

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202291849** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2023.03.22

(51) Int. Cl. *A61K 47/60* (2017.01)  
*A61K 38/18* (2006.01)  
*A61K 47/18* (2017.01)  
*A61P 3/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.01.07

---

(54) **ПРЕПАРАТЫ КОНЬЮГАТОВ FGF-21**

---

(31) 62/958,580

(32) 2020.01.08

(33) US

(86) PCT/US2021/012530

(87) WO 2021/142143 2021.07.15

(71) Заявитель:

**БРИСТОЛЬ-МЕЙЕРЗ СКВИББ  
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:

**Палм Томас, Хоссрави Мехрназ,  
Патке Санкет (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) В изобретении представляются фармацевтические препараты, содержащие ПЭГилированный FGF-21, например конъюгат FGF-21, и один или более стабилизаторов, таких как комплексон DPTA. Препараты могут быть дополнительно стабилизированы путем включения поверхностно-активного вещества, такого как полисорбат 80, и/или доведения pH до приблизительно 7,1. Также представляются способы производства, способы лечения и наборы.

**A1**

**202291849**

**202291849**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574971EA/071

### ПРЕПАРАТЫ КОНЬЮГАТОВ FGF-21

ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДОСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ ЧЕРЕЗ СИСТЕМУ EFS-WEB.

[0001] Содержание предоставленного в электронном виде списка последовательностей (название: 3338\_208PC03\_SeqListing.txt; размер: 11049 байтов; и дата создания: 5 января 2021 г.), поданного вместе с настоящей заявкой, полностью включено сюда посредством ссылки.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Эта заявка имеет отношение, среди прочего, к препаратам, содержащим полипептид FGF-21, например, ПЭГилированный полипептид FGF-21 (ПЭГ-FGF-21), стабилизированный, используя комплексоны (например, ДТРА), поверхностно-активные вещества (например, PS80), и имеющим рН в определенном диапазоне (например, приблизительно 7,1), для введения различными путями, в том числе, например, для подкожного введения.

#### ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Факторы роста фибробластов (FGF) представляют собой полипептиды, широко представленные в тканях, характерных для развивающихся и взрослых организмов (Baird et al., Cancer Cells, 3:239-243, 1991), которые играют решающую роль во множестве физиологических функций (McKeehan et al., Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 59:135-176, 1998; Burgess, W. H. et al., Annu. Rev. Biochem. 58:575-606 (1989)). Согласно литературным данным семейство FGF состоит из по крайней мере двадцати двух членов (Reuss et al., Cell Tissue Res. 313:139-157 (2003)).

[0004] FGF-21 может использоваться для лечения заболеваний и состояний, связанных с фиброзом. Фиброз представляет собой образование избыточной фиброзной соединительной ткани в органе или ткани. Избыточное отложение фиброзной ткани связано с патологическими состояниями, которые могут привести к нарушению функции органа или ткани. Пораженные органы могут включать легкие (фиброз легких или легочный фиброз), печень (фиброз печени или печеночный фиброз), почек (фиброз почек или почечный фиброз) и сердца (кардиальный фиброз). Фиброз также может поражать другие ткани и органы, в том числе суставы, кожу, кишечник, костный мозг и другие. Приводимые в качестве примера фиброзные состояния или заболевания включают, но без ограничения этим, неалкогольный стеатогепатит (NASH), который поражает печень; диабетическую болезнь почек и диабетическую нефропатию, которые поражают почки; и связанную с метаболическими изменениями сердечную недостаточность, которая поражает сердце. Например, NASH характеризуется накоплением жира, воспалением и повреждением печени у людей, мало употребляющих или совсем не употребляющих алкоголь, и заболевание может приводить к циррозу печени. NASH, как правило, диагностируют у людей среднего возраста с избыточным весом или ожирением, которые

часто имеют повышенные уровни некоторых липидов в крови и диабет или преддиабет.

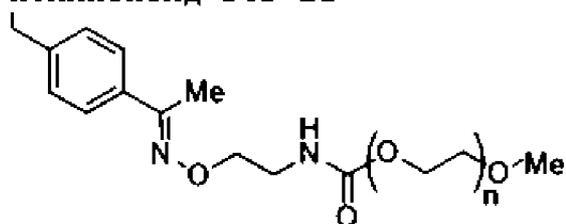
[0005] Сообщалось, что FGF-21 имеет склонность к подверганию протеолизу *in vivo*, образованию агрегатов *in vitro* и подверганию дезамидированию (Gimeno and Moller, Trends Endocrinol Metab. 2014 June; 25(6):303-11; патент США с № 8361963; Hecht et al., PLoS One. 2012; 7(11):e49345; публикация заявки на патент США с № 2007/0293430; WO 2006/0065582), что потенциально ограничивает срок годности фармацевтических композиций, содержащих FGF-21. Агрегаты и дезамидированные формы терапевтических полипептидов могут потенциально увеличивать иммуногенность (смотрите U.S. Department of Health and Human Services, "Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products," August 2014; Subramanyam (ed.), "Therapeutic Protein Immunogenicity Focus Group Newsletter," American Association of Pharmaceutical Scientists, Vol. 1, Issue 3 (December 2011)).

[0006] Настоящее изобретение удовлетворяет, среди прочего, потребность в фармацевтических препаратах, которые решают проблемы, связанные с производством фармацевтических препаратов, содержащих полипептиды FGF-21 и, в частности, варианты полипептидов FGF-21.

#### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Настоящим изобретением предоставляется фармацевтический препарат, содержащий (i) полипептид в виде фактора роста фибробластов 21 (FGF-21), конъюгированный с фрагментом полиэтиленгликоля (ПЭГ) («конъюгат FGF-21»), и (ii) комплексон для катионов в виде аминокполикарбоновой кислоты, причем препарат обладает улучшенной стабильностью по сравнению с эталонным препаратом, который не содержит комплексон для катионов в виде аминокполикарбоновой кислоты, причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



(Формула I),

и где  $n$  является любым целым числом.

[0008] В некоторых аспектах фрагмент ПЭГ конъюгирован с не встречающейся в природе аминокислотой в полипептиде FGF-21. В некоторых аспектах не встречающаяся в природе аминокислота в полипептиде FGF-21 представляет собой производное фенилаланина. В некоторых аспектах производное фенилаланина представляет собой пара-ацетил-L-фенилаланин.

[0009] В некоторых аспектах полипептид FGF-21 включает аминокислотную последовательность, идентичную на по крайней мере приблизительно 80%, по крайней мере приблизительно 85%, по крайней мере приблизительно 90%, по крайней мере

приблизительно 95%, по крайней мере приблизительно 96%, по крайней мере приблизительно 97%, по крайней мере приблизительно 98% или по крайней мере приблизительно 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3, причем этот полипептид обладает активностью FGF-21. В некоторых аспектах не встречающаяся в природе аминокислота находится в положении 109 аминокислотного остатка, соответствующем SEQ ID NO:3. В некоторых аспектах полипептид FGF-21 включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:1. В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 соответствует соединению с SEQ ID NO:2.

[0010] В некоторых аспектах  $n$  в формуле I составляет от приблизительно 500 до приблизительно 900 этиленгликолевых звеньев, от приблизительно 600 до приблизительно 800 этиленгликолевых звеньев, от приблизительно 650 до приблизительно 750 этиленгликолевых звеньев или от приблизительно 670 до приблизительно 690 этиленгликолевых звеньев. В некоторых аспектах  $n$  составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690 этиленгликолевых звеньев, например, приблизительно 681 этиленгликолевое звено.

[0011] В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 соответствует соединению с SEQ ID NO:4. В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 находится в L-конформации. В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 находится в D-конформации. В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 присутствует в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 40 мг/мл. В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 10 мг/мл или приблизительно 20 мг/мл. В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 20 мг/мл.

[0012] В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 присутствует в количестве от приблизительно 1 мг до приблизительно 40 мг в стандартной дозе. В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 присутствует в количестве, составляющем приблизительно 1 мг в стандартной дозе, приблизительно 5 мг в стандартной дозе, приблизительно 10 мг в стандартной дозе, приблизительно 20 мг в стандартной дозе или приблизительно 40 мг в стандартной дозе. В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 присутствует в количестве, составляющем приблизительно 10 мг или приблизительно 20 мг в стандартной дозе.

[0013] В некоторых аспектах фармацевтический препарат демонстрирует одно или более из следующего:

(a) более низкую скорость дезамидирования полипептида при хранении при 40°C в течение приблизительно месяца относительно эталонного препарата;

(b) более низкую скорость агрегации высокомолекулярного (HMW) полипептида при хранении при 40°C в течение приблизительно месяца относительно эталонного препарата; или

(c) как (a), так и (b).

[0014] В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде аминополикарбоновой кислоты предотвращает или уменьшает окисление одного или

более метионинов. В некоторых аспектах метионины соответствуют метионину 1 (Met1) и/или метионину 169 (Met169) полипептида FGF-21. В некоторых аспектах комплексон предотвращает или уменьшает окисление метионинов при 25°C и/или 40°C. В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде аминополикарбоновой кислоты представляет собой диэтилентриаминпентауксусную кислоту (ДТРА). В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде ДТРА присутствует в количестве от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 100 мкМ ДТРА, от приблизительно 20 мкМ до приблизительно 90 мкМ ДТРА, от приблизительно 30 мкМ до приблизительно 80 мкМ ДТРА, от приблизительно 25 мкМ до приблизительно 75 мкМ ДТРА, или от приблизительно 40 мкМ до приблизительно 60 мкМ ДТРА, или от приблизительно 30 мкМ до приблизительно 70 мкМ ДТРА, или от приблизительно 40 мкМ до приблизительно 70 мкМ ДТРА. В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде ДТРА присутствует в количестве, составляющем приблизительно 40 мкМ, приблизительно 45 мкМ, приблизительно 50 мкМ, приблизительно 55 мкМ или приблизительно 60 мкМ ДТРА.

[0015] В некоторых аспектах pH препарата превышает 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 или 7,5. В некоторых аспектах pH составляет от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,5, от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,5, от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,4, от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,3, от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,2, от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,3, от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,4, или приблизительно 7,1 и приблизительно 7,5. В некоторых аспектах pH составляет приблизительно 6,7, приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, приблизительно 7,3, приблизительно 7,4 или приблизительно 7,5. В некоторых аспектах фармацевтический препарат является более стабильным, чем эталонный препарат с pH 6,5.

[0016] В некоторых аспектах фармацевтический препарат содержит, кроме того, поверхностно-активное вещество. В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество. В некоторых аспектах неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат. В некоторых аспектах полисорбат представляет собой полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеат (полисорбат 80). В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество полисорбат 80 присутствует в количестве от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,02% до приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,03% до приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,04% до приблизительно 0,07% (в отношении веса к объему) или от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,06% (в отношении веса к объему). В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество полисорбат 80 присутствует в количестве, составляющем по крайней мере приблизительно 0,01% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,02% (в отношении веса к объему), по крайней

мере приблизительно 0,03% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,04% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,06% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,07% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему) или по крайней мере приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему). В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество уменьшает образование (макро)частиц и/или пузырьков воздуха при встряхивании на шейкере.

[0017] В некоторых аспектах фармацевтический препарат содержит, кроме того, буферный агент в виде аминокислоты. В некоторых аспектах буферный агент в виде аминокислоты представляет собой гистидин. В некоторых аспектах буферный агент в виде гистидина присутствует в количестве от приблизительно 10 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 90 мМ гистидина, от приблизительно 30 мМ до приблизительно 80 мМ гистидина, от приблизительно 40 мМ до приблизительно 70 мМ гистидина, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 30 мМ гистидина, от приблизительно 15 мМ до приблизительно 25 мМ гистидина, от приблизительно 17,5 до приблизительно 22,5 мМ или от приблизительно 40 мМ до приблизительно 60 мМ гистидина. В некоторых аспектах буферный агент в виде гистидина присутствует в количестве, составляющем приблизительно 10 мМ гистидина, приблизительно 15 мМ гистидина, приблизительно 20 мМ гистидина, приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 30 мМ гистидина, приблизительно 35 мМ гистидина, приблизительно 40 мМ гистидина, приблизительно 45 мМ гистидина или приблизительно 50 мМ гистидина.

