ii)浓度为600mM的蔗糖;其中所述pH是7.0。还提供了用于改善包含浓度为约10mg/mL的PEG-FGF-21的配制品的稳定性的方法,其中所述方法包括掺和(i)浓度为约20mM的组氨酸;(ii)浓度为约600mM的蔗糖;(iii)浓度为约0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80;以及(iv)浓度为约50 μ M的DTPA;其中所述pH是约7.1。

[0038] 本公开文本还提供了用于改善包含浓度为约20mg/mL的PEG-FGF-21的配制品的稳定性的方法,其中所述方法包括掺和(i)浓度为约20mM的组氨酸;(ii)浓度为约600mM的蔗糖;(iii)浓度为约0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80;以及(iv)浓度为约50 μ M的DTPA;其中所述pH是约7.1。还提供了用于改善包含浓度为约10mg/mL的PEG-FGF-21的配制品的稳定性的方法,其中所述方法包括掺和(i)浓度为20mM的组氨酸;(ii)浓度为600mM的蔗糖;(iii)浓度为0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80;以及(iv)浓度为50 μ M的DTPA;其中所述pH是7.1。

[0039] 还提供了用于改善包含浓度为约20mg/mL的PEG-FGF-21的配制品的稳定性的方法,其中所述方法包括掺和(i)浓度为20mM的组氨酸;(ii)浓度为600mM的蔗糖;(iii)浓度为0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80;以及(iv)浓度为50 μ M的DTPA;其中所述pH是7.1。

[0040] 本公开文本还提供了根据本文公开的用于改善包含FGF-21 (例如,修饰的FGF-21如PEG-FGF-21) 的配制品的稳定性的任何方法制备的药物配制品。还提供了试剂盒,所述试剂盒包含(i)本文公开的包含FGF-21 (例如,修饰的FGF-21如PEG-FGF-21) 的药物配制品,和(ii)使用说明。

[0041] 本公开文本还提供了在有需要的受试者中治疗或预防与纤维化和/或糖尿病相关的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文公开的包含FGF-21

(例如,修饰的FGF-21如PEG-FGF-21)的药物配制品。在一些方面,所述疾病或病症是糖尿病。在一些方面,所述糖尿病是2型糖尿病。在一些方面,所述疾病或病症是非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。在一些方面,向所述受试者施用有效量的本文公开的包含FGF-21(例如,修饰的FGF-21如PEG-FGF-21)的药物配制品降低肝脏硬度、降低体脂百分比、降低体重、降低肝脏与体重比、降低肝脏脂质含量、降低肝脏纤维化面积、降低空腹血糖水平、降低空腹甘油三酯水平、降低LDL胆固醇水平、降低ApoB水平、降低ApoC水平、增加HDL胆固醇或其任何组合。在一些方面,每剂量施用约1mg与约40mg之间的FGF-21多肽。在一些方面,每剂量施用约1mg、约5mg、约10mg、约20mg或约40mg的FGF-21多肽。在一些方面,所述药物配制品是皮下施用的。在一些方面,所述药物配制品是使用安全性注射器皮下施用的。在一些方面,所述药物配制品是每日或每周施用的。

[0042] 在一些方面,与未治疗的受试者中的水平或与施用所述药物配制品之前的受试者相比,根据本文公开的治疗方法向所述受试者施用本文公开的包含FGF-21(例如,修饰的FGF-21如PEG-FGF-21)的药物配制品导致(i)肝脏脂肪水平的降低;(ii)肝脏损伤水平的降低;(iii)纤维化水平的降低;(iv)纤维化生物标志物血清Pro-C3(N末端III型胶原前肽)水平的降低;(v)丙氨酸转氨酶(ALT)水平的降低;(vi)天冬氨酸转氨酶(AST)水平的降低;(vii)血清脂联素水平的增加;(viii)血浆LDL水平的降低、血浆HDL水平的增加;(ix)血浆甘油三酯水平的降低;(x)肝脏硬度水平的降低;或(xi)其任何组合。

[0043] 在一些方面,所述药物配制品通过以下过程制得:掺和(i)实现约10mg/mL最终浓度的量的PEG-FGF-21;(ii)实现约20mM最终浓度的量的组氨酸;(iii)实现约600mM最终浓度的量的蔗糖;(iv)实现约0.05%(w/v)最终浓度的量的聚山梨醇酯80;以及(v)实现约50uM最终浓度的量的DTPA;以及将pH调整为约7.1。

[0044] 在一些方面,所述药物配制品通过以下过程制得:掺和(i)实现约20mg/mL最终浓度的量的PEG-FGF-21;(ii)实现约20mM最终浓度的量的组氨酸;(iii)实现约600mM最终浓度的量的蔗糖;(iv)实现约0.05%(w/v)最终浓度的量的聚山梨醇酯80;以及(v)实现约50uM最终浓度的量的DTPA;以及将pH调整为约7.1。

[0045] 在一些方面,所述药物配制品通过以下过程制得:掺和(i)实现10mg/mL最终浓度的量的PEG-FGF-21;(ii)实现20mM最终浓度的量的组氨酸;(iii)实现600mM最终浓度的量的蔗糖;(iv)实现0.05%(w/v)最终浓度的量的聚山梨醇酯80;以及(v)实现50uM最终浓度的量的DTPA;以及将pH调整为7.1。

[0046] 在一些方面,所述药物配制品通过以下过程制得:掺和(i)实现20mg/mL最终浓度的量的PEG-FGF-21;(ii)实现20mM最终浓度的量的组氨酸;(iii)实现600mM最终浓度的量的蔗糖;(iv)实现0.05%(w/v)最终浓度的量的聚山梨醇酯80;以及(v)实现50uM最终浓度的量的DTPA;以及将pH调整为7.1。

附图说明

[0047] 图1A和图1B示出了PEG-FGF-21的脱酰胺化随配制品组成而变化。图1A示出了在没有喷替酸(DTPA)或聚山梨醇酯80的配制品中的脱酰胺化。图1B示出了在包含喷替酸(DTPA)和聚山梨醇酯80的配制品中的脱酰胺化。

[0048] 图2A和图2B示出了在存在和不存在50μM DTPA(也称为喷替酸)的情况下,金属催

化的PEG-FGF-21多肽在甲硫氨酸1(图2A)和甲硫氨酸169(图2B)上的氧化。

[0049] 图3A和图3B示出了pH对PEG-FGF-21聚集的影响。图3A示出了聚集随时间、pH和所用缓冲体系而变化。图3B示出了在不同温度和时间(5℃,14个月;25℃,1个月;40℃,1天)以及不同pH值下的聚集。

[0050] 图4A和图4B示出了PEG-FGF-21的聚集随配制品组成而变化。图4A示出了在没有喷替酸(DTPA)或聚山梨醇酯80的配制品中的聚集。图4B示出了在具有喷替酸(DTPA)和聚山梨醇酯80的配制品中的聚集。

[0051] 图5显示在300rpm轨道式振荡器24h(左)或腕式振荡器6h(右)后,没有PS80的较高浓度的PEG-FGF-21变浑浊。添加在0.01%与0.1%(w/v)之间的聚山梨醇酯80降低样品的浊度。

具体实施方式

[0052] 本公开文本提供了稳定化的药物配制品,所述药物配制品包含成纤维细胞生长因子21(FGF-21)多肽,例如修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21(SEQ ID NO:2)。已经观察到氨基多羧酸阳离子螯合剂如DTPA的存在缓和FGF-21多肽中一个或多个氨基酸残基,例如甲硫氨酸的氧化。将DTPA并入在FGF-21配制品中还降低了FGF-21多肽在储存期间的脱酰胺化速率,并且还降低了储存期间的高分子量聚集速率。可以通过将配制品的pH调整至7.1来实现进一步的稳定化。另外,可以通过添加表面活性剂如聚山梨醇酯80来进一步稳定化配制品。

[0053] 本公开文本还提供了制造所公开的配制品的方法,以及通过应用所公开的方法产生的配制品。还提供了治疗或预防与纤维化相关的疾病,例如NASH和糖尿病的方法,所述方法包括将所公开的稳定化配制品施用至有需要的受试者。

定义

[0054] 为了更容易地理解本公开文本,首先定义某些术语。如本申请中所使用的,除非本文另外明确规定,否则以下术语中的每一个应具有下文所述的含义。另外的定义在整个申请中阐述。

[0055] 本公开文本包括如下方面,在所述方面中,组中的恰好一个成员存在于、被用于或以其他方式关联于给定的产品或过程。本公开文本包括如下方面,在所述方面中,多于一个或所有的组成员存在于、被用于或以其他方式关联于给定的产品或过程。

[0056] 除非上下文另外清楚地说明,否则单数形式“一个/一种(a/an)”以及“所述(the)”包括复数引用。术语“一个/一种(a或an)”以及术语“一个/一种或多个/多种(one or more)”和“至少一个/至少一种(at least one)”可以在本文中互换使用。在某些方面,术语“一个/一种(a或an)”意指“单一”。在其他方面,术语“一个/一种(a或an)”包括“两个/两种或更多个/更多种(two or more)”或“多个/多种(multiple)”。因此,例如,提及“FGF-21”或“FGF-21多肽”是提及一种或多种此类蛋白质,并且包括本领域普通技术人员已知的其等同物,等等。

[0057] 此外,本文使用的“和/或”被视为两个指定特征或组分中的每一个与或不与其他特征或组分的特定公开。因此,如在本文短语如“A和/或B”中使用的术语“和/或”旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)和“B”(单独)。同样地,如在短语如“A、B和/或C”中使用的术语“和/或”旨在涵盖以下方面中的每一个:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和

C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

[0058] 如本文所用的术语“约”是指在本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成,其部分取决于如何测量或确定所述值或组成,即测量系统的局限性。例如,根据本领域的实践,“约”可以意指在1个或多于1个标准差内。可替代地,“约”可以意指高达20%的范围。此外,特别是关于生物系统或过程,所述术语可以意指高达值的一个数量级或高达值的5倍。当在本申请和项中提供特定值或组成时,除非另外说明,否则应当假定“约”的含义在该特定值或组成的可接受的误差范围内。在术语“约”结合数字范围使用时,其通过扩展所述数值上下的边界来修饰所述范围。因此,“约10-20”意指“约10至约20”。通常,术语“约”可以将数值修饰为高于和低于所述值某个差值(例如,10%)上或下(更高或更低)。

[0059] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语均具有与本公开文本所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。例如,Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 第2版, 2002, CRC出版社; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 第3版, 1999, 学术出版社; 以及Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, 修订版, 2000, 牛津大学出版社, 为技术人员提供本公开文本中所使用的许多术语的通用辞典解释。

[0060] 应当理解, 本文中无论用语言“包含”描述任何方面, 还提供了以“由...组成”和/或“基本上由...组成”描述的其他类似方面。

[0061] 单位、前缀和符号均以其国际单位制(Système International de Unites, SI)可接受的形式表示。数字范围包括限定所述范围的数字。除非另外指明, 否则氨基酸序列以氨基到羧基的方向从左到右书写。本文提供的标题不是对本公开文本的各个方面的限制, 所述各个方面可以通过参考说明书作为整体而获得。因此, 通过从整体上参考说明书, 可以更全面地定义下面紧接着定义术语。

[0062] 氨基酸在本文中由其通常已知的三字母符号或由IUPAC-IUB生化命名委员会推荐的单字母符号表示。除非另外指明, 否则氨基酸序列以氨基到羧基的方向从左到右书写。

[0063] 聚集: 术语“聚集”是指多肽, 例如本文公开的FGF-21多肽与其他分子(如相同多肽的其他分子)形成非共价连接的复合物从而形成高分子量复合物的趋势。测量聚集体形成的示例性方法包括如在本文实施例所述的分析型尺寸排阻色谱法。可以相对于参考化合物确定聚集的相对量, 例如以鉴定具有减少的聚集的多肽。还可以相对于参考配制品确定聚集的相对量, 例如以鉴定其中FGF-21多肽具有减少的聚集的配制品。

[0064] 氨基酸取代: 术语“氨基酸取代”是指用另一个氨基酸残基替代存在于亲本或参考序列(例如, 野生型序列)中的氨基酸残基。可以例如经由化学肽合成或通过本领域已知的重组方法取代亲本或参考序列(例如, 野生型多肽序列)中的氨基酸。因此, 提及“在位置X处的取代”是指用替代性氨基酸残基取代位置X处存在的氨基酸。在一些方面, 可以根据方案AnY描述取代模式, 其中A是对应于天然或最初存在于位置n处的氨基酸的单字母代码, 并且Y是取代的氨基酸残基。在其他方面, 可以根据方案An(YZ)描述取代模式, 其中A是对应于取代天然或最初存在于位置n处的氨基酸的氨基酸残基的单字母代码, 并且Y和Z是可以替代A的替代性取代的氨基酸残基。

[0065] 在本公开文本的上下文中, 在核酸水平上进行取代(即使当它们被称为氨基酸取

代时),即,用替代性氨基酸残基取代氨基酸残基是通过用编码第二氨基酸的密码子取代编码第一氨基酸的密码子来进行。

[0066] 大约:如本文所用,如应用于一个或多个目标值的术语“大约”是指与所陈述的参考值类似的值。在某些方面,除非另外说明或者另外从上下文明显看出,否则术语“大约”是指落在所陈述参考值的任一方向(大于或小于)上的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小内的值的范围(这个数字会超过可能值的100%的情况除外)。

[0067] 与……相关:如本文关于疾病所用,术语“与……相关”意指所讨论的症状、测量、特征或状态与该疾病的诊断、发展、存在或进展相关。相关可能但不一定与疾病有因果联系。

[0068] 生物活性的:如应用于本文公开的分子,例如FGF-21多肽的术语“生物活性的”意指可以影响与活生物体有关的生物系统、途径、分子或相互作用的任何物理或生化特性的任何物质。特别地,如本文所用,生物活性分子包括但不限于旨在用于诊断、治愈、缓和、治疗或预防人或动物中的疾病或病症,例如与纤维化相关的疾病或病症,或以其他方式增强人或动物的生理或心理健康的任何物质。

[0069] 保守性氨基酸取代:“保守性氨基酸取代”是其中用具有类似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的取代。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族,包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸或谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸或半胱氨酸)、非极性的侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸或色氨酸)、 β -分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)、以及芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或组氨酸)。因此,如果多肽中的氨基酸被来自相同侧链家族的另一种氨基酸替代,则认为所述氨基酸取代是保守性的。在另一个方面,氨基酸串可以用结构上类似但侧链家族成员的顺序和/或组成不同的串来保守地替代。

[0070] 非保守性氨基酸取代包括如下那些取代,其中:(i)具有正电性侧链的残基(例如,Arg、His或Lys)取代负电性残基(例如,Glu或Asp)或被其取代,(ii)亲水性残基(例如,Ser或Thr)取代疏水性残基(例如,Ala、Leu、Ile、Phe或Val)或被其取代,(iii)半胱氨酸或脯氨酸取代任何其他残基或被其取代,或(iv)具有大体积的疏水性或芳香族性侧链的残基(例如,Val、His、Ile或Trp)取代具有较小侧链(例如,Ala或Ser)或没有侧链(例如,Gly)的残基或被其取代。

[0071] 也可以使用其他氨基酸取代。例如,对于氨基酸丙氨酸,可以由D-丙氨酸、甘氨酸、 β -丙氨酸、L-半胱氨酸和D-半胱氨酸中的任何一种进行取代。对于赖氨酸,替代物可以是D-赖氨酸、精氨酸、D-精氨酸、高精氨酸、甲硫氨酸、D-甲硫氨酸、鸟氨酸或D-鸟氨酸中的任何一种。一般来讲,功能重要区域中可以预期诱导分离的多肽的特性变化的取代是如下那些取代,其中:(i)极性残基(例如,丝氨酸或苏氨酸)取代疏水性残基(例如,亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸或丙氨酸)(或被其取代);(ii)半胱氨酸残基取代任何其他残基(或被其取代);(iii)具有正电性侧链的残基(例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)取代具有负电性侧链的残基(例如,谷氨酸或天冬氨酸)(或被其取代);或(iv)具有大体积侧链的残基(例如,苯丙氨酸)取代没有这种侧链的残基(例如,甘氨酸)(或被其取代)。前述非保守性取代之一可以改变蛋白质的功能特性的可能性也与所述取代相对于蛋白质的功能重要区域的位置相关:

一些非保守性取代可能因此对生物特性具有很小影响或没有影响。

[0072] 保守的：如本文所用，术语“保守的”分别是指多肽序列的氨基酸残基，所述氨基酸残基是在比较的两个或更多个序列的相同位置处不变地存在的那些氨基酸残基。相对保守的氨基酸是在比序列中其他地方出现的核苷酸或氨基酸更相关的序列中保守的那些氨基酸。

[0073] 在一些方面，如果两个或多个序列彼此100%相同，则称它们是“完全保守的”或“相同的”。在一些方面，如果两个或更多个序列彼此至少70%相同、至少80%相同、至少90%相同或至少95%相同，则称它们是“高度保守的”。在一些方面，如果两个或更多个序列彼此约70%相同、约80%相同、约90%相同、约95%、约98%或约99%相同，则称它们是“高度保守的”。在一些方面，如果两个或更多个序列彼此至少30%相同、至少40%相同、至少50%相同、至少60%相同、至少70%相同、至少80%相同、至少90%相同或至少95%相同，则称它们是“保守的”。在一些方面，如果两个或更多个序列彼此约30%相同、约40%相同、约50%相同、约60%相同、约70%相同、约80%相同、约90%相同、约95%相同、约98%相同、或约99%相同，则称它们是“保守的”。序列的保守性可以应用于多核苷酸或多肽的全长，或者可以应用于其部分、区域或特征。

[0074] 脱酰胺化：术语“脱酰胺化”是指多肽内的氨基酸残基自发经受脱酰胺反应，从而改变氨基酸的化学结构，并潜在地影响多肽功能的趋势。本文的实施例中公开了测量脱酰胺化的示例性方法。可以相对于参考化合物确定脱酰胺化的相对量，例如以鉴定具有降低的脱酰胺化的多肽。还可以相对于参考配制品确定脱酰胺化的相对量，例如以鉴定其中FGF-21多肽具有降低的脱酰胺化的配制品。

[0075] 与纤维化相关的疾病：术语“与纤维化相关的疾病”包括如下疾病、障碍和病症：其中已观察到发生纤维化，或者其中已知或认为纤维化相关于或促进疾病的病因、进展或症状，或者其中已知或认为纤维化随着疾病进展而发生。

[0076] 纤维化可能影响器官或组织，如胰腺、肺、心脏、肾脏、肝脏、眼睛、神经系统、骨髓、淋巴结、心内膜心肌(endomyocardium)或腹膜后腔。与纤维化相关的示例性疾病包括但不限于非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、肝脏纤维化、肝硬化前期、肝硬化、弥漫性实质性肺病、囊性纤维化、肺或肺部纤维化、进行性大块纤维化、特发性肺部纤维化、注射性纤维化、肾脏或肾纤维化、慢性肾脏疾病、糖尿病肾病、局灶性节段性肾小球硬化、膜性肾病、IgA肾病、骨髓纤维化、心力衰竭、代谢性心力衰竭、心脏性纤维化、白内障纤维化、白内障、眼部疤痕形成、胰腺纤维化、皮肤纤维化、肠纤维化、肠狭窄、心内膜心肌纤维化、心房纤维化、纵隔纤维化、克罗恩病(Crohn's disease)、腹膜后纤维化、瘢痕疙瘩、肾源性系统性纤维化、硬皮病、系统性硬化症、关节纤维化、佩罗尼氏综合征(Peyronie's syndrome)、杜普伊特伦氏挛缩(Dupuytren's contracture)、糖尿病性神经病、粘连性关节囊炎、酒精性肝病、肝脂肪变性、病毒性肝炎、胆道疾病、原发性血色沉着病、药物相关性肝硬化、隐源性肝硬化、肝豆状核变性(Wilson's disease)和 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症、间质性肺病(ILD)、人纤维化肺病、黄斑变性、视网膜性视网膜病变、玻璃体视网膜病变、心肌纤维化、格雷夫斯眼病(Grave's ophthalmopathy)、药物引起的麦角中毒、心血管疾病、动脉粥样硬化/再狭窄、肥厚性瘢痕、原发性或特发性骨髓纤维化和炎症性肠病(包括但不限于胶原性结肠炎)。在一些方面，与纤维化相关的疾病可以包括肝脏纤维化、肾脏或肾纤维化、肺或肺部纤维化以及心脏或

心脏性纤维化。在一些方面,与纤维化相关的疾病可以是肝脏纤维化。在一些方面,与纤维化相关的疾病可以是NASH。

[0077] 有效量:如本文所用,术语本文公开的FGF-21配制品的“有效量”是足以产生有益或期望结果(例如,临床结果)的量,并且因此,“有效量”取决于应用它的情境。例如,在施用治疗NASH的FGF-21多肽的情境下,FGF-21多肽的有效量例如是足以改善肝脏脂肪、肝脏损伤或纤维化(例如,相对于未治疗的受试者中的水平或相对于施用治疗之前的受试者中的水平减少肝脏脂肪、肝脏损伤或纤维化)的量。

[0078] 在一些方面,相对于未治疗的受试者中的水平或相对于施用治疗之前的受试者中的水平,FGF-21多肽,例如修饰的FGF-21多肽治疗NASH的有效量可以改变一种或多种纤维化生物标志物的水平:例如,降低血清Pro-C3;降低ALT或AST;增加血清脂联素;降低血浆LDL;增加血浆HDL;降低血浆甘油三酯水平或其任何组合。

[0079] 术语“有效量”可以与“有效剂量”、“治疗有效量”或“治疗有效剂量”互换使用。

[0080] FGF-21活性:术语“FGF-21活性”是指FGF-21多肽的至少一种生物活性。术语“生物活性”是指分子例如FGF-21多肽影响与生物体有关的生物系统、途径、分子或相互作用的任何物理或生化特性的能力,所述生物体包括但不限于病毒、细菌、噬菌体、转座子、朊病毒、昆虫、真菌、植物、动物和人。

[0081] 例如,在未修饰或修饰的FGF-21的情境下,生物活性包括由FGF-21执行的任何生物学功能。确定分子是否具有野生型FGF-21(如SEQ ID NO:3的野生型FGF-21多肽)的至少一种生物活性的示例性方法可包括本领域已知的任何功能性测定,包括美国申请公开号2017/0189486的实施例5和17中披露的方法,将所述文献通过引用以其整体并入本文。

[0082] 可以相对于参考化合物确定生物活性的相对水平,例如以鉴定具有生物活性或具有对于预期治疗用途足够高的生物活性(例如,EC₅₀比参考化合物的EC₅₀高小于5倍、小于10倍、小于20倍、小于50倍或小于100倍)的多肽。还可以相对于参考配制品确定生物活性的相对水平,例如以鉴定这样的配制品,其中FGF-21多肽具有生物活性或具有对于预期治疗用途足够高的生物活性,例如,EC₅₀比参考配制品中FGF-21多肽的EC₅₀高小于5倍、小于10倍、小于20倍、小于50倍或小于100倍。

[0083] 本文所述的参考化合物可以是缺乏修饰,如本文所述的修饰的FGF-21序列。例如,参考化合物可以是野生型FGF-21或没有融合配偶体,例如没有PEG的相同的修饰的FGF-21多肽序列。PEG-FGF-21的示例性参考化合物包括但不限于SEQ ID NO:3的野生型FGF-21多肽和SEQ ID NO:1的修饰的FGF-21多肽。

[0084] 在一些方面,参考化合物可含有至少一个非天然编码氨基酸,所述氨基酸可连接至本文所述的接头、聚合物、生物活性分子、肽、多肽或半衰期延长部分(例如PEG)。在一些方面,参考化合物可含有至少一个非天然编码氨基酸,所述氨基酸不能连接至本文所述的接头、聚合物、生物活性分子、肽、多肽或半衰期延长部分(例如PEG)。在一些方面,参考化合物可含有另外的氨基酸取代、缺失和/或插入。在一些方面,可以与聚乙二醇化或非聚乙二醇化形式的多肽进行比较;在前一种情况下,可以与包含或不包含非天然编码氨基酸的多肽进行比较。

[0085] FGF-21多肽:术语“FGF-21多肽”是指野生型FGF-21多肽和修饰的FGF-21多肽。

[0086] 半衰期延长部分:术语“半衰期延长部分”是指这样的药学上可接受的部分、结构

域或分子,所述部分、结构域或分子任选地经由非天然编码氨基酸,直接或经由接头与本文所述的FGF-21多肽例如修饰的FGF-21多肽共价连接(“缀合”或“融合”),与参考化合物如修饰的FGF-21多肽的非缀合形式或野生型FGF-21多肽相比,所述部分、结构域或分子防止或缓和修饰的FGF-21多肽的体内蛋白水解降解或其他降低活性的化学修饰,增加半衰期,和/或改善或改变其他药代动力学或生物物理学特性,包括但不限于增加吸收速率、降低毒性、改善溶解度、减少蛋白质聚集、增加修饰的FGF-21多肽的生物活性和/或靶选择性、增加可制造性和/或降低修饰的FGF-21多肽的免疫原性。

[0087] 同一性:如本文所用,术语“同一性”是指聚合物分子之间,例如多肽分子之间的总体单体保守性。在没有任何其他限定词的情况下,术语“相同”,例如,蛋白质A与蛋白质B相同,意味着所述序列是100%相同的(100%序列同一性)。将两个序列描述为例如“70%相同”,等同于将它们描述为具有例如“70%序列同一性”。

[0088] 两个多肽序列的同一性百分比的计算例如可以通过出于最佳比较目的比对两个序列来进行(例如,可以在第一多肽序列和第二多肽序列的一个或两个中引入空位以实现最佳比对,并且出于比较目的可忽视不相同序列)。在某些方面,出于比较目的比对的序列长度是参考序列的长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%。然后比较在相应氨基酸位置处的氨基酸。

[0089] 当第一序列中的位置被与第二序列中的对应位置相同的氨基酸占据时,则分子在该位置上相同。两个序列之间的同一性百分比是所述序列共有的相同位置的数量的函数,其中考虑到出于两个序列的最佳比对而需要引入的空位的数量和每个空位的长度。可使用数学算法来完成序列比对和两个序列之间同一性百分比的确定。

[0090] 合适的软件程序可自各种来源获得,并且可用于比对蛋白质和核苷酸序列。用于确定序列同一性百分比的一个合适程序是b12seq,其是可获自美国政府国家生物技术信息中心BLAST网址(blast.ncbi.nlm.nih.gov)的BLAST程序套件的一部分。B12seq使用BLASTN或BLASTP算法进行两个序列之间的比较。BLASTN是用于比较核酸序列,而BLASTP是用于比较氨基酸序列。其他合适的程序是例如Needle、Stretcher、Water或Matcher(生物信息程序的EMBOSS套件的一部分),并且也可获自欧洲生物信息研究所(EBI)的www.ebi.ac.uk/Tools/psa。序列比对可使用本领域已知的方法进行,如MAFFT、Clustal(ClustalW、Clustal X或Clustal Omega)、MUSCLE等。

[0091] 与多肽参考序列比对的单个多肽靶序列内的不同区域可以各自具有其自身的序列同一性百分比。应注意,将序列同一性百分比的值舍入至最接近的十分位。例如,将80.11、80.12、80.13和80.14向下舍入至80.1,而将80.15、80.16、80.17、80.18和80.19向上舍入至80.2。还需注意,长度值将总是整数。

[0092] 在某些方面,将第一氨基酸序列与第二氨基酸序列的同一性百分比(ID%)计算为 $\%ID = 100 \times (Y/Z)$,其中Y是第一序列和第二序列的比对(如通过目测检查或特定序列比对程序来比对)中评分为相同匹配的氨基酸残基的数量,并且Z是第二序列中的残基总数。如果第一序列的长度比第二序列长,则第一序列与第二序列的同一性百分比将高于第二序列与第一序列的同一性百分比。

[0093] 本领域技术人员将理解,用于计算序列同一性百分比的序列比对的产生不限于仅由原始序列数据驱动的二元序列-序列比较。还应理解,序列比对可通过将序列数据与来自

异质性来源的数据(如结构数据(例如结晶学蛋白质结构)、功能数据(例如突变的位置)或系统发育数据)整合来产生。整合异质性数据以产生多重序列比对的合适程序是T-Coffee,其可从www.tcoffee.org获得,并且可替代地例如从EBI获得。还应理解,用于计算序列同一性百分比的最终比对可自动地或人工地加以编策。

[0094] 体内蛋白水解降解:术语“体内蛋白水解降解”是指当引入活的系统时(例如,当注射至生物体中时)可由所述生物体中存在的蛋白酶引起的多肽的切割。蛋白水解可潜在地影响多肽的生物活性或半衰期。例如,野生型FGF-21可以在C末端经受切割,从而产生截短的无活性多肽。测量FGF-21体内蛋白水解的示例性方法是美国申请公开号US 2017/0189486的实施例10中所述的基于Meso Scale Discovery (MSD)的电致化学发光免疫吸附测定(ECLIA)。可以相对于参考化合物确定体内或体外蛋白水解的相对量,例如以鉴定具有降低的体内蛋白水解的多肽。还可以相对于参考配制品确定体内蛋白水解的相对量,即以鉴定其中FGF-21多肽具有降低的体外蛋白水解的配制品。

[0095] 分离的:如本文所用,术语“分离的”是指已经与至少一些与其缔合(在自然界中或者在实验环境中)的组分分开的物质或实体(例如,多肽)。关于与其缔合的物质,分离的物质(例如,蛋白质)可以具有不同纯度水平。

[0096] 连接的:如本文所用的术语“连接的”或“附接的”是指与分子例如水溶性聚合物共价或非共价接合的氨基酸序列。术语“连接的”不仅意指氨基酸序列(例如,FGF-21多肽)与第二氨基酸序列(例如,白蛋白半衰期延长剂)在C末端或N末端的融合或拼接。它还包括将完整的氨基酸序列(例如,XTEN半衰期延长剂)插入至第二氨基酸序列(例如,FGF-21多肽)中的任何两个氨基酸中。在一些方面,连接可以发生在第一氨基酸序列(例如,FGF-21多肽)中的氨基酸的侧链与第二分子(例如,第二氨基酸序列或可溶性聚合物如PEG)之间。在本公开文本的情境下,术语“融合的”或“融合”表明,至少两条多肽链已被可操作地连接并重组表达。在一些方面,两条多肽链可以由于化学合成而发生“融合”。在本公开文本的情境下,术语“缀合物”或“缀合”表示,两个分子实体(例如,两个多肽,或者多肽与聚合物如PEG)已经化学连接。