[0018] В некоторых аспектах фармацевтический препарат содержит, кроме того, регулятор осмотического давления (осморегулятор). В некоторых аспектах осморегулятор включает сахар. В некоторых аспектах сахар представляет собой сахарозу. В некоторых аспектах осморегулятор в виде сахарозы присутствует в количестве от приблизительно 100 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 200 мМ до приблизительно 900 мМ, от приблизительно 300 мМ до приблизительно 800 мМ, от приблизительно 400 мМ до приблизительно 700 мМ или от приблизительно 500 мМ до приблизительно 600 мМ. В некоторых аспектах осморегулятор в виде сахарозы присутствует в количестве, составляющем приблизительно 100 мМ сахарозы, приблизительно 200 мМ сахарозы, приблизительно 300 мМ сахарозы, приблизительно 400 мМ сахарозы, приблизительно 500 мМ сахарозы, приблизительно 600 мМ сахарозы, приблизительно 700 мМ сахарозы, приблизительно 800 мМ сахарозы, приблизительно 900 мМ сахарозы или приблизительно 1 М сахарозы.

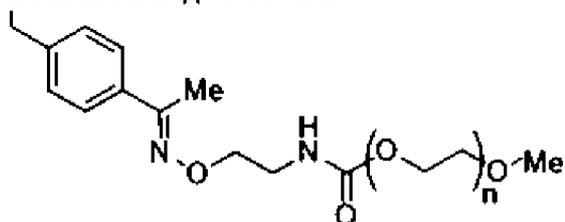
[0019] В некоторых аспектах препарат составлен для подкожного введения. В некоторых аспектах препарат составлен для подкожного введения с помощью безопасного шприца. В некоторых аспектах препарат составлен для ежедневного или еженедельного

введения. В некоторых аспектах препарат представляет собой водный препарат.

[0020] Настоящим изобретением предоставляется фармацевтический препарат, содержащий:

- (i) конъюгат FGF-21;
  - (ii) гистидин в концентрации от приблизительно 10 мМ до приблизительно 50 мМ;
  - (iii) сахарозу в концентрации от приблизительно 100 мМ до приблизительно 1М;
  - (iv) полисорбат 80 в концентрации от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему); и
  - (v) ДТРА в концентрации от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 100 мкМ;
- причем рН препарата составляет от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,5, причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



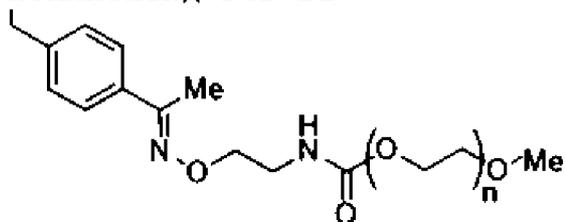
(Формула I),

где n составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

[0021] Настоящим изобретением также предоставляется фармацевтический препарат, содержащий:

- (i) конъюгат FGF-21;
  - (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ;
  - (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ;
  - (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и
  - (v) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ;
- причем рН составляет приблизительно 7,1, причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



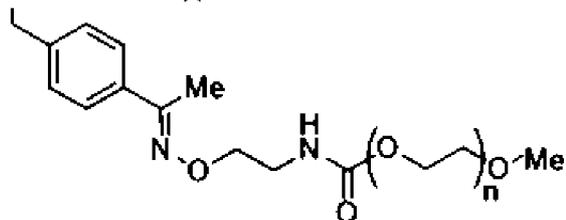
(Формула I),

где n составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

[0022] Также предоставляется фармацевтический препарат, содержащий:

- (i) конъюгат FGF-21;
  - (ii) гистидин в концентрации, составляющей 20 мМ;
  - (iii) сахарозу в концентрации, составляющей 600 мМ;
  - (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей 0,05% (в отношении веса к объему); и
  - (v) ДТРА в концентрации, составляющей 50 мкМ;
- причем рН составляет 7,1,  
причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



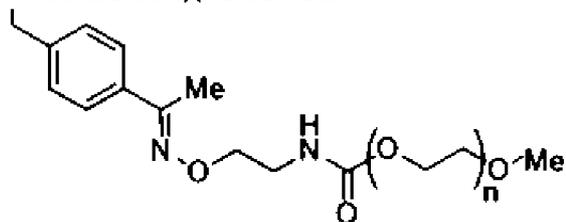
(Формула I),

где n составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

[0023] Настоящим изобретением предоставляется фармацевтический препарат, содержащий:

- (i) конъюгат FGF-21,
  - (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ и
  - (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ,
- причем рН составляет приблизительно 7,0,  
причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21

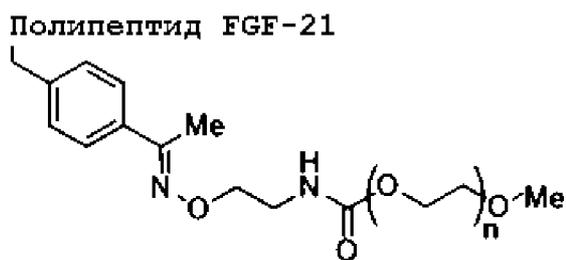


(Формула I),

где n составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

[0024] Настоящим изобретением предоставляется фармацевтический препарат, содержащий:

- (i) конъюгат FGF-21,
  - (ii) гистидин в концентрации, составляющей 20 мМ; и
  - (iii) сахарозу в концентрации, составляющей 600 мМ,
- причем рН составляет 7,0,  
причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

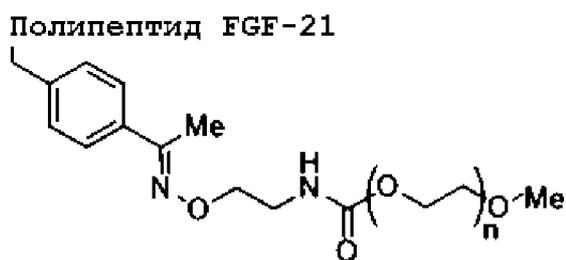


(Формула I)

где  $n$  составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

[0025] Настоящим изобретением также предоставляется фармацевтический препарат, содержащий:

- (i) конъюгат FGF-21 в концентрации, составляющей приблизительно 10 мг/мл;
  - (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ;
  - (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ;
  - (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и
  - (v) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ;
- причем рН составляет приблизительно 7,1,  
причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

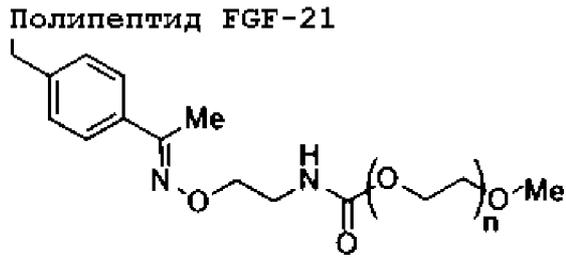


(Формула I),

где  $n$  составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

[0026] Настоящим изобретением также предоставляется фармацевтический препарат, содержащий:

- (i) конъюгат FGF-21 в концентрации, составляющей приблизительно 20 мг/мл;
  - (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ;
  - (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ;
  - (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и
  - (v) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ;
- причем рН составляет приблизительно 7,1,  
причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:



(Формула I),

где  $n$  составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

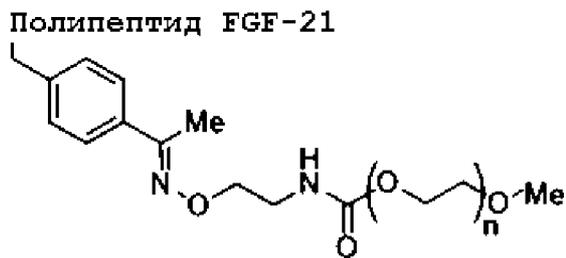
[0027] Настоящим изобретением предоставляется фармацевтический препарат, содержащий:

- (i) конъюгат FGF-21 в концентрации, составляющей 10 мг/мл,
- (ii) гистидин в концентрации, составляющей 20 мМ;
- (iii) сахарозу в концентрации, составляющей 600 мМ;
- (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей 0,05% (в отношении веса к объему), и

(v) ДТРА в концентрации, составляющей 50 мкМ;

причем pH составляет 7,0,

причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:



(Формула I),

где  $n$  составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

[0028] Настоящим изобретением предоставляется фармацевтический препарат, содержащий:

(i) ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 4 в концентрации, составляющей 20 мг/мл;

(ii) гистидин в концентрации, составляющей 20 мМ;

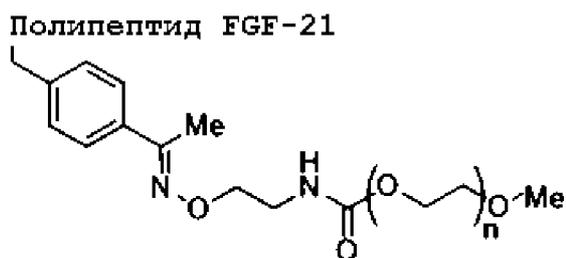
(iii) сахарозу в концентрации, составляющей 600 мМ;

(iv) полисорбат 80 в концентрации 0,05% (в отношении веса к объему); и

(v) ДТРА в концентрации, составляющей 50 мкМ;

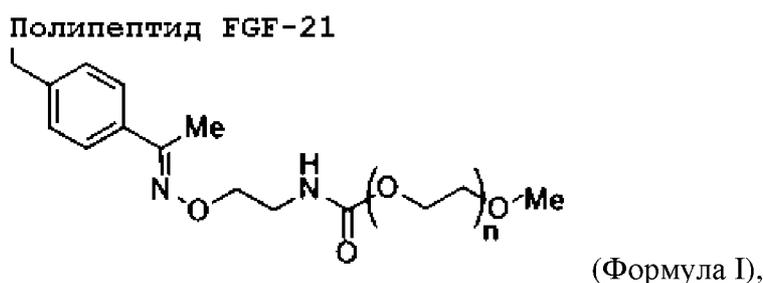
причем pH составляет 7,0,

причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:



где  $n$  находится в диапазоне от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

[0029] Настоящим изобретением предоставляется способ улучшения стабильности фармацевтического препарата, содержащего полипептид в виде фактора роста фибробластов 21 (FGF-21), конъюгированный с фрагментом полиэтиленгликоля (ПЭГ) («конъюгат FGF-21»), при этом способ включает примешивание комплексона для катионов в виде аминополикарбоновой кислоты, причем препарат обладает улучшенной стабильностью по сравнению с эталонным препаратом, который не содержит комплексон для катионов в виде аминополикарбоновой кислоты, причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:



где  $n$  составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

[0030] В некоторых аспектах раскрытых здесь способов фрагмент ПЭГ конъюгирован с не встречающейся в природе аминокислотой в полипептиде FGF-21. В некоторых аспектах не встречающаяся в природе аминокислота в полипептиде FGF-21 представляет собой пара-ацетил-L-фенилаланин. В некоторых аспектах полипептид FGF-21 представляет собой полипептид FGF-21 с SEQ ID NO:1. В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 находится в L-конформации. В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 находится в D-конформации. В некоторых аспектах улучшение стабильности включает (i) повышение физической стойкости полипептида, (ii) повышение химической стойкости полипептида или (iii) как (i), так и (ii). В некоторых аспектах повышение физической стойкости включает (i) предотвращение или уменьшение агрегации полипептида, (ii) предотвращение или уменьшение фрагментации полипептида или (iii) как (i), так и (ii). В некоторых аспектах повышение химической стойкости включает (i) предотвращение или уменьшение дезамидирования полипептида, (ii) предотвращение или уменьшение окисления полипептида или (iii) как (i), так и (ii). В некоторых аспектах улучшение

стабильности включает одно или более из следующего: (а) более низкую скорость дезамидирования полипептида при хранении при 40°C в течение приблизительно месяца относительно эталонного препарата; (б) более низкую скорость агрегации высокомолекулярного (HMW) полипептида при хранении при 40°C в течение приблизительно месяца относительно эталонного препарата; или (с) как (а), так и (б). В некоторых аспектах улучшение стабильности включает предотвращение или уменьшение окисления одного или более метионинов. В некоторых аспектах метионины соответствуют Met1 и/или Met169 в полипептиде FGF-21. В некоторых аспектах окисление метионинов предотвращается или уменьшается при 25°C и/или 40°C.

[0031] В некоторых аспектах раскрытых здесь способов комплексон для катионов в виде аминополикарбоновой кислоты представляет собой ДТРА. В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде ДТРА присутствует в количестве от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 100 мкМ ДТРА, от приблизительно 20 мкМ до приблизительно 90 мкМ ДТРА, от приблизительно 25 мкМ до приблизительно 75 мкМ ДТРА, от приблизительно 40 мкМ до приблизительно 60 мкМ ДТРА, от приблизительно 30 мкМ до приблизительно 70 мкМ ДТРА, от приблизительно 30 мкМ до приблизительно 80 мкМ ДТРА или от приблизительно 40 мкМ до приблизительно 70 мкМ. В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде ДТРА присутствует в количестве, составляющем приблизительно 40 мкМ, приблизительно 45 мкМ, приблизительно 50 мкМ, приблизительно 55 мкМ или приблизительно 60 мкМ ДТРА.

[0032] В некоторых аспектах раскрытых здесь способов способ включает, кроме того, доведение рН до значения, превышающего 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 или 7,0. В некоторых аспектах рН доводят до значения от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,5, или от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,4, или от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,3, или от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,2, или от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,3, или от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,4, или от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,5. В некоторых аспектах доведенный рН составляет приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, приблизительно 7,3, приблизительно 7,4 или приблизительно 7,5. В некоторых аспектах препарат является более стабильным, чем эталонный препарат с рН 6,5.

[0033] В некоторых аспектах раскрытых здесь способов способ включает, кроме того, примешивание поверхностно-активного вещества. В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество. В некоторых аспектах неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат. В некоторых аспектах полисорбат представляет собой полисорбат 80. В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество полисорбат 80 примешивают в количестве от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,02% до приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,03% до приблизительно 0,08% (в

отношении веса к объему), от приблизительно 0,04% до приблизительно 0,07% (в отношении веса к объему) или от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,06% (в отношении веса к объему). В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество полисорбат 80 примешивают в количестве, составляющем по крайней мере приблизительно 0,01% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,02% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,03% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,04% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,06% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,07% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему) или по крайней мере приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему). В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество уменьшает образование (макро)частиц и/или образование пузырьков воздуха при встряхивании на шейкере.

[0034] В некоторых аспектах раскрытых здесь способов способ включает, кроме того, примешивание буферного агента в виде аминокислоты. В некоторых аспектах буферный агент в виде аминокислоты представляет собой гистидин. В некоторых аспектах буферный агент в виде гистидина примешивают в количестве от приблизительно 10 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 90 мМ гистидина, от приблизительно 30 мМ до приблизительно 80 мМ гистидина, от приблизительно 40 мМ до приблизительно 70 мМ гистидина, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 30 мМ гистидина, от приблизительно 15 мМ до приблизительно 25 мМ гистидина, от приблизительно 17,5 мМ до приблизительно 22,5 мМ или от приблизительно 40 мМ до приблизительно 60 мМ гистидина. В некоторых аспектах буферный агент в виде гистидина примешивают в количестве, составляющем приблизительно 10 мМ гистидина, приблизительно 15 мМ гистидина, приблизительно 20 мМ гистидина, приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 30 мМ гистидина, приблизительно 35 мМ гистидина, приблизительно 40 мМ гистидина, приблизительно 45 мМ гистидина или приблизительно 50 мМ гистидина.

[0035] В некоторых аспектах раскрытых здесь способов способ включает, кроме того, примешивание осморегулятора. В некоторых аспектах осморегулятор включает сахар. В некоторых аспектах сахар представляет собой сахарозу. В некоторых аспектах осморегулятор в виде сахарозы примешивают в количестве от приблизительно 100 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 200 мМ до приблизительно 900 мМ сахарозы, от приблизительно 300 мМ до приблизительно 800 мМ сахарозы, от приблизительно 400 мМ до приблизительно 700 мМ сахарозы или от приблизительно 500 мМ до приблизительно 600 мМ сахарозы. В некоторых аспектах осморегулятор в виде сахарозы примешивают в количестве, составляющем приблизительно 100 мМ сахарозы, приблизительно 200 мМ сахарозы, приблизительно 300 мМ сахарозы, приблизительно 400 мМ сахарозы, приблизительно 500 мМ сахарозы, приблизительно 600 мМ сахарозы,

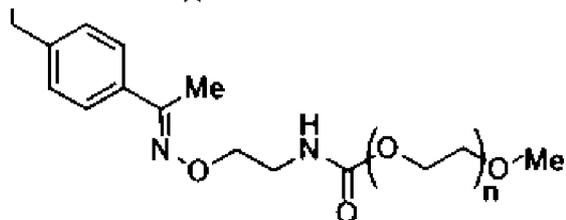
приблизительно 700 мМ сахарозы, приблизительно 800 мМ сахарозы, приблизительно 900 мМ сахарозы или приблизительно 1 М сахарозы.

[0036] В некоторых аспектах препарат представляет собой водный препарат. В некоторых аспектах настоящим изобретением предоставляется фармацевтический препарат, приготовленный в соответствии с раскрытыми здесь способами.

[0037] Настоящим изобретением также предоставляется флакон, содержащий:

- (i) конъюгат FGF-21;
- (ii) гистидин в концентрации от приблизительно 10 мМ до приблизительно 50 мМ;
- (iii) сахарозу в концентрации от приблизительно 100 мМ до приблизительно 1М;
- (iv) полисорбат 80 в концентрации от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему); и
- (v) ДТРА в концентрации от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 100 мкМ; причем рН препарата составляет от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,5, причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



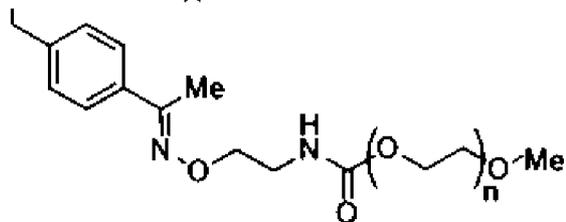
(Формула I),

где n составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

[0038] Настоящим изобретением также предоставляется флакон, содержащий:

- (i) от приблизительно 5 мг до приблизительно 20 мг конъюгата FGF-21;
  - (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ; и
  - (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ;
- причем рН составляет приблизительно 7,0, причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



(Формула I),

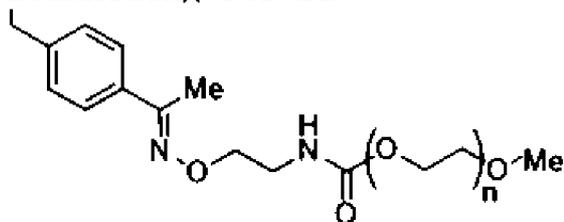
где n составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

[0039] Настоящим изобретением также предоставляется флакон, содержащий:

- (i) от приблизительно 10 мг до приблизительно 20 мг конъюгата FGF-21;

- (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ;
  - (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ;
  - (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и
  - (v) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ;
- причем рН составляет приблизительно 7,1,  
причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



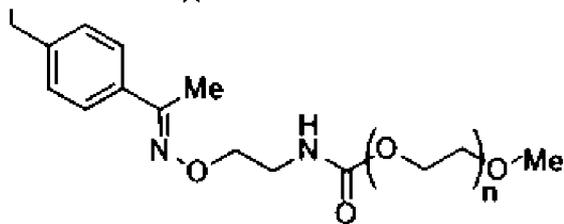
(Формула I),

где n составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

[0040] Настоящим изобретением также предоставляется флакон, содержащий:

- (i) приблизительно 10 мг конъюгата FGF-21;
  - (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ;
  - (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ;
  - (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и
  - (v) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ;
- причем рН составляет приблизительно 7,1,  
причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



(Формула I),

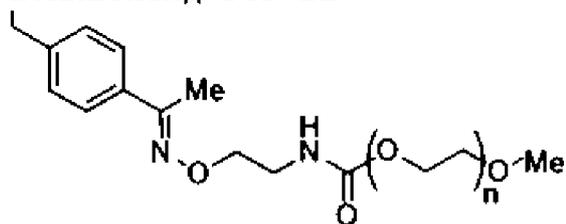
где n составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

[0041] Настоящим изобретением также предоставляется флакон, содержащий:

- (i) приблизительно 20 мг конъюгата FGF-21;
- (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ,
- (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ,
- (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему), и

(v) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ; причем рН составляет приблизительно 7,1, причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



(Формула I),

где n составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

[0042] Настоящим изобретением также предоставляется набор или изделие, включающий(ее) (i) раскрытый здесь фармацевтический препарат или раскрытый здесь флакон и (ii) инструкции по применению.

[0043] Настоящим изобретением также предоставляется способ лечения или предотвращения заболевания или состояния, связанного с фиброзом и/или диабетом, у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтического препарата, раскрытого здесь, эффективного количества из флакона, раскрытого здесь, или набора, раскрытого здесь. В некоторых аспектах заболевание или состояние представляет собой диабет. В некоторых аспектах диабет представляет собой диабет 2 типа. В некоторых аспектах заболевание или состояние представляет собой неалкогольный стеатогепатит (NASH). В некоторых аспектах введение субъекту эффективного количества фармацевтического препарата уменьшает жесткость печени, снижает процентное содержание жира в организме, уменьшает вес тела, уменьшает отношение веса печени к весу тела, снижает содержание липидов в печени, уменьшает площадь фиброза в печени, снижает уровни глюкозы в крови натощак, снижает уровни триглицеридов натощак, снижает уровни холестерина LDL (ЛПНП), снижает уровни ApoB, снижает уровни ApoC, повышает уровни холестерина HDL (ЛПВП) или вызывает любую их комбинацию. В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 20 мг. В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 вводят с интервалом между введениями доз, составляющим неделю. В некоторых аспектах фармацевтический препарат вводят подкожно. В некоторых аспектах фармацевтический препарат вводят подкожно, используя безопасный шприц. В некоторых аспектах введение фармацевтического препарата субъекту приводит к следующему:

- (i) снижению уровня жира в печени;
- (ii) снижению уровня повреждения печени;
- (iii) снижению уровня фиброза;
- (iv) снижению уровней биомаркера фиброза Pro-C3 (N-концевого пропептида коллагена III типа) в сыворотке;

- (v) снижению уровней аланинаминотрансферазы (ALT);
- (vi) снижению уровней аспартатаминотрансферазы (AST);
- (vii) повышению уровней адипонектина в сыворотке;
- (viii) снижению уровней LDL в плазме;
- (ix) повышению уровней HDL в плазме;
- (x) снижению уровней триглицеридов в плазме;
- (xi) уменьшению степени жесткости печени; или
- (xii) вызову любой их комбинации;

по сравнению с уровнями у не подвергнутых лечению субъектов или у субъекта до введения фармацевтического препарата.

[0044] В некоторых аспектах полипептид FGF-21 может быть конъюгирован с ПЭГ с М.м. (молекулярной массой), составляющей приблизительно 30 кДа.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0045] На фиг. 1А и 1В показано дезамидирование ПЭГ-FGF-21 в зависимости от состава препарата. На фиг. 1А показано дезамидирование в препарате без триамина пентауксусной кислоты (ДТРА) или полисорбата 80. На фиг. 1В показано дезамидирование в препарате, содержащем триамин пентауксусной кислоты (ДТРА) и полисорбат 80.

[0046] На фиг. 2А и 2В показано катализируемое металлом окисление полипептида ПЭГ-FGF-21 в положении метионина 1 (фиг. 2А) и метионина 169 (фиг. 2В) в присутствии и в отсутствие 50 мкМ ДТРА (также известной как триамин пентауксусной кислоты).

[0047] На фиг. 3А и 3В показано влияние pH на агрегацию ПЭГ-FGF-21. На фиг. 3А показана агрегация в зависимости от времени, pH и используемой буферной системы. На фиг. 3В показана агрегация при различных температурах и в различные моменты времени (5°C, 14 месяцев; 25°C, 1 месяц; 40°C, 1 день) и различных pH.

[0048] На фиг. 4А и 4В показана агрегация ПЭГ-FGF-21 в зависимости от состава препарата. На фиг. 4А показана агрегация в препарате без триамина пентауксусной кислоты (ДТРА) или полисорбата 80. На фиг. 4В показана агрегация в препарате с триамином пентауксусной кислоты (ДТРА) и полисорбатом 80.

[0049] На фиг. 5 показано, что ПЭГ-FGF-21 в более высокой концентрации без PS80 становился мутным после 24 часов на круговой качалке со скоростью 300 об./мин (слева) или встряхивания на шейкере, имитирующем возвратно-поступательные движения запястья человека, в течение 6 часов (справа). Добавление полисорбата 80 в количестве от 0,01% до 0,1% (в отношении веса к объему) уменьшало мутность образцов.

[0050] На фиг. 6 показано схематическое представление конъюгата в виде ПЭГилированного FGF-21 по настоящему изобретению; в частности, пример, в котором не встречающаяся в природе аминокислота в конъюгате FGF-21 представляет собой пара-ацетилфенилаланин, например пара-ацетил-L-фенилаланин. n представляет количество этиленгликолевых звеньев, содержащихся в полимере ПЭГ.