[0097] 修饰的FGF-21多肽:如本文所用,“修饰的FGF-21多肽”、“修饰的成纤维细胞生长因子21”或“修饰的FGF-21”及其无连字符形式可互换使用,并且应当包括与野生型FGF-21(例如,SEQ ID NO:3的野生型人FGF-21)不同,并且通常具有成纤维细胞生长因子21的至少一种生物活性的那些多肽和蛋白质,以及FGF-21类似物、FGF-21亚型、FGF-21模拟物、FGF-21片段、杂合FGF-21蛋白、其融合蛋白、寡聚体和多聚体、同系物、糖基化模式变体、变体、剪接变体和突变蛋白,无论其生物活性如何。该定义所涵盖的修饰的FGF-21多肽在下文更详细地描述。

[0098] 突变:在本公开文本的内容中,如以上定义的术语“突变”和“氨基酸取代”(有时简称为“取代”)被认为是可互换的。

[0099] 非天然编码氨基酸:“非天然编码氨基酸”是指不是20种常见氨基酸之一或吡咯赖氨酸或硒代半胱氨酸的氨基酸。可与术语“非天然编码氨基酸”同义使用的其他术语是“非天然氨基酸(non-natural amino acid、unnatural amino acid)”、“非天然存在的氨基酸”及其各种加连字符和无连字符形式。术语“非天然编码氨基酸”还包括但不限于通过天然编码的氨基酸(包括但不限于20种常见氨基酸)的修饰(例如翻译后修饰)而出现,但本身不通

过翻译复合物天然地并入生长中的多肽链的氨基酸。此类非天然编码氨基酸的例子包括但不限于N-乙酰氨基葡萄糖基-L-丝氨酸、N-乙酰氨基葡萄糖基-L-苏氨酸和O-磷酸酪氨酸。在本公开文本的一个具体方面,非天然编码氨基酸是对乙酰基-L-苯丙氨酸。

[0100] 患者:如本文所用,“患者”是指可能寻求或可能需要治疗、需要治疗、正在接受治疗、将要接受治疗的受试者,或者由受过训练的职业人员针对特定疾病或病症进行护理的受试者。

[0101] 药物组合物:术语“药物组合物”是指如下制剂:其所呈形式允许活性成分(FGF-21多肽,例如修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的生物活性有效,并且不含对被施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的组分(例如,赋形剂和水)。这种组合物可以是无菌的。

[0102] 药学上可接受的:短语“药学上可接受的”在本文中用于指代如下那些化合物、材料、组合物和/或剂型:在合理医学判断的范围内,适合用于与人类和动物的组织接触而没有过多的毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的效益/风险比相称。一般来讲,经联邦或州政府的监管机构批准(或在美国药典或其他公认的药典中列出)用于动物、且更特别用于人意味着,这些化合物、材料、组合物和/或剂型是药学上可接受的。普遍可接受为对于治疗目的安全的化合物、材料、组合物和/或剂型是“治疗上可接受的”。

[0103] 药学上可接受的赋形剂:如本文所用的短语“药学上可接受的赋形剂”是指除本文所述的活性化合物以外并且具有在受试者中基本上无毒且非炎性的特性的任何成分(例如,能够悬浮或溶解活性化合物的媒介物)。赋形剂可包括例如螯合剂、表面活性剂、缓冲剂、渗透调节剂、抗氧化剂、乳化剂、填充剂(稀释剂)、防腐剂、吸附剂、悬浮或分散剂、甜味剂和水合水。普遍接受为对于治疗目的安全的赋形剂是“治疗上可接受的赋形剂”。

[0104] 药学上可接受的盐:本公开文本还包括本文所述化合物的药学上可接受的盐。如本文所用,“药学上可接受的盐”是指所公开的化合物的衍生物,其中通过将现有酸或碱部分转化为其盐形式(例如,通过使游离碱基团与合适的有机酸反应)而对亲本化合物进行修饰。药学上可接受的盐的例子包括但不限于碱性残基如胺的矿物酸盐或有机酸盐;酸性残基如羧酸的碱盐或有机盐;等等。

[0105] 多肽:术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,是指任何长度的氨基酸聚合物。所述聚合物可包含修饰的氨基酸。所述术语还涵盖天然修饰的或通过干预修饰的氨基酸聚合物;所述修饰是例如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰,如与标记组分缀合。所述定义内还包括例如含有氨基酸的一种或多种类似物(包括例如非天然氨基酸,如高半胱氨酸、鸟氨酸、对乙酰基苯丙氨酸、D-氨基酸和肌酸)、以及本领域已知的其他修饰的多肽。

[0106] 如本文所用,所述术语是指任何大小、结构或功能的蛋白质、多肽和肽。多肽包括基因产物、天然存在的多肽、合成多肽、同系物、直系同源物、旁系同源物、片段以及前述各项的其他等同物、变体和类似物。多肽可以是单一多肽,或者可以是多分子复合物,如二聚体、三聚体或四聚体。它们还可包含单链或多链多肽。最常见的二硫键联存在于多链多肽中。术语多肽也可应用于如下氨基酸聚合物:其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学类似物。在一些方面,“肽”长度可以小于或等于50个氨基酸,例如长度约为5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸。

[0107] 预防:如本文所用,术语“预防”是指部分或完全延迟疾病、障碍和/或病症的发作;部分或完全延迟特定疾病、障碍和/或病症的一种或多种症状、特征或临床表现的发作;部分或完全延迟特定疾病、障碍和/或病症的一种或多种症状、特征或表现的发作;部分或完全延迟从特定疾病、障碍和/或病症的进展;和/或降低发展与疾病、障碍和/或病症相关的病状的风险。在一些方面,本申请中公开的药物配制品可用于预防与纤维化相关的疾病或病症(如NASH或糖尿病)的发作、预防所述疾病或病症的症状,或预防所述疾病或病症的并发症。

[0108] 预防性:如本文所用,“预防性”是指用于预防疾病或病症的发作、或预防或延迟与纤维化相关的疾病或病症(例如NASH)的症状的治疗剂或作用过程。在一些方面,可以预防性地使用本申请中公开的药物配制品。

[0109] 预防:如本文所用,“预防”是指为维持健康并预防或延迟与纤维化相关的疾病或病症(例如,NASH或糖尿病)的发作、或为预防或延迟与疾病或病症相关的症状而采取的措施。

[0110] 重组的:“重组的”多肽或蛋白质是指经由重组DNA技术产生的多肽或蛋白质。出于本公开文本的目的,在工程化宿主细胞中表达的重组产生的多肽和蛋白质被视为是分离的,已经通过任何适当的技术分离、分级分离或者部分或基本上纯化的天然或重组多肽也被视为是分离的。可以使用本领域已知的方法重组产生本文公开的FGF-21多肽。本文公开的蛋白质和肽也可以化学合成。

[0111] 相似性:如本文所用,术语“相似性”是指聚合物分子之间,例如多肽分子之间的总体关联性。聚合物分子彼此的相似性百分比的计算可以与计算同一性百分比相同的方式进行,不同的是相似性百分比的计算考虑了如本领域中理解的保守性取代。

[0112] 溶解度:术语“溶解度”是指一种物质可以溶解在另一种物质中的量,例如未修饰或修饰的FGF-21多肽可以溶解在水溶液中的量。测量未修饰或修饰的FGF-21多肽的溶解度的示例性方法是美国申请公开号US2017/0189486的实施例8中所述的活塞流溶解度测试。可以相对于参考化合物确定相对溶解度,例如以鉴定具有增加的溶解度的多肽。在一些方面,还可以相对于参考配制品确定相对溶解度,例如以鉴定其中多肽具有增加的溶解度的配制品。

[0113] 受试者:“受试者”或“个体”或“动物”或“哺乳动物”意指任何需要诊断、预后或疗法的受试者,特别是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括但不限于人;家畜;农场动物;动物园动物;运动动物;宠物动物,如狗、猫、豚鼠、兔子、大鼠、小鼠、马、牛、奶牛;灵长类动物,如猿、猴子、猩猩和黑猩猩;犬科动物,如狗和狼;猫科动物,如猫、狮子和老虎;马科动物,如马、驴和斑马;熊;食用动物,如奶牛、猪和绵羊;有蹄类动物,如鹿和长颈鹿;啮齿类动物,如小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠;等等。在某些方面,哺乳动物是人受试者。在其他方面,受试者是人患者。在特定方面,受试者是适于本文所述方法的人患者或其细胞(无论体内、体外或离体)。

[0114] 患有:“患有”疾病、障碍和/或病症的个体已经被诊断具有或者展示所述疾病、障碍和/或病症的一种或多种症状。在一些方面,可以将本文公开的药物配制品施用至患有与纤维化相关的疾病或病症(如NASH或糖尿病)的受试者。

[0115] 易患:“易患”疾病、障碍和/或病症的个体尚未被诊断具有和/或可能不展现出所

述疾病、障碍和/或病症的症状,但是具有患上疾病或其症状的倾向。在一些方面,“易患”疾病、障碍和/或病症(例如,癌症)的个体的特征可以是以下中的一种或多种:(1)与所述疾病、障碍和/或病症的发展相关的基因突变;(2)与所述疾病、障碍和/或病症的发展相关的遗传多态性;(3)增加的和/或降低的与所述疾病、障碍和/或病症相关的蛋白质和/或核酸的表达和/或活性;(4)与所述疾病、障碍和/或病症的发展相关的习惯和/或生活方式;(5)所述疾病、障碍和/或病症的家族史;以及(6)与所述疾病、障碍和/或病症的发展相关的微生物的暴露和/或感染。

[0116] 在一些方面,易患疾病、障碍和/或病症的个体将患上所述疾病、障碍和/或病症。在一些方面,易患疾病、障碍和/或病症的个体不会患上所述疾病、障碍和/或病症。在一些方面,可以将本文公开的药物配制品施用至易患与纤维化相关的疾病或病症(如NASH或糖尿病)的受试者。

[0117] 治疗剂:术语“治疗剂”或“药剂”是指在施用至受试者时具有治疗、诊断和/或预防作用和/或引发所需的生物学和/或药理学作用的分子实体。例如,在一些方面,本文公开的FGF-21多肽(例如,PEG-FGF-21)可以是治疗剂。在一些方面,药剂是作为组合疗法的一部分与至少一种本文公开的FGF-21多肽共施用的另一种分子。

[0118] 治疗有效量:如本文所用,术语“治疗有效量”意指要递送的药剂(例如,本文公开的FGF-21多肽或包含所述多肽的配制品)在施用至患有或易患感染、疾病、障碍和/或病症的受试者时,足以治疗所述感染、疾病、障碍和/或病症,改善所述感染、疾病、障碍和/或病症的症状,诊断或预防所述感染、疾病、障碍和/或病症,和/或延迟所述感染、疾病、障碍和/或病症的发作的量。一般来讲,预期治疗有效量的施用会得到治疗有效结果。

[0119] 治疗有效结果:如本文所用,术语“治疗有效结果”意指在患有或易患感染、疾病、障碍和/或病症的受试者中足以治疗所述感染、疾病、障碍和/或病症,改善所述感染、疾病、障碍和/或病症的症状,诊断或预防所述感染、疾病、障碍和/或病症,和/或延迟所述感染、疾病、障碍和/或病症的发作的结果。

[0120] 治疗(Treat、treatment)、疗法(therapy):如本文所用,术语“治疗(treat或treatment)”或“疗法”或其语法变体是指部分或完全预防、减轻、改善、改良、缓解与纤维化相关的疾病或病症(例如,NASH或糖尿病)的一种或多种症状或特征、延迟所述一种或多种症状或特征的发作、抑制所述一种或多种症状或特征的进展、降低所述一种或多种症状或特征的严重程度、和/或降低所述一种或多种症状或特征的发生率。例如,“治疗”与纤维化相关的疾病可以是指预防症状、改善症状、延迟所述疾病或病症或其症状的发作等。可以将治疗施用至没有展现出疾病、障碍和/或病症的体征的受试者,和/或施用至仅展现出疾病、障碍和/或病症的早期体征的受试者,用于降低发展与所述疾病、障碍和/或病症相关的病状的风险的目的。

[0121] ug、uM、uL:如本文所用,术语“ug”、“uM”和“uL”分别可与“μg”、“μM”和“μL”互换使用。

[0122] 水溶性聚合物:如本文所用,术语“水溶性聚合物”是指可溶于水性溶剂的任何聚合物。水溶性聚合物与修饰的FGF-21多肽的键联可导致如下变化:包括但不限于增加或调节的血清(体内)半衰期、或相对于未修饰形式增加或调节的治疗半衰期、调节的免疫原性或毒性、调节的物理缔合特征如聚集和多聚体形成、改变的受体结合、改变的与一种或多种

结合配偶体的结合,以及改变的受体二聚化或多聚化。

[0123] 水溶性聚合物可以或不可以具有其自身的生物活性,并且可以用作将修饰的FGF-21附接至其他物质的接头,所述其他物质包括但不限于一种或多种未修饰或修饰的FGF-21多肽、或者一种或多种生物活性分子。合适的聚合物包括但不限于聚乙二醇、聚乙二醇丙醛、其单C1-C10烷氧基或芳氧基衍生物(美国专利号5,252,714中所述的,将所述文献通过引用并入本文)、单甲氧基-聚乙二醇、离散PEG、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚氨基酸、二乙氧基醚马来酸酐、N-(2-羟丙基)-甲基丙烯酰胺、葡聚糖、葡聚糖衍生物(包括硫酸葡聚糖)、聚丙二醇、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇、肝素、肝素片段、多糖、寡糖、聚糖、纤维素和纤维素衍生物(包括但不限于甲基纤维素和羧甲基纤维素)、淀粉和淀粉衍生物、多肽、聚亚烷基二醇及其衍生物、聚亚烷基二醇及其衍生物的共聚物、聚乙氧基乙醚,以及 α - β -聚[(2-羟乙基)-DL-天冬酰胺等,或其混合物。此类水溶性聚合物的例子包括但不限于聚乙二醇和血清白蛋白。

[0124] 在以下小节中更详细地描述了本公开文本的各个方面。

I. FGF-21配制品

[0125] 本公开文本提供了药物配制品,所述药物配制品包含成纤维细胞生长因子21(FGF-21)多肽,例如修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21,和氨基多羧酸阳离子螯合剂,例如二乙三胺五乙酸(DTPA),其中所述配制品与参考配制品(即含有相同组分但不含氨基多羧酸阳离子螯合剂的相应配制品)相比具有改善的稳定性。

[0126] 术语“螯合剂”或“阳离子螯合剂”是可互换的,并且是指能够通过形成化学特性不同于原始金属离子的化学特性的新络离子而从溶液系统中除去金属离子的任何物质。特别地,本文公开的阳离子螯合剂是特异性结合二价金属例如 Ca^{++} 的螯合剂。

[0127] 在一些方面,本文公开的药物配制品在稳定性方面展现出一种或多种改善,例如,较低的脱酰胺化速率和/或较低的聚集速率。例如,在药物配制品中包含氨基多羧酸阳离子螯合剂(如DTPA)可以相对于参考配制品降低当在一定温度(例如40°C)下储存一定时间段(例如1个月)时的FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的脱酰胺化速率。

[0128] 在一些方面,氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低在约25°C、在约30°C、在约35°C、在约40°C或在约45°C下储存的药物配制品中FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的脱酰胺化速率。在一些方面,氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低在高于25°C、高于30°C、高于35°C、约40°C或约45°C的温度下储存的药物配制品中FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的脱酰胺化速率。

[0129] 在一些方面,氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低在约20°C与约25°C之间、约25°C与约30°C之间、约30°C与约35°C之间或约40°C与约45°C之间储存的药物配制品中FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的脱酰胺化速率。

[0130] 在一些方面,氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低在以上公开的温度或温度范围下储存约1周、约2周、约3周、约1个月、约2个月、约3个月或约4个月之后的药物配制品中FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的脱酰胺化速率。在具体方面,氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低在

40℃下储存约1个月的药物配制品中FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的脱酰胺化速率。

[0131] 在一些方面,氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低在约25℃、约30℃、约35℃、约40℃或约45℃下储存的药物配制品中FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的高分子量(HMW)聚集速率。在一些方面,氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低在高于25℃、高于30℃、高于35℃、约40℃或约45℃的温度下储存的药物配制品中FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的HMW聚集速率。

[0132] 在一些方面,氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低在约20℃与约25℃之间、约25℃与约30℃之间、约30℃与约35℃之间或约40℃与约45℃之间储存的药物配制品中FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的HMW聚集速率。

[0133] 在一些方面,氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低在以上公开的温度或温度范围下储存约1周、约2周、约3周、约1个月、约2个月、约3个月或约4个月之后的药物配制品中FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的HMW聚集速率。在具体方面,氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低在40℃下储存约1个月的药物配制品中FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的HMW聚集速率。

[0134] 在一些方面,氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)防止或缓和FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)中一个或多个氨基酸(例如,甲硫氨酸)的氧化。在特定方面,氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)防止或缓和在25℃和/或40℃下SEQ ID NO: 3的氨基酸1和/或氨基酸169(或SEQ ID:1或SEQ ID NO:2或任何其他FGF-21多肽中的相应氨基酸)的氧化。

[0135] 在一些具体方面,氨基多羧酸阳离子螯合剂是DTPA。喷替酸或二乙烯三胺五乙酸(DTPA)是由二乙烯三胺骨架和五个羧甲基组成的氨基多羧酸。DTPA的共轭碱对金属阳离子具有高亲和力。因此,假定将每个氮中心和每个COO⁻基团视为配位中心,五阴离子DTPA⁵⁻潜在地是八齿配体。其络合物的形成常数比EDTA的形成常数高约100。作为螯合剂,DTPA通过形成多达8个键来包绕金属离子。然而,过渡金属通常形成少于八个的配位键。因此,在与金属形成络合物之后,DTPA仍具有与其他试剂结合的能力,如通过其衍生物喷地肽所示。例如,在DTPA与铜(II)的络合物中,DTPA利用三个胺中心和五个羧酸根中的三个以六齿方式结合。

[0136] 在一些其他方面,氨基多羧酸阳离子螯合剂可以是另一种氨基多羧酸阳离子螯合剂,如乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇-双(β-氨基乙基醚)-N,N',N'-四乙酸(EGTA)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)或相关化合物,例如替克西坦(tiuxetan)(DTPA的修饰型式,其碳骨架含有异硫氰基苄基和甲基)。本领域已知的与DTPA和EDTA相关的其他螯合剂是其中酰胺基的氮可以被一个或多个C₁₋₁₈烷基取代的那些,例如DTPA.BMA和EDTA.BMA。

[0137] 在一些方面,DTPA阳离子螯合剂的存在量在约10μM与约100μM之间、在15μM与约95μM之间、在约20μM与约90μM之间、在约25μM与约85μM之间、在约30μM与约80μM之间、在约35μ

M与约75 μ M之间、在约40 μ M与约70 μ M之间、在约45 μ M与约65 μ M之间、在约50 μ M与约60 μ M之间、在约25 μ M与约75 μ M之间、在约40 μ M与约60 μ M之间、在约30 μ M与约70 μ M之间、或在约40 μ M与约75 μ M之间。

[0138] 在一些方面,DTPA阳离子螯合剂的存在量为约10 μ M、约15 μ M、约20 μ M、约25 μ M、约30 μ M、约35 μ M、约40 μ M、约45 μ M、约50 μ M、约55 μ M、约60 μ M、约65 μ M、约70 μ M、约75 μ M、约80 μ M、约85 μ M、约90 μ M、约95 μ M或约100 μ M。

[0139] 在一些方面,DTPA阳离子螯合剂的存在量为至少约15 μ M、至少约20 μ M、至少约25 μ M、至少约30 μ M、至少约35 μ M、至少约40 μ M、至少约45 μ M、至少约50 μ M、至少约55 μ M、至少约60 μ M、至少约65 μ M、至少约70 μ M、或至少约75 μ M。

[0140] 在具体方面,氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)的存在量为50 μ M。

[0141] 在一些方面,本文公开的配制品的pH高于约6.5、高于约6.6、高于约6.7、高于约6.8、高于约6.9、高于约7.0、高于约7.1、高于约7.2、高于约7.3、高于约7.4、或高于约7.5。在一些方面,所述配制品的pH高于6.5、高于6.6、高于6.7、高于6.8、高于6.9、高于7.0、高于7.1、高于7.2、高于7.3、高于7.4或高于7.5。在一些方面,所述配制品的pH是约6.5、约6.6、约6.7、约6.8、约6.9、约7.0、约7.1、约7.2、约7.3、约7.4或约7.5。

[0142] 在一些方面,所述配制品的pH在约6.5与约7.5之间、约6.6与约7.5之间、约6.7与约7.5之间、约6.8与约7.5之间、约6.9与约7.5之间、约7.0与约7.5之间、约7.1与约7.5之间、约7.2与约7.5之间、约7.3与约7.5之间、约7.4与约7.5之间、约6.5与约7.4之间、约6.5与约7.3之间、约6.5与约7.2之间、约6.5与约7.1之间、约6.5与约7.0之间、约6.5与约6.9之间、约6.5与约6.8之间、约6.5与约6.7之间、约6.6与约7.4之间、约6.7与约7.4之间、约6.8与约7.4之间、约6.9与约7.4之间、约7.0与约7.4之间、约7.1与约7.4之间、约7.2与约7.4之间、约7.3与约7.4之间、约6.5与约7.3之间、约6.6与约7.3之间、约6.7与约7.3之间、约6.7与约7.3之间、约6.8与约7.3之间、约6.9与约7.3之间、约7.0与约7.3之间、约7.1与约7.3之间、约7.2与约7.3之间、约6.5与约7.2之间、约6.6与约7.2之间、约6.7与约7.2之间、约6.8与约7.2之间、约6.9与约7.2之间、约7.0与约7.2之间、约7.1与约7.2之间、约6.9与约7.1之间、或约7.0与约7.1之间。

[0143] 在一些方面,所述配制品的pH是约6.8、约6.9、约7.0、约7.1、约7.2、约7.3、约7.4或约7.5。在一些方面,所述药物配制品比pH为6.5的参考配制品更稳定。

[0144] 在一些方面,药物配制品进一步包含表面活性剂。如本文所用的术语“表面活性剂”是指任何化合物,通常是两亲性分子,其溶解或悬浮于水或水性溶液中时降低表面张力,或者其降低两种液体之间、或液体与固体之间的界面张力。在本公开文本的情境下,表面活性剂是在包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的溶液中降低界面应力和剪切的任何化合物。

[0145] 在一些方面,表面活性剂是非离子表面活性剂,即是往往在中性溶液中不具有净电荷的表面活性剂。在一些方面,非阴离子表面活性剂是聚山梨醇酯。聚山梨醇酯是一类重要的非离子表面活性剂,其在蛋白质药物中广泛用于稳定化蛋白质以对抗界面诱导的聚集并使蛋白质的表面吸附降至最低(Wang W 2005. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. Int J Pharm 289(1-2):1-30)。聚山梨醇酯是由聚氧乙烯(POE)脱水山梨糖醇的脂肪酸酯构成的两亲性非离子表面活性剂。可商购获得的聚山

梨醇酯是主要含有脱水山梨糖醇POE脂肪酸酯的化学多样性混合物。

[0146] 如本文所用,术语“聚山梨醇酯”是指山梨糖醇及其酸酐的油酸酯,通常与环氧乙烷共聚。示例性聚山梨醇酯包括聚山梨醇酯20(吐温20;PS20)(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单月桂酸酯);聚山梨醇酯40(吐温40;PS40)(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单棕榈酸酯);聚山梨醇酯60(吐温60;PS60)(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单硬脂酸酯);和聚山梨醇酯80(吐温80;PS80)(聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单油酸酯)。

[0147] “聚氧乙烯”部分后的数字20是指分子中存在的氧乙烯- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$ -基团的总数。“聚山梨醇酯”部分后的数字涉及与分子的聚氧乙烯脱水山梨糖醇部分相关的脂肪酸类型。单月桂酸酯指示为20,单棕榈酸酯指示为40,单硬脂酸酯指示为60,并且单油酸酯指示为80。在一些方面,非离子表面活性剂的存在量高于临界胶束浓度(CMC),这对于聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯是大约至少0.01mg/ml的量。参见Wan和Lee, *Journal of Pharm Sci*, 63, 第136页, 1974。

[0148] 在一些方面,聚山梨醇酯是聚山梨醇酯80(PS80)。在一些方面,所述聚山梨醇酯80表面活性剂的存在量为约0.01%至约0.1%(w/v)、约0.02%至约0.1%(w/v)、约0.03%至约0.1%(w/v)、约0.04%至约0.1%(w/v)、约0.05%至约0.1%(w/v)、约0.06%至约0.1%(w/v)、约0.07%至约0.1%(w/v)、约0.08%至约0.1%(w/v)、约0.09%至约0.1%(w/v)、约0.02%至约0.09%(w/v)、约0.03%至约0.09%(w/v)、约0.04%至约0.09%(w/v)、约0.05%至约0.09%(w/v)、约0.06%至约0.09%(w/v)、约0.07%至约0.09%(w/v)、约0.08%至约0.09%(w/v)、约0.03%至约0.08%(w/v)、约0.04%至约0.08%(w/v)、约0.05%至约0.08%(w/v)、约0.06%至约0.08%(w/v)、约0.07%至约0.08%(w/v)、约0.04%至约0.07%(w/v)、约0.05%至约0.07%(w/v)、约0.06%至约0.07%(w/v)或约0.05%至约0.06%(w/v)。

[0149] 在一些方面,所述聚山梨醇酯80表面活性剂的存在量为至少约0.01%(w/v)、至少约0.02%(w/v)、至少约0.03%(w/v)、至少约0.04%(w/v)、至少约0.05%(w/v)、至少约0.06%(w/v)、至少约0.07%(w/v)、至少约0.08%(w/v)、至少约0.09%(w/v)或至少约0.1%(w/v)。

[0150] 在一些方面,例如当将配制品在振荡器上搅拌时,表面活性剂(例如聚山梨醇酯80)缓和微粒和/或空气泡形成。在一些方面,与参考配制品中微粒形成的水平相比,配制品中表面活性剂(例如聚山梨醇酯80)的存在可以将微粒形成减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%。在一些方面,与参考配制品中空气泡形成的水平相比,配制品中表面活性剂(例如聚山梨醇酯80)的存在可以将空气泡形成减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%。

[0151] 在一些方面,药物配制品进一步包含氨基酸缓冲剂。氨基酸可以有利地用作药物应用中的缓冲剂,因为它们天然呈现易于代谢的物质。此外,如果将配制品冷冻干燥,则用作缓冲剂的氨基酸也可以保护呈无定形相的蛋白质。合适的氨基酸缓冲剂可含有组氨酸、赖氨酸和/或精氨酸。组氨酸在pH 7附近具有良好的缓冲能力。

[0152] 如本文所用,术语“组氨酸”包括L-组氨酸或D-组氨酸、组氨酸的溶剂化形式、组氨酸的水合形式(例如一水合物)或组氨酸的无水形式或其混合物。仅举几例,在本公开文本的配制品中的其他合适的缓冲剂是谷氨酸盐、Tris或琥珀酸盐。

[0153] 在一些具体方面,氨基酸缓冲剂是L-组氨酸。

[0154] 在一些方面,组氨酸缓冲剂的存在量为约10mM至约100mM组氨酸、约15mM至约100mM组氨酸、约20mM至约100mM组氨酸、约25mM至约100mM、约30mM至约100mM组氨酸、约35mM至约100mM组氨酸、约40mM至约100mM组氨酸、约45mM至约100mM组氨酸、约50mM至约100mM组氨酸、约55mM至约100mM组氨酸、约60mM至约100mM组氨酸、约65mM至约100mM组氨酸、约70mM至约100mM组氨酸、约75mM至约100mM组氨酸、约80mM至约100mM组氨酸、约85mM至约100mM组氨酸、约90mM至约100mM组氨酸或约95mM至约100mM组氨酸。

[0155] 在一些方面,组氨酸缓冲剂的存在量为约20mM至约90mM组氨酸、约25mM至约90mM组氨酸、约30mM至约90mM组氨酸、约35mM至约90mM组氨酸、约40mM至约90mM组氨酸、约45mM至约90mM组氨酸、约50mM至约90mM组氨酸、约55mM至约90mM组氨酸、约60mM至约90mM组氨酸、约65mM至约90mM组氨酸、约70mM至约90mM组氨酸、约75mM至约90mM组氨酸、约80mM至约90mM组氨酸、约85mM至约90mM组氨酸、约30mM至约80mM组氨酸、约35mM至约80mM组氨酸、约40mM至约80mM组氨酸、约45mM至约80mM组氨酸。

[0156] 在一些方面,组氨酸缓冲剂的存在量为约50mM至约80mM组氨酸、约55mM至约80mM组氨酸、约60mM至约80mM组氨酸、约65mM至约80mM组氨酸、约70mM至约80mM组氨酸、约75mM至约80mM组氨酸、约40mM至约70mM组氨酸、约45mM至约70mM组氨酸、约50mM至约70mM组氨酸、约55mM至约70mM组氨酸、约60mM至约70mM组氨酸、约65mM至约70mM组氨酸、约10mM至约30mM组氨酸、约15mM至约30mM组氨酸、约20mM至约30mM组氨酸、约25mM至约30mM组氨酸、约15mM至约25mM组氨酸或约20mM至约25mM。