[0051] На фиг. 7 показано схематическое представление конкретного ПЭГ-линкера,

содержащего 681 этиленгликолевое звено, которое может быть слито или конъюгировано сайт-специфическим образом с полипептидом FGF-21 (например, полипептидом FGF-21, содержащим не встречающуюся в природе аминокислоту, такую как пара-ацетилфенилаланин) с получением конъюгата FGF-21 по настоящему изобретению.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0052] Настоящим изобретением предоставляется стабилизированный фармацевтический препарат, содержащий конъюгат фактора роста фибробластов 21 (FGF-21), например, такой как ПЭГ-FGF-21 (например, SEQ ID NO:2 или 4). Было обнаружено, что присутствие комплексона для катионов в виде аминополикарбоновой кислоты, такого как DTPA, уменьшает окисление одного или более аминокислотных остатков, например, метионинов, в раскрытом здесь конъюгате FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.

[0053] Включение DTPA в препарат, содержащий раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, также снижает скорость дезамидирования полипептида FGF-21 при хранении, а также снижает скорость агрегации высокомолекулярного полипептида при хранении. Дальнейшая стабилизация может быть достигнута путем доведения pH препарата до 7,1. Кроме того, препарат можно дополнительно стабилизировать путем добавления поверхностно-активного вещества, такого как полисорбат 80.

[0054] Настоящим изобретением также предоставляются способы производства раскрытого препарата, а также препараты, полученные с применением раскрытого способа. Также предоставляются способы лечения или профилактики заболеваний, связанных с фиброзом, например, NASH и диабета, включающие введение раскрытых стабилизированных препаратов нуждающемуся в этом субъекту.

#### Определения

[0055] Для того чтобы описание настоящего изобретения можно было легче понять, сначала даны определения некоторых терминов. При использовании в этой заявке, если иное прямо не предусмотрено здесь, каждый из следующих терминов имеет представленное ниже значение. Дополнительные определения представлены на протяжении всей заявки.

[0056] Описание настоящего изобретения включает аспекты, в которых ровно один член группы присутствует, используется или иным образом имеет отношение к определенному продукту или процессу. Раскрытие включает аспекты, в которых более одного или все члены группы присутствуют, используются или иным образом имеют отношение к определенному продукту или процессу.

[0057] Формы единственного числа «a», «an» и «the» включают ссылки на множественное число, если контекст явно не требует иного. Термины «a» (или «an»), а также термины «один или более» и «по крайней мере один» могут использоваться здесь взаимозаменяемо. В некоторых аспектах термин «a» или «an» означает «один». В других аспектах термин «a» или «an» включает «два или более» или «множество». Так, например,

ссылка на «конъюгат FGF-21» является ссылкой на один или более таких белков или конъюгатов и включает их эквиваленты, известные специалистам со средним уровнем компетентности в данной области техники, и т.д.

[0058] Кроме того, термин «и/или», при его использовании здесь, следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе или без другого. Таким образом, термин «и/или», используемый здесь в такой фразе, как «А и/или В», как подразумевается, включает «А и В», «А или В», «А» (только) и «В» (только). Так же, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А, В и/или С», как подразумевается, включает каждый из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (только); В (только); и С (только).

[0059] Термин «приблизительно» используется здесь для значения или состава, которое(ый) находится в допустимом диапазоне ошибок для конкретного значения или состава, как определенном специалистом со средним уровнем компетентности в данной области техники, который будет частично зависеть от того, каким образом значение или состав измеряется или определяется, т.е. ограничений системы измерения. Например, «приблизительно» может означать в пределах 1 или более 1 стандартного отклонения в соответствии с практикой в данной области техники. Альтернативно, «приблизительно» может означать диапазон вплоть до 20%. Кроме того, особенно по отношению к биологическим системам или процессам, эти термины могут означать значение вплоть до порядка величины или вплоть до 5-кратного значения. Если в заявке и пунктах формулы изобретения указаны конкретные значения или составы, если не указано иное, следует исходить из того, что значение «приблизительно» находится в допустимом диапазоне ошибок для этого конкретного значения или состава. Когда термин «приблизительно» используется в сочетании с диапазоном численных значений, он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже установленных численных значений. Таким образом, «приблизительно 10-20» означает «от приблизительно 10 до приблизительно 20». В общем, термин «приблизительно» может отклонять численное значение выше и ниже заявленного значения с отклонением, составляющим, например, 10 процентов, в большую или меньшую сторону (больше или меньше).

[0060] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, в котором они обычно понимаются специалистом со средним уровнем компетентности в области техники, к которой относится это описание. Например, Краткий словарь по биомедицине и молекулярной биологии, (The Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press); Словарь по клеточной и молекулярной биологии (The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press); и Оксфордский словарь по биохимии и молекулярной биологии (The Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press), предоставляют специалисту общий словарь многих терминов, используемых в этом описании.

[0061] Следует понимать, что везде, где аспекты описаны здесь с использованием

формулировки «содержащий (включающий)», также предоставляются аналогичные во всем остальном аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «по существу состоящий из».

[0062] Единицы, префиксы и символы обозначаются в принятой для них форме Международной системы единиц (Systeme International de Unites, SI). Диапазоны численных значений включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, аминокислотные последовательности записываются слева направо в ориентации от N-конца к С-концу. Представленные здесь заголовки не являются ограничениями различных аспектов настоящего изобретения, которые могут быть получены при ссылке на описание в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, полнее определяются при ссылке на описание в целом.

[0063] Аминокислоты обозначаются здесь либо их общеизвестными трехбуквенными символами, либо однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Если не указано иное, аминокислотные последовательности записываются слева направо в ориентации от N-конца к С-концу.

[0064] *Агрегация*: Термин «агрегация» относится к склонности полипептида, например, фрагмента полипептида FGF-21 в конъюгате FGF-21, раскрытом здесь, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, образовывать нековалентно связанные комплексы с другими молекулами (такими как другие молекулы того же полипептида), тем самым образуя высокомолекулярные комплексы. Приводимые в качестве примера способы определения образования агрегатов включают аналитическую эксклюзионную хроматографию, как описано здесь в разделе «Примеры». Относительные степени агрегации могут быть определены по отношению к эталонному соединению, например, для идентификации полипептида с уменьшенной агрегацией. Относительные степени агрегации также могут быть определены по отношению к эталонному препарату, например, для идентификации препарата, в котором, например, раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, подвержен уменьшенной агрегации.

[0065] *Аминокислотная замена*: Термин «аминокислотная замена» относится к замене аминокислотного остатка, присутствующего в родительской или эталонной последовательности (например, последовательности дикого типа), другим аминокислотным остатком. Аминокислота может быть заменена в родительской или эталонной последовательности (например, в последовательности полипептида дикого типа), например, с помощью химического синтеза пептидов или с помощью рекомбинантных методов, известных в данной области техники. Соответственно, ссылка на «замену в положении X» относится к замене аминокислоты, присутствующей в положении X, альтернативным аминокислотным остатком. В некоторых аспектах характеры замен могут быть описаны в соответствии со схемой AnY, где A представляет собой однобуквенный код, соответствующий аминокислоте, присутствующей в

природных условиях или исходно в положении n, а Y представляет собой заменяющий аминокислотный остаток. В других аспектах характеры замен могут быть описаны в соответствии со схемой An(YZ), где A представляет собой однобуквенный код, соответствующий аминокислотному остатку, заменяющему аминокислоту, присутствующую в природных условиях или исходно в положении n, а Y и Z представляют собой альтернативные заменяющие аминокислотные остатки, которые могут заменить A.

[0066] В контексте настоящего изобретения замены (даже когда они упоминаются как аминокислотные замены) проводятся на уровне нуклеиновой кислоты, т.е. замену аминокислотного остатка альтернативным аминокислотным остатком проводят путем замены кодона, кодирующего первую аминокислоту, кодоном, кодирующим вторую аминокислоту.

[0067] *Приблизительно*: Используемый здесь термин «приблизительно» применительно к одному или более представляющих интерес значений относится к значению, которое схоже с заявленным референсным значением. В некоторых аспектах термин «приблизительно» относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любом направлении (больше или меньше) от заявленного референсного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышает 100% возможного значения).

[0068] *Связанный с*: Используемый здесь применительно к заболеванию термин «связанный с» означает, что рассматриваемый симптом, измерение, характеристика или состояние связаны с диагнозом, развитием, наличием или прогрессированием этого заболевания. Связь с заболеванием может, но не обязательно, быть причинной.

[0069] *Биологически активный*: Термин «биологически активный» применительно к раскрытой здесь молекуле, например, раскрытому здесь конъюгату FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, означает любое вещество, которое может влиять на любые физические или биохимические свойства биологической системы, пути, молекулы или взаимодействия, относящиеся к живому организму. В частности, здесь биологически активные молекулы включают, но без ограничения этим, любое вещество, предназначенное для диагностики, лечения, ослабления, лечения или предотвращения заболеваний или состояний, например, заболеваний или состояний, связанных с фиброзом, у людей или других животных или для повышения иным образом физического или психического благополучия людей или животных.

[0070] *Консервативная аминокислотная замена*: «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, в случае которой аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим схожую боковую цепь. В данной области техники определены семейства аминокислотных остатков, имеющих схожие боковые цепи, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин или гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота),

незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин или цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин или триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан или гистидин). Таким образом, если аминокислота в полипептиде заменена другой аминокислотой из того же семейства боковых цепей, аминокислотная замена считается консервативной. В другом аспекте цепочка аминокислот может быть консервативно заменена структурно схожей цепочкой, которая отличается порядком и/или составом членов семейства боковых цепей.

[0071] Неконсервативные аминокислотные замены включают замены, в случае которых (i) остаток, имеющий электроположительную боковую цепь (например, Arg, His или Lys), заменяется или замещается электроотрицательным остатком (например, Glu или Asp), (ii) гидрофильный остаток (например, Ser или Thr) заменяется или замещается гидрофобным остатком (например, Ala, Leu, Ile, Phe или Val), (iii) цистеин или пролин заменяется или замещается любым другим остатком, или (iv) остаток, имеющий большую гидрофобную или ароматическую боковую цепь (например, Val, His, Ile или Trp) заменяется или замещается остатком, имеющим меньшую боковую цепь (например, Ala или Ser) или не имеющим боковую цепь (например, Gly).

[0072] Также могут использоваться другие аминокислотные замены. Например, для аминокислоты аланина замена может быть выбрана из любого из D-аланина, глицина, бета-аланина, L-цистеина и D-цистеина. Для лизина заменой может быть любой из D-лизина, аргинина, D-аргинина, гомоаргинина, метионина, D-метионина, орнитина или D-орнитина. Как правило, замены в функционально важных областях, которые, как можно ожидать, будут вызывать изменения свойств выделенных полипептидов, представляют собой замены, в случае которых (i) полярный остаток, например, серин или треонин, заменяется (замещается) гидрофобным остатком, например, лейцином, изолейцином, фенилаланином или аланином; (ii) остаток цистеина заменяется (замещается) любым другим остатком; (iii) остаток, имеющий электроположительную боковую цепь, например, лизин, аргинин или гистидин, заменяется (или посредством) остатком, имеющим электроотрицательную боковую цепь, например, глутаминовой кислотой или аспарагиновой кислотой; или (iv) остаток, имеющий объемную боковую цепь, например, фенилаланин, заменяется (или замещается) остатком, не имеющим такую боковую цепь, например, глицином. Вероятность того, что одна из вышеперечисленных неконсервативных замен может изменить функциональные свойства белка, также коррелирует с положением замены относительно функционально важных областей белка: соответственно, некоторые неконсервативные замены могут незначительно влиять или совсем не влиять на биологические свойства.

[0073] *Консервативный*: Используемый здесь термин «консервативный» относится к аминокислотным остаткам полипептидной последовательности, соответственно, которые представляют собой те, которые встречаются в неизменном виде в одном и том

же положении двух или более сравниваемых последовательностей. Аминокислоты, которые являются относительно консервативными, - это те, которые являются консервативными среди родственных в большей степени последовательностей, чем нуклеотиды или аминокислоты, обнаруживающиеся где-либо в других частях последовательностей.