[0157] 在一些方面,组氨酸缓冲剂的存在量为约15mM至约20mM组氨酸、约40mM至约60mM组氨酸、约45mM至约60mM组氨酸、约50mM至约60mM组氨酸、约15.5mM至约24.5mM组氨酸、约16mM至约24mM组氨酸、约16.5mM至约23.5mM组氨酸、约17mM至约23mM组氨酸、约17.5mM至约22.5mM组氨酸、约18mM至约22mM组氨酸、约18.5mM至约21.5mM组氨酸、约19mM至约21mM组氨酸或约19.5mM至约20.5mM组氨酸。

[0158] 在一些方面,组氨酸缓冲剂的存在量为约10mM组氨酸、约11mM组氨酸、约12mM组氨酸、约13mM组氨酸、约14mM组氨酸、约15mM组氨酸、约16mM组氨酸、约17mM组氨酸、约18mM组氨酸、约19mM组氨酸、约20mM组氨酸、约21mM组氨酸、约22mM组氨酸、约23mM组氨酸、约24mM组氨酸、约25mM组氨酸、约26mM组氨酸、约27mM组氨酸、约28mM组氨酸、约29mM组氨酸、约30mM组氨酸、约31mM组氨酸、约32mM组氨酸、约33mM组氨酸、约34mM组氨酸、约35mM组氨酸、约36mM组氨酸、约37mM组氨酸、约38mM组氨酸、约39mM组氨酸、约40mM组氨酸、约41mM组氨酸、约42mM组氨酸、约43mM组氨酸、约44mM组氨酸、约45mM组氨酸、约46mM组氨酸、约47mM组氨酸、约48mM组氨酸、约49mM组氨酸或约50mM组氨酸。

[0159] 在一些方面,药物配制品进一步包含渗透调节剂(在本领域中也已知为张度剂)。根据本公开文本,渗透调节剂(张度剂)可包括多元醇、糖类、碳水化合物、盐(如氯化钠)或其混合物。示例性多元醇包括分子量小于约600kD(例如,在120至400kD的范围内)的那些,例如甘露醇、海藻糖、山梨糖醇、赤藓糖醇、异麦芽糖醇、乳糖醇、麦芽糖醇、木糖醇、甘油、乳

糖醇、丙二醇、聚乙二醇、肌醇或其混合物。

[0160] 糖类或碳水化合物渗透调节剂包括单糖、二糖和多糖或其混合物。在一些方面,糖类或碳水化合物选自果糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、山梨糖、木糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、葡聚糖、普鲁兰多糖(pullulan)、糊精、环糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉、水溶性葡聚糖及其混合物。

[0161] 在一些方面,渗透调节剂包括选自还原糖或非还原糖或其混合物的糖。在一些方面,渗透调节剂即张度剂包括糖,所述糖是非还原性糖,优选地选自蔗糖、海藻糖及其混合物的糖。在一些具体方面,所述非还原糖是蔗糖。

[0162] 在一些方面,糖渗透调节剂的存在量为约100mM至约1M蔗糖、约200mM至约1M蔗糖、约300mM至约1M蔗糖、约400mM至约1M蔗糖、约500mM至约1M蔗糖、约600mM至约1M蔗糖、约700mM至约1M蔗糖、约800mM至约1M蔗糖、约900mM至约1M蔗糖、约200mM至约900mM蔗糖、约300mM至约900mM蔗糖、约400mM至约900mM蔗糖、约500mM至约900mM蔗糖、约600mM至约900mM蔗糖、约700mM至约900mM蔗糖、约800mM至约900mM蔗糖、约300mM至约800mM蔗糖、约400mM至约800mM蔗糖、约500mM至约800mM蔗糖、约600mM至约800mM蔗糖、约700mM至约800mM蔗糖、约400mM至约700mM蔗糖、约500mM至约700mM蔗糖、约600mM至约700mM蔗糖或约500mM至约600mM蔗糖。

[0163] 在一些方面,蔗糖渗透调节剂的存在量为约100mM蔗糖、约150mM蔗糖、约200mM蔗糖、约250mM蔗糖、约300mM蔗糖、约350mM蔗糖、约400mM蔗糖、约450mM蔗糖、约500mM蔗糖、约550mM蔗糖、约600mM蔗糖、约650mM蔗糖、约700mM蔗糖、约750mM蔗糖、约800mM蔗糖、约850mM蔗糖、约900mM蔗糖、约950mM蔗糖或约1M蔗糖。

[0164] 在本文公开的药物配制品的一些方面,FGF-21多肽是修饰的FGF-21多肽。本领域已知的多种修饰的FGF-21多肽可以用于本文公开的配制品中,例如美国专利号8,012,931和9,434,788中公开的那些,将所述两个文献通过引用以其整体并入本文。在文献中已经描述了成纤维细胞生长因子21(FGF-21)(Nishimura等人,Biochimica et Biophysica Acta, 1492:203-206(2000);WO 01/36640;和WO 01/18172以及美国专利公开号20040259780,将所述文献中的每一篇通过引用以其整体并入本文)。与其他FGF不同,已经报道了FGF-21不具有增殖和致癌作用(Ornitz和Itoh,Genome Biology 2001,2(3):reviews3005.1-3005.12)。

[0165] 某些FGF-21多肽及其用途描述于以下文献中:美国专利公开号20010012628;美国专利号6,716,626;美国专利公开号2004/0259780;W003/011213;Kharitononkov等人J Clin Invest.2005年6月;115(6):1627-35;W003/059270;美国专利公开号2005/0176631;WO 2005/091944;W02007/0293430;美国专利公开号2007/0293430;W0/2008/121563;美国专利号4,904,584;WO 99/67291;WO 99/03887;WO 00/26354;和美国专利号5,218,092,将所述文献中的每一篇通过引用以其整体并入本文。

[0166] 可如本申请中所公开配制的另外的FGF-21在下文更详细地描述。

[0167] 在一些方面,所述修饰的FGF-21多肽包括与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%氨基酸序列同一性的多肽,其中所述多肽具有FGF-21活性。

[0168] 在一些方面,所述修饰的FGF-21多肽由如下多肽组成或基本上由如下多肽组成:与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%氨基酸序列同一性,其中所述多肽具有FGF-21活性。

[0169] 在一些方面,将所述修饰的FGF-21多肽例如经由所述FGF-21多肽的序列中非天然编码氨基的侧链连接至半衰期延长部分。可以连接至本公开文本的修饰的FGF-21多肽(例如,SEQ ID NO:1的FGF-21多肽)的半衰期延长部分包括例如白蛋白、免疫球蛋白恒定区或其部分、免疫球蛋白结合多肽、免疫球蛋白G(IgG)、白蛋白结合多肽(ABP)、PAS化部分、HES化部分、XTEN、Fc区及其任何组合。可用于修饰FGF-21多肽的半衰期延长部分在下文更详细地描述。

[0170] 在一些方面,所述半衰期延长部分包括水溶性聚合物,例如聚乙二醇(PEG)。在一些方面,所述PEG具有约10kDa与约40kDa之间的平均分子量。因此,在一些方面,所述PEG具有约10kDa、约15kDa、约20kDa、约25kDa、约30kDa、约35kDa或约40kDa的平均分子量。

[0171] 在一些方面,所述PEG具有约30kDa的平均分子量。在一些方面,所述PEG的平均分子量在约15kDa与约40kDa之间、在约20kDa与约40kDa之间、在约25kDa与约40kDa之间、在约30kDa与约40kDa之间、在约35kDa与约40kDa之间、在约15kDa与约35kDa之间、在约15kDa与约30kDa之间、在约15kDa与约25kDa之间、在约15kDa与约20kDa之间、在约20kDa与约35kDa之间、在约25kDa与约35kDa之间或在约30kDa与约35kDa之间。

[0172] 在一些方面,所述半衰期延长部分(例如PEG)经由非天然编码氨基酸(例如苯丙氨酸衍生物)连接至FGF-21多肽(例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的修饰的FGF-21多肽)。在一些方面,所述苯丙氨酸衍生物是对乙酰基-L-苯丙氨酸。在一些方面,所述半衰期延长部分经由脒键连接至所述非天然编码氨基酸。在一些方面,所述非天然编码氨基酸替代SEQ ID NO:3(野生型FGF-21)的氨基酸谷氨酰胺109。

[0173] 在本公开文本的一些具体方面,FGF-21多肽是PEG-FGF-21(SEQ ID NO:2),即SEQ ID NO:1的修饰的FGF-21的衍生物,其中野生型FGF-21(SEQ ID NO:3)的谷氨酰胺109已经被对乙酰基-L-苯丙氨酸替代并且30kDa PEG链已经经由脒键共价附接至位置109处的对乙酰基-L-苯丙氨酸。

[0174] 在一些方面,所述FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的存在浓度在约1mg/ml与约40mg/ml之间。在一些方面,所述FGF-21多肽的存在浓度为约10mg/ml、约20mg/ml、约30mg/ml或约40mg/ml。在一些方面,所述FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的存在浓度在约1mg/ml与5mg/ml之间、在约5mg/ml与约10mg/ml之间、在约10mg/ml与约15mg/ml之间、在约15mg/ml与约20mg/ml之间、在约20mg/ml与约25mg/ml之间、在约25mg/ml与约30mg/ml之间、在约30mg/ml与约35mg/ml之间或在约35mg/ml与约40mg/ml之间。

[0175] 在一些方面,所述FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的存在浓度为1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml、11mg/ml、12mg/ml、13mg/ml、14mg/ml、15mg/ml、16mg/ml、17mg/ml、18mg/ml、19mg/ml、20mg/ml、21mg/ml、22mg/ml、23mg/ml、24mg/ml、25mg/ml、26mg/ml、27mg/ml、28mg/ml、29mg/ml、30mg/ml、31mg/ml、32mg/ml、33mg/ml、34mg/ml、35mg/ml、36mg/ml、37mg/ml、38mg/ml、39mg/ml、

ml或40mg/ml。在一些方面,FGF-21多肽的浓度根据本领域已知的方法、或本说明书的实施例部分中公开的具体方法确定。

[0176] 在一些方面,所述FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)在本文公开的配制品中的存在量在约1mg/剂量与约40mg/剂量之间。在一些方面,所述FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)在本文公开的配制品中的存在量在约1mg/剂量与约5mg/剂量之间、在约5mg/剂量与约10mg/剂量之间、或在约10mg/剂量与约15mg/剂量之间、在约15mg/剂量与约20mg/剂量之间、或在约20mg/剂量与约25mg/剂量之间、在约25mg/剂量与约30mg/剂量之间、或在约30mg/剂量与约35mg/剂量之间、或在约35mg/剂量与约40mg/剂量之间。在一些方面,所述FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)在本文公开的配制品中的存在量高于40mg/剂量。

[0177] 在一些方面,所述FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)在本文公开的配制品中的存在量为约1mg/剂量、约2mg/剂量、约3mg/剂量、约4mg/剂量、约5mg/剂量、约6mg/剂量、约7mg/剂量、约8mg/剂量、约9mg/剂量、约10mg/剂量、约11mg/剂量、约12mg/剂量、约13mg/剂量、约14mg/剂量、约15mg/剂量、约16mg/剂量、约17mg/剂量、约18mg/剂量、约19mg/剂量、约20mg/剂量、约21mg/剂量、约22mg/剂量、约23mg/剂量、约24mg/剂量、约25mg/剂量、约26mg/剂量、约27mg/剂量、约28mg/剂量、约29mg/剂量、约30mg/剂量、约31mg/剂量、约32mg/剂量、约33mg/剂量、约34mg/剂量、约35mg/剂量、约36mg/剂量、约37mg/剂量、约38mg/剂量、约39mg/剂量或约40mg/剂量。

[0178] 在一些方面,所述药物配制品被配制用于皮下施用。如下文所论述,本文公开的其他药物配制品可以经由其他途径施用。在一些方面,所述药物配制品被配制用于例如通过安全性注射器进行的皮下施用。在一些方面,所述配制品被配制用于每日或每周施用,例如每1、2、3、4、5、6天、每周或每两周施用。在一些方面,所述配制品是水性配制品。

[0179] 在一些方面,本公开文本提供了药物配制品,所述药物配制品包含(i) FGF-21多肽,例如修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21; (ii) 浓度在约10mM与约50mM之间的组氨酸; (iii) 浓度在约100mM与约1M之间的蔗糖; (iv) 浓度在约0.01%与约0.1% (w/v) 之间的聚山梨醇酯80; 以及(v) 浓度在约10 μ M与约100 μ M之间的DTPA; 其中所述配制品的pH在约6.7与约7.5之间。

[0180] 还提供了药物配制品,所述药物配制品包含(i) FGF-21多肽,例如修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21; (ii) 浓度为约20mM的组氨酸; (iii) 浓度为约600mM的蔗糖; (iv) 浓度为约0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80; 以及(v) 浓度为约50 μ M的DTPA; 其中所述pH是约7.1。

[0181] 还提供了药物配制品,所述药物配制品包含(i) FGF-21多肽,例如修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21; (ii) 浓度为20mM的组氨酸; (iii) 浓度为约600mM的蔗糖; (iv) 浓度为0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80; 以及(v) 浓度为50 μ M的DTPA; 其中所述pH是7.1。

[0182] 还提供了药物配制品,所述药物配制品包含(i) FGF-21多肽,例如修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21; (ii) 浓度为约20mM的组氨酸; 以及(iii) 浓度为约600mM的蔗糖; 其中所述pH是约7.0。

[0183] 还提供了药物配制品,所述药物配制品包含(i) FGF-21多肽,例如修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21; (ii) 浓度为20mM的组氨酸; 以及(iii) 浓度为600mM的蔗糖; 其中所述pH是7.0。

[0184] 在一些具体方面,本公开文本提供了药物配制品,所述药物配制品包含(i)浓度为约10mg/mL的PEG-FGF-21 (SEQ ID NO:2);(ii)浓度为约20mM的组氨酸;(iii)浓度为约600mM的蔗糖;(iv)浓度为约0.05% (w/v)的聚山梨醇酯80;以及(v)浓度为约50uM的DTPA;其中所述pH是约7.1。

[0185] 还提供了药物配制品,所述药物配制品包含(i)浓度为约20mg/mL的PEG-FGF-21;(ii)浓度为约20mM的组氨酸;(iii)浓度为约600mM的蔗糖;(iv)浓度为约0.05% (w/v)的聚山梨醇酯80;以及(v)浓度为约50uM的DTPA;其中所述pH是约7.1。

[0186] 还提供了药物配制品,所述药物配制品包含(i)浓度为10mg/mL的PEG-FGF-21;(ii)浓度为20mM的组氨酸;(iii)浓度为600mM的蔗糖;(iv)浓度为0.05% (w/v)的聚山梨醇酯80;以及(v)浓度为50uM的DTPA;其中所述pH是7.1。

[0187] 还提供了药物配制品,所述药物配制品包含(i)浓度为20mg/mL的PEG-FGF21;(ii)浓度为20mM的组氨酸;(iii)浓度为600mM的蔗糖;(iv)浓度为0.05% (w/v)的聚山梨醇酯80;以及(v)浓度为50uM的DTPA;其中所述pH是7.1。

[0188] 本公开文本还提供了根据下文公开的用于改善包含FGF-21 (例如,修饰的FGF-21如PEG-FGF-21)的配制品的稳定性的任何方法制备的药物配制品。

II. 制造方法

[0189] 本公开文本还提供了用于改善或增强包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的药物配制品的稳定性的方法,所述方法包括掺和氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如DTPA),其中所述配制品与不含有所述氨基多羧酸阳离子螯合剂的参考配制品相比具有改善的稳定性。这些稳定化方法包括(i)向配制品中掺和氨基多羧酸阳离子螯合剂,(ii)掺和聚山梨醇酯表面活性剂,例如聚山梨醇酯80,(iii)将配制品的pH调整至大约7.1,或(iv)其任何组合。

[0190] 在一些方面,本文所述的药物配制品通过以下过程制得:掺和(i)实现约10mg/mL最终浓度的量的PEG-FGF-21;(ii)实现约20mM最终浓度的量的组氨酸;(iii)实现约600mM最终浓度的量的蔗糖;(iv)实现约0.05% (w/v)最终浓度的量的聚山梨醇酯80;以及(v)实现约50uM最终浓度的量的DTPA;以及将pH调整为约7.1。

[0191] 在一些方面,本文所述的药物配制品通过以下过程制得:掺和(i)实现约20mg/mL最终浓度的量的PEG-FGF-21;(ii)实现约20mM最终浓度的量的组氨酸;(iii)实现约600mM最终浓度的量的蔗糖;(iv)实现约0.05% (w/v)最终浓度的量的聚山梨醇酯80;以及(v)实现约50uM最终浓度的量的DTPA;以及将pH调整为约7.1。

[0192] 在一些方面,本文所述的药物配制品通过以下过程制得:掺和(i)实现10mg/mL最终浓度的量的PEG-FGF-21;(ii)实现20mM最终浓度的量的组氨酸;(iii)实现600mM最终浓度的量的蔗糖;(iv)实现0.05% (w/v)最终浓度的量的聚山梨醇酯80;以及(v)实现50uM最终浓度的量的DTPA;以及将pH调整为7.1。

[0193] 在一些方面,本文所述的药物配制品通过以下过程制得:掺和(i)实现20mg/mL最终浓度的量的PEG-FGF-21;(ii)实现20mM最终浓度的量的组氨酸;(iii)实现600mM最终浓度的量的蔗糖;(iv)实现0.05% (w/v)最终浓度的量的聚山梨醇酯80;以及(v)实现50uM最终浓度的量的DTPA;以及将pH调整为7.1。

[0194] 如本文所用,术语“掺和”是指通过本领域已知的任何手段以非预定顺序组合本文

公开的配制品的组分,以达到所公开的浓度。例如,可以将本文公开的药物配制品中的赋形剂依次或同时添加至FGF-21多肽溶液。可替代地,可以将浓缩的FGF-21多肽溶液添加至包含配制品中所有或部分赋形剂的溶液。在其他方面,可以使用例如透析或过滤将赋形剂并入配制品。

[0195] 在一些方面,由于应用所公开的方法而导致的稳定性的改善包括例如(i)相对于参考配制品的物理稳定性的增加,(ii)相对于参考配制品的化学稳定性的增加,或(iii)其组合。

[0196] 在一些方面,所述物理稳定性的增加包括(i)防止或减少多肽聚集,(ii)防止或减少多肽片段化,或(iii)其组合。在一些方面,在本文公开的药物组合物中观察到的多肽聚集为在参考配制品中观察到的聚集的约90%、约85%、约80%、约75%、约70%、约65%、约60%、约55%、约50%、约45%、约40%、约35%、约30%、约25%、约20%、约15%或约10%。在一些方面,在本文公开的药物组合物中观察到的多肽聚集为在参考配制品中观察到的聚集的少于90%、少于85%、少于80%、少于75%、少于70%、少于65%、少于60%、少于55%、少于50%、少于45%、少于40%、少于35%、少于30%、少于25%、少于20%、少于15%或少于10%。在一些方面,在本文公开的药物组合物中观察到的多肽片段化为在参考配制品中观察到的片段化的约90%、约85%、约80%、约75%、约70%、约65%、约60%、约55%、约50%、约45%、约40%、约35%、约30%、约25%、约20%、约15%或约10%。在一些方面,在本文公开的药物组合物中观察到的多肽片段化为在参考配制品中观察到的片段化的少于90%、少于85%、少于80%、少于75%、少于70%、少于65%、少于60%、少于55%、少于50%、少于45%、少于40%、少于35%、少于30%、少于25%、少于20%、少于15%或少于10%。

[0197] 在一些方面,所述化学稳定性的增加包括(i)防止或减少多肽脱酰胺化,(ii)防止或减少多肽氧化,或(iii)其组合。在一些方面,在本文公开的药物组合物中观察到的多肽脱酰胺化为在参考配制品中观察到的多肽脱酰胺化的约90%、约85%、约80%、约75%、约70%、约65%、约60%、约55%、约50%、约45%、约40%、约35%、约30%、约25%、约20%、约15%或约10%。在一些方面,在本文公开的药物组合物中观察到的多肽脱酰胺化为在参考配制品中观察到的多肽脱酰胺化的少于90%、少于85%、少于80%、少于75%、少于70%、少于65%、少于60%、少于55%、少于50%、少于45%、少于40%、少于35%、少于30%、少于25%、少于20%、少于15%或少于10%。在一些方面,在本文公开的药物组合物中观察到的多肽氧化为在参考配制品中观察到的多肽氧化的约90%、约85%、约80%、约75%、约70%、约65%、约60%、约55%、约50%、约45%、约40%、约35%、约30%、约25%、约20%、约15%或约10%。在一些方面,在本文公开的药物组合物中观察到的多肽氧化为在参考配制品中观察到的多肽氧化的少于90%、少于85%、少于80%、少于75%、少于70%、少于65%、少于60%、少于55%、少于50%、少于45%、少于40%、少于35%、少于30%、少于25%、少于20%、少于15%或少于10%。

[0198] 在一些方面,稳定化(改善或增强稳定性)本文公开的配制品的方法相对于参考配制品不仅可以降低降解水平,而且可以降低降解速率:例如,所公开的方法可以降低多肽脱酰胺化速率,降低多肽氧化速率,降低多肽聚集速率,降低蛋白水解降解速率,或其任何组合。

[0199] 例如,在本文公开的药物配制品中掺和氨基多羧酸阳离子螯合剂(如DTPA)可以相

对于参考配制品降低当在一定温度下储存一定时间段时的FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的脱酰胺化速率。

[0200] 在一些方面,向包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的药物配制品中掺和氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低当将药物配制品例如在约25℃、在约30℃、在约35℃、在约40℃或在约45℃下储存时的FGF-21多肽的脱酰胺化速率。在一些方面,氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低当将药物配制品在高于25℃、高于30℃、高于35℃、约40℃或约45℃的温度下储存时的FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的脱酰胺化速率。在一些方面,氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低当将药物配制品在约20℃与约25℃之间、约25℃与约30℃之间、约30℃与约35℃之间或约40℃与约45℃之间储存时的FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的脱酰胺化速率。

[0201] 在一些方面,向包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的药物配制品中掺和氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低当将药物配制品在以上公开的温度或温度范围下储存约1周、约2周、约3周、约1个月、约2个月、约3个月或约4个月时的FGF-21多肽的脱酰胺化速率。

[0202] 在具体方面,向包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的药物配制品中掺和氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低当将药物配制品在40℃下储存约一个月时的FGF-21多肽的脱酰胺化速率。

[0203] 在一些方面,向包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的药物配制品中掺和氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低当将药物配制品在约25℃、在约30℃、在约35℃、在约40℃或在约45℃下储存时的FGF-21多肽的高分子量(HMW)聚集速率。

[0204] 在一些方面,向包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的药物配制品中掺和氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低当将药物配制品在高于25℃、高于30℃、高于35℃、约40℃或约45℃的温度下储存时的FGF-21多肽的HMW聚集速率。在一些方面,向包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的药物配制品中掺和氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低当将药物配制品在约20℃与约25℃之间、约25℃与约30℃之间、约30℃与约35℃之间或约40℃与约45℃之间的温度下储存时的FGF-21多肽的HMW聚集速率。

[0205] 在一些方面,向包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的药物配制品中掺和氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低当将药物配制品在以上公开的温度或温度范围下储存约1周、约2周、约3周、约1个月、约2个月、约3个月或约4个月时的FGF-21多肽的HMW聚集速率。

[0206] 在具体方面,向包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的药物配制品中掺和氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以相对于参考配制品降低当将药物配制品在40℃下储存约一个月时的FGF-21多肽的HMW聚集速率。

[0207] 在一些方面,向包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的药物配制品中掺和氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以防止或缓和FGF-21多肽中一个或多个甲硫氨酸的氧化。

[0208] 在特定方面,向包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的药物配制品中掺和氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)可以防止或缓和例如在25℃下和/或在40℃下SEQ ID NO:3的氨基酸1和/或氨基酸169(或SEQ ID:1或SEQ ID NO:2或任何其他FGF-21多肽中的相应氨基酸)的氧化。

[0209] 所公开的方法可以使用氨基多羧酸阳离子螯合剂DTPA。然而,在一些其他方面,氨基多羧酸阳离子螯合剂可以是例如另一种氨基多羧酸阳离子螯合剂,如EDTA、EGTA、DOTA相关化合物如替克西坦、或本领域已知的与DTPA和EDTA相关的任何螯合剂,例如DTPA.BMA和EDTA.BMA。

[0210] 在一些方面,可以将DTPA阳离子螯合剂掺和至下述量:在约10μM与约100μM之间、在15μM与约95μM之间、在约20μM与约90μM之间、在约25μM与约85μM之间、在约30μM与约80μM之间、在约35μM与约75μM之间、在约40μM与约70μM之间、在约45μM与约65μM之间、在约50μM与约60μM之间、在约25μM与约75μM之间、在约40μM与约60μM之间、在约30μM与约70μM之间、或在约40μM与约75μM之间。

[0211] 在一些方面,可以将DTPA阳离子螯合剂掺和至下述量:约10μM、约15μM、约20μM、约25μM、约30μM、约35μM、约40μM、约45μM、约50μM、约55μM、约60μM、约65μM、约70μM、约75μM、约80μM、约85μM、约90μM、约95μM或约100μM。

[0212] 在一些方面,可以将DTPA阳离子螯合剂掺和至下述量:至少约15μM、至少约20μM、至少约25μM、至少约30μM、至少约35μM、至少约40μM、至少约45μM、至少约50μM、至少约55μM、至少约60μM、至少约65μM、至少约70μM、或至少约75μM。

[0213] 在具体方面,将氨基多羧酸阳离子螯合剂(例如,DTPA)掺和至50μM的量。

[0214] 在本文公开的方法的一些方面,将所述配制品的pH调整至高于约6.5、高于约6.6、高于约6.7、高于约6.8、高于约6.9、高于约7.0、高于约7.1、高于约7.2、高于约7.3、高于约7.4、或高于约7.5的pH。

[0215] 在一些方面,将所述配制品的pH调整至高于6.5、高于6.6、高于6.7、高于6.8、高于6.9、高于7.0、高于7.1、高于7.2、高于7.3、高于7.4或高于7.5的pH。

[0216] 在一些方面,将所述配制品的pH调整至6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4或7.5的pH。

[0217] 在一些方面,将所述配制品的pH调整至在约6.5与约7.5之间、约6.6与约7.5之间、约6.7与约7.5之间、约6.8与约7.5之间、约6.9与约7.5之间、约7.0与约7.5之间、约7.1与约7.5之间、约7.2与约7.5之间、约7.3与约7.5之间、约7.4与约7.5之间、约6.5与约7.4之间、约6.5与约7.3之间、约6.5与约7.2之间、约6.5与约7.1之间、约6.5与约7.0之间、约6.5与约6.9之间、约6.5与约6.8之间、约6.5与约6.7之间、约6.6与约7.4之间、约6.7与约7.4之间、约6.8与约7.4之间、约6.9与约7.4之间、约7.0与约7.4之间、约7.1与约7.4之间、约7.2与约7.4之间、约7.3与约7.4之间、约6.5与约7.3之间、约6.6与约7.3之间、约6.7与约7.3之间、约6.7与约7.3之间、约6.8与约7.3之间、约6.9与约7.3之间、约7.0与约7.3之间、约7.1与约7.3之间、约7.2与约7.3之间、约6.5与约7.2之间、约6.6与约7.2之间、约6.7与约7.2之间、约6.8与约7.2之间、约6.9与约7.2之间、约7.0与约7.2之间、约7.1与约7.2之间、约6.9与约7.1之间、或约7.0与约7.1之间的pH。

[0218] 在一些方面,将所述配制品的pH调整至约6.8、约6.9、约7.0、约7.1、约7.2、约7.3、

约7.4或约7.5的pH。在一些方面,在调整pH之后,所述药物配制品比pH为6.5的参考配制品更稳定。

[0219] 在一些方面,将所述配制品的pH调整至6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4或7.5的pH。在一些方面,在调整pH之后,所述药物配制品比pH为6.5的参考配制品更稳定。

[0220] 在一些方面,用于改善包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的药物配制品的稳定性的所述方法进一步包括掺和表面活性剂。在一些方面,所掺和的表面活性剂是非离子表面活性剂,即往往在中性溶液中不具有净电荷的表面活性剂。在一些方面,所掺和的非阴离子表面活性剂是聚山梨醇酯。在一些方面,非离子表面活性剂的掺和量高于临界胶束浓度(CMC),这对于聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯是大约至少0.01mg/ml的量。参见Wan和Lee, *Journal of Pharm Sci*, 63, 第136页, 1974。在本发明方法的一些方面,聚山梨醇酯是聚山梨醇酯80 (PS80)。

[0221] 在一些方面,将所述PS80表面活性剂以下述量掺和至所述药物配制品:约0.01%至约0.1% (w/v)、约0.02%至约0.1% (w/v)、约0.03%至约0.1% (w/v)、约0.04%至约0.1% (w/v)、约0.05%至约0.1% (w/v)、约0.06%至约0.1% (w/v)、约0.07%至约0.1% (w/v)、约0.08%至约0.1% (w/v)、约0.09%至约0.1% (w/v)、约0.02%至约0.09% (w/v)、约0.03%至约0.09% (w/v)、约0.04%至约0.09% (w/v)、约0.05%至约0.09% (w/v)、约0.06%至约0.09% (w/v)、约0.07%至约0.09% (w/v)、约0.08%至约0.09% (w/v)、约0.03%至约0.08% (w/v)、约0.04%至约0.08% (w/v)、约0.05%至约0.08% (w/v)、约0.06%至约0.08% (w/v)、约0.07%至约0.08% (w/v)、约0.04%至约0.07% (w/v)、约0.05%至约0.07% (w/v)、约0.06%至约0.07% (w/v) 或约0.05%至约0.06% (w/v)。

[0222] 在一些方面,所述聚山梨醇酯80表面活性剂的掺和量为至少约0.01% (w/v)、至少约0.02% (w/v)、至少约0.03% (w/v)、至少约0.04% (w/v)、至少约0.05% (w/v)、至少约0.06% (w/v)、至少约0.07% (w/v)、至少约0.08% (w/v)、至少约0.09% (w/v) 或至少约0.1% (w/v)。在一些方面,例如当搅拌配制品(例如,在振荡器上)时,表面活性剂(例如PS80)的掺和量足以缓和或防止微粒形成和/或空气泡形成。