[0074] В некоторых аспектах две или более последовательностей называются «полностью консервативными» или «идентичными», если они на 100% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательностей называются «высококонсервативными», если они идентичны друг другу на по крайней мере 70%, по крайней мере 80%, по крайней мере 90% или по крайней мере 95%. В некоторых аспектах две или более последовательностей называются «высококонсервативными», если они идентичны друг другу на приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или приблизительно 99%. В некоторых аспектах две или более последовательностей называются «консервативными», если они идентичны друг другу на по крайней мере 30%, по крайней мере 40%, по крайней мере 50%, по крайней мере 60%, по крайней мере 70%, по крайней мере 80%, по крайней мере 90% или по крайней мере 95%. В некоторых аспектах две или более последовательностей называются «консервативными», если они идентичны друг другу на приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или приблизительно 99%. Консервативность последовательности может быть применима ко всей длине полинуклеотида или полипептида или может быть применима к его части, области или признаку.

[0075] *Дезамидирование*: Термин «дезамидирование» относится к склонности аминокислотных остатков в полипептиде спонтанно подвергаться реакции дезамидирования, тем самым изменяя химическую структуру аминокислоты и потенциально влияя на функцию полипептида. Приводимые в качестве примера способы определения дезамидирования раскрыты в приведенном здесь разделе «Примеры». Относительная степень дезамидирования может быть определена по отношению к эталонному соединению, например, для идентификации полипептида с уменьшенным дезамидированием. Относительные степени дезамидирования также могут быть определены по отношению к эталонному препарату, например, для идентификации препарата, в котором раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, подвержен уменьшенному дезамидированию.

[0076] *Заболевание, связанное с фиброзом*: Термин «заболевание, связанное с фиброзом», включает заболевания, нарушения и состояния, в случае которых наблюдалось возникновение фиброза, или в случае которых известно или считается, что фиброз связан с этиологией заболевания, его прогрессированием или симптомами или способствует их (ее, его) развитию, или в случае которых известно или предполагается, что фиброз возникает по мере прогрессирования заболевания.

[0077] Фиброз может поражать орган или ткань, такой(ую) как поджелудочная железа, легкое, сердце, почка, печень, глаза, нервная система, костный мозг, лимфатические узлы, эндомиокард или забрюшинное пространство. Приводимые в качестве примера заболевания, связанные с фиброзом, включают, но без ограничения этим, неалкогольный стеатогепатит (NASH), фиброз печени, предциррозное состояние, цирроз, диффузное паренхиматозное заболевание легких, кистозный фиброз, фиброз легких или легочный фиброз, прогрессирующий массивный фиброз, идиопатический легочный фиброз, фиброз после инъекций, фиброз почек или почечный фиброз, хроническую болезнь почек, диабетическую болезнь почек, фокально-сегментарный гломерулосклероз, мембранозную нефропатию, IgA-нефропатию, миелофиброз, сердечную недостаточность, связанную с метаболическими изменениями сердечную недостаточность, сердечный фиброз, фиброз при катаракте, катаракту, рубцевание роговицы, фиброз поджелудочной железы, фиброз кожи, фиброз кишечника, сужения просвета кишечника, эндомиокардиальный фиброз, фиброз предсердий, медиастинальный фиброз, болезнь Крона, ретроперитонеальный фиброз, келоид, нефрогенный системный фиброз, склеродермию, системный склероз, артрофиброз, болезнь Пейрони, контрактуру Дюпюитрена, диабетическую невропатию, адгезивный капсулит, алкогольную болезнь печени, гепатостеатоз, вирусный гепатит, заболевание желчевыводящих путей, первичный гемохроматоз, связанный с лекарственными средствами цирроз, криптогенный цирроз, болезнь Вильсона и дефицит альфа-1-антитрипсина, интерстициальное заболевание легких (ILD), фиброз легких человека, дегенерацию желтого пятна, ретинопатию сетчатки, витреоретинопатию, миокардиальный фиброз, офтальмопатию Грейвса, вызванный лекарственными средствами эрготизм, сердечнососудистые заболевания, атеросклероз/рестеноз, гипертрофические рубцы, первичный или идиопатический миелофиброз и воспалительное заболевание кишечника (включая, но без ограничения этим, коллагеновый колит). В некоторых аспектах заболевание, связанное с фиброзом, может включать фиброз печени, фиброз почек или почечный фиброз, фиброз легких или легочный фиброз и фиброз сердца или сердечный фиброз. В некоторых аспектах заболевание, связанное с фиброзом, может представлять собой фиброз печени. В некоторых аспектах заболевание, связанное с фиброзом, может представлять собой NASH.

[0078] *Эффективное количество*: Используемый здесь термин «эффективное количество» препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, представляет собой количество, достаточное для вызова полезных или желаемых результатов, например, клинических результатов, и как таковое «эффективное количество» зависит от ситуации, в которой оно применяется. Например, при введении раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, который лечит NASH, эффективное количество конъюгата FGF-21 составляет, например, количество, достаточное для уменьшения уровня жира в печени, повреждения печени или фиброза (например, уменьшения уровня жира в печени, повреждения печени или фиброза относительно уровней у не подвергнутых

лечению субъектов или относительно уровней у субъекта до проведения лечения). В некоторых аспектах количество полипептида FGF-21 в раскрытом здесь препарате основано на измерении с помощью угловой спектроскопии, например, спектрофотометра УФ-видимой области Agilent Cary 60, оснащенного SoloVPE Fibrette (C Technologies, Inc.; P/N OF0002-P50) (одноразовым пластиковым сосудом для УФ-излучения SoloVPE (C Technologies, Inc.; P/N OC0009-1)), при 280 нм с коэффициентом поглощения=0,87 (мл/(мг\*см)).

[0079] В некоторых аспектах эффективное количество раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, для лечения NASH может изменить уровень одного или более биомаркеров фиброза: например, снизить уровень Pro-C3 в сыворотке; снизить ALT или AST; повысить уровень адипонектина в сыворотке; снизить уровень LDL в плазме; повысить уровень HDL в плазме; снизить уровни триглицеридов в плазме или вызвать любую их комбинацию относительно уровней у субъектов, не подвергнутых лечению, или относительно уровней у субъектов до проведения лечения.

[0080] Термин «эффективное количество» может использоваться взаимозаменяемо с «эффективной дозой», «терапевтически эффективным количеством» или «терапевтически эффективной дозой».

[0081] «Фиксированная доза» применительно к способам и дозировкам по настоящему изобретению означает дозу, которую вводят пациенту независимо от веса или площади поверхности тела (BSA) пациента. Поэтому фиксированная доза представлена не как доза в мг/кг, а скорее как абсолютное количество молекулы, например мг. В отличие от фиксированной дозы термин «доза на основе веса тела», упоминаемый здесь, означает, что доза, вводимая пациенту, рассчитывается на основе веса тела пациента. В некоторых аспектах количество полипептида FGF-21 в фиксированной дозе, раскрытой здесь, основано на измерении с помощью угловой спектроскопии, например, спектрофотометра УФ-видимой области Agilent Cary 60, оснащенного SoloVPE Fibrette (C Technologies, Inc.; P/N OF0002-P50) (одноразовым пластиковым сосудом для УФ-излучения SoloVPE (C Technologies, Inc.; P/N OC0009-1)), при 280 нм с коэффициентом поглощения=0,87 (мл/(мг\*см)).

[0082] *Активность FGF-21*: Термин «активность FGF-21» относится к по крайней мере одной биологической активности полипептида FGF-21 в конъюгате FGF-21 (например, конъюгате в виде ПЭГилированного FGF-21 по настоящему изобретению). Термин «биологическая активность» относится к способности молекулы, например, полипептида FGF-21 (например, полипептида FGF-21 в конъюгате FGF-21 или раскрытом здесь конъюгате FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4), влиять на любые физические или биохимические свойства биологической системы, пути, молекулы или взаимодействия, относящиеся к организму, в том числе, но без ограничения этим, вирусам, бактериям, бактериофагам, транспозонам, прионом, насекомым, грибам, растениям, животным и людям.

[0083] Например, биологическая активность включает любую из биологических функций, выполняемых FGF-21 дикого типа. Приводимые в качестве примера способы определения того, обладает ли молекула по крайней мере одной биологической активностью FGF-21 дикого типа (такого как полипептид FGF-21 дикого типа с SEQ ID NO:3), могут включать любые функциональные анализы, известные в данной области техники, включающие способы, описанные в примерах 5 и 17 заявки на патент США с № 2017/0189486, которая полностью включена сюда посредством ссылки.

[0084] *Эталонное соединение*: Относительный уровень биологической активности можно определить по отношению к эталонному соединению, например, для идентификации полипептида, обладающего биологической активностью или обладающего достаточно высокой биологической активностью для предполагаемого терапевтического применения, например, имеющего  $EC_{50}$ , превышающую в менее чем 5 раз, в менее чем 10 раз, в менее чем 20 раз, в менее чем 50 раз или в менее чем 100 раз  $EC_{50}$  эталонного соединения. Относительный уровень биологической активности также можно определить по отношению к эталонному препарату, например, для идентификации препарата, в котором раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, обладает биологической активностью или обладает достаточно высокой биологической активностью для предполагаемого терапевтического применения, например, имеет  $EC_{50}$ , превышающую в менее чем 5 раз, в менее чем 10 раз, в менее чем 20 раз, в менее чем 50 раз или в менее чем 100 раз  $EC_{50}$  соответствующего FGF-21 в эталонном препарате.

[0085] Эталонное соединение, описанное здесь, может представлять собой соответствующую последовательность FGF-21, в которой отсутствует модификация, такая как ПЭГилирование, как здесь описано. Например, эталонное соединение может представлять собой FGF-21 дикого типа или вариант последовательности полипептида FGF-21 (например, FGF-21 дикого типа с аминокислотной заменой, такой как замена Q109 не встречающейся в природе аминокислотой, такой как пара-ацетил-L-фенилаланин), но без фрагмента ПЭГ конъюгата. Таким образом, в некоторых аспектах эталонное соединение может содержать по крайней мере одну не встречающуюся в природе аминокислоту, которая не связана с фрагментом ПЭГ, описанным здесь. В некоторых аспектах фрагмент ПЭГ содержит дистальную метоксигруппу ( $O-CH_3$ ).

[0086] Приводимые в качестве примеров эталонные соединения для раскрытых здесь конъюгатов FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, включают, без ограничения, FGF-21 дикого типа с SEQ ID NO:3 и вариант полипептида FGF-21 с SEQ ID NO:1.

[0087] В некоторых аспектах эталонное соединение может содержать дополнительные аминокислотные замены, делеции и/или вставки. В некоторых аспектах можно проводить сравнение с ПЭГилированной или неПЭГилированной формой полипептида; в первом случае сравнение можно проводить с полипептидом, содержащим или не содержащим не встречающуюся в природе аминокислоту.

[0088] *Идентичность*: Используемый здесь термин «идентичность» относится к общей консервативности мономера между полимерными молекулами, например, между молекулами полипептидов. Термин «идентичный» без каких-либо дополнительных уточнителей, например, белок А является идентичным белку В, подразумевает, что последовательности являются идентичными на 100% (100% идентичность последовательностей). Описание двух последовательностей как, например, «идентичных на 70%» равнозначно их описанию как имеющих, например, «70% идентичность последовательностей».

[0089] Расчет процента идентичности двух полипептидных последовательностей, например, может быть выполнен путем совмещения двух последовательностей для целей оптимального сравнения (например, могут быть введены пробелы в одну или обе из первой и второй полипептидных последовательностей для оптимального совмещения, и неидентичные последовательности могут быть проигнорированы для целей сравнения). В некоторых аспектах длина последовательности, совмещаемой для целей сравнения, составляет по крайней мере 30%, по крайней мере 40%, по крайней мере 50%, по крайней мере 60%, по крайней мере 70%, по крайней мере 80%, по крайней мере 90%, по крайней мере 95% или 100% длины эталонной последовательности. Затем сравнивают аминокислоты в соответствующих положениях аминокислот.

[0090] Когда положение в первой последовательности занято той же аминокислотой, что и соответствующее положение во второй последовательности, тогда молекулы являются идентичными в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от числа идентичных положений, общих для последовательностей, с учетом числа пробелов и длины каждого пробела, которые необходимо ввести для оптимального совмещения двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно выполнить с помощью математического алгоритма.

[0091] Подходящие программы программного обеспечения доступны из различных источников и предназначены для совмещения как белковых, так и нуклеотидных последовательностей. Одной подходящей программой для определения процента идентичности последовательностей является `bl2seq`, входящая в набор программ BLAST, доступный на веб-сайте BLAST Национального центра биотехнологической информации правительства США ([blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)). `Bl2seq` выполняет сравнение двух последовательностей, используя алгоритм или BLASTN, или BLASTP. BLASTN используется для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, тогда как BLASTP используется для сравнения аминокислотных последовательностей. Другими подходящими программами являются, например, `Needle`, `Stretcher`, `Water`, или `Matcher`, входящие в набор программ по биоинформатики EMBOSS и также доступные в Европейском институте биоинформатики (EBI) на сайте [www.ebi.ac.uk/Tools/psa](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa). Совмещение последовательностей можно проводить, используя известные в данной области техники методы, такие как MAFFT, Clustal (`ClustalW`, `Clustal X` или `Clustal`

Omega), MUSCLE, и т.д.

[0092] Каждый из различных участков в пределах одной полипептидной последовательности-мишени, который совмещается с эталонной последовательностью полипептида, может иметь собственный процент идентичности последовательности. Следует отметить, что процент идентичности последовательности округляется до ближайшей десятой. Например, 80,11, 80,12, 80,13 и 80,14 округляются до 80,1, тогда как 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 и 80,19 округляются до 80,2. Также следует отметить, что значение длины всегда будет целым числом.

[0093] В некоторых аспектах процент идентичности (%ID) первой аминокислотной последовательности второй аминокислотной последовательности рассчитывается как  $\%ID=100 \times (Y/Z)$ , где Y представляет собой число аминокислотных остатков, которые засчитаны как идентичные соответствия при совмещении первой и второй последовательностей (при совмещении путем визуального контроля или конкретной программы для совмещения последовательностей), а Z представляет собой общее число остатков во второй последовательности. Если длина первой последовательности больше длины второй последовательности, процент идентичности первой последовательности второй последовательности будет выше, чем процент идентичности второй последовательности первой последовательности.

[0094] Специалисту в данной области техники будет понятно, что выполнение совмещения последовательностей для расчета процента идентичности последовательностей не ограничивается бинарными сравнениями последовательности с последовательностью, задаваемыми исключительно данными о первичной последовательности. Также будет понятно, что совмещение последовательностей может быть выполнено путем объединения данных о последовательностях с данными из разнородных источников, такими как структурные данные (например, кристаллографические структуры белков), функциональные данные (например, расположение мутаций) или филогенетические данные. Подходящей программой, которая интегрирует разнородные данные для выполнения совмещения множества последовательностей, является T-Coffee, доступная на сайте [www.tcoffee.org](http://www.tcoffee.org), и доступная в качестве альтернативы, например, в EBI. Также будет понятно, что конечное совмещение, используемое для расчета процента идентичности последовательности, можно контролировать либо автоматически, либо вручную.

[0095] *Протеолитическая деградация in vivo*: Термин «протеолитическая деградация in vivo» относится к расщеплению полипептида при введении в живую систему (например, при инъекции в организм), которое может происходить под действием протеаз, присутствующих в указанном организме. Протеолиз потенциально может влиять на биологическую активность или время полужизни полипептида. Например, FGF-21 дикого типа может подвергаться расщеплению на С-конце с образованием укороченного неактивного полипептида.

[0096] Приводимым в качестве примера способом определения протеолиза FGF-21

in vivo является электрохемилюминесцентный иммуносорбентный анализ (ECLIA) на основе Meso ScaleDiscovery (MSD), описанный в примере 10 публикации заявки на патент США с № US2017/0189486. Относительную степень протеолиза in vivo или in vitro можно определить по отношению к эталонному соединению, например, для идентификации полипептида с уменьшенным протеолизом in vivo. Относительную степень протеолиза in vivo также можно определить по отношению к эталонному препарату, т.е. для идентификации препарата, в котором фрагмент полипептида FGF-21 в конъюгате FGF-21, раскрытом здесь, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO: 4, подвергается уменьшенному протеолизу in vitro.

[0097] *Выделенный*: Используемый здесь термин «выделенный» относится к веществу или объекту (например, полипептиду), который(ое) был отделен от по крайней мере некоторых компонентов, с которыми он был связан (или в природных условиях, или в экспериментальных условиях). Выделенные вещества (например, белки) могут иметь различные уровни чистоты относительно веществ, с которыми они были связаны.

[0098] *Связанный*: Термины «связанный», «слитый», «конъюгированный» и «присоединенный» используются взаимозаменяемо и относятся к фрагменту ПЭГ (например, фрагменту ПЭГ с М.м. 30 кДа), ковалентно слитому или соединенному, в том числе встроенному внутрь, вставленному, с полипептидом (в полипептид) FGF-21, например, вариантом полипептида FGF-21, раскрытым здесь (например, полипептидом FGF-21 с SEQ ID NO:1).

[0099] В контексте настоящего изобретения полипептид FGF-21, например вариант полипептида FGF-21, раскрытый здесь (например, полипептид FGF-21 с SEQ ID NO:1), и фрагмент ПЭГ могут быть «слиты» в результате химического синтеза.

[0100] В контексте настоящего изобретения термины «конъюгат» или «конъюгация» означают, что два молекулярных объекта (например, полипептид FGF-21, например, вариант полипептида FGF-21, раскрытый здесь, и фрагмент полимера, такого как ПЭГ) были химически связаны. В некоторых конкретных аспектах полипептид FGF-21 и фрагмент ПЭГ связаны оксимной связью, как показано в формуле I, представленной здесь. В некоторых аспектах фрагмент ПЭГ содержит дистальную метоксигруппу (-O-CH<sub>3</sub>).

[0101] *Мутация*: В контексте настоящего изобретения термины «мутация» и «аминокислотная замена», определенные выше (иногда называемые просто «заменой»), считаются взаимозаменяемыми.

[0102] Не встречающаяся в природе аминокислота: «Не встречающаяся в природе аминокислота» относится к аминокислоте, которая не является одной из 20 обычных аминокислот или пирролизином, или селеноцистеином. Другими терминами, которые могут использоваться как синонимы с термином «не встречающаяся в природе аминокислота», являются «не кодируемая в природных условиях аминокислота», «неприродная аминокислота» и их различные варианты, написанные или не написанные через дефис.

[0103] Термин «не встречающаяся в природе аминокислота» также включает, но без ограничения этим, аминокислоты, которые возникают в результате модификации (например, посттрансляционных модификаций) кодируемой в природных условиях аминокислоты (в том числе, но без ограничения этим, 20 обычных аминокислот), но сами не включаются в природных условиях в растущую полипептидную цепь с помощью трансляционного комплекса. Примеры таких не встречающихся в природе аминокислот включают, но без ограничения этим, N-ацетилглюкозаминил-L-серин, N-ацетилглюкозаминил-L-треонин и O-фосфотирозин. В одном конкретном аспекте настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота представляет собой пара-ацетилфенилаланин. В одном конкретном аспекте настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота представляет собой пара-ацетил-L-фенилаланин. В одном конкретном аспекте настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота представляет собой пара-ацетил-D-фенилаланин.

[0104] *Пациент*: Используемый здесь термин «пациент» относится к субъекту, который может обратиться за лечением или нуждаться в нем, нуждается в лечении, получает лечение, будет получать лечение, или субъекту, который находится под наблюдением квалифицированного специалиста по поводу конкретного заболевания или состояния.

[0105] *Фармацевтическая композиция*: Термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, которая позволяет биологической активности активного ингредиента (например, раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4), быть эффективной, и который не содержит дополнительных компонентов (например, наполнителей и воду), которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому должна быть введена композиция. Такая композиция может быть стерильной.

[0106] *Фармацевтически приемлемый*: Выражение «фармацевтически приемлемый» используется здесь для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые, в рамках здравого врачебного суждения, подходят для применения в виде контакта с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соответствующему разумному соотношению польза/риск. Как правило, одобрение регулирующим органом федерального правительства или правительств штатов (или перечисленных в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее) для применения для животных и, в частности, людей подразумевает, что эти соединения, материалы, композиции и/или лекарственные формы являются фармацевтически приемлемыми. Соединения, материалы, композиции и/или лекарственные формы, которые обычно считаются безопасными для терапевтических целей, являются «терапевтически приемлемыми».

[0107] *Фармацевтически приемлемые наполнители*: Используемое здесь выражение «фармацевтически приемлемый наполнитель» относится к любому

ингредиенту, отличному от активных соединений, описанных здесь, (например, носителю, способному к суспендированию или растворению активного соединения) и обладающему свойствами быть практически нетоксичным и не вызывающим воспаление у субъекта. Наполнители могут включать, например, комплексоны, поверхностно-активные вещества, буферные агенты, осморегуляторы, антиоксиданты, эмульгаторы, наполнители (разбавители), консерванты, сорбенты, суспендирующие или диспергирующие агенты, подсластители и гидратационные воды. Наполнители, которые обычно считаются безопасными для терапевтических целей, называются «терапевтически приемлемыми наполнителями».

[0108] *Фармацевтически приемлемые соли*: Настоящее изобретение также включает фармацевтически приемлемые соли соединений, описанных здесь. Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемые соли» относится к производным раскрытых соединений, родительское соединение для которых модифицировано путем превращения существующей кислотной или основной части в форму соли (например, в результате взаимодействия группы свободного основания с подходящей органической кислотой). Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но без ограничения этим, соли минеральных или органических кислот и основных остатков, таких как амины; щелочные или органические соли кислотных остатков, таких как карбоновые кислоты; и т.п.

[0109] *Полипептид*: Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются здесь взаимозаменяемо для обозначения полимеров из аминокислот любой длины. Полимер может содержать модифицированные аминокислоты. Эти термины также включают полимер из аминокислот, который был модифицирован в природных условиях путем или в результате вмешательства; например, образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидирования, ацетилирования, фосфорилирования или любой другой манипуляции или модификации, такой как конъюгация с метящим компонентом. В определение также включены, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты (в том числе, например, не встречающиеся в природе аминокислоты, такие как гомоцистеин, орнитин, п-ацетилфенилаланин, D-аминокислоты и креатин), а также другие модификации, известные в данной области техники. В конкретном аспекте раскрытый здесь полипептид представляет собой полипептид FGF-21.

[0110] Используемый здесь термин относится к белкам, полипептидам и пептидам любого размера, структуры или функции. Полипептиды включают продукты генов, встречающиеся в природе полипептиды, синтетические полипептиды, гомологи, ортологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги вышеперечисленных веществ. Полипептид может быть одиночным полипептидом или может представлять собой мультимолекулярный комплекс, такой как димер, тример или тетрамер. Они также могут включать одноцепочечные или многоцепочечные полипептиды. В многоцепочечных полипептидах чаще всего встречаются дисульфидные связи. Термин «полипептид» может также применяться к полимерам из аминокислот, в которых один

или более аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический аналог соответствующей встречающейся в природе аминокислоты. В некоторых аспектах длина «пептида» может быть меньше или равна 50 аминокислотам, например, приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислотам.

[0111] *Предотвращение*: Используемый здесь термин «предотвращение» относится к частичной или полной задержке возникновения заболевания, нарушения и/или состояния; частичной или полной задержке проявления одного или более симптомов, признаков или клинических проявлений конкретного заболевания, нарушения и/или состояния; частичной или полной задержке проявления одного или более симптомов, признаков или проявлений конкретного заболевания, нарушения и/или состояния; частичной или полной задержке прогрессирования конкретного заболевания, нарушения и/или состояния; и/или уменьшению риска развития патологии, связанной с заболеванием, нарушением и/или состоянием. В некоторых аспектах фармацевтический препарат, раскрытый в настоящей заявке, может использоваться для предотвращения возникновения, предотвращения симптомов или предотвращения осложнений заболеваний или состояний, связанных с фиброзом, таких как NASH или диабет.

[0112] *Профилактический*: Используемый здесь термин «профилактический» относится к терапевтическому действию или порядку действий, используемому для предотвращения возникновения заболевания или состояния или для предотвращения или задержки проявления симптома заболевания или состояния, связанного с фиброзом, например, NASH. В некоторых аспектах фармацевтические препараты, раскрытые в настоящей заявке, могут использоваться профилактически.

[0113] *Профилактика*: Используемый здесь термин «профилактика» относится к мерам, принимаемым для поддержания здоровья и предотвращения или задержки возникновения заболевания или состояния, связанного с фиброзом, например, NASH или диабета, или для предотвращения или задержки проявления симптомов, связанных с заболеванием или состоянием.

[0114] *Рекомбинантный*: «Рекомбинантный» полипептид или белок относится к полипептиду или белку, продуцированному с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Рекомбинантно продуцированные полипептиды и белки, экспрессированные в сконструированных клетках-хозяевах, считаются выделенными для целей настоящего изобретения, как и встречающиеся в природе или рекомбинантные полипептиды, которые были выделены, фракционированы или частично или в значительной степени очищены с помощью любого подходящего метода. Раскрытые здесь варианты FGF-21 могут быть продуцированы рекомбинантно, используя известные в данной области техники способы. Раскрытые здесь белки и пептиды также могут быть химически синтезированы.