[0223] 在一些方面,用于改善包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的药物配制品的稳定性的所述方法进一步包括掺和氨基酸缓冲剂,例如组氨酸(即,L-组氨酸、D-组氨酸、溶剂化组氨酸、水合组氨酸、无水组氨酸或其混合物)。

[0224] 在一些方面,所述组氨酸缓冲剂的掺和量为约10mM至约100mM组氨酸、约15mM至约100mM组氨酸、约20mM至约100mM组氨酸、约25mM至约100mM组氨酸、约30mM至约100mM组氨酸、约35mM至约100mM组氨酸、约40mM至约100mM组氨酸、约45mM至约100mM组氨酸、约50mM至约100mM组氨酸、约55mM至约100mM组氨酸、约60mM至约100mM组氨酸、约65mM至约100mM组氨酸、约70mM至约100mM组氨酸、约75mM至约100mM组氨酸、约80mM至约100mM组氨酸、约85mM至约100mM组氨酸、约90mM至约100mM组氨酸、约95mM至约100mM组氨酸、约20mM至约90mM组氨酸、约25mM至约90mM组氨酸、约30mM至约90mM组氨酸、约35mM至约90mM组氨酸、约40mM至约90mM组氨酸、约45mM至约90mM组氨酸、约50mM至约90mM组氨酸、约55mM至约90mM组氨酸、约60mM至约90mM组氨酸、约65mM至约90mM组氨酸、约70mM至约90mM组氨酸、约75mM至约90mM组氨酸、约80mM至约90mM组氨酸、约85mM至约90mM组氨酸、约30mM至约80mM组氨酸、约35mM至约80mM组氨酸、约40mM至约80mM组氨酸、约45mM至约80mM组氨酸、约50mM至约80mM组氨酸、

约55mM至约80mM组氨酸、约60mM至约80mM组氨酸、约65mM至约80mM组氨酸、约70mM至约80mM组氨酸、约75mM至约80mM组氨酸、约40mM至约70mM组氨酸、约45mM至约70mM组氨酸、约50mM至约70mM组氨酸、约55mM至约70mM组氨酸、约60mM至约70mM组氨酸、约65mM至约70mM组氨酸、约10mM至约30mM组氨酸、约15mM至约30mM组氨酸、约20mM至约30mM组氨酸、约25mM至约30mM组氨酸、约15mM至约25mM组氨酸、约20mM至约25mM、约15mM至约20mM组氨酸、约40mM至约60mM组氨酸、约45mM至约60mM组氨酸、约50mM至约60mM组氨酸、约15.5mM至约24.5mM组氨酸、约16mM至约24mM组氨酸、约16.5mM至约23.5mM组氨酸、约17mM至约23mM组氨酸、约17.5mM至约22.5mM组氨酸、约18mM至约22mM组氨酸、约18.5mM至约21.5mM组氨酸、约19mM至约21mM组氨酸、或约19.5mM至约20.5mM组氨酸。

[0225] 在一些方面,所述组氨酸缓冲剂的掺和量为约10mM组氨酸、约11mM组氨酸、约12mM组氨酸、约13mM组氨酸、约14mM组氨酸、约15mM组氨酸、约16mM组氨酸、约17mM组氨酸、约18mM组氨酸、约19mM组氨酸、约20mM组氨酸、约21mM组氨酸、约22mM组氨酸、约23mM组氨酸、约24mM组氨酸、约25mM组氨酸、约26mM组氨酸、约27mM组氨酸、约28mM组氨酸、约29mM组氨酸、约30mM组氨酸、约31mM组氨酸、约32mM组氨酸、约33mM组氨酸、约34mM组氨酸、约35mM组氨酸、约36mM组氨酸、约37mM组氨酸、约38mM组氨酸、约39mM组氨酸、约40mM组氨酸、约41mM组氨酸、约42mM组氨酸、约43mM组氨酸、约44mM组氨酸、约45mM组氨酸、约46mM组氨酸、约47mM组氨酸、约48mM组氨酸、约49mM组氨酸或约50mM组氨酸。

[0226] 在一些方面,用于改善包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的药物配制品的稳定性的所述方法进一步包括掺和渗透调节剂(张度剂)。根据本公开文本,渗透调节剂(张度剂)可包括多元醇、糖类、碳水化合物、盐(如氯化钠)或其混合物。示例性多元醇包括分子量小于约600kD(例如,在120至400kD的范围内)的那些,例如甘露醇、海藻糖、山梨糖醇、赤藓糖醇、异麦芽糖醇、乳糖醇、麦芽糖醇、木糖醇、甘油、乳糖醇、丙二醇、聚乙二醇、肌醇或其混合物。糖类或碳水化合物渗透调节剂包括单糖、二糖和多糖或其混合物。在一些方面,糖类或碳水化合物选自果糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、山梨糖、木糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、葡聚糖、普鲁兰多糖、糊精、环糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉、水溶性葡聚糖及其混合物。在一些方面,渗透调节剂包括选自还原糖或非还原糖或其混合物的糖。在一些方面,渗透调节剂即张度剂包括糖,所述糖是非还原性糖,优选地选自蔗糖、海藻糖及其混合物。在一些具体方面,所述非还原糖是蔗糖。

[0227] 在一些方面,所述蔗糖渗透调节剂的掺和量为约100mM至约1M蔗糖、约200mM至约1M蔗糖、约300mM至约1M蔗糖、约400mM至约1M蔗糖、约500mM至约1M蔗糖、约600mM至约1M蔗糖、约700mM至约1M蔗糖、约800mM至约1M蔗糖、约900mM至约1M蔗糖、约200mM至约900mM蔗糖、约300mM至约900mM蔗糖、约400mM至约900mM蔗糖、约500mM至约900mM蔗糖、约600mM至约900mM蔗糖、约700mM至约900mM蔗糖、约800mM至约900mM蔗糖、约300mM至约800mM蔗糖、约400mM至约800mM蔗糖、约500mM至约800mM蔗糖、约600mM至约800mM蔗糖、约700mM至约800mM蔗糖、约400mM至约700mM蔗糖、约500mM至约700mM蔗糖、约600mM至约700mM蔗糖或约500mM至约600mM蔗糖。

[0228] 在一些方面,所述蔗糖渗透调节剂的掺和量为约100mM蔗糖、约150mM蔗糖、约200mM蔗糖、约250mM蔗糖、约300mM蔗糖、约350mM蔗糖、约400mM蔗糖、约450mM蔗糖、约500mM蔗糖、约550mM蔗糖、约600mM蔗糖、约650mM蔗糖、约700mM蔗糖、约750mM蔗糖、约800mM蔗糖、

约850mM蔗糖、约900mM蔗糖、约950mM蔗糖或约1M蔗糖。

[0229] 在一些方面,所述FGF-21多肽是修饰的FGF-21多肽。本领域已知的多种修饰的FGF-21多肽可以用于本文公开的方法中,例如美国专利号8,012,931和9,434,788中公开的那些,将所述两个文献通过引用以其整体并入本文。可如本申请中所公开配制的另外的FGF-21在下文更详细地描述。

[0230] 在一些方面,可用于本文公开的方法中的所述修饰的FGF-21多肽包括与SEQ ID NO:3(野生型人FGF-21)的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%氨基酸序列同一性的多肽,其中所述多肽具有FGF-21活性。

[0231] 在一些方面,可用于本文公开的方法中的所述修饰的FGF-21多肽由如下多肽组成或基本上由如下多肽组成:与SEQ ID NO:3(野生型人FGF-21)的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%氨基酸序列同一性,其中所述多肽具有FGF-21活性。

[0232] 在一些方面,将可用于本文公开的方法中的所述修饰的FGF-21多肽例如经由所述FGF-21多肽的序列中非天然编码氨基的侧链连接至所述半衰期延长部分。可以连接至本公开文本的FGF-21多肽(例如,SEQ ID NO:1的修饰的FGF-21多肽)的半衰期延长部分包括例如白蛋白、免疫球蛋白恒定区或其部分、免疫球蛋白结合多肽、IgG、ABP、PAS化部分、HES化部分、XTEN、Fc区及其任何组合。可用于修饰FGF-21多肽的半衰期延长部分在下文更详细地描述。

[0233] 在一些方面,可用于本文公开的方法中的所述半衰期延长部分包括水溶性聚合物,例如聚乙二醇(PEG)。在一些方面,所述PEG具有在约10kDa与约40kDa之间,例如约10kDa、约15kDa、约20kDa、约25kDa、约30kDa、约35kDa或约40kDa的平均分子量。在一些方面,所述PEG具有约30kDa的平均分子量。在一些方面,所述PEG的平均分子量在约15kDa与约40kDa之间、在约20kDa与约40kDa之间、在约25kDa与约40kDa之间、在约30kDa与约40kDa之间、在约35kDa与约40kDa之间、在约15kDa与约35kDa之间、在约15kDa与约30kDa之间、在约15kDa与约25kDa之间、在约15kDa与约20kDa之间、在约20kDa与约35kDa之间、在约25kDa与约35kDa之间或在30kDa与约35kDa之间。

[0234] 在一些方面,所述半衰期延长部分(例如PEG)经由非天然编码氨基酸(例如苯丙氨酸衍生物)连接至FGF-21多肽。在一些方面,所述苯丙氨酸衍生物是对乙酰基-L-苯丙氨酸。在一些方面,所述半衰期延长部分经由肽键连接至所述非天然编码氨基酸。在一些方面,所述非天然编码氨基酸替代SEQ ID NO:3的氨基酸谷氨酰胺109。在一些方面,所述FGF-21多肽是PEG-FGF-21(SEQ ID NO:2),即SEQ ID NO:1的FGF-21,其中谷氨酰胺109已经被对乙酰基-L-苯丙氨酸替代并且30kDa PEG链已经经由肽键共价附接至对乙酰基-L-苯丙氨酸。

[0235] 在本文公开的方法的一些方面,所述FGF-21多肽的存在浓度在约1mg/ml与约40mg/ml之间。在一些方面,所述FGF-21多肽的存在浓度为约10mg/ml、约20mg/ml、约30mg/ml或约40mg/ml。在一些方面,所述FGF-21多肽的浓度根据本领域已知的方法、或本说明书的实施例部分中公开的具体方法确定。

[0236] 在本文公开的方法的一些方面,所述配制品被配制用于皮下施用。在一些方面,所

述配制品被配制用于使用安全性注射器的皮下施用。在一些方面,所述配制品被配制用于每日或每周施用。在一些方面,所述配制品是水性配制品。

[0237] 本公开文本提供了用于改善包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的配制品的稳定性的方法,所述方法包括掺和(i)浓度在约10mM与约50mM之间的组氨酸;(ii)浓度在约100mM与约1M之间的蔗糖;(iii)浓度在约0.01%与约0.1% (w/v) 之间的聚山梨醇酯80;以及(iv)浓度在约10 μ M与约100 μ M之间的DTPA;其中所述配制品的pH在约6.7与约7.5之间。

[0238] 本公开文本提供了用于改善包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的配制品的稳定性的方法,所述方法包括掺和(i)浓度在约15mM与约45mM之间的组氨酸;(ii)浓度在约200mM与约900mM之间的蔗糖;(iii)浓度在约0.02%与约0.09% (w/v) 之间的聚山梨醇酯80;以及(iv)浓度在约20 μ M与约90 μ M之间的DTPA;其中所述配制品的pH在约6.8与约7.4之间。

[0239] 本公开文本提供了用于改善包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的配制品的稳定性的方法,所述方法包括掺和(i)浓度在约15mM与约40mM之间的组氨酸;(ii)浓度在约300mM与约800mM之间的蔗糖;(iii)浓度在约0.03%与约0.08% (w/v) 之间的聚山梨醇酯80;以及(iv)浓度在约30 μ M与约80 μ M之间的DTPA;其中所述配制品的pH在约6.9与约7.3之间。

[0240] 本公开文本提供了用于改善包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的配制品的稳定性的方法,所述方法包括掺和(i)浓度在约15mM与约30mM之间的组氨酸;(ii)浓度在约400mM与约800mM之间的蔗糖;(iii)浓度在约0.04%与约0.07% (w/v) 之间的聚山梨醇酯80;以及(iv)浓度在约40 μ M与约70 μ M之间的DTPA;其中所述配制品的pH在约7与约7.2之间。

[0241] 本公开文本提供了用于改善包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的配制品的稳定性的方法,所述方法包括掺和(i)浓度在约15mM与约25mM之间的组氨酸;(ii)浓度在约500mM与约700mM之间的蔗糖;(iii)浓度在约0.04%与约0.06% (w/v) 之间的聚山梨醇酯80;以及(iv)浓度在约45 μ M与约55 μ M之间的DTPA;其中所述配制品的pH在约7与约7.1之间。

[0242] 本公开文本还提供了用于改善包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的配制品的稳定性的方法,所述方法包括掺和(i)浓度为约20mM的组氨酸;(ii)浓度为约600mM的蔗糖;(iii)浓度为约0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80;以及(iv)浓度为约50 μ M的DTPA;其中所述pH是约7.1。

[0243] 本公开文本还提供了用于改善包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的配制品的稳定性的方法,所述方法包括掺和(i)浓度为20mM的组氨酸;(ii)浓度为600mM的蔗糖;(iii)浓度为0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80;以及(iv)浓度为50 μ M的DTPA;其中所述pH是7.1。

[0244] 本公开文本提供了用于改善包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的配制品的稳定性的方法,所述方法包括掺和(i)浓度为约20mM的组氨酸;和(ii)浓度为约600mM的蔗糖;其中所述pH是约7.0。

[0245] 本公开文本提供了用于改善包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-

FGF-21)的配制品的稳定性的方法,所述方法包括掺和(i)浓度为20mM的组氨酸;和(ii)浓度为600mM的蔗糖;其中所述pH是7.0。

[0246] 本公开文本提供了用于改善包含浓度为约10mg/mL的PEG-FGF-21 (SEQ ID NO:2)的配制品的稳定性的方法,所述方法包括掺和(i)浓度为约20mM的组氨酸;(ii)浓度为约600mM的蔗糖;(iii)浓度为约0.05% (w/v)的聚山梨醇酯80;以及(iv)浓度为约50uM的DTPA;其中所述pH是约7.1。

[0247] 本公开文本提供了用于改善包含浓度为约20mg/mL的PEG-FGF-21 (SEQ ID NO:2)的配制品的稳定性的方法,所述方法包括掺和(i)浓度为约20mM的组氨酸;(ii)浓度为约600mM的蔗糖;(iii)浓度为约0.05% (w/v)的聚山梨醇酯80;以及(iv)浓度为约50uM的DTPA;其中所述pH是约7.1。

[0248] 本公开文本提供了用于改善包含浓度为约10mg/mL的PEG-FGF-21 (SEQ ID NO:2)的配制品的稳定性的方法,所述方法包括掺和(i)浓度为20mM的组氨酸;(ii)浓度为600mM的蔗糖;(iii)浓度为0.05% (w/v)的聚山梨醇酯80;以及(iv)浓度为50uM的DTPA;其中所述pH是7.1。

[0249] 本公开文本提供了用于改善包含浓度为约20mg/mL的PEG-FGF-21 (SEQ ID NO:2)的配制品的稳定性的方法,所述方法包括掺和(i)浓度为20mM的组氨酸;(ii)浓度为600mM的蔗糖;(iii)浓度为0.05% (w/v)的聚山梨醇酯80;以及(iv)浓度为50uM的DTPA;其中所述pH是7.1。

[0250] 在一些实施方案中,可以将药物配制品中包括的单独赋形剂(例如DTPA、PS80、组氨酸、蔗糖)的浓度确定/计算为根据完成的药物配制品的最终体积单位在药物配制品的制造过程中添加至所述药物配制品中的单独赋形剂的量(重量、摩尔等)。在其他实施方案中,药物配制品中包括的赋形剂(例如DTPA、PS80、组氨酸、蔗糖)的浓度是基于药物配制品中单独赋形剂的实际量。

III. 治疗方法

[0251] 本公开文本还提供了在有需要的受试者中治疗或预防与纤维化和/或糖尿病相关的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文公开的包含FGF-21(例如,修饰的FGF-21如PEG-FGF-21)的药物配制品。

[0252] 在一些方面,所述疾病或病症是糖尿病,例如2型糖尿病。在一些方面,所述疾病或病症是非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。

[0253] 在一些方面,所述FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)在本文公开的治疗或预防方法中的使用量可以在约1mg/剂量与约40mg/剂量之间。在一些方面,所述FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)在本文公开的治疗或预防方法中的使用量可以在约1mg/剂量与约5mg/剂量之间、或在约5mg/剂量与约10mg/剂量之间、或在约10mg/剂量与约15mg/剂量之间、或在约15mg/剂量与约20mg/剂量之间、或在约20mg/剂量与约25mg/剂量之间、或在约25mg/剂量与约30mg/剂量之间、或在约30mg/剂量与约35mg/剂量之间、或在约35mg/剂量与约40mg/剂量之间。在一些方面,所述FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)在本文公开的治疗或预防方法中的使用量可以高于40mg/剂量。

[0254] 在一些方面,所述FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)在本文公开的治疗或预防方法中的使用量为约1mg、约2mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约

8mg、约9mg、约10mg、约11mg、约12mg、约13mg、约14mg、约15mg、约16mg、约17mg、约18mg、约19mg、约20mg、约21mg、约22mg、约23mg、约24mg、约25mg、约26mg、约27mg、约28mg、约29mg、约30mg、约31mg、约32mg、约33mg、约34mg、约35mg、约36mg、约37mg、约38mg、约39mg或约40mg/剂量。

[0255] 在一些方面,所述药物配制品是例如使用安全性注射器皮下施用的。在一些方面,所述药物配制品是每日或每周施用的。

[0256] 在一些方面,向所述受试者施用有效量的本文公开的包含FGF-21(例如,修饰的FGF-21如PEG-FGF-21)的药物配制品降低肝脏硬度、降低体脂百分比、降低体重、降低肝脏与体重比、降低肝脏脂质含量、降低肝脏纤维化面积、降低空腹血糖水平、降低空腹甘油三酯水平、降低LDL胆固醇水平、降低ApoB水平、降低ApoC水平、增加HDL胆固醇或其任何组合。

[0257] 在一些方面,与未治疗的受试者中的水平或与施用所述药物配制品之前的受试者相比,根据本文公开的治疗方法向所述受试者施用本文公开的包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21多肽如PEG-FGF-21)的药物配制品导致(i)肝脏脂肪水平的降低;(ii)肝脏损伤水平的降低;(iii)纤维化水平的降低;(iv)纤维化生物标志物血清Pro-C3(N末端III型胶原前肽)水平的降低;(v)丙氨酸转氨酶(ALT)水平的降低;(vi)天冬氨酸转氨酶(AST)水平的降低;(vii)血清脂联素水平的增加;(viii)血浆LDL水平的降低;(ix)血浆HDL水平的增加;(x)血浆甘油三酯水平的降低;(xi)肝脏硬度水平的降低;或(xii)其任何组合。

[0258] 本公开文本提供了治疗与纤维化相关的疾病的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的本文公开的包含FGF-21多肽的药物配制品。在一些方面,与纤维化相关的疾病可能影响器官或组织,如胰腺、肺、心脏、肾脏、肝脏、眼睛、神经系统、骨髓、淋巴结、心内膜心肌和/或腹膜后腔。在一些方面,与纤维化相关的疾病可以是肝脏纤维化或肝硬化前期。在一些方面,与纤维化相关的疾病可以选自:非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、肝硬化、弥漫性实质性肝病、囊性纤维化、肺部纤维化、进行性大块纤维化、特发性肺部纤维化、注射性纤维化、肾纤维化、慢性肾脏疾病、糖尿病肾病、局灶性节段性肾小球硬化、膜性肾病、IgA肾病、骨髓纤维化、心力衰竭、急性心力衰竭、慢性心力衰竭、代谢性心力衰竭、心脏性纤维化、白内障纤维化、白内障、眼部疤痕形成、胰腺纤维化、皮肤纤维化、肠纤维化、肠狭窄、心内膜心肌纤维化、心房纤维化、纵隔纤维化、克罗恩病、腹膜后纤维化、瘢痕疙瘩、肾源性系统性纤维化、硬皮病、系统性硬化症、关节纤维化、佩罗尼氏综合征、杜普伊特伦氏挛缩、糖尿病性神经病、粘连性关节囊炎、酒精性肝病、肝脂肪变性、病毒性肝炎、胆道疾病、原发性血色沉着病、药物相关性肝硬化、隐源性肝硬化、肝豆状核变性和 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症、间质性肺病(ILD)、人纤维化肺病、肝脏纤维化、黄斑变性、视网膜性视网膜病变、玻璃体视网膜病变、心肌纤维化、格雷夫斯眼病、药物引起的麦角中毒、心血管疾病、动脉粥样硬化/再狭窄、肥厚性瘢痕、原发性或特发性骨髓纤维化和炎症性肠病(包括但不限于胶原性结肠炎)。在一些方面,与纤维化相关的疾病是由肺部疾病、肺癌、药物疗法、化学疗法或放射疗法中的一种或多种引起的。在一些方面,与纤维化相关的疾病是由衰老、心脏病发作、中风、心肌损伤或左心室功能障碍中的一种或多种引起的。在一些方面,与纤维化相关的疾病可以选自肾纤维化、肾小球肾炎、慢性肾脏疾病、慢性肾脏衰竭和与系统性红斑狼疮、癌症、物理性阻塞、毒素、代谢疾病、免疫学疾病或糖尿病性肾病相关的肾炎。在一些方面,与纤维化相关的疾病是由以下一种或多种引起的:创伤、脊柱损伤、感染、手术、局部缺血性损伤、心脏病发

作、烧伤、环境污染物暴露、肺炎、结核病或急性呼吸窘迫综合征。在一些方面，与纤维化相关的疾病可以选自肺部纤维化、间质性肺病、人纤维化肺病、特发性肺部纤维化、肝脏纤维化、心脏性纤维化、心肌纤维化、黄斑变性、视网膜性视网膜病变、玻璃体视网膜病变、格雷夫斯眼病、药物引起的麦角中毒、心血管疾病、动脉粥样硬化/再狭窄、瘢痕疙瘩和肥厚性瘢痕、原发性或特发性骨髓纤维化、炎症性肠病、胶原性结肠炎、眼部瘢痕形成和白内障纤维化。在一些方面，与纤维化相关的疾病可以选自NASH、肝脏纤维化或肝硬化。在一些方面，与纤维化相关的疾病可以是NASH。在一些方面，与纤维化相关的疾病可以选自糖尿病性肾脏疾病、慢性肾脏疾病和肾纤维化。在一些方面，与纤维化相关的疾病可以选自代谢性心力衰竭和心脏性纤维化。在一些方面，与纤维化相关的疾病可以是肺纤维化。

[0259] 在一些方面，本公开文本提供了在有需要的受试者中降低肝脂肪分数的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的包含FGF-21多肽的药物配制品，其中任选地所述受试者有患NASH的风险或已被诊断为患有NASH。

[0260] 在一些方面，本公开文本提供了在有需要的受试者中降低肝脏硬度、降低体脂百分比、降低体重、降低肝脏/体重比、降低肝脏脂质含量、降低肝脏纤维化面积、降低空腹血糖水平、空腹甘油三酯、降低LDL胆固醇、降低ApoB、降低ApoC和/或增加HDL胆固醇的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的包含FGF-21多肽的药物配制品，其中任选地所述受试者有患NASH的风险或已被诊断为患有NASH。

[0261] 在一些方面，本公开文本提供了在有需要的受试者中增加脂联素水平的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的包含FGF-21多肽的药物配制品，其中任选地所述受试者有患NASH的风险或已被诊断为患有NASH。

[0262] 在一些方面，本公开文本提供了在有需要的受试者中治疗与NASH相关的一种或多种症状的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的包含FGF-21多肽的药物配制品。

[0263] 本文还提供了在有需要的受试者中治疗或预防NASH的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文公开的药物配制品，所述药物配制品包含含有SEQ ID NO:1的修饰的FGF-21多肽，其中其pAF残基连接至分子量约为30kDa的聚(乙二醇)部分(PEG-FGF-21)。

[0264] 在一些方面，所述受试者可以展现出NASH CRN纤维化1-3期，其任选地通过肝脏活检确定。在一些方面，在治疗之前，所述受试者可以展现出至少约60的脂肪肝指数。在一些方面，在治疗之前，所述受试者可以展现出至少10%的肝脂肪分数百分比，其任选地通过磁共振成像确定。

[0265] 在一些方面，本公开文本提供了在有需要的受试者中治疗1型糖尿病或2型糖尿病的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所述的包含FGF-21多肽的药物配制品。在一些方面，本公开文本提供了在有需要的受试者中治疗肥胖症的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所述的包含FGF-21多肽的药物配制品。在一些方面，本公开文本提供了在有需要的受试者中调节葡萄糖和脂质稳态、葡萄糖摄取、GLUT1表达和/或葡萄糖、甘油三酯、胰岛素或胰高血糖素的血清浓度中的至少一种的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的包含FGF-21多肽的药物配制品。

[0266] 在一些方面，本公开文本提供了在有需要的受试者中增加胰岛素敏感性、增加脂联素水平、降低血糖水平、降低胰高血糖素水平、降低甘油三酯水平、降低果糖胺水平、降低

低密度胆固醇水平或降低C-反应蛋白水平的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本文所述的包含FGF-21多肽的药物配制品。

[0267] 在一些方面,本公开文本提供了在有需要的受试者中治疗选自肥胖症、糖尿病、胰腺炎、胰岛素抵抗、高胰岛素血症、葡萄糖耐受不良、高血糖症、代谢综合征、葡萄糖耐量受损、葡萄糖清除率不足、高血糖和普拉德-威利综合征(Prader-Willi syndrome)的病症或障碍的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的包含FGF-21多肽的药物配制品。

[0268] 在一些方面,本公开文本提供了在有需要的受试者中治疗选自A型胰岛素抵抗、C型胰岛素抵抗(也称为HAIR-AN综合征)、罗伯森-门登霍尔综合征(Rabson-Mendenhall Syndrome)、多诺霍氏综合征(Donohue's Syndrome)或矮怪病(Leprechaunism)、雄激素过多症、多毛症(hirsutism)或黑棘皮症(acanthosis nigricans)的胰岛素相关病症或障碍的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的包含FGF-21多肽的药物配制品。

[0269] 在一些方面,本文公开的包含FGF-21多肽的药物配制品可以经由注射施用。在一些方面,本文公开的包含FGF-21多肽的药物配制品可以经由皮下注射、IV注射、腹膜内注射或肌肉注射施用。

[0270] 在一些方面,本文公开的包含FGF-21多肽的药物配制品可以以约每天一次的频率或低于约每天一次的频率施用。在一些方面,本文公开的包含FGF-21多肽的药物配制品可以以约每周两次的频率或低于约每周两次的频率施用。在一些方面,本文公开的包含FGF-21多肽的药物配制品可以以约每周一次的频率或低于约每周两次的频率施用。在一些方面,本文公开的包含FGF-21多肽的药物配制品可以以约每两周一次的频率或低于约每周两次的频率施用。在一些方面,本文公开的包含FGF-21多肽的药物配制品可以以约每三周一次的频率或低于约每周两次的频率施用。在一些方面,本文公开的包含FGF-21多肽的药物配制品可以以约每月一次的频率或低于约每月一次的频率施用。在一些方面,本文公开的包含FGF-21多肽的药物配制品可以以每四周一次的频率施用。在一些方面,本文公开的包含FGF-21多肽的药物配制品可以以约每天一次的频率施用。在一些方面,本文公开的包含FGF-21多肽的药物配制品可以以约每周一次的频率施用。

[0271] 在一些方面,本文公开的包含FGF-21多肽的药物配制品的施用量可以选自约1mg、约2mg、约5mg、约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95和约100mg FGF-21多肽/剂量。

[0272] 例如,本文公开的包含FGF-21多肽的药物配制品可以以约0.1与100mg/kg受体受试者体重之间的FGF-21多肽浓度施用至受试者。在一些方面,本文公开的包含FGF-21多肽的药物配制品可以以约0.5-5mg/kg受体受试者体重的FGF-21多肽浓度施用至受试者。在另一个方面,本文公开的包含FGF-21多肽的药物配制品可以以下述频率施用至受体受试者:在每天一次与每两周一次之间,如约每周一次或两次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次或每六天一次。

[0273] 本公开文本的药物配制品可以通过适于蛋白质或肽的任何常规途径施用,所述常规途径包括但不限于肠胃外,例如注射,包括但不限于皮下或静脉内或任何其他形式的注

射或输注。

IV. 修饰的FGF-21多肽

[0274] 本公开文本的修饰的FGF-21多肽涵盖包含一个或多个氨基酸取代、添加或缺失的FGF-21多肽。例如，本公开文本的修饰的FGF-21多肽包含一个或多个氨基酸取代(例如被天然存在或非天然存在的氨基酸取代)、缺失(末端或内部缺失)或修饰，如异源部分的附接(C末端、N末端或内部，通过在氨基酸序列中插层/插入，或者通过侧链附接)。在一些具体方面，修饰的FGF-21多肽包含SEQ ID NO:3(野生型FGF-21)的修饰型式，或SEQ ID NO:1(通过用对乙酰基-L-苯丙氨酸取代谷氨酰胺109而修饰的野生型序列)。在一些具体方面，修饰的FGF-21多肽是SEQ ID NO:1的衍生物，例如经由附接异源部分(例如，PEG)。在具体方面，修饰的FGF-21是PEG-FGF-21(SEQ ID NO:2)。

表1:FGF-21多肽的序列

SEQ ID NO	描述	序列
1	Q109被修饰的FGF-21	MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSP ESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELL LEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP PGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS pAF = 对乙酰基-L-苯丙氨酸
2	PEG-FGF-21 聚乙二醇化的 Q109被修饰的 FGF-21	MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSP ESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELL LEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP PGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS 其中pAF连接至30 kDa PEG
3	天然FGF-21	MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSP ESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELL LEDGYNVY <u>Q</u> SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP PGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS SEQ ID NO:1和2中修饰的谷氨酰胺 (Q) 加下划线。

[0275] 术语修饰的FGF-21多肽还涵盖多态性(例如，天然存在的FGF-21序列变体)，例如FGF-21的P型或L型。

[0276] 已经描述了天然存在的FGF-21中多个氨基酸位置中的取代。取代包括但不限于以下的那些：调节溶解度或稳定性、增加激动剂活性、增加体内或体外半衰期、增加蛋白酶抗性、使多肽转化为拮抗剂、降低免疫原性或毒性、促进纯化或可制造性或其任何组合，并且也被术语修饰的FGF-21多肽所涵盖。

[0277] 在一些情况下，一个或多个非天然编码氨基酸取代可以与修饰的FGF-21多肽内的其他添加、取代或缺失组合，以相对于另一FGF-21多肽（例如，SEQ ID NO:3的野生型FGF-21多肽、SEQ ID NO:1的修饰的FGF-21多肽、SEQ ID NO:2的PEG-FGF-21多肽、无添加、取代或缺失的相同FGF-21多肽或另一种未修饰或修饰的FGF-21未修饰或修饰的多肽）影响修饰的FGF-21多肽的其他生物学性状。

[0278] 在一些情况下，所述其他添加、取代或缺失可以增加修饰的FGF-21多肽的稳定性（包括但不限于对蛋白水解降解的抗性）或者增加修饰的FGF-21多肽对其受体的亲和力。在一些情况下，所述其他添加、取代或缺失可以增加修饰的FGF-21多肽的药学稳定性。在一些情况下，所述其他添加、取代或缺失可以增加修饰的FGF-21多肽的溶解度。

[0279] 在一些方面，除用于并入在重组宿主细胞中表达后导致增加多肽溶解度的非天然氨基酸的另一位点之外，还选择位点用于以天然编码或非天然氨基酸取代。

[0280] 在一些方面，修饰的FGF-21多肽包含另一添加、取代或缺失，所述添加、取代或缺失调节对FGF-21多肽受体、结合蛋白或相关配体的亲和力，调节与FGF-21受体结合后的信号转导，调节循环半衰期，调节释放或生物利用度，促进纯化，或者改善或改变特定施用途径。

[0281] 在一些方面，修饰的FGF-21多肽包含增加修饰的FGF-21对其受体的亲和力的添加、取代或缺失。类似地，修饰的FGF-21多肽可以包含化学或酶切割序列、蛋白酶切割序列、反应性基团、抗体结合结构域（包括但不限于FLAG或聚His）或其他基于亲和力的序列（包括但不限于FLAG、聚His、GST等）或连接分子（包括但不限于生物素），它们改善多肽的检测（包括但不限于GFP）、纯化、通过组织或细胞膜的运输、前药释放或活化、修饰的FGF-21尺寸减小或其他性状。

[0282] 已经鉴定了FGF-21的多种多态性。亮氨酸或脯氨酸已经在美国专利公开号20010012628和美国专利号6,716,626中被描述在相同位置处。相差1个氨基酸（亮氨酸）的N末端前导序列或信号序列示于美国专利号6,716,626和美国专利公开号20040259780中。FGF-21多肽变体或突变体包括但不限于以下文献中披露的那些：美国专利号6,716,626；美国专利公开号2005/0176631、2005/0037457、2004/0185494、2004/0259780、2002/0164713和2001/0012628；WO 01/36640；WO 03/011213；WO 03/059270；WO 04/110472；WO 05/061712；WO 05/072769；WO 05/091944；WO 05/113606；WO 06/028595；WO 06/028714；WO 06/050247；WO 06/065582；WO 06/078463；WO 01/018172；WO 09/149171；WO 10/042747；WO 12/066075；WO 11/154349；WO 13/052311；WO 13/188181，将所述文献通过引用以其整体并入本文。

[0283] 术语修饰的FGF-21多肽还包括天然存在的FGF-21的生物活性片段、生物活性变体和立体异构体，以及天然存在的FGF-21的激动剂、模拟物和拮抗剂变体及其多肽融合物。在氨基末端、羧基末端或两者处包含另外的氨基酸的融合物被术语修饰的FGF-21多肽所涵盖。

[0284] 示例性融合物包括但不限于例如甲硫氨酰FGF-21 (其中甲硫氨酸与由于缺乏前导肽或信号肽或其部分的FGF-21的成熟形式的重组表达产生的FGF-21的N末端连接(甲硫氨酸与由于例如大肠杆菌(E.coli)中的重组表达产生的FGF-21的N末端连接))、用于纯化目的的融合物(包括但不限于聚组氨酸或亲和力表位)、与血清白蛋白结合肽(如PKE阿德奈汀蛋白(adnectin))的融合物和与血清蛋白(如血清白蛋白)的融合物,以及包含FGF-21和一种或多种其他分子(异源部分)(包括但不限于血清白蛋白、Fc结构域、免疫球蛋白恒定区、非结构化多肽(如XTEN)等)的融合蛋白。任何此类片段均可以通过标准生物化学方法或通过表达编码所述片段的多核苷酸,从蛋白质制备。

[0285] 术语修饰的FGF-21多肽包括缀合至聚合物(如PEG)的多肽,并且可以任选地包含半胱氨酸、赖氨酸或其他残基的一种或多种另外的衍生化。另外,修饰的FGF-21多肽可以包含接头或聚合物,其中与所述接头或聚合物所缀合的氨基酸可以是根据本公开文本的非天然氨基酸,或者所述修饰的FGF-21多肽可以利用本领域已知的技术缀合至天然编码氨基酸,如与赖氨酸或半胱氨酸偶联。

[0286] 术语修饰的FGF-21多肽还包括糖基化的修饰的FGF-21,如但不限于在任何氨基酸位置处被糖基化的多肽、多肽的N-连接或O-连接的糖基化形式。含有单核苷酸变化的变体也被认为是FGF-21多肽的生物活性变体。另外,还包括剪接变体。

[0287] 术语修饰的FGF-21多肽还包括通过化学手段连接的或表达为融合蛋白的任何一种或多种未修饰或修饰的FGF-21多肽或任何其他多肽、蛋白质、碳水化合物、聚合物、小分子、接头、配体或任何类型的其他生物活性分子的FGF-21多肽异二聚体、同二聚体、异多聚体或同多聚体,以及含有例如特定缺失或其他修饰但仍保持生物活性的多肽类似物。

[0288] 术语修饰的FGF-21多肽还涵盖包含一个或多个氨基酸取代、添加或缺失的FGF-21多肽。例如,本公开文本的修饰的FGF-21多肽可以由一个或多个天然氨基酸的修饰构成,任选地与一个或多个非天然氨基酸修饰结合。FGF-21多肽中多个氨基酸位置的示例性取代、插入或缺失被术语修饰的FGF-21多肽所涵盖,所述示例性取代、插入或缺失包括但不限于如下取代:调节药学稳定性,调节FGF-21多肽的一种或多种生物活性,例如但不限于增加激动剂活性、增加多肽的溶解度、降低蛋白酶易感性、减少脱酰胺化、将多肽转化为拮抗剂、降低免疫原性或毒性、或者促进纯化或可制造性等。

[0289] 在一些方面,修饰的FGF-21多肽进一步包含调节修饰的FGF-21多肽的生物活性的另外的插入、取代或缺失。例如,所述添加、取代或缺失可以调节修饰的FGF-21的一种或多种特性或活性。例如,所述添加、取代或缺失可以调节对FGF-21多肽受体的亲和力、调节循环半衰期、调节治疗半衰期、调节多肽的稳定性、调节蛋白酶的切割、调节剂量、调节释放或生物利用度、促进纯化、减少脱酰胺化、改善储存期限、或者改善或改变特定施用途径。相似地,修饰的FGF-21多肽可以包含蛋白酶切割序列、反应性基团、抗体结合结构域(包括但不限于FLAG或聚His)或其他基于亲和力的序列(包括但不限于FLAG、聚His、GST等)或连接分子(包括但不限于生物素),它们改善多肽的检测(包括但不限于GFP)、纯化或其他性状。

[0290] 术语修饰的FGF-21多肽还涵盖同二聚体、异二聚体、同多聚体和异多聚体,它们是由融合配偶体如Fc结构域形成的,或者连接的,包括但不限于经由非天然编码氨基酸侧链直接连接至相同或不同的非天然编码氨基酸侧链、连接至天然编码氨基酸侧链或者经由接头间接连接的那些。示例性接头包括但不限于小的有机化合物、各种长度的水溶性聚合

物(如聚(乙二醇)或聚葡聚糖)或各种长度的多肽。

[0291] 在一些方面,本文所述的非天然编码氨基酸可以包含羰基、氨基氧基、酰肼基、肼基、氨基脒基、叠氮基或炔基。在一些方面,非天然编码氨基酸包含羰基部分,并且连接至包含氨基氧基、肼、酰肼或氨基脒部分的接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分。在一些方面,非天然编码氨基酸包含氨基氧基、肼、酰肼或氨基脒部分,其通过酰胺键连接至接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分。

[0292] 在一些方面,非天然编码氨基酸包含炔部分,其经由叠氮基部分连接至接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分。在一些方面,非天然编码氨基酸包含叠氮基部分,其连接至包含炔部分的接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分。在一些中,一个非天然编码氨基酸包含叠氮基或炔部分,其通过酰胺键连接至接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分。

[0293] 在一些方面,非天然编码氨基酸通过肟键连接至接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分。在一些方面,非天然编码氨基酸通过肟键连接至接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分,其中所述肟键具有由羰基和氨基氧基的反应产生的结构。在一些方面,非天然编码氨基酸通过肟键连接至接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分,其中所述肟键具有由所述非天然编码氨基酸中包含的羰基与所述接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分中包含的氨基氧基的反应产生的结构。

[0294] 在一些方面,本文所述的修饰的FGF-21多肽具有野生型人FGF-21多肽的至少一种生物活性,所述野生型人FGF-21多肽具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0295] 在一些方面,修饰的FGF-21多肽包含至少一个非天然编码氨基酸,其连接至包含聚(乙二醇)部分的水溶性聚合物。在一些方面,将一个或多个非天然编码氨基酸并入在修饰的FGF-21中的以下位置中的一个或多个中:在位置1之前(即在N末端处)、位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182(即,在蛋白质的羧基末端处)(氨基酸位置对应于SEQ ID NO:3)。

[0296] 在一些方面,本文公开的药物配制品中的FGF-21多肽是例如以下文献中所述的修饰的FGF-21多肽:美国专利号9,273,106;9,458,214;9,744,213;8,541,369;8,188,040;9,120,871;9,895,417;9,266,935;6,716,626;4,904,584;或8,722,622;美国申请公开号2013/0231277;2009/0305986;2011/0195895;2010/0216715;2001/0012628;2004/0259780;2005/0176631;20070293430;或2012/0035099;或PCT公开号WO 2016048999;WO 2010065439;WO 2017093465;WO 2003011213;WO 2003059270;WO 2005091944;WO 2008121563;WO 199967291;WO 199903887;WO 200026354;或WO 2017220706;将所有所述文献通过引用以其整体并入本文。

V. 半衰期延长部分

[0297] 本公开文本的FGF-21多肽可以包含异源部分,所述异源部分在一些方面是半衰期延长部分。在一些方面,半衰期延长部分是多肽部分,而在一些其他方面,半衰期延长部分是非多肽部分。在一些方面,FGF-21多肽包含单一半衰期延长部分。然而,在其他方面,本文公开的FGF-21多肽可以包含多于一个的半衰期延长部分。

[0298] 半衰期延长部分包括非蛋白质和蛋白质半衰期延长部分。非蛋白质半衰期延长部分包括例如水溶性聚合物如聚乙二醇(PEG)、羟乙基淀粉(HES)、脂质、支链或无支链酰基、支链或无支链 C_8-C_{30} 酰基、支链或无支链烷基和支链或无支链 C_8-C_{30} 烷基。蛋白质半衰期延长部分包括例如血清白蛋白、转铁蛋白、阿德奈汀蛋白(例如,白蛋白结合或药代动力学扩展(PKE)阿德奈汀蛋白)、Fc结构域和非结构化多肽(如XTEN和PAS)(例如,由氨基酸Pro、Ala和/或Ser构成的构象无序的多肽序列)以及任何前述项的片段。

[0299] FGF-21或一个或多个FGF家族成员的晶体结构及其与FGF受体的相互作用的检查可指示哪些氨基酸残基具有可完全或部分接近溶剂的侧链。这些位置处的非天然编码氨基酸的侧链可远离蛋白质表面指向溶剂中,且由此连接至例如水溶性聚合物。

(a) 免疫球蛋白恒定区或其部分

[0300] 在一些方面,FGF-21多肽连接(例如,融合或缀合)至免疫球蛋白恒定区或其部分。免疫球蛋白恒定区由表示CH(恒定重)结构域(CH1、CH2等)的结构域构成。根据同种型(即IgG、IgM、IgA、IgD或IgE),恒定区可以由3个或4个CH结构域构成。一些同种型(例如IgG)恒定区还含有铰链区。参见Janeway等人2001,Immunobiology, Garland Publishing, 纽约州纽约。

[0301] 用于产生本公开文本的融合蛋白的免疫球蛋白恒定区或其部分可以从多种不同来源获得。在一些方面,免疫球蛋白恒定区或其部分衍生自人免疫球蛋白。然而,应理解,免疫球蛋白恒定区或其部分可以衍生自另一哺乳动物物种的免疫球蛋白,所述另一种哺乳动物物种包括例如啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、兔、豚鼠)或非人灵长类动物(例如,黑猩猩、猕猴)物种。此外,免疫球蛋白恒定区或其部分可以衍生自任何免疫球蛋白类别(包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE)以及任何免疫球蛋白同种型(包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。在一方面,使用人同种型IgG1。

[0302] 多个免疫球蛋白恒定区基因序列(例如,人恒定区基因序列)能以可公开获得的存放物的形式获得。可以选择具有特定效应子功能(或缺少特定效应子功能)或具有特定修饰的恒定区结构域序列以降低免疫原性。已经公开了许多抗体和抗体编码基因的序列并且适宜的Ig恒定区序列(例如,铰链、CH2和/或CH3序列或其部分)可以使用本领域公认的技术从这些序列衍生。然后可以改变或合成使用任何前述方法获得的遗传物质以获得本公开文本的多肽。应进一步了解,本公开文本的范围涵盖恒定区DNA序列的等位基因、变体和突变。

[0303] 免疫球蛋白恒定区或其部分的序列可以例如使用聚合酶链式反应和所选用于扩增目标结构域的引物来克隆。为了从抗体克隆免疫球蛋白恒定区或其部分的序列,可以从杂交瘤、脾脏或淋巴细胞分离mRNA,逆转录成DNA,并通过PCR扩增抗体基因。PCR扩增方法详细描述于以下文献中:美国专利号4,683,195;4,683,202;4,800,159;4,965,188;以及例如“PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications”Innis等人编辑, Academic Press, 加利福尼亚州圣地亚哥(1990);Ho等人1989. Gene 77:51;Horton等人1993. Methods

Enzymol.217:270)。PCR可以基于所公开的重链和轻链DNA和氨基酸序列由共有恒定区引物或由更具特异性的引物来起始。如上所讨论的,PCR还可以用于分离编码抗体轻链和重链的DNA克隆。在这种情况下,可以通过共有引物或较大同源探针(如小鼠恒定区探针)筛选文库。许多适于扩增抗体基因的引物组是本领域已知的(例如,基于纯化抗体N端序列的5'引物(Benhar和Pastan.1994.Protein Engineering 7:1509);cDNA末端的快速扩增(Ruberti,F.等人1994.J.Immunol.Methods 173:33);抗体前导序列(Larrick等人1989Biochem.Biophys.Res.Comm.160:1250)。抗体序列的克隆进一步描述于1995年1月25日提交的Newman等人的美国专利号5,658,570。

[0304] 本文所用的免疫球蛋白恒定区可以包括所有结构域和铰链区或其部分。在一方面,免疫球蛋白恒定区或其部分包含CH2结构域、CH3结构域和铰链区,即Fc区或FcRn结合配偶体。

[0305] 如本文所用,术语“Fc区”定义为多肽中对应于天然免疫球蛋白的Fc区的部分,即如通过其两条重链的相应Fc结构域的二聚缔合所形成。天然Fc区与另一Fc区形成同二聚体。

[0306] 在一方面,“Fc区”是指单一免疫球蛋白重链的部分,所述部分始于铰链区中紧邻木瓜蛋白酶切割位点(即,IgG中的残基216',以重链恒定区的第一个残基为114)上游,并终于抗体的C末端。因此,完整Fc结构域至少包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。

[0307] 根据免疫球蛋白同种型,免疫球蛋白恒定区的Fc区可以包括CH2、CH3和CH4结构域以及铰链区。包含免疫球蛋白的Fc区的融合蛋白赋予融合蛋白若干种所需特性,包括增加的稳定性、增加的血清半衰期(参见Capon等人,1989,Nature 337:525)以及与Fc受体(如新生Fc受体(FcRn))的结合(美国专利号6,086,875、6,485,726、6,030,613;WO 03/077834;US2003-0235536A1)。

[0308] 在一些方面,“Fc区”包括Fc结构域的或衍生自Fc结构域的氨基酸序列。在某些方面,Fc区包含以下中的至少一者:铰链(例如,上部、中间和/或下部铰链区)结构域(根据EU编号的抗体Fc区的约氨基酸216-230)、CH2结构域(根据EU编号的抗体Fc区的约氨基酸231-340)、CH3结构域(根据EU编号的抗体Fc区的约氨基酸341-438)、CH4结构域或其变体、部分或片段。在其他方面,Fc区包含完整的Fc结构域(即,铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域)。在一些方面,Fc区包含以下项、基本上由以下项组成或由以下项组成:与CH3结构域(或其部分)融合的铰链结构域(或其部分)、与CH2结构域(或其部分)融合的铰链结构域(或其部分)、与CH3结构域(或其部分)融合的CH2结构域(或其部分)、与铰链结构域(或其部分)和CH3结构域(或其部分)二者融合的CH2结构域(或其部分)。在再其他方面,Fc区缺乏CH2结构域的至少一部分(例如,CH2结构域的全部或部分)。在特定方面,Fc区包含对应于EU编号221至447的氨基酸或由其组成。

[0309] 本文中表示为F、F1或F2的Fc结构域可以从多种不同来源获得。在一个方面,多肽的Fc区衍生自人免疫球蛋白。然而,应理解,Fc区可以衍生自另一哺乳动物物种的免疫球蛋白,所述哺乳动物物种包括例如啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、兔、豚鼠)或非人灵长类动物(例如,黑猩猩、猕猴)物种。此外,Fc结构域或其部分的多肽可以衍生自任何免疫球蛋白类别(包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE)以及任何免疫球蛋白同种型(包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。在另一个方面,使用人同种型IgG1。

[0310] 在某些方面,Fc变体赋予至少一种由包含所述野生型Fc结构域的Fc区赋予的效应子功能的变化(例如,Fc区结合至Fc受体(例如Fc γ RI、Fc γ RII或Fc γ RIII)或补体蛋白(例如,C1q)或触发抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、吞噬作用或补体依赖性细胞毒性(CDCC)的能力的改善或降低)。在其他方面,Fc变体提供工程化半胱氨酸残基。

[0311] 本公开文本的Fc区可以利用本领域公认的Fc变体,已知所述Fc变体可赋予效应子功能和/或FcR结合的变化(例如,增强或降低)。具体来说,本公开文本的结合分子可以包括例如在以下文献中披露的一个或多个氨基酸位置处的变化(例如,取代):国际PCT公开案WO 88/07089A1、WO 96/14339A1、WO 98/05787A1、WO 98/23289A1、WO 99/51642A1、WO 99/58572A1、WO 00/09560A2、WO 00/32767A1、WO 00/42072A2、WO 02/44215A2、WO 02/060919A2、WO 03/074569A2、WO 04/016750A2、WO 04/029207A2、WO 04/035752A2、WO 04/063351A2、WO 04/074455A2、WO 04/099249A2、WO 05/040217A2、WO 04/044859、WO 05/070963A1、WO 05/077981A2、WO 05/092925A2、WO 05/123780A2、WO 06/019447A1、WO 06/047350A2和WO 06/085967A2;美国专利公开号US 2007/0231329、US 2007/0231329、US 2007/0237765、US 2007/0237766、US 2007/0237767、US 2007/0243188、US 20070248603、US 20070286859、US 20080057056;或美国专利5,648,260;5,739,277;5,834,250;5,869,046;6,096,871;6,121,022;6,194,551;6,242,195;6,277,375;6,528,624;6,538,124;6,737,056;6,821,505;6,998,253;7,083,784;7,404,956和7,317,091。在一个方面,可以在一个或多个所披露的氨基酸位置进行特定变化(例如,本领域中披露的一个或多个氨基酸的特定取代)。在另一个方面,可以在一个或多个所披露的氨基酸位置进行不同变化(例如,本领域中披露的一个或多个氨基酸位置的不同取代)。

[0312] IgG的Fc区可以根据公认程序(如定点诱变等)来修饰,以产生将由Fc受体结合的修饰的IgG或其Fc片段或部分。此类修饰包括远离Fc受体接触位点的修饰以及在接触位点内的修饰,所述修饰保留或甚至增强与Fc受体的结合。例如,可以在不显著损失Fc对Fc受体的结合亲和力的情况下取代人IgG1 Fc(Fc γ 1)中的以下单个氨基酸残基:P238A、S239A、K246A、K248A、D249A、M252A、T256A、E258A、T260A、D265A、S267A、H268A、E269A、D270A、E272A、L274A、N276A、Y278A、D280A、V282A、E283A、H285A、N286A、T289A、K290A、R292A、E293A、E294A、Q295A、Y296F、N297A、S298A、Y300F、R301A、V303A、V305A、T307A、L309A、Q311A、D312A、N315A、K317A、E318A、K320A、K322A、S324A、K326A、A327Q、P329A、A330Q、P331A、E333A、K334A、T335A、S337A、K338A、K340A、Q342A、R344A、E345A、Q347A、R355A、E356A、M358A、T359A、K360A、N361A、Q362A、Y373A、S375A、D376A、A378Q、E380A、E382A、S383A、N384A、Q386A、E388A、N389A、N390A、Y391F、K392A、L398A、S400A、D401A、D413A、K414A、R416A、Q418A、Q419A、N421A、V422A、S424A、E430A、N434A、T437A、Q438A、K439A、S440A、S444A和K447A,其中例如P238A表示在位置编号238处由丙氨酸取代野生型脯氨酸。作为例子,一个具体方面并入N297A突变,从而去除高度保守的N糖基化位点。在上文指定的位置处,除了丙氨酸以外,可以用其他氨基酸取代野生型氨基酸。可以将突变引入Fc中,从而产生多于一百种与天然Fc不同的Fc区。另外,这些单独突变中的两个、三个或更多个的组合可以一起引入,从而再产生数百个Fc区。此外,本公开文本的构建体的一个Fc区可以发生突变,并且所述构建体的另一个Fc区完全不突变,或者所述二者可以都发生突变但是突变不同。

[0313] 某些上述突变可以赋予Fc区新的功能性。例如,一个方面并入N297A,从而去除高度保守的N糖基化位点。这个突变的作用是降低免疫原性,由此增强Fc区的循环半衰期,并使Fc区不能结合至Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB和Fc γ RIIIA,并且不损害亲和力(Routledge等人1995,Transplantation60:847;Friend等人1999,Transplantation 68:1632;Shields等人1995,J.Biol.Chem.276:6591)。作为从上述突变产生的新的功能性的另一个例子,在一些情况下对Fc受体的亲和力可以增加超过野生型的该亲和力。这种增加的亲和力可以反映增加的“缔合”速率、降低的“解离”速率、或增加的“缔合”速率与降低的“解离”速率二者。相信可赋予增加的对Fc受体的亲和力的突变的例子包括但不限于T256A、T307A、E380A和N434A(Shields等人2001,J.Biol.Chem.276:6591)。

[0314] 另外,至少三种人Fc γ 受体似乎可识别IgG上在下铰链区内的结合位点,通常是氨基酸234-237。因此,如例如通过将人IgG1的氨基酸233-236“ELLG”替代为来自IgG2的相应序列“PVA”(一个氨基酸缺失),可以从这个区域的突变产生新功能性的另一个例子和可能降低的免疫原性。已经显示,在已经引入此类突变时,介导各种效应子功能的Fc γ RII、Fc γ RII和Fc γ RIII不会结合至IgG1.Ward和Ghetie 1995,Therapeutic Immunology 2:77和Armour等人1999,Eur.J.Immunol.29:2613。

[0315] 在某些方面,免疫球蛋白恒定区或其部分是半糖基化的。例如,包含两个Fc区或FcRn结合配偶体的融合蛋白可包含第一糖基化Fc区(例如,糖基化CH2区)和第二非糖基化Fc区(例如,非糖基化CH2区)。在一个方面,可以在糖基化Fc区与非糖基化Fc区之间插入接头。在另一个方面,Fc区或FcRn结合配偶体被完全糖基化,即所有的Fc区都被糖基化。在其他方面,Fc区可以是非糖基化的,即,没有Fc部分被糖基化。

[0316] 在某些方面,本公开文本的融合蛋白包含对免疫球蛋白恒定区或其部分的氨基酸取代(例如,Fc变体),所述氨基酸取代改变Ig恒定区的非抗原依赖性效应子功能,特别是蛋白质的循环半衰期。

[0317] 当与缺乏这些取代的蛋白质相比时,此类蛋白质展现出增加或减少的与Fc受体的结合,因此分别具有增加或减少的血清半衰期。预期具有改善的对Fc受体的亲和力的Fc变体具有较长的血清半衰期,并且在需要所施用的多肽具有长半衰期的情况下,例如为了治疗慢性疾病或障碍,此类分子在治疗哺乳动物的方法中具有有用的应用(参见例如,美国专利号7,348,004、7,404,956和7,862,820)。相反,预期具有降低的Fc受体结合亲和力的Fc变体具有较短的半衰期,并且此类分子也是有用的,例如,用于在缩短的循环时间可能有利的情况下施用至哺乳动物,例如,用于体内诊断成像或者用于当起始多肽在循环中存在延长时间段时具有毒性副作用的情况下。具有降低的Fc受体结合亲和力的Fc变体也不太可能穿过胎盘,因此也可用于治疗孕妇的疾病或障碍。

[0318] 另外,可能需要降低的Fc受体结合亲和力的其他应用包括需要定位到脑、肾脏和/或肝脏的那些应用。在一个示例性方面,本公开文本的融合蛋白展现从脉管系统穿过肾小球上皮的运输减少。在另一个方面,本公开文本的融合蛋白展现从脑穿过血脑屏障(BBB)进入血管空间的转运减少。在一个方面,具有改变的Fc受体结合的蛋白质包含在Ig恒定区的“Fc受体结合环”内具有一个或多个氨基酸取代的至少一个Fc区(例如,一个或两个Fc区)。Fc受体结合环由野生型全长Fc区的氨基酸残基280-299(根据EU编号)构成。

[0319] 在其他方面,具有改变的Fc受体结合亲和力的本公开文本的Ig恒定区或其部分包

含在对应于以下EU位置中任一个的氨基酸位置处具有一个或多个氨基酸取代的至少一个Fc区:256、277-281、283-288、303-309、313、338、342、376、381、384、385、387、434(例如,N434A或N434K)和438。在国际PCT公开号WO 05/047327中公开了改变Fc受体结合活性的示例性氨基酸取代。

(b) 白蛋白或其片段或变体

[0320] 在一些方面,FGF-21多肽连接(例如,融合或缀合)至白蛋白或其功能片段。

[0321] 人血清白蛋白(HSA或HA)是在全长形式中有609个氨基酸的蛋白质,其负责大部分血清渗透压,并且还用作内源和外源配体的载体。如本文所用的术语“白蛋白”包括全长白蛋白或其功能性片段、变体、衍生物或类似物。

[0322] 在一些方面,连接至FGF-21多肽的半衰期延长部分是白蛋白或其片段或变体,其延长(或能够延长)FGF-21多肽的半衰期。白蛋白或其片段或变体的其他例子披露于以下文献中:美国专利公开号2008/0194481A1、2008/0004206A1、2008/0161243A1、2008/0261877A1或2008/0153751A1或PCT申请公开号2008/033413A2、2009/058322A1或2007/021494A2。

(c) 白蛋白结合部分

[0323] 在某些方面,连接(例如融合或缀合)至FGF-21多肽的半衰期延长部分是白蛋白结合部分,所述白蛋白结合部分包含白蛋白结合肽、细菌白蛋白结合结构域、白蛋白结合抗体片段或其任何组合。例如,白蛋白结合蛋白可以是细菌白蛋白结合蛋白、抗体或抗体片段,包括结构域抗体(参见美国专利号6,696,245)。例如,白蛋白结合蛋白可以是细菌白蛋白结合结构域,如一种链球菌蛋白G(Konig,T.和Skerra,A.(1998)J.Immunol.Methods 218,73-83)。可以用作缀合配偶体的白蛋白结合肽的其他例子是例如具有Cys-Xaa 1-Xaa 2-Xaa 3-Xaa 4-Cys共有序列的那些白蛋白结合肽,其中Xaa1是Asp、Asn、Ser、Thr或Trp;Xaa 2是Asn、Gln、His、Ile、Leu或Lys;Xaa3是Ala、Asp、Phe、Trp或Tyr;并且Xaa 4是Asp、Gly、Leu、Phe、Ser或Thr,如美国专利申请2003/0069395或Dennis等人(Dennis等人(2002)J.Biol.Chem.277,35035-35043)中所述。