[0115] В некоторых аспектах полипептид FGF-21, применимый для раскрытого здесь конъюгата (например, полипептид FGF-21, содержащий не встречающуюся в природе аминокислоту, например, FGF-21 с SEQ ID NO:1), рекомбинантно продуцируют с помощью бактериального хозяина.

[0116] *Сходство*: Используемый здесь термин «сходство» относится к общему родству между полимерными молекулами, например, между молекулами полипептидов. Расчет процента сходства полимерных молекул друг с другом может быть выполнен таким же образом, как расчет процента идентичности, за исключением того, что при расчете процента сходства принимаются во внимание консервативные замены, как известно в данной области техники.

[0117] *Растворимость*: Термин «растворимость» относится к количеству вещества, которое может раствориться в другом веществе, например, количеству FGF-21 дикого типа (например, полипептида FGF-21 с SEQ ID NO:3), варианта FGF-21 (например, полипептида FGF-21, содержащего не встречающуюся в природе аминокислоту, например, полипептида FGF-21 с SEQ ID NO:1), или конъюгата FGF-21 по настоящему изобретению (например, полипептида FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4), которое может раствориться в водном растворе.

[0118] Приводимым в качестве примера способом определения растворимости полипептида дикого типа, варианта полипептида FGF-21 или конъюгата FGF-21 является исследование растворимости с использованием поршневого режима потока, описанное в примере 8 публикации заявки на патент США с № US2017/0189486. Относительную растворимость можно определить по отношению к эталонному соединению, например, для идентификации полипептида с повышенной растворимостью. В некоторых аспектах относительную растворимость можно определить по отношению к эталонному препарату, например, для идентификации препарата, в котором полипептид обладает повышенной растворимостью.

[0119] *Субъект*: Под «субъектом», или «индивидуумом», или «животным», или «млекопитающим» подразумевается любой субъект, в частности являющийся млекопитающим субъект, для которого желательна постановка диагноза, прогноз или терапия. Являющиеся млекопитающими субъекты включают, но без ограничения этим, людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных, животных зоопарка, спортивных животных, любимых домашних животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы; приматов, таких как человекообразные обезьяны, мартышки, орангутанги и шимпанзе; псовых, таких как собаки и волки; кошачьих, таких как кошки, львы и тигры; непарнокопытных, таких как лошади, ослы и зебры; медведей, животных в качестве продуктов питания, таких как коровы, свиньи и овцы; копытных, таких как олени и жирафы; грызунов, таких как мыши, крысы, хомяки и морские свинки; и т.д. В некоторых аспектах млекопитающее представляет собой являющегося человеком субъекта. В других аспектах субъект представляет собой являющегося человеком пациента. В конкретном аспекте субъект представляет собой являющегося человеком пациента или его клетки *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*, поддающиеся описанным здесь способам.

[0120] *Страдающий*: У индивидуума, который «страдает» заболеванием, нарушением и/или состоянием, был диагностирован один или более симптомов

заболевания, нарушения и/или состояния, или он проявляет один или более таких симптомов. В некоторых аспектах раскрытые здесь фармацевтические препараты могут вводиться субъекту, страдающему заболеванием или состоянием, связанным с фиброзом, таким как NASH или диабет.

[0121] *Восприимчивый к*: У «индивидуума, который является «восприимчивым к» заболеванию, нарушению и/или состоянию, не были диагностированы и/или могут не проявляться симптомы заболевания, нарушения и/или состояния, но имеется склонность к развитию заболевания или его симптомов. В некоторых аспектах индивидуум, восприимчивый к заболеванию, нарушению и/или состоянию (например, раку), может характеризоваться одним или более из следующего: (1) генетической мутацией, связанной с развитием заболевания, нарушения и/или состояния; (2) генетическим полиморфизмом, связанным с развитием заболевания, нарушения и/или состояния; (3) увеличенной и/или уменьшенной экспрессией и/или активностью белка и/или нуклеиновой кислоты, связанной с заболеванием, нарушением и/или состоянием; (4) привычками и/или образом жизни, связанными с развитием заболевания, нарушения и/или состояния; (5) заболеванием, нарушением и/или состоянием в семейном анамнезе; и (6) воздействием и/или заражением микроорганизмом(а), связанным(ого) с развитием заболевания, нарушения и/или состояния.

[0122] В некоторых аспектах у индивидуума, восприимчивого к заболеванию, нарушению и/или состоянию, разовьется заболевание, нарушение и/или состояние. В некоторых аспектах у индивидуума, восприимчивого к заболеванию, нарушению и/или состоянию, заболевание, нарушение и/или состояние не разовьется. В некоторых аспектах раскрытые здесь фармацевтические препараты могут вводиться субъекту, восприимчивому к заболеванию или состоянию, связанному с фиброзом, такому как NASH или диабет.

[0123] *Терапевтический агент*: Термины «терапевтический агент» или «агент» относятся к молекулярному объекту, который при введении субъекту оказывает терапевтическое, диагностическое и/или профилактическое действие и/или вызывает желаемый биологический и/или фармакологический эффект. Например, в некоторых аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21 (например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4) может представлять собой терапевтический агент. В некоторых аспектах агент представляет собой другую молекулу, которую вводят совместно в качестве части комбинированной терапии вместе с по крайней мере одним конъюгатом FGF-21, раскрытым здесь, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.

[0124] *Терапевтически эффективное количество*: Используемый здесь термин «терапевтически эффективное количество» означает количество подлежащего доставке агента (например, раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, или препарата, содержащего конъюгат FGF-21), которого достаточно при введении субъекту, страдающему или восприимчивого к инфекции, заболеванию, нарушению и/или состоянию, для лечения, ослабления симптомов,

постановки диагноза, предотвращения и/или задержке возникновения инфекции, заболевания, нарушения и/или состояния. Как правило, ожидается, что введение терапевтически эффективного количества приведет к терапевтически эффективному результату.

[0125] *Терапевтически эффективный результат*: Используемый здесь термин «терапевтически эффективный результат» означает результат, достаточный у субъекта, страдающего инфекцией, заболеванием, нарушением и/или состоянием или восприимчивого к нему, для лечения, ослабления симптомов, постановки диагноза, предотвращения и/или задержке возникновения инфекции, заболевания, нарушения и/или состояния.

[0126] *Лечить, лечение, терапия*: Используемые здесь термины «лечить», или «лечение», или «терапия», или их грамматические варианты относятся к, частичному или полному, предотвращению, облегчению, уменьшению интенсивности, улучшению, облегчению, задержке проявления, подавлению прогрессирования, снижению тяжести и/или снижению частоты возникновения одного или более симптомов или признаков заболевания или состояния, связанного с фиброзом, например, NASH или диабета. Например, «лечение» заболевания, связанного с фиброзом, может относиться к предотвращению симптомов, уменьшению интенсивности симптомов, задержке возникновения заболевания или состояния или его симптомов и т.д. Лечение может быть назначено субъекту, у которого нет признаков заболевания, нарушения и/или состояния, и/или субъекту, у которого проявляются только ранние признаки заболевания, нарушения и/или состояния, с целью уменьшения риска развития патологии, связанной с заболеванием, нарушением и/или состоянием.

[0127] мкг, мкМ, мкл: Используемые здесь термины «мкг», «мкМ» и «мкл» используются взаимозаменяемо с «мкг», «мкМ» и «мкл», соответственно.

[0128] Различные аспекты настоящего изобретения описаны подробнее в следующих подразделах.

### **I. Препараты конъюгатов FGF-21**

[0129] Настоящим изобретением предоставляются фармацевтические препараты, содержащие конъюгат фактора роста фибробластов 21 (FGF-21) и комплексон для катионов в виде аминополикарбоновой кислоты, например, диэтилентриаминпентауксусную кислоту (ДТРА), причем препараты обладают улучшенной стабильностью по сравнению с эталонным препаратом. Термин «эталонный препарат» относится к препарату, содержащему те же компоненты и имеющего те же свойства (например, pH, температуру), что и «тест-препарат» (препарат, сравниваемый с эталонным препаратом), за исключением того, что он не содержит комплексон для катионов в виде аминополикарбоновой кислоты.

[0130] Термин «конъюгат FGF-21» относится к конъюгату, включающему фрагмент полипептида FGF-21, связанный с фрагментом ПЭГ. В некоторых аспектах фрагмент ПЭГ содержит дистальную метоксигруппу (-O-CH<sub>3</sub>). Термин «полипептид FGF-

21» в общем относится как к полипептиду FGF-21 дикого типа (например, полипептиду с SEQ ID NO:3), так и к «варианту полипептида FGF-21».

[0131] Используемые здесь термины «конъюгат ПЭГ-FGF-21» или «ПЭГ-FGF-21» относятся к ПЭГилированным формам FGF-21, включающим фрагмент ПЭГ, связанный с фрагментом варианта полипептида FGF-21 через оксимную связь. Приводимые в качестве примеров конъюгаты ПЭГ-FGF-21 по настоящему изобретению представлены в SEQ ID NO:2 или 5 и SEQ ID NO:4 или 6 в таблице 4 ниже.

**Таблица 1:** Приводимые в качестве примеров последовательности FGF-21

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	Q109pAF FGF-21	MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIR EDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRF LCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pAF) SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPP APPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS pAF=пара-ацетил-L-фенилаланин
2	ПЭГ-FGF-21 Q109pAF FGF-21 ПЭГилированный	MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIR EDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRF LCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pAF) SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPP APPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS где pAF связан с ПЭГ с М.м. 28-32 кДа
5	ПЭГ-FGF-21 без Met, Q109pAF FGF-21 ПЭГилированный	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRE DGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFL CQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pAF) SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPAP PEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS где pAF связан с ПЭГ с М.м. 28-32 кДа
3	Встречающийся в природе FGF-21	MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIR EDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRF LCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQS EAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPAPP EPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS Подчеркнут глутамин (Q), модифицированный в SEQ ID NOS:1, 2 и 4.
4	ПЭГ-FGF-21,	MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIR

	<p>Q109pAF FGF-21 ПЭГилованный, ПЭГ=ПЭГ<sub>681</sub></p>	<p>EDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRF LCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pA F)SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPP APPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS</p> <p>где pAF связан с ПЭГ<sub>681</sub> (линейным ПЭГ, включающим 681 этиленгликолевое звено) через оксимную связь, например, образованную в результате реакции между ацетильной группой pAF и аминоксигруппой молекулы метил-ПЭГ<sub>681</sub>-аминокси с М.м. 30 кДа, представленной на фиг. 7.</p>
6	<p>ПЭГ-FGF-21 без Met Q109pAF FGF-21 ПЭГилованный ПЭГ=ПЭГ<sub>681</sub></p>	<p>НPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEHLEIRE DGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFL CQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pAF) SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPAP PEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS</p> <p>где pAF связан с ПЭГ<sub>681</sub> (линейным ПЭГ, включающим 681 этиленгликолевое звено) через оксимную связь, например, образованную в результате реакции между ацетильной группой pAF и аминоксигруппой молекулы метил-ПЭГ<sub>681</sub>-аминокси с М.м. 30 кДа, представленной на фиг. 7.</p>

[0132] Многочисленные FGF-21S, известные в данной области техники, могут использоваться в препаратах конъюгата в виде ПЭГилованного FGF-21, раскрытых здесь, например, те, которые раскрыты в патентах США № 8012931 и 9434788, оба из которых полностью включены сюда посредством ссылки. Фактор роста фибробластов 21 (FGF-21) был описан в литературе (Nishimura et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1492:203-206 (2000); WO 01/36640; and WO 01/18172, и публикация патента США с № 20040259780, каждый из которых полностью включен сюда посредством ссылки). Сообщалось, что в отличие от других FGF, FGF-21 не оказывает пролиферативного и онкогенного эффектов (Ornitz and Itoh, *Genome Biology* 2001, 2(3):reviews3005.1-3005.12).

[0133] В некоторых аспектах полипептиды FGF-21, применимые для настоящего изобретения, включают аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO: 4, без метионина на N-конце.