(d) PAS序列

[0324] 在其他方面,连接(例如,融合或缀合)至FGF-21多肽的半衰期延长部分是PAS序列。如本文所用的“PAS序列”意指主要包含丙氨酸和丝氨酸残基或主要包含丙氨酸、丝氨酸和脯氨酸残基的氨基酸序列,所述氨基酸序列在生理条件下形成无规螺旋构象。因此,PAS序列是包含丙氨酸、丝氨酸和脯氨酸、基本上由所述氨基酸组成或由所述氨基酸组成的构件块、氨基酸聚合物或序列盒,其可以用作融合蛋白中异源部分的一部分。然而,技术人员知道,当添加丙氨酸、丝氨酸和脯氨酸以外的残基作为PAS序列中的次要成分时,氨基酸聚合物也可以形成无规螺旋构象。如本文所用的术语“次要成分”意指,可以在PAS序列中添加除了丙氨酸、丝氨酸和脯氨酸以外的氨基酸至某种程度,例如,高达约12%,即PAS序列的100个氨基酸中的约12个;高达约10%,即PAS序列的100个氨基酸中的约10个;高达约9%,即100个氨基酸中的约9个;高达约8%,即100个氨基酸中的约8个;约6%,即100个氨基酸中的约6个;约5%,即100个氨基酸中的约5个;约4%,即100个氨基酸中的约4个;约3%,即100个氨基酸中的约3个;约2%,即100个氨基酸中的约2个;约1%,即100个氨基酸中的约1个。与丙氨酸、丝氨酸和脯氨酸不同的氨基酸可以选自Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、

Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr和Val。

[0325] 在生理条件下,PAS序列延伸段形成无规螺旋构象,从而可以介导FGF-21多肽的增加的体内和/或体外稳定性。由于无规螺旋结构域自身不具有稳定结构或功能,基本上保留了由FGF-21介导的生物活性。在其他方面,形成无规螺旋结构域的PAS序列是生物惰性的,尤其关于血浆中的蛋白质水解、免疫原性、等电点/静电行为、与细胞表面受体的结合或内化,但仍然是生物可降解的,这提供了优于合成聚合物如PEG的明显优势。

[0326] 示例性PAS序列提供例如以下文献中:美国专利公开号2010/0292130A1和PCT申请公开号W0 2008/155134 A1,将所述两个文献均通过引用以其整体并入。

(e) HAP序列

[0327] 在某些方面,连接(例如,融合或缀合)至FGF-21多肽的半衰期延长部分是富甘氨酸的同氨基酸聚合物(HAP)。HAP序列可以包含甘氨酸的重复序列,所述重复序列的长度为至少50个氨基酸、至少100个氨基酸、120个氨基酸、140个氨基酸、160个氨基酸、180个氨基酸、200个氨基酸、250个氨基酸、300个氨基酸、350个氨基酸、400个氨基酸、450个氨基酸或500个氨基酸。

[0328] 在一个方面,HAP序列能够延长融合至或连接至HAP序列的部分的半衰期。HAP序列的非限制性例子包括但不限于(Gly) n 、(Gly₄Ser) n 或S(Gly₄Ser) n ,其中 n 是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。在一个方面, n 是20、21、22、23、24、25、26、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40。在另一个方面, n 是50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200。

(f) 转铁蛋白或其片段

[0329] 在某些方面,连接(例如,融合或缀合)至FGF-21多肽的半衰期延长部分是转铁蛋白或其片段。任何转铁蛋白都可以用于制备本公开文本的融合蛋白。作为例子,野生型人Tf(Tf)是679个氨基酸的蛋白质,大约75KDa(不计糖基化),具有似乎源自基因重复的两个主要结构域N(约330个氨基酸)和C(约340个氨基酸)。参见GenBank登录号NM001063、XM002793、M12530、XM039845、XM 039847和S95936(www.ncbi.nlm.nih.gov/)。转铁蛋白包含两个结构域N结构域和C结构域。N结构域包含两个子结构域N1结构域和N2结构域,并且C结构域包含两个子结构域C1结构域和C2结构域。

[0330] 在一个方面,融合蛋白的转铁蛋白部分包括转铁蛋白剪接变体。在一个例子中,转铁蛋白剪接变体可以是人转铁蛋白的剪接变体,例如Genbank登录号AAA61140。在另一个方面,融合蛋白的转铁蛋白部分包括转铁蛋白序列的一个或多个结构域,例如N结构域、C结构域、N1结构域、N2结构域、C1结构域、C2结构域或其任何组合。

(g) 聚合物,例如聚乙二醇(PEG)

[0331] 在其他方面,连接(例如,融合或缀合)至FGF-21多肽的半衰期延长部分是本领域已知的可溶性聚合物,包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖或聚乙烯醇。本公开文本的FGF-21多肽的化学修饰的衍生物可以提供另外的优点,如增加的多肽溶解度、稳定性和循环时间,或降低的免疫原性(参见美国专利号4,179,337)。可溶性聚合物可以附接至FGF-21多肽内的任何位置或附接至其N或C末端。

可溶性聚合物可以附接在FGF-21多肽序列内的随机位置处或附接在FGF-21多肽内的预定位置处,并且可以包括一个、两个、三个或更多个附接的可溶性聚合物部分。在一

些方面,聚合物附接至天然存在的氨基酸的侧链。在其他方面,聚合物附接至非天然编码氨基酸(例如苯丙氨酸衍生物,如对乙酰基-L-苯丙氨酸)的侧链。

[0332] 可溶性聚合物可以具有任何分子量,并且可以是支链或无支链的。对于PEG,在一个方面,分子量在约1kDa与约100kDa之间,以易于处理和制造。在一些方面,可溶性聚合物(例如PEG)的分子量是约30kDa。可以使用其他大小,这取决于所需的特性(例如所需的持续释放的持续时间、对生物活性的作用(如果有的话)、易处理性、抗原性的程度或缺乏、以及聚乙二醇对蛋白质或类似物的其他已知作用)。例如,PEG可以具有以下的平均分子量:约200、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、10,000、10,500、11,000、11,500、12,000、12,500、13,000、13,500、14,000、14,500、15,000、15,500、16,000、16,500、17,000、17,500、18,000、18,500、19,000、19,500、20,000、25,000、30,000、35,000、40,000、45,000、50,000、55,000、60,000、65,000、70,000、75,000、80,000、85,000、90,000、95,000或100,000Da。

[0333] 在一些方面,PEG可以具有支链结构。支链PEG描述于例如以下文献中:美国专利号5,643,575;Morpurgo等人,Appl.Biochem.Biotechnol.56:59-72(1996);Vorobjev等人,Nucleosides Nucleotides 18:2745-2750(1999);和Caliceti等人,Bioconj.Chem.10:638-646(1999)。

[0334] 附接至FGF-21多肽的PEG部分的数量也可以变化。例如,本公开文本的聚乙二醇化蛋白可以平均与1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、12个、15个、17个、20个或更多个PEG分子连接。类似地,平均取代度可以位于如以下的范围内:每个蛋白质分子1-3、2-4、3-5、4-6、5-7、6-8、7-9、8-10、9-11、10-12、11-13、12-14、13-15、14-16、15-17、16-18、17-19或18-20个PEG部分。用于确定取代度的方法披露于例如Delgado等人,Crit.Rev.Thera Drug Carrier Sys.9:249-304(1992)中。

[0335] 在其他方面,本公开文本的配制品中使用的FGF-21多肽缀合至一种或多种聚合物。聚合物可以是水溶性的,并且共价或非共价附接至FGF-21多肽或与FGF-21缀合的其他部分。聚合物的非限制性例子可以是聚(环氧烷)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚噁唑啉或聚(丙烯酸吗啉)。

(h) 羟乙基淀粉(HES)

[0336] 在某些方面,连接(例如,融合或缀合)至FGF-21多肽的半衰期延长部分是羟乙基淀粉(HES)或其衍生物。HES是天然存在的支链淀粉的衍生物,并且在体内由 α -淀粉酶降解。HES是碳水化合物聚合物支链淀粉的取代衍生物,其以按重量计高达95%的浓度存在于玉米淀粉中。HES展现有利的生物特性并且在临床中用作血容量替代剂以及用于血液稀释疗法(Sommermeier等人,Krankenhauspharmazie,8(8),271-278(1987);和Weidler等人,Arzneim.-Forschung/Drug Res.,41,494-498(1991))。

[0337] 支链淀粉含有葡萄糖部分,其中在主链中存在 α -1,4-糖苷键,并且在分支位点发现 α -1,6-糖苷键。此分子的物理化学特性主要由糖苷键的类型决定。由于带切口的 α -1,4-糖苷键,产生了每转具有约六个葡萄糖单体的螺旋结构。聚合物的物理化学和生物化学特性可以经由取代来修改。羟乙基的引入可以经由碱羟乙基化来实现。通过调整反应条件,可能利用未取代的葡萄糖单体中的相应羟基关于羟乙基化的不同反应性。由于这个事实,技术人员能够在有限程度上影响取代模式。

[0338] HES主要通过分子量分布和取代度来表征。取代度表示为DS,与摩尔取代相关,是技术人员已知的。参见,如上文引用的Sommermeyer等人,Krankenhauspharmazie,8(8),271-278(1987),具体而言第273页。

[0339] 在一个方面,HES具有从1至300kD、2至200kD、3至100kD或4至70kD的平均分子量(重均分子量)。关于羟乙基,羟乙基淀粉可以进一步展现从0.1至3、优选0.1至2、更优选0.1至0.9、优选0.1至0.8的摩尔取代度,以及从2至20范围内的C2:C6取代之间的比率。具有约130kD的平均分子量的HES的非限制性例子是具有0.2至0.8,如0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7或0.8,优选0.4至0.7,如0.4、0.5、0.6或0.7的取代度的HES。在具体方面,具有约130kD的平均分子量的HES是来自Fresenius的**Voluven®**。**Voluven®**是一种例如用于容量替代的人工胶体,用于低血容量症的治疗和预防的治疗性适应症中。**Voluven®**的特征是平均分子量为130,000+/-20,000D,摩尔取代度为0.4,并且C2:C6比率为约9:1。在其他方面,羟乙基淀粉的平均分子量范围是,例如4至70kD,或10至70kD,或12至70kD,或18至70kD,或50至70kD,或4至50kD,或10至50kD,或12至50kD,或18至50kD,或4至18kD,或10至18kD,或12至18kD,或4至12kD,或10至12kD,或4至10kD。在再其他方面,采用的羟乙基淀粉的平均分子量是在大于4kD且低于70kD的范围内,如约10kD,或在从9至10kD或从10至11kD或从9至11kD的范围内,或约12kD,或在从11至12kD或从12至13kD或从11至13kD的范围内,或约18kD,或在从17至18kD或从18至19kD或从17至19kD的范围内,或约30kD,或在从29至30、或从30至31kD的范围内,或约50kD,或在从49至50kD或从50至51kD或从49至51kD的范围内。

[0340] 在某些方面,半衰期延长部分可以是具有不同平均分子量和/或不同取代度和/或不同C2:C6取代比率的HES的混合物。因此,可以采用如下HES的混合物:具有不同的平均分子量和不同的取代度和不同的C2:C6取代比率,或具有不同的平均分子量和不同的取代度和相同或大致相同的C2:C6取代比率,或具有不同的平均分子量和相同或大致相同的取代度和不同的C2:C6取代比率,或具有相同或大致相同的平均分子量和不同的取代度和不同的C2:C6取代比率,或具有相同或大致相同的平均分子量和不同的取代度和相同或大致相同的C2:C6取代比率,或具有相同或大致相同的平均分子量和不同的取代度和相同或大致相同的C2:C6取代比率,或具有相同或大致相同的平均分子量和相同或大致相同的取代度和不同的C2:C6取代比率,或具有大致相同的平均分子量和大致相同的取代度和大致相同的C2:C6取代比率。

(i) 聚唾液酸 (PSA)

[0341] 在某些方面,连接(例如,融合或缀合)至FGF-21多肽的半衰期延长部分是聚唾液酸(PSA)或其衍生物。PSA是某些细菌菌株和在哺乳动物的某些细胞中产生的唾液酸的天然存在的无支链聚合物,Roth J.等人(1993)Polysialic Acid:From Microbes to Man,Roth J.,Rutishauser U.,Troy F.A.编辑(**Birkhäuser** Verlag,巴塞尔,瑞士),第335-348页。它们可以通过聚合物天然细菌衍生形式的有限酸水解或用神经氨酸酶消化或分级分离,以从n=约80或更多个唾液酸残基低至n=2的不同聚合度来产生。

[0342] 不同的聚唾液酸的组成也变化,使得存在同聚形式,即包含大肠杆菌菌株K1和B群脑膜炎球菌的荚膜多糖的 α -2,8-连接的聚唾液酸,所述聚唾液酸也发现于神经细胞粘附分子(N-CAM)的胚胎形式上。还存在异聚形式,如大肠杆菌菌株K92和脑膜炎奈瑟球菌(N.meningitidis)C群多糖的交替 α -2,8 α -2,9聚唾液酸。唾液酸也可以发现于与除了唾液

酸以外的单体的交替共聚物中,如脑膜炎奈瑟球菌的W135群或Y群。尽管在哺乳动物中没有已知的聚唾液酸受体,但聚唾液酸具有重要的生物学功能,包括致病性细菌逃避免疫系统和补体系统,以及在胎儿发育过程中调节未成熟神经元的神经胶质粘附性(其中所述聚合物具有抗粘附功能)Cho和Troy, P.N.A.S., USA, 91 (1994) 11427-11431。大肠杆菌菌株K1的 α -2,8-连接的聚唾液酸也称为“多聚乙酰神经氨酸(colominic acid)”,并且用于(以各种长度)举例说明本公开文本。

[0343] 已经描述了将聚唾液酸附接或缀合至多肽的各种方法,例如,参见美国专利号5,846,951;WO-A-0187922和US 2007/0191597 A1)。

(j) XTEN序列

[0344] 在一些方面,连接(例如,融合或缀合)至FGF-21多肽的半衰期延长部分是XTEN序列。如本文所用,“XTEN序列”是指延伸长度的多肽,其具有非天然存在的基本上不重复的序列,所述序列主要由小亲水性氨基酸构成,并且所述序列在生理条件下具有较低程度的或不具有二级或三级结构。作为融合蛋白配偶体,XTEN可以用作载体,当与FGF-21多肽连接以产生融合蛋白时,赋予某些期望的药代动力学、物理化学和药学特性。这些期望的特性包括但不限于增强的药代动力学参数和溶解度特征。

[0345] 在一些方面,本公开文本的XTEN序列是具有大于约20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1200、1400、1600、1800或2000个氨基酸残基的肽或多肽。在某些方面,XTEN是具有大于约20至约3000个氨基酸残基、大于30至约2500个残基、大于40至约2000个残基、大于50至约1500个残基、大于60至约1000个残基、大于70至约900个残基、大于80至约800个残基、大于90至约700个残基、大于100至约600个残基、大于110至约500个残基、或大于120至约400个残基的肽或多肽。

[0346] 本公开文本的XTEN序列可以包含一个或多个具有9至14个氨基酸残基的序列基序或与所述序列基序至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,其中所述基序包含4-6种类型的氨基酸,基本上由所述氨基酸组成或由所述氨基酸项组成,所述氨基酸选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)。参见US 2010-0239554 A1。

[0347] 在一些方面,XTEN序列包含AD基序家族、或AE基序家族、或AF基序家族、或AG基序家族、或AM基序家族、或AQ基序家族、或BC家族、或BD家族的非重叠序列基序的多个单元,并且所得XTEN展现出同源性范围。在其他方面,XTEN包含来自两个或更多个基序家族的基序序列的多个单元。可以选择这些序列以实现所需的物理/化学特征,包括诸如以下的特性:净电荷、亲水性、二级结构的缺少或重复性的缺少,这些特性由基序的氨基酸组成赋予,下面将更全面地描述。在其他方面,可以使用本文所述方法选择并组装并入XTEN中的基序,以得到约36至约3000个氨基酸残基的XTEN。

[0348] 在其他方面,本公开文本中使用的XTEN序列影响本公开文本的融合蛋白的物理或化学特性,例如药代动力学。本公开文本中使用的XTEN序列可以展现出以下有利特性中的一种或多种:构象灵活性、增强的水溶性、高度的蛋白酶抗性、低免疫原性、与哺乳动物受体的低结合或增加的流体动力学(或斯托克斯(Stokes))半径。

[0349] 在一些方面,连接至FGF-21多肽的XTEN序列可以增加药代动力学特性,如更长的

终末半衰期或增加的曲线下面积 (AUC),使得与没有XTEN的相应FGF-21多肽相比,FGF-21多肽在体内停留增加的时间段。在其他方面,连接至本文公开的FGF-21多肽的XTEN序列可以增加药代动力学特性,如更长的终末半衰期或增加的曲线下面积 (AUC),使得与没有XTEN的相应FGF-21多肽相比,FGF-21多肽在体内停留增加的时间段。

[0350] 可以采用多种方法和测定来确定包含XTEN序列的蛋白质的物理/化学特性。此类方法包括但不限于分析离心法、EPR、HPLC-离子交换、HPLC-尺寸排阻、HPLC-反相、光散射、毛细管电泳、圆二色性、差示扫描量热法、荧光、HPLC-离子交换、HPLC-尺寸排阻、IR、NMR、拉曼光谱、折光测定法和UV/可见光谱法。在Amau等人,Prot Expr and Purif 48,1-13 (2006)中披露了另外的方法。

[0351] 可以根据本公开文本使用的XTEN序列的另外的例子披露于以下文献中:美国专利申请号2010/0239554A1、2010/0323956A1、2011/0046060A1、2011/0046061A1、2011/0077199A1或2011/0172146A1,或国际专利申请号WO 2010091122 A1、WO 2010144502 A2、WO 2010144508 A1、WO2011028228A1、WO 2011028229 A1或WO 2011028344 A2,将所述所有文献通过引用以其整体并入本文。

(k) 免疫球蛋白结合肽(或多肽)

[0352] 在某些方面,连接(例如,融合或缀合)至FGF-21多肽的半衰期延长部分是免疫球蛋白结合肽。免疫球蛋白结合肽可以结合至Fc区,并且可以改善本文描述的融合蛋白的半衰期。

[0353] 在一些方面,可用于本公开文本的免疫球蛋白结合肽是具有大于约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450或500个氨基酸残基的肽或多肽。

[0354] 在一些方面,可用于本公开文本的免疫球蛋白结合肽包含13聚体IgG-Fc结构域结合肽(IgGBP)。DeLano WL,等人(2000) Science 287:1279-1283。在其他方面,可用于本公开文本的免疫球蛋白结合肽包含在美国专利公开号20170334954、美国专利公开号20170210777或PCT公开号WO/2017/069158中所披露的肽。

VI. 制品和试剂盒

[0355] 本公开文本还提供了制品和试剂盒,所述制品和试剂盒包含(i) 本文公开的包含FGF-21多肽(例如,修饰的FGF-21如PEG-FGF-21)的FGF-21药物配制品,和(ii) 使用说明。所述制品可以包含容器。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器和试管。容器可以由多种材料(如玻璃、或塑料或金属)形成。容器容纳FGF-21药物配制品,例如液体配制品。

[0356] 容器上或与容器相联的标签可以指示重构和/或使用的指导。例如,标签可以指示要将FGF-21药物配制品稀释至如上文所述的蛋白质浓度。标签可以进一步指示皮下配制品可用于或旨在用于皮下施用。

[0357] 容纳配制品的容器可以是多次使用的小瓶,所述小瓶允许例如皮下配制品的重复施用(例如,2至6次或更多次施用)。可替代地,容器可以是含有例如皮下配制品的预填充注射器。

[0358] 所述制品或试剂盒可以进一步包含含有例如溶剂的第二容器。所述制品可以进一步包括从商业和用户角度来看希望的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射器和具有使用说明的包装插页。

[0359] 应了解,具体实施方式部分而不是发明内容和摘要部分旨在用于解释项。发明内容和摘要部分可以阐述如由一个或多个本发明人所设想的本公开文本的一个或多个但不是全部示例性方面,因此并不旨在以任何方式限制本公开文本和所附项。

[0360] 本公开文本已经在上文借助功能性结构单元来描述,从而说明指定功能及其关系的实施。为便于描述,本文中已将这些功能性结构单元的边界任意地定义。可定义替代性边界,只要适当地执行指定功能及其关系即可。

[0361] 具体方面的前述描述将充分地揭示本公开文本的大体性质,使得其他人可以通过应用本领域技术范围内的知识,无需过度实验,在不偏离本公开文本的总体概念的情况下,针对各种应用容易地修改和/或调整这些具体方面。因此,基于本文给出的传授内容和指导,此类调整和修改旨在包含在所公开的方面的等效方案的含义和范围内。应理解,本文中的措辞或术语是出于描述而非限制的目的,因此本说明书的术语或措辞将由本领域技术人员根据传授内容和指导来解释。

[0362] 本公开文本的广度和范围不应受任何上述示例性方面限制,而应仅根据以下项及其等同物定义。

实施例

实施例1

PEG-FGF-21配制品开发

[0363] 对于初步研究,将PEG-FGF-21以7.5mg/mL配制在20mM Tris、250mM蔗糖、pH 8.3中。在该配制品中观察到的高脱酰胺化速率使得必须将药物产品冷冻储存在-20℃下。因此,还进行了另外的工作来开发即用型(RTU)配制品,从而允许药物产品的2℃-8℃储存。

[0364] PEG-FGF-21 (SEQ ID NO:2)是通过以位点特异性方式将线性30-kDa PEG部分附接至修饰的FGF-21 (SEQ ID NO:1)而制得的。为了实现位点特异性聚乙二醇化,通过本领域已知的方法使活化的PEG与FGF-21分子的位置109中的非天然氨基酸对乙酰基苯丙氨酸(pAF)反应,以形成化学稳定的肽连接的PEG-蛋白质缀合物。

[0365] 显示较低的配制品pH增加了分子的聚集速率,而显示较高的配制品pH增加了脱酰胺化速率。在10mg/mL的目标蛋白质浓度下,发现pH 7.0是聚集速率与脱酰胺化速率之间的最佳平衡。显示增加蔗糖浓度进一步稳定化分子以对抗聚集。

[0366] 选择用于进一步研究的配制品是在20mM L-组氨酸、600mM蔗糖、pH 7.0中的10mg/mL PEG-FGF-21。鉴于设想的20mg的每周剂量,开发了预填充注射器中浓度更高的药物产品。为了实现更高浓度的药物产品,必须进一步优化配制品。

[0367] 在3mL I型玻璃小瓶中进行了更高浓度配制品的初步开发。在20mM L-组氨酸、600mM蔗糖、pH 7.0中搅拌15mg/mL和22mg/mL PEG-FGF-21时,观察到空气泡滞留,并且溶液变得越来越混浊(图5,左图)。为了缓和所述问题,使用聚山梨醇酯80。聚山梨醇酯80能够防止空气泡滞留(图5,右图)。因此,将聚山梨醇酯80以0.05% (w/v) 的浓度添加至PEG-FGF-21的高浓度配制品。

[0368] 氧化是PEG-FGF-21的重要质量属性,并且在C末端附近的甲硫氨酸-169的氧化消除了受体结合且由此消除了分子的活性。金属催化的氧化是蛋白质可被氧化的机制之一。蛋白质配制品中可能由于以下方面而存在痕量浓度的金属:细胞培养的遗留、与不锈钢容

器的接触、赋形剂中的杂质、可预填充注射器的形成过程等。

[0369] 为了测试PEG-FGF-21对金属催化的氧化是否敏感,在存在或不存在0.05mM喷替酸(二乙烯三胺五乙酸,DTPA)的情况下将添加或未添加金属混合剂(250ppm Fe、10ppm Cu、15ppm Cr、15ppm Ni、10ppm Mo)的样品分别在25℃下孵育一个月和在40℃下孵育两周,并且通过胰蛋白酶肽图确定甲硫氨酸1和甲硫氨酸169的氧化水平(图2A和图2B)。

[0370] 在不存在喷替酸(DTPA)的情况下,即使在不添加金属的样品中,也观察到两个甲硫氨酸残基的显著氧化,而在添加金属混合剂的样品中,氧化水平甚至更高。在具有50μM喷替酸的样品中,对于任一个甲硫氨酸均未观察到氧化水平的增加。这表明PEG-FGF-21对金属催化的氧化敏感,并且配制品中已经存在痕量水平的金属。喷替酸有效螯合配制品中存在的金属以及添加至配制品中的另外的金属,并防止甲硫氨酸1和169的金属催化的氧化。因此,向PEG-FGF-21的高浓度配制品中添加50μM喷替酸。

[0371] 为了优化用于较高浓度配制品的pH,我们回顾了pH 6.3和8.5之间收集的PEG-FGF-21的聚集数据,所述数据显示聚集速率在低于pH 6.8时迅速增加(图3A和图3B)。因此,我们将高浓度配制品的目标pH从pH 7.0增加至pH 7.1。

[0372] 为了将新的高浓度配制品与先前配制品进行比较,将在20mM L-组氨酸、600mM蔗糖、0.05mM喷替酸、0.05% (w/v) 聚山梨醇酯80、pH7.0(在优化pH之前)中的20mg/mL PEG-FGF-21置于稳定性上,并与在20mM L-组氨酸、600mM蔗糖、pH 7.0中的22.5mg/mL PEG-FGF-21进行比较。

[0373] 如图4A和图4B、图1A和1B中所示,向PEG-FGF-21配制品中添加聚山梨醇酯80和喷替酸在所有温度下导致较低的聚集速率并且在40℃下导致较少的脱酰胺化。

测试方法

[0374] 聚集:聚集是在配有可商购获得的分析柱(Tosoh TSK凝胶G3000SWXL,7.8x300mm,P/N:08541)的可商购获得的系统(例如,具有PDA检测器的Agilent Technologies 1100系列HPLC系统或具有PDA检测器的Waters Alliance e2695系列HPLC)上通过尺寸排阻高效液相色谱进行测试的。使用流速为0.8ml/min的95%磷酸盐缓冲盐水(PBS)和5%乙醇的流动相将高分子量物质与蛋白质单体分离。将样品用PBS稀释至蛋白质浓度为0.5mg/mL,并且每次实验注射0.01mg (0.02mL)。通过使用仪器软件将高分子量峰的面积除以所有观察到的峰的总面积来确定聚集体的量。

[0375] 脱酰胺化:脱酰胺化是在配有可商购获得的分析柱(Agilent Bio WAX,无孔,5μm柱,4.6x 250mm,P/N:5190-2487)的可商购获得的系统(例如,具有PDA检测器的Agilent Technologies 1100系列HPLC系统或具有PDA检测器的Waters Alliance e2695系列HPLC)上通过阴离子交换高效液相色谱进行测试的。流动相A由20mM Tris、pH 8.2组成,并且流动相B由20mM Tris、500mM氯化钠、pH 8.2组成。使用以1.0ml/min的流速在20分钟内从2%B至67%B的线性梯度来分离带电荷的蛋白质变体。将样品用流动相A稀释至蛋白质浓度为1mg/mL,并且每次实验注射0.075mg (0.075mL)。通过使用仪器软件将酸性变体峰的面积除以所有观察到的峰的总面积来确定脱酰胺化的量。

[0376] 氧化:通过胰蛋白酶肽图测试氧化。用胰蛋白酶消化蛋白质样品之后,在配有可商购获得的分析柱(Waters Acquity C18 BEH肽RP UPLC柱,2.1×150mm,1.7-μm粒径,130-Å孔径,P/N:186003556)的可商购获得的系统(例如,Waters Acquity UPLC)上通过反相超高

效液相色谱来分离所得肽。流动相A由在水中的0.2%三氟乙酸(TFA)组成,并且流动相B由在乙腈中的0.2%TFA组成。使用以60℃的温度和0.3ml/min的流速在27分钟内从10%B至40%B的复合梯度来分离胰蛋白酶肽。通过使用仪器软件将氧化肽峰的面积除以氧化峰和相应非氧化峰的总面积来确定氧化量。

[0377] 微粒形成和空气泡形成:目测观察。

[0378] PEG-FGF-21的浓度:使用0.87 (mL/(mg*cm))的消光系数在280nm处通过斜率光谱法测量本文公开的药物配制品中PEG-FGF-21的浓度。

[0379] pH的确定:根据标准方法(USP<791>)确定pH。

[0380] 赋形剂的浓度:将在本文公开的药物配制品中单独赋形剂(例如DTPA、PS80、组氨酸、蔗糖)的浓度确定/计算为,在完成的药物配制品的每个最终体积单位中,在药物配制品的制造过程中添加至其中的单独赋形剂的量(重量、摩尔等)。可替代地,赋形剂的浓度可以是基于药物配制品中单独赋形剂的实际量。

综上所述,本申请包括但不限于以下各项:

1. 一种药物配制品,所述药物配制品包含成纤维细胞生长因子21 (FGF-21) 多肽和氨基多羧酸阳离子螯合剂,其中所述配制品与不含有所述氨基多羧酸阳离子螯合剂的参考配制品相比具有改善的稳定性。

2. 根据项1所述的药物配制品,所述药物配制品展现出以下中的一项或多项:

(a) 相对于所述参考配制品,当在40℃下储存约一个月时较低的多肽脱酰胺化速率;

(b) 相对于所述参考配制品,当在40℃下储存约一个月时较低的高分子量(HMW)多肽聚集速率;或者

(c) (a) 和(b) 两者。

3. 根据项1或2所述的药物配制品,其中所述氨基多羧酸阳离子螯合剂缓和在25℃和/或40℃下对应于SEQ ID NO:1的氨基酸1和/或氨基酸169的一个或多个甲硫氨酸的氧化。

4. 根据项1或2所述的药物配制品,其中所述氨基多羧酸阳离子螯合剂是二乙烯三胺五乙酸(DTPA)。

5. 根据项4所述的药物配制品,其中所述DTPA阳离子螯合剂的存在量在约10μM与约100μM DTPA之间、在约20μM与约90μM DTPA之间、在约30μM与约80μM DTPA之间、在约25μM与约75μM DTPA之间、或在约40μM与约60μM DTPA之间、或在约30μM与约70μM DTPA之间、或在约40μM与约70μM DTPA之间。

6. 根据项4或5所述的药物配制品,其中所述DTPA阳离子螯合剂的存在量为约40μM、约45μM、约50μM、约55μM、或约60μM DTPA。

7. 根据项1至6中任一项所述的药物配制品,其中所述pH高于6.5、高于6.6、高于6.7、高于6.8、高于6.9、高于7.0、高于7.1、高于7.2、高于7.3、高于7.4或高于7.5。

8. 根据项7所述的药物配制品,其中所述pH在约6.7与约7.5之间、约6.8与约7.5之间、约6.9与约7.4之间、约7.0与约7.3之间、约7.1与7.2之间、约7.1与约7.3之间、约7.1与约7.4之间、或约7.1与约7.5之间。

9. 根据项7所述的药物配制品,其中所述pH是约6.7、约6.8、约6.9、约7.0、约7.1、

约7.2、约7.3、约7.4或约7.5。

10. 根据项7至9中任一项所述的药物配制品,其中所述药物配制品比pH为6.5的参考配制品更稳定。

11. 根据项1至10中任一项所述的药物配制品,所述药物配制品进一步包含表面活性剂。

12. 根据项11所述的药物配制品,其中所述表面活性剂是非离子表面活性剂。

13. 根据项12所述的药物配制品,其中所述非阴离子表面活性剂是聚山梨醇酯。

14. 根据项13所述的药物配制品,其中所述聚山梨醇酯是聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯(聚山梨醇酯80)。

15. 根据项14所述的药物配制品,其中所述聚山梨醇酯80表面活性剂的存在量为约0.01%至约0.1% (w/v)、约0.02%至约0.09% (w/v)、约0.03%至约0.08% (w/v)、约0.04%至约0.07% (w/v)或约0.05%至约0.06% (w/v)。

16. 根据项14或15所述的药物配制品,其中所述聚山梨醇酯80表面活性剂的存在量为至少约0.01% (w/v)、至少约0.02% (w/v)、至少约0.03% (w/v)、至少约0.04% (w/v)、至少约0.05% (w/v)、至少约0.06% (w/v)、至少约0.07% (w/v)、至少约0.08% (w/v)、至少约0.09% (w/v)或至少约0.1% (w/v)。

17. 根据项11至16中任一项所述的药物配制品,其中当在振荡器上搅拌时,所述表面活性剂缓和微粒和/或空气泡形成。

18. 根据项1至17中任一项所述的药物配制品,所述药物配制品进一步包含氨基酸缓冲剂。

19. 根据项18所述的药物配制品,其中所述氨基酸缓冲剂是组氨酸。

20. 根据项19所述的药物配制品,其中所述组氨酸缓冲剂的存在量为约10mM至约100mM组氨酸、约20mM至约90mM组氨酸、约30mM至约80mM组氨酸、约40mM至约70mM组氨酸、约10mM至约30mM组氨酸、约15mM至约25mM组氨酸、约17.5至约22.5组氨酸或约40mM至约60mM组氨酸。

21. 根据项19或20所述的药物配制品,其中所述组氨酸缓冲剂的存在量为约10mM组氨酸、约15mM组氨酸、约20mM组氨酸、约25mM组氨酸、约30mM组氨酸、约35mM组氨酸、约40mM组氨酸、约45mM组氨酸或约50mM组氨酸。

22. 根据项1至21中任一项所述的药物配制品,所述药物配制品进一步包含渗透调节剂。

23. 根据项22所述的药物配制品,其中所述渗透调节剂包括糖。

24. 根据项23所述的药物配制品,其中所述糖是蔗糖。

25. 根据项24所述的药物配制品,其中所述蔗糖渗透调节剂的存在量为约100mM至约1M、约200mM至约900mM、约300mM至约800mM、约400mM至约700mM或约500mM至约600mM。

26. 根据项24或25所述的药物配制品,其中所述蔗糖渗透调节剂的存在量为约100mM蔗糖、约200mM蔗糖、约300mM蔗糖、约400mM蔗糖、约500mM蔗糖、约600mM蔗糖、约700mM蔗糖、约800mM蔗糖、约900mM蔗糖或约1M蔗糖。

27. 根据项1至26中任一项所述的药物配制品,其中所述FGF-21多肽是修饰的FGF-21多肽。

28. 根据项27所述的药物配制品,其中所述修饰的FGF-21多肽包括与SEQID NO:3的氨基酸序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%氨基酸序列同一性的多肽,其中所述多肽具有FGF-21活性。

29. 根据项27或28所述的药物配制品,其中将所述修饰的FGF-21多肽连接至半衰期延长部分。

30. 根据项29所述的药物配制品,其中将修饰的FGF-21多肽经由所述FGF-21多肽的序列中非天然编码氨基的侧链连接至所述半衰期延长部分。

31. 根据项29或30所述的药物配制品,其中所述半衰期延长部分包括白蛋白、免疫球蛋白恒定区或其部分、免疫球蛋白结合多肽、免疫球蛋白G (IgG)、白蛋白结合多肽 (ABP)、PAS化部分、HES化部分、XTEN、Fc区及其任何组合。

32. 根据项29或30所述的药物配制品,其中所述半衰期延长部分包括水溶性聚合物。

33. 根据项32所述的药物配制品,其中所述水溶性聚合物是聚乙二醇 (PEG)。

34. 根据项33所述的药物配制品,其中所述PEG具有约10kDa与约40kDa之间的平均分子量。

35. 根据项33或34所述的药物配制品,其中所述PEG具有约30kDa的平均分子量。

36. 根据项30至35中任一项所述的药物配制品,其中所述非天然编码氨基酸是苯丙氨酸衍生物。

37. 根据项36所述的药物配制品,其中所述苯丙氨酸衍生物是对乙酰基-L-苯丙氨酸。

38. 根据项36或37所述的药物配制品,其中所述半衰期延长部分经由肽键联接至所述非天然编码氨基酸。

39. 根据项30至38中任一项所述的药物配制品,其中所述非天然编码氨基酸替代SEQ ID NO:3的氨基酸谷氨酰胺109。

40. 根据项1至39中任一项所述的药物配制品,其中所述FGF-21多肽的存在浓度在约1mg/ml与约40mg/ml之间。

41. 根据项40所述的药物配制品,其中所述FGF-21多肽的存在浓度为约10mg/ml或约20mg/ml。

42. 根据项1至41中任一项所述的药物配制品,其中所述FGF-21多肽的存在量在约1mg/剂量与约40mg/剂量之间。

43. 根据项42所述的药物配制品,其中所述FGF-21多肽的存在量为约1mg/剂量、约5mg/剂量、约10mg/剂量、约20mg/剂量或约40mg/剂量。

44. 根据项1至43中任一项所述的药物配制品,其中所述配制品被配制用于皮下施用。

45. 根据项44所述的药物配制品,其中所述配制品被配制用于使用安全性注射器的皮下施用。

46. 根据项1至45中任一项所述的药物配制品,其中所述配制品被配制用于每日或每周施用。

47. 根据项1至46中任一项所述的药物配制品,其中所述配制品是水性配制品。

48. 根据项1至47中任一项所述的药物配制品, 其中所述FGF-21多肽是PEG-FGF-21 (SEQ ID NO:2)。

49. 一种药物配制品, 所述药物配制品包含:

- (i) FGF-21多肽;
- (ii) 浓度在约10mM与约50mM之间的组氨酸;
- (iii) 浓度在约100mM与约1M之间的蔗糖;
- (iv) 浓度在约0.01%与约0.1% (w/v) 之间的聚山梨醇酯80; 以及,
- (v) 浓度在约10 μ M与约100 μ M之间的DTPA;

其中所述配制品的pH在约6.7与约7.5之间。

50. 一种药物配制品, 所述药物配制品包含:

- (i) FGF-21多肽;
- (ii) 浓度为约20mM的组氨酸;
- (iii) 浓度为约600mM的蔗糖;
- (iv) 浓度为约0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80; 以及
- (v) 浓度为约50 μ M的DTPA;

其中所述pH是约7.1。

51. 一种药物配制品, 所述药物配制品包含:

- (i) FGF-21多肽;
- (ii) 浓度为20mM的组氨酸;
- (iii) 浓度为600mM的蔗糖;
- (iv) 浓度为0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80; 以及
- (v) 浓度为50 μ M的DTPA;

其中所述pH是7.1。

52. 一种药物配制品, 所述药物配制品包含:

- (i) FGF-21多肽;
- (ii) 浓度为约20mM的组氨酸; 以及
- (iii) 浓度为约600mM的蔗糖;

其中所述pH是约7.0。

53. 一种药物配制品, 所述药物配制品包含:

- (i) FGF-21多肽;
- (ii) 浓度为20mM的组氨酸; 以及
- (iii) 浓度为600mM的蔗糖;

其中所述pH是7.0。

54. 一种药物配制品, 所述药物配制品包含:

- (i) 浓度为约10mg/mL的PEG-FGF-21;
- (ii) 浓度为约20mM的组氨酸;
- (iii) 浓度为约600mM的蔗糖;
- (iv) 浓度为约0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80; 以及
- (v) 浓度为约50 μ M的DTPA;

其中所述pH是约7.1。

55. 一种药物配制品, 所述药物配制品包含:

- (i) 浓度为约20mg/mL的PEG-FGF-21;
- (ii) 浓度为约20mM的组氨酸;
- (iii) 浓度为约600mM的蔗糖;
- (iv) 浓度为约0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80; 以及
- (v) 浓度为约50uM的DTPA;

其中所述pH是约7.1。

56. 一种药物配制品, 所述药物配制品包含:

- (i) 浓度为10mg/mL的PEG-FGF-21;
- (ii) 浓度为20mM的组氨酸;
- (iii) 浓度为600mM的蔗糖;
- (iv) 浓度为0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80; 以及
- (v) 浓度为50uM的DTPA;

其中所述pH是7.1。

57. 一种药物配制品, 所述药物配制品包含:

- (i) 浓度为20mg/mL的PEG-FGF21;
- (ii) 浓度为20mM的组氨酸;
- (iii) 浓度为600mM的蔗糖;
- (iv) 浓度为0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80; 以及
- (v) 浓度为50uM的DTPA;

其中所述pH是7.1。

58. 一种用于改善包含FGF-21多肽的药物配制品的稳定性的方法, 所述方法包括掺和氨基多羧酸阳离子螯合剂, 其中所述配制品与不含有所述氨基多羧酸阳离子螯合剂的参考配制品相比具有改善的稳定性。

59. 根据项58所述的方法, 其中所述稳定性的改善包括 (i) 多肽物理稳定性的增加, (ii) 多肽化学稳定性的增加, 或 (iii) 其组合。

60. 根据项59所述的方法, 其中所述物理稳定性的增加包括 (i) 防止或减少多肽聚集, (ii) 防止或减少多肽片段化, 或 (iii) 其组合。

61. 根据项60所述的方法, 其中所述化学稳定性的增加包括 (i) 防止或减少多肽脱酰胺化, (ii) 防止或减少多肽氧化, 或 (iii) 其组合。

62. 根据项58至61中任一项所述的方法, 其中所述稳定性的改善包括以下中的一项或多项:

(a) 相对于所述参考配制品, 当在40℃下储存约一个月时较低的多肽脱酰胺化速率;

(b) 相对于所述参考配制品, 当在40℃下储存约一个月时较低的高分子量 (HMW) 多肽聚集速率; 或者

(c) (a) 和 (b) 两者。

63. 根据项58至62中任一项所述的方法, 其中所述氨基多羧酸阳离子螯合剂缓和

在25℃和/或40℃下对应于SEQ ID NO:1的氨基酸3和/或氨基酸169的一个或多个甲硫氨酸的氧化。

64. 根据项58至63中任一项所述的方法,其中所述氨基多羧酸阳离子螯合剂是DTPA。

65. 根据项64所述的方法,其中所述DTPA阳离子螯合剂的存在量在约10 μ M与约100 μ M DTPA之间、在约20 μ M与约90 μ M DTPA之间、在约25 μ M与约75 μ M DTPA之间、在约40 μ M与约60 μ M DTPA之间、在约30 μ M与约70 μ M DTPA之间、在约30 μ M与约80 μ M DTPA之间、或在约40 μ M与约70 μ M之间。

66. 根据项64或65所述的方法,其中所述DTPA阳离子螯合剂的存在量为约40 μ M、约45 μ M、约50 μ M、约55 μ M、或约60 μ M DTPA。

67. 根据项58至66中任一项所述的方法,所述方法进一步包括将pH调整至高于6.5、高于6.6、高于6.7、高于6.8、高于6.9或高于7.0。

68. 根据项67所述的方法,其中将所述pH调整至在约6.8与约7.5之间、或在约6.9与约7.4之间、或在约7.0与约7.3之间、或在约7.1与7.2之间、或在约7.1与约7.3之间、或在约7.1与约7.4之间或在约7.1与约7.5之间。

69. 根据项67所述的方法,其中所述调整过的pH是约6.8、约6.9、约7.0、约7.1、约7.2、约7.3、约7.4或约7.5。

70. 根据项67至69中任一项所述的方法,其中所述配制品比pH为6.5的所述参考配制品更稳定。

71. 根据项58至70中任一项所述的方法,所述方法进一步包括掺和表面活性剂。

72. 根据项71所述的方法,其中所述表面活性剂是非离子表面活性剂。

73. 根据项72所述的方法,其中所述非阴离子表面活性剂是聚山梨醇酯。

74. 根据项73所述的方法,其中所述聚山梨醇酯是聚山梨醇酯80。

75. 根据项74所述的方法,其中所述聚山梨醇酯80表面活性剂的掺和量为约0.01%至约0.1% (w/v)、约0.02%至约0.09% (w/v)、约0.03%至约0.08% (w/v)、约0.04%至约0.07% (w/v) 或约0.05%至约0.06% (w/v)。

76. 根据项74或75所述的方法,其中聚山梨醇酯80表面活性剂的掺和量为至少约0.01% (w/v)、至少约0.02% (w/v)、至少约0.03% (w/v)、至少约0.04% (w/v)、至少约0.05% (w/v)、至少约0.06% (w/v)、至少约0.07% (w/v)、至少约0.08% (w/v)、至少约0.09% (w/v) 或至少约0.1% (w/v)。

77. 根据项71至76中任一项所述的方法,其中当在振荡器上搅拌时,所述表面活性剂缓和微粒形成和/或空气泡形成。

78. 根据项58至77中任一项所述的方法,所述方法进一步包括掺和氨基酸缓冲剂。

79. 根据项78所述的方法,其中所述氨基酸缓冲剂是组氨酸。

80. 根据项79所述的方法,其中所述组氨酸缓冲剂的掺和量为约10mM至约100mM组氨酸、约20mM至约90mM组氨酸、约30mM至约80mM组氨酸、约40mM至约70mM组氨酸、约10mM至约30mM组氨酸、约15mM至约25mM组氨酸、约17.5mM至约22.5mM组氨酸或约40mM至约60mM组氨酸。

81. 根据项79或80所述的方法,其中所述组氨酸缓冲剂的掺和量为约10mM组氨酸、

约15mM组氨酸、约20mM组氨酸、约25mM组氨酸、约30mM组氨酸、约35mM组氨酸、约40mM组氨酸、约45mM组氨酸或约50mM组氨酸。

82. 根据项58至81中任一项所述的方法,所述方法进一步包括掺和渗透调节剂。

83. 根据项82所述的方法,其中所述渗透调节剂包括糖。

84. 根据项83所述的方法,其中所述糖是蔗糖。

85. 根据项84所述的方法,其中所述蔗糖渗透调节剂的掺和量为约100mM至约1M蔗糖、约200mM至约900mM蔗糖、约300mM至约800mM蔗糖、约400mM至约700mM蔗糖或约500mM至约600mM蔗糖。

86. 根据项84或85所述的方法,其中所述蔗糖渗透调节剂的掺和量为约100mM蔗糖、约200mM蔗糖、约300mM蔗糖、约400mM蔗糖、约500mM蔗糖、约600mM蔗糖、约700mM蔗糖、约800mM蔗糖、约900mM蔗糖或约1M蔗糖。

87. 根据项58至86中任一项所述的方法,其中所述FGF-21多肽是修饰的FGF-21多肽。

88. 根据项87所述的方法,其中所述修饰的FGF-21多肽包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%氨基酸序列同一性的多肽序列,其中所述多肽具有FGF-21活性。

89. 根据项87或88所述的方法,其中将所述修饰的FGF-21多肽连接至半衰期延长部分。

90. 根据项89所述的方法,其中将修饰的FGF-21多肽经由所述FGF-21多肽的序列中非天然编码氨基酸的侧链连接至所述半衰期延长部分。

91. 根据项89或90所述的方法,其中所述半衰期延长部分包括白蛋白、免疫球蛋白恒定区或其部分、免疫球蛋白结合多肽、IgG、ABP、PAS化部分、HES化部分、XTEN、Fc区及其任何组合。

92. 根据项89或90所述的方法,其中所述半衰期延长部分包括水溶性聚合物。

93. 根据项92所述的方法,其中所述水溶性聚合物是PEG。

94. 根据项93所述的方法,其中所述PEG具有约10kDa与约40kDa之间的平均分子量。

95. 根据项93或94所述的方法,其中所述PEG具有约30kDa的平均分子量。

96. 根据项90至95中任一项所述的方法,其中所述非天然编码氨基酸是苯丙氨酸衍生物。

97. 根据项96所述的方法,其中所述苯丙氨酸衍生物是对乙酰基-L-苯丙氨酸。

98. 根据项96或97所述的方法,其中所述半衰期延长部分经由肽键连接至所述非天然编码氨基酸。

99. 根据项90至98中任一项所述的方法,其中所述非天然编码氨基酸替代SEQ ID NO:3的氨基酸谷氨酰胺109。

100. 根据项58至99中任一项所述的方法,其中所述FGF-21多肽的存在浓度在约1mg/ml与约40mg/ml之间。

101. 根据项100所述的方法,其中所述FGF-21多肽的存在浓度为约10mg/ml或约20mg/ml。

102. 根据项58至101中任一项所述的方法, 其中所述配制品是水性配制品。

103. 根据项58至102中任一项所述的方法, 其中所述FGF-21多肽是PEG-FGF-21 (SEQ ID NO:2)。

104. 一种用于改善包含FGF-21多肽的配制品的稳定性的方法, 所述方法包括掺和

(i) 浓度在约10mM与约50mM之间的组氨酸;

(ii) 浓度在约100mM与约1M之间的蔗糖;

(iii) 浓度在约0.01%与约0.1% (w/v) 之间的聚山梨醇酯80; 以及,

(iv) 浓度在约10 μ M与约100 μ M之间的DTPA;

其中所述配制品的pH在约6.7与约7.5之间。

105. 一种用于改善包含FGF-21多肽的配制品的稳定性的方法, 所述方法包括掺和

(i) 浓度为约20mM的组氨酸;

(ii) 浓度为约600mM的蔗糖;

(iii) 浓度为约0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80; 以及,

(iv) 浓度为约50 μ M的DTPA;

其中所述pH是约7.1。

106. 一种用于改善包含FGF-21多肽的配制品的稳定性的方法, 所述方法包括掺和

(i) 浓度为20mM的组氨酸;

(ii) 浓度为600mM的蔗糖;

(iii) 浓度为0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80; 以及,

(iv) 浓度为50 μ M的DTPA;

其中所述pH是7.1。

107. 一种用于改善包含FGF-21多肽的配制品的稳定性的方法, 所述方法包括掺和

(i) 浓度为约20mM的组氨酸; 以及,

(ii) 浓度为约600mM的蔗糖;

其中所述pH是约7.0。

108. 一种用于改善包含FGF-21多肽的配制品的稳定性的方法, 所述方法包括掺和

(i) 浓度为20mM的组氨酸; 以及,

(ii) 浓度为600mM的蔗糖;

其中所述pH是7.0。

109. 一种用于改善包含浓度为约10mg/mL的PEG-FGF-21的配制品的稳定性的方法, 所述方法包括掺和

(i) 浓度为约20mM的组氨酸;

(ii) 浓度为约600mM的蔗糖;

(iii) 浓度为约0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80; 以及,

(iv) 浓度为约50 μ M的DTPA;

其中所述pH是约7.1。

110. 一种用于改善包含浓度为约20mg/mL的PEG-FGF-21的配制品的稳定性的方法, 所述方法包括掺和

(i) 浓度为约20mM的组氨酸;

- (ii) 浓度为约600mM的蔗糖；
- (iii) 浓度为约0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80；以及，
- (iv) 浓度为约50uM的DTPA；

其中所述pH是约7.1。

111. 一种用于改善包含浓度为约10mg/mL的PEG-FGF-21的配制品的稳定性的方法，所述方法包括掺和

- (i) 浓度为20mM的组氨酸；
- (ii) 浓度为600mM的蔗糖；
- (iii) 浓度为0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80；以及，
- (iv) 浓度为50uM的DTPA；

其中所述pH是7.1。

112. 一种用于改善包含浓度为约20mg/mL的PEG-FGF-21的配制品的稳定性的方法，所述方法包括掺和

- (i) 浓度为20mM的组氨酸；
- (ii) 浓度为600mM的蔗糖；
- (iii) 浓度为0.05% (w/v) 的聚山梨醇酯80；以及，
- (iv) 浓度为50uM的DTPA；

其中所述pH是7.1。

113. 一种药物配制品，所述药物配制品根据项58至112中任一项所述的方法制备。

114. 一种试剂盒，所述试剂盒包含 (i) 根据项1至57、或113中任一项所述的药物配制品，和 (ii) 使用说明书。

115. 一种在有需要的受试者中治疗或预防与纤维化和/或糖尿病相关的疾病或病症的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据项1至57、或113中任一项所述的药物配制品。

116. 根据项115所述的方法，其中所述疾病或病症是糖尿病。

117. 根据项116所述的方法，其中所述糖尿病是2型糖尿病。

118. 根据项115所述的方法，其中所述疾病或病症是非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)。

119. 根据项115至118中任一项所述的方法，其中向所述受试者施用所述有效量的药物配制品降低肝脏硬度、降低体脂百分比、降低体重、降低肝脏与体重比、降低肝脏脂质含量、降低肝脏纤维化面积、降低空腹血糖水平、降低空腹甘油三酯水平、降低LDL胆固醇水平、降低ApoB水平、降低ApoC水平、增加HDL胆固醇或其任何组合。

120. 根据项115至119中任一项所述的方法，其中每剂量施用约1mg与约40mg之间的FGF-21多肽。

121. 根据项115至120中任一项所述的方法，其中每剂量施用约1mg、约5mg、约10mg、约20mg或约40mg的FGF-21多肽。

122. 根据项115至121中任一项所述的方法，其中所述药物配制品是皮下施用的。

123. 根据项122所述的方法，其中所述药物配制品是使用安全性注射器皮下施用的。

124. 根据项115至123中任一项所述的方法，其中所述药物配制品是每日或每周施

用的。

125. 根据项115至124中任一项所述的方法,其中与未治疗的受试者中的水平或与施用所述药物配制品之前的所述受试者相比,向所述受试者施用所述药物配制品导致

- (i) 肝脏脂肪水平的降低;
- (ii) 肝脏损伤水平的降低;
- (iii) 纤维化水平的降低;
- (iv) 纤维化生物标志物血清Pro-C3 (N末端III型胶原前肽) 水平的降低;
- (v) 丙氨酸转氨酶 (ALT) 水平的降低;
- (vi) 天冬氨酸转氨酶 (AST) 水平的降低;
- (vii) 血清脂联素水平的增加;
- (viii) 血浆LDL水平的降低;
- (ix) 血浆HDL水平的增加;
- (x) 血浆甘油三酯水平的降低;
- (xi) 肝脏硬度水平的降低;或
- (xii) 其任何组合。

126. 根据项115至125中任一项所述的治疗方法,其中所述FGF-21多肽是PEG-FGF-21 (SEQ ID NO:2)。

127. 一种药物配制品,所述药物配制品通过以下过程制得:掺和

- (i) 实现约10mg/mL最终浓度的量的PEG-FGF-21;
 - (ii) 实现约20mM最终浓度的量的组氨酸;
 - (iii) 实现约600mM最终浓度的量的蔗糖;
 - (iv) 实现约0.05% (w/v) 最终浓度的量的聚山梨醇酯80;以及
 - (v) 实现约50uM最终浓度的量的DTPA;以及
- 以及将pH调整为约7.1。

128. 一种药物配制品,所述药物配制品通过以下过程制得:掺和

- (i) 实现约20mg/mL最终浓度的量的PEG-FGF-21;
 - (ii) 实现约20mM最终浓度的量的组氨酸;
 - (iii) 实现约600mM最终浓度的量的蔗糖;
 - (iv) 实现约0.05% (w/v) 最终浓度的量的聚山梨醇酯80;以及
 - (v) 实现约50uM最终浓度的量的DTPA;以及
- 以及将pH调整为约7.1。

129. 一种药物配制品,所述药物配制品通过以下过程制得:掺和

- (i) 实现10mg/mL最终浓度的量的PEG-FGF-21;
 - (ii) 实现20mM最终浓度的量的组氨酸;
 - (iii) 实现600mM最终浓度的量的蔗糖;
 - (iv) 实现0.05% (w/v) 最终浓度的量的聚山梨醇酯80;以及
 - (v) 实现50uM最终浓度的量的DTPA;以及
- 以及将pH调整为7.1。

130. 一种药物配制品,所述药物配制品通过以下过程制得:掺和

- (i) 实现20mg/mL最终浓度的量的PEG-FGF-21;
 - (ii) 实现20mM最终浓度的量的组氨酸;
 - (iii) 实现600mM最终浓度的量的蔗糖;
 - (iv) 实现0.05% (w/v) 最终浓度的量的聚山梨醇酯80;以及
 - (v) 实现50uM最终浓度的量的DTPA;以及
- 以及将pH调整为7.1。

序列表

<110> 百时美施贵宝公司

<120> FGF-21配制品

<130> 3338.133PC01/ELE/C-K

<150> US 62/693,847

<151> 2018-07-03

<160> 3

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 182

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Q109修饰的FGF-21

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (109) .. (109)

<223> 用对乙酰基-L-苯丙氨酸替代的野生型Q109

<400> 1

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln

1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala

20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln

35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile

50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe

85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala

100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp

115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro

130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp

145	150	155	160
Val Gly Ser Ser Asp	Pro Leu Ser Met	Val Gly Pro Ser	Gln Gly Arg
	165	170	175
Ser Pro Ser Tyr	Ala Ser		
	180		
<210> 2			
<211> 182			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> PEG-FGF-21聚乙二醇化的Q109修饰的FGF-21			
<220>			
<221> 尚未归类的特征			
<222> (109) .. (109)			
<223> 经由肽键连接至30 kDa聚(乙二醇)的对乙酰基-L-苯丙氨酸			
<400> 2			
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln			
1	5	10	15
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala			
	20	25	30
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln			
	35	40	45
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile			
	50	55	60
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp			
65	70	75	80
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe			
	85	90	95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala			
	100	105	110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp			
	115	120	125
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro			
	130	135	140
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp			
145	150	155	160
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg			
	165	170	175
Ser Pro Ser Tyr	Ala Ser		

180

<210> 3

<211> 182

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FGF-21野生型序列

<400> 3

Met	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln
1				5					10					15	
Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala
				20				25						30	
His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln
				35				40						45	
Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile
				50				55						60	
Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp
65					70					75					80
Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe
					85				90						95
Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala
					100				105						110
His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Gly	Asn	Lys	Ser	Pro	His	Arg	Asp
					115				120						125
Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro
					130				135						140
Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp
145					150					155					160
Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Gly	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg
					165					170					175
Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser										

180

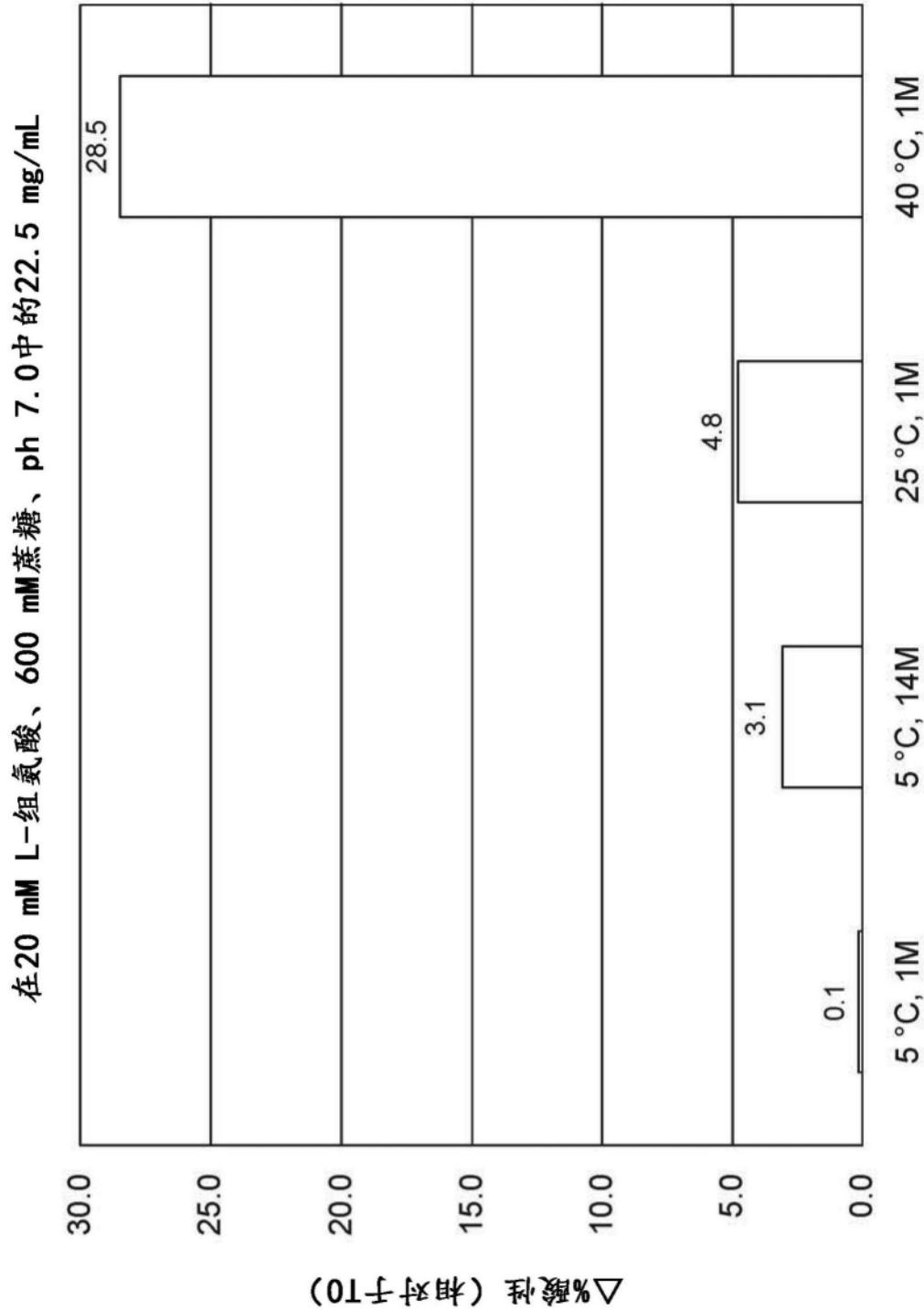


图1A

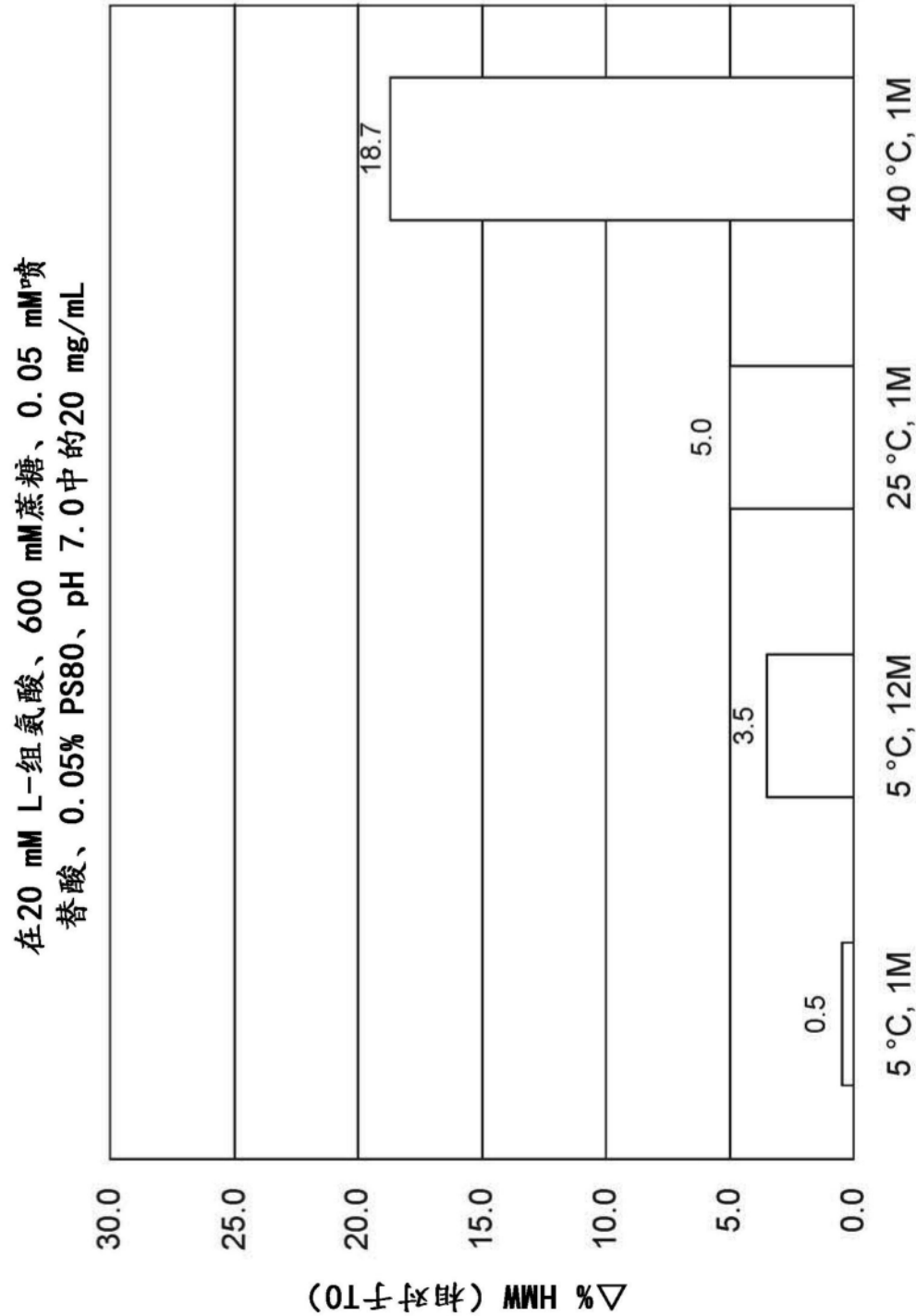


图1B

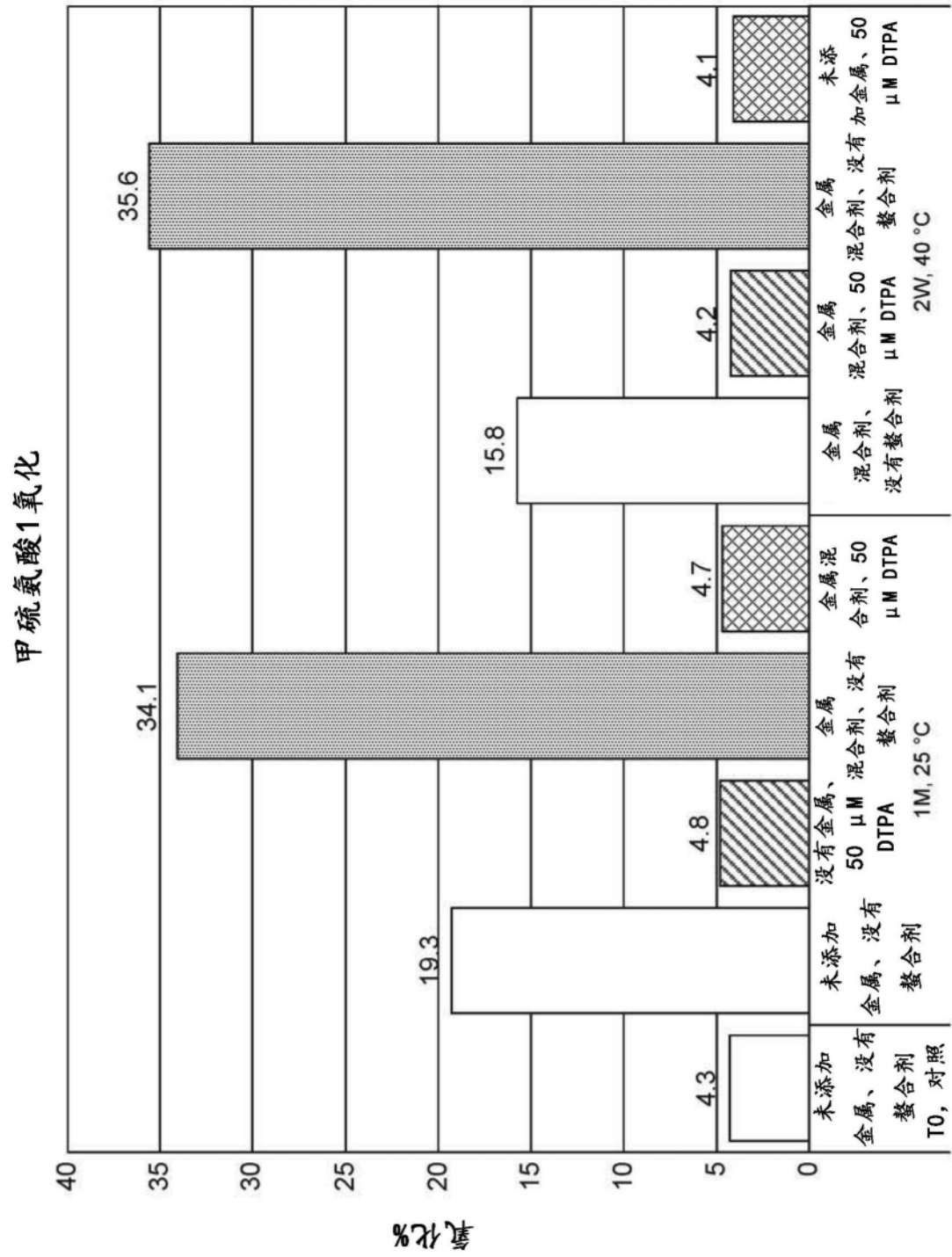


图2A

甲硫氨酸169氧化

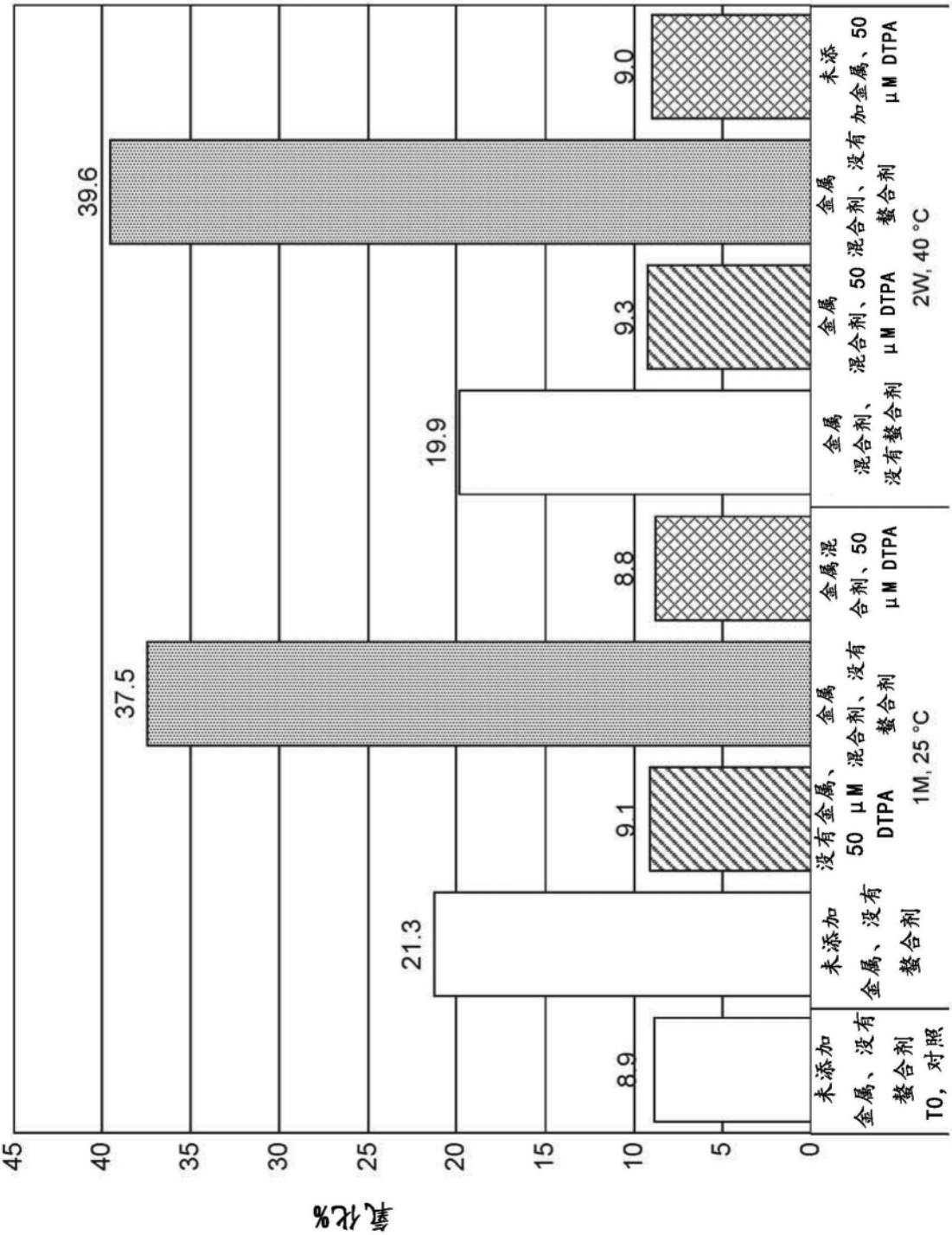


图2B

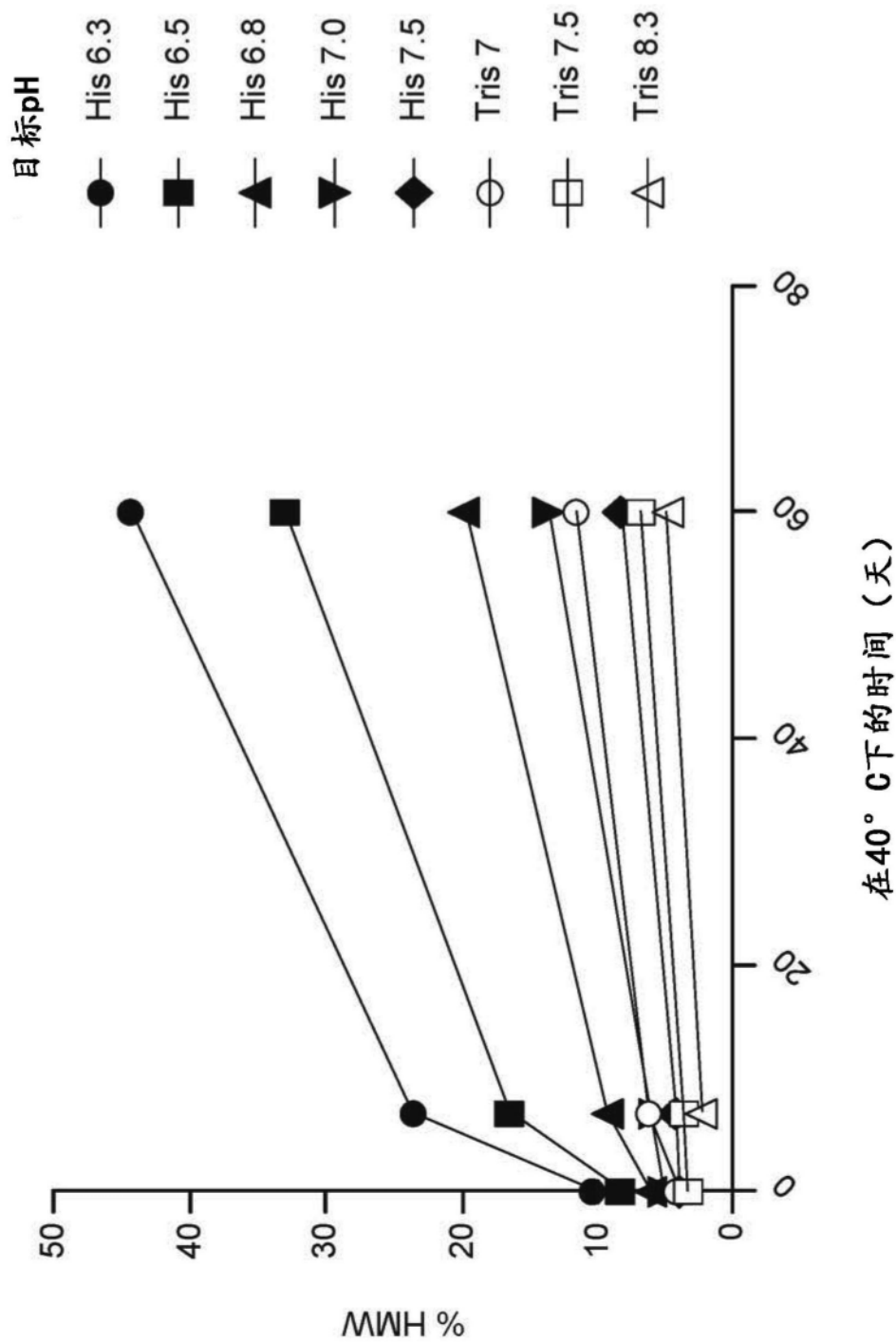


图3A

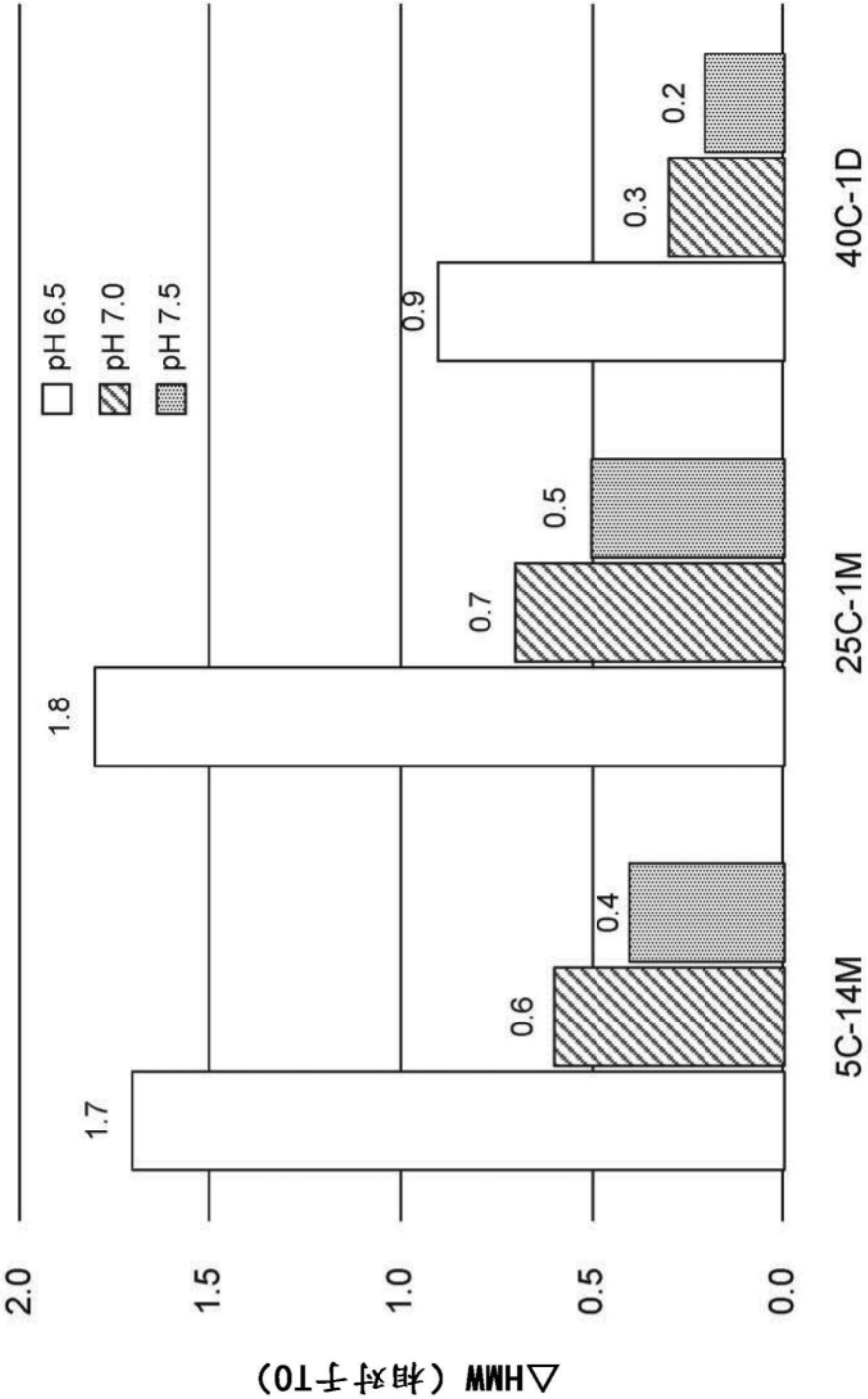


图3B

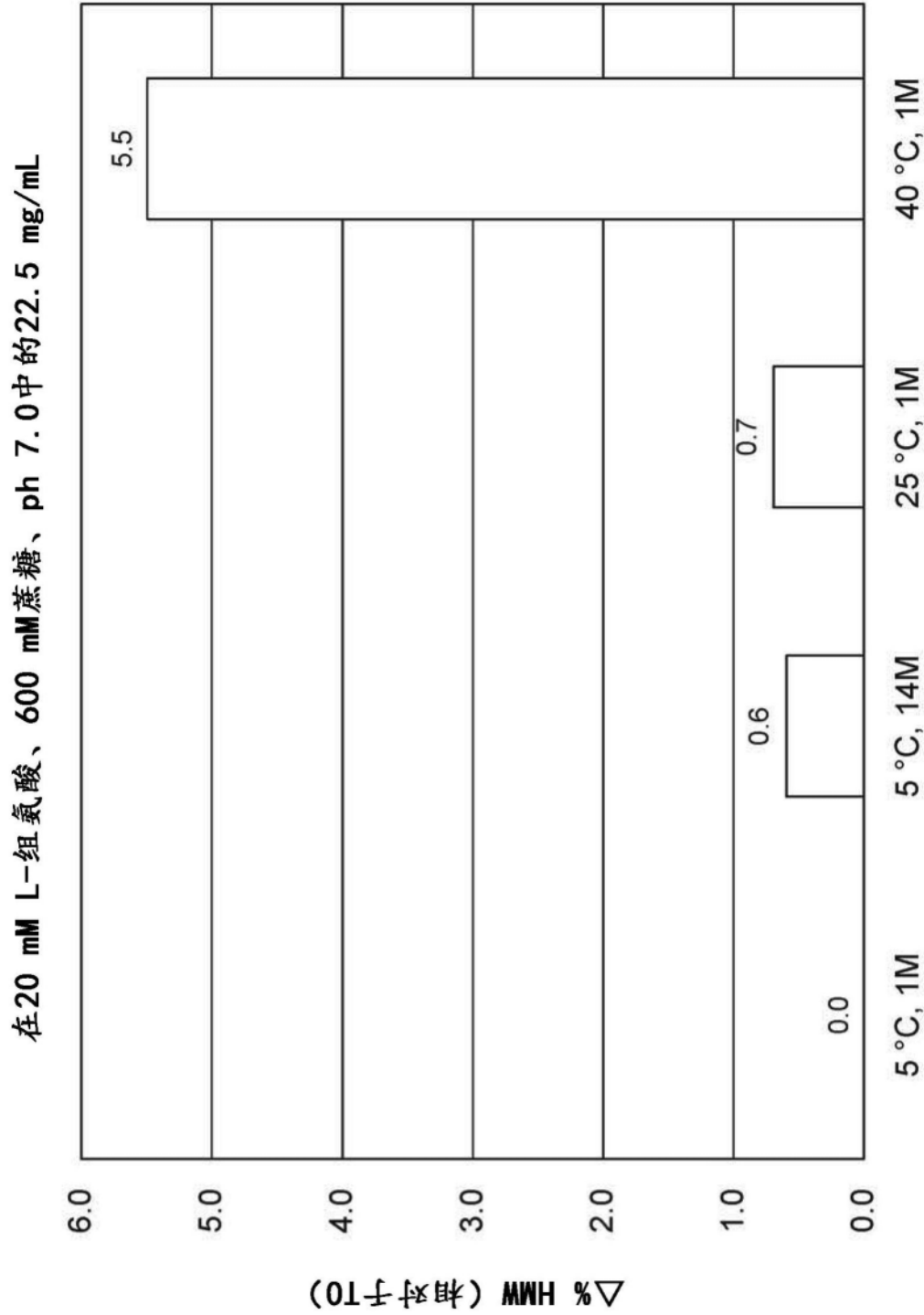


图4A

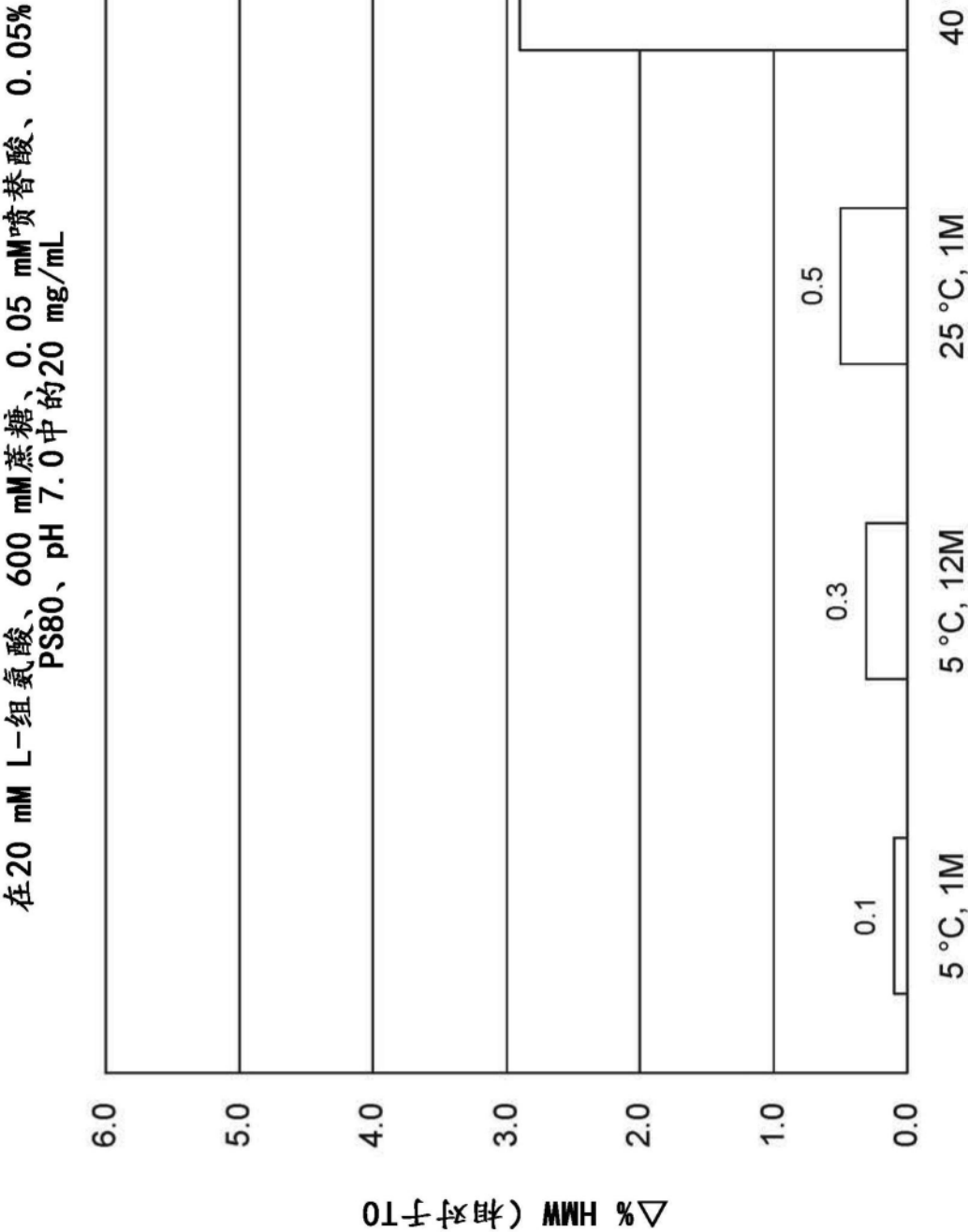


图4B

没有PS80

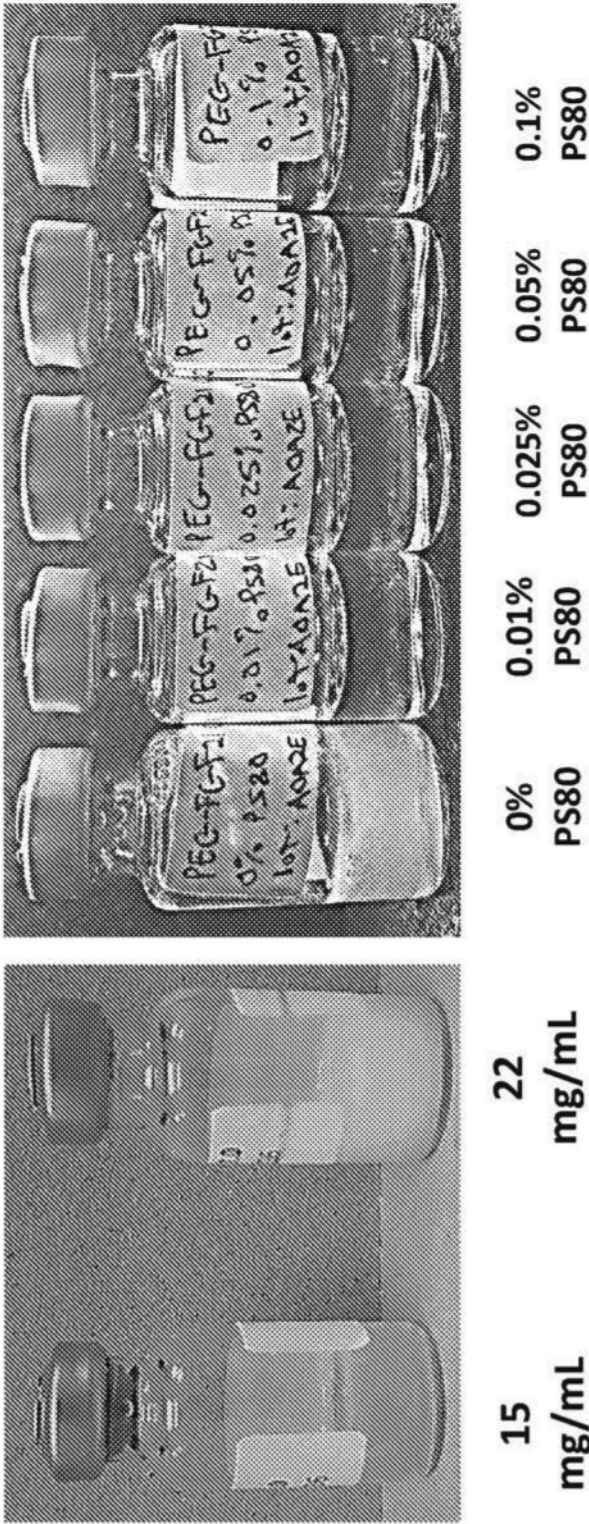


图5