[0134] Были идентифицированы множественные полиморфизмы FGF-21. Лейцин или пролин были описаны в одном и том же положении в публикации заявки на патент США с № 20010012628 и патенте США с № 6716626. N-концевые лидерные или сигнальные последовательности, отличающиеся одной аминокислотой (лейцином),

выявлены в патенте США с № 6716626 и публикации заявки на патент США с № 20040259780. Варианты или мутанты FGF-21 включают, но без ограничения этим, те, которые раскрыты в патенте США с № 6716626; публикациях заявок на патент США с №№ 2005/0176631, 2005/0037457, 2004/0185494, 2004/0259780, 2002/0164713 и 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; W001/018172; WO 09/149171; W010/042747; W012/066075; WO 11/154349; WO 13/052311; WO13/188181, которые полностью включены сюда посредством ссылки.

[0135] Используемые здесь термины «вариант FGF-21» и «вариант полипептида FGF-21» относятся к полипептиду FGF-21, который отличается от эталонного полипептида FGF-21 дикого типа (например, FGF-21 человека дикого типа с SEQ ID NO:3) в по крайней мере одном аминокислотном положении и, как правило, обладает по крайней мере одной биологической активностью фактора роста фибробластов 21, а также аналогам FGF-21, изоформам FGF-21, миметикам FGF-21, фрагментам FGF-21, гибридным белкам FGF-21, слитым с FGF-21 белкам, его олигомерам и мультимерам, гомологам, вариантам по характеру гликозилирования, вариантам сплайсинга и мутеинам, независимо от их биологической активности. Термин охватывает как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе варианты, например, вариант, полученный в результате замены аминокислоты в полипептиде FGF-21 дикого типа, например, полипептиде с SEQ ID NO:3, не встречающейся в природе аминокислотой (например, пара-ацетил-L-фенилаланином). Замена может быть, например, результатом рекомбинантной экспрессии или химического или ферментативного синтеза. В некоторых аспектах вариант полипептида FGF-21 по настоящему изобретению включает, состоит или по существу состоит из полипептида SEQ ID NO:1.

[0136] Варианты полипептида FGF-21 по настоящему изобретению включают полипептид FGF-21, содержащий одну или более замен, добавлений или делеций аминокислот. Например, вариант полипептида FGF-21 по настоящему изобретению содержит одну или более аминокислотных замен (например, встречающимися в природе или не встречающимися в природе аминокислотами), делеций (концевых или внутренних делеций) или модификаций, таких как присоединение гетерологичного фрагмента (С-концевого, N-концевого или внутреннего, либо путем интеркаляции/вставки в аминокислотную последовательность, либо путем присоединения к боковой цепи). Термин «вариант полипептида FGF-21» также охватывает полиморфизмы (например, встречающиеся в природе варианты последовательности FGF-21), например Р-форму или L-форму FGF-21.

[0137] Были описаны замены в широком ряде положений аминокислот во встречающемся в природе полипептиде FGF-21. Замены, в том числе, но без ограничения этим, те, которые модулируют растворимость или стабильность, повышают агонистическую активность, увеличивают время полужизни *in vivo* или *in vitro*, повышают

устойчивость к протеазе, превращают полипептид в антагонист, снижают иммуногенность или токсичность, способствуют очистке или обрабатываемости, или любая их комбинация, также охватываются термином «вариант полипептида FGF-21».

[0138] Термин «вариант полипептида FGF-21» также включает биологически активные фрагменты, биологически активные варианты и стереоизомеры встречающегося в природе полипептида FGF-21, а также являющиеся агонистами, миметиками и антагонистами варианты встречающегося в природе FGF-21 и слитые с ним полипептиды. Слияния, включающие дополнительные аминокислоты на N-конце, C-конце или на обоих концах, охватываются термином «вариант полипептида FGF-21».

[0138] Приводимые в качестве примеров слияния включают, но без ограничения этим, например, метионил-FGF-21, в котором метионин связан с N-концом полипептида FGF-21, в результате, например, рекомбинантной экспрессии зрелой формы FGF-21, в которой отсутствует лидерный или сигнальный пептид, или его часть (метионин связан с N-концом FGF-21 в результате рекомбинантной экспрессии, например, в *E. coli*), слияния с целью очистки (в том числе, но без ограничения этим, с полигистидином или аффинными эпитопами).

[0140] Термин «вариант полипептида FGF-21» также включает гликозилированные полипептиды FGF-21, такие как, но без ограничения этим, полипептиды, гликозилированные в любом положении аминокислоты, N-связанные или O-связанные гликозилированные формы полипептида. Варианты, содержащие одиночные нуклеотидные замены, также считаются биологически активными вариантами FGF-21. Кроме того, также включены варианты сплайсинга.

[0141] Термин «вариант полипептида FGF-21» также включает гетеродимеры FGF-21, его гомодимеры, гетеромультимеры или гомомультимеры любого одного или более немодифицированных или модифицированных FGF-21 или любого другого полипептида, белка, углевода, полимера, небольшой молекулы, линкера, лиганда или другой биологически активной молекулы любого типа, связанных химически или экспрессированных в виде слитого белка, а также аналоги полипептида, содержащие, например, специфические делеции или другие модификации, все еще сохраняющие биологическую активность.

[0142] В некоторых аспектах вариант полипептида FGF-21 содержит добавление, замену или делецию, которое(ая) увеличивает сродство полипептида FGF-21 к своему рецептору. Так же термин «вариант полипептида FGF-21» включает химически или ферментативно расщепляемые последовательности, расщепляемые протеазами последовательности, реакционноспособные группы, антитело-связывающие домены (в том числе, но без ограничения этим, FLAG или поли-His) или другие основанные на аффинности последовательности (в том числе, но без ограничения этим, FLAG, поли-His, GST и т.д.) или связанные молекулы (в том числе, но без ограничения этим, биотин), которые улучшают обнаружение (включающие, но без ограничения этим, GFP), очистку, перенос через ткани или клеточные мембраны, высвобождение или активацию

пролекарства, уменьшение размера полипептида FGF-21 или другие признаки полипептида.

[0143] В некоторых аспектах вариант полипептида FGF-21 включает полипептид, идентичный по аминокислотной последовательности на по крайней мере приблизительно 70%, по крайней мере приблизительно 75%, по крайней мере приблизительно 80%, по крайней мере приблизительно 85%, по крайней мере приблизительно 90%, по крайней мере приблизительно 95%, по крайней мере приблизительно 96%, по крайней мере приблизительно 97%, по крайней мере приблизительно 98% или по крайней мере приблизительно 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3, или SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3 без метионина на N-конце, причем этот полипептид обладает активностью FGF-21. В некоторых аспектах вариант полипептида FGF-21 включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6.

[0144] В некоторых аспектах вариант полипептида FGF-21 состоит или по существу состоит из полипептида, идентичного по аминокислотной последовательности на по крайней мере приблизительно 70%, по крайней мере приблизительно 75%, по крайней мере приблизительно 80%, по крайней мере приблизительно 85%, по крайней мере приблизительно 90%, по крайней мере приблизительно 95%, по крайней мере приблизительно 96%, по крайней мере приблизительно 97%, по крайней мере приблизительно 98% или по крайней мере приблизительно 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3, или SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3 без метионина на N-конце, причем этот полипептид обладает активностью FGF-21. В некоторых аспектах вариант полипептида FGF-21 по существу состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6.

[0145] Варианты полипептида FGF-21, охватываемые этим определением, включают, например, вариант полипептида FGF-21, содержащий по крайней мере одну не встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых аспектах не встречающаяся в природе аминокислота представляет собой аминокислоту, которая при реакции с содержащим аминоксигруппу производным может образовывать стабильную оксимную связь, например п-ацетилфенилаланин, м-ацетилфенилаланин, п-(3-оксобутеноил)-L-фенилаланин, п-(2-амино-3-гидроксиэтил)фенилаланин и т.п. В некоторых аспектах не встречающаяся в природе аминокислота представляет собой п-ацетилфенилаланин. В некоторых аспектах не встречающаяся в природе аминокислота представляет собой п-ацетил-L-фенилаланин.

[0146] В некоторых аспектах одна или более не встречающихся в природе аминокислот включены в одном или более из следующих положений FGF-21 дикого типа: перед положением 1 (т.е. на N-конце), 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 (т.е. на С-конце белка) (положения аминокислот соответствуют SEQ ID NO:3).

[0147] В некоторых конкретных аспектах вариант FGF-21 по настоящему изобретению представляет собой модифицированный полипептид FGF-21 с SEQ ID NO:1, т.е. производное FGF-21 дикого типа с SEQ ID NO:3, в котором глутамин 109 FGF-21 дикого типа был заменен не встречающейся в природе аминокислотой пара-ацетил-L-фенилаланином.

[0148] В некоторых конкретных аспектах полипептид FGF-21 по настоящему изобретению модифицирован таким образом, что метионин на N-конце полипептида FGF-21 (SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3) удален: SEQ ID NO:5 или 6.

[0149] Как описано выше, вариант полипептида FGF-21 по настоящему изобретению может быть связан с фрагментом ПЭГ (полиэтиленгликоля). Связывание ПЭГ с раскрытым здесь вариантом полипептида FGF-21 (например, полипептидом FGF-21 с SEQ ID NO:1), может приводить к изменениям, включающим, но без ограничения этим, увеличение или изменение времени полужизни в сыворотке (*in vivo*) или увеличение или изменение времени терапевтической полужизни относительно немодифицированной формой, изменение иммуногенности или токсичности, модулирование характеристик физической ассоциации, таких как агрегация и образование мультимеров, изменение связывания с рецептором, изменение связывания с одним или более партнеров по связыванию и изменение димеризации или мультимеризации рецептора. В некоторых аспектах связывание ПЭГ с раскрытым здесь вариантом FGF-21 (например, полипептидом FGF-21 с SEQ ID NO:1), приводит к улучшению или изменению фармакокинетических или биофизических свойств, в том числе, но без ограничения этим, увеличению скорости всасывания, уменьшению токсичности, улучшению растворимости, уменьшению агрегации белка, повышению биологической активности и/или селективности к мишени ПЭГилированного FGF-21, увеличению обрабатываемости и/или уменьшению иммуногенности (смотрите, например, патент США с № 4179337) по сравнению с эталонным соединением, таким как неконъюгированная форма варианта полипептида FGF-21 (например, полипептида FGF-21 с SEQ ID NO:1) или FGF-21 дикого типа (например, полипептида FGF-21 с SEQ ID NO:3). В некоторых аспектах по крайней мере один линкер может быть вставлен между фрагментом варианта полипептида FGF-21 и фрагментом ПЭГ. В некоторых аспектах фрагмент ПЭГ включает дистальную метоксигруппу (-O-CH<sub>3</sub>).

[0150] Исследование кристаллической структуры FGF-21 или члена(ов) семейства FGF и его взаимодействия с рецептором FGF может показать, какие некоторые аминокислотные остатки имеют боковые цепи, которые полностью или частично

доступны для растворителя. Боковая цепь не встречающейся в природе аминокислоты в этих положениях может быть направлена от поверхности белка к растворителю и, таким образом, быть связана с ПЭГ.

[0150] ПЭГ может быть связан с аминокислотой(ами) полипептида FGF-21 дикого типа или варианта полипептида FGF-21 в одном или более из следующих положений: перед положением 1 (т.е. на N-конце), 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 (т.е. на C-конце белка) (положения аминокислот соответствуют SEQ ID NO:3). В некоторых аспектах ПЭГ присоединен к боковой цепи не встречающейся в природе аминокислоты, например, производного фенилаланина, такого как пара-ацетил-L-фенилаланин, который заменяет встречающуюся в природе аминокислоту в любом из положений, раскрытых выше.

[0152] ПЭГ по настоящему изобретению включает, но без ограничения этим, полиэтиленгликоль, полиэтиленгликоль-пропиональдегид, их моно- $C_1$ - $C_{10}$ -алкокси- или арилокси-производные (описанные в патенте США с № 5252714, который включен сюда посредством ссылки), монометоксиполиэтиленгликоль, дискретный ПЭГ (с одной молекулярной массой), сополимер пропиленоксида и этиленоксида, полиалкиленгликоль и его производные, сополимеры алкиленгликолей и их производные или их смеси. В некоторых аспектах ПЭГ может иметь разветвленную структуру. Разветвленные ПЭГ описаны, например, в патенте США с № 5643575; Morpurgo et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 56:59-72 (1996); Vorobjev et al., Nucleosides Nucleotides 18:2745-2750 (1999); и Caliceti et al., Bioconjug. Chem. 10:638-646 (1999).

[0153] В некоторых аспектах молекулярная масса ПЭГ составляет приблизительно 30 кДа. Могут использоваться другие размеры в зависимости от желаемого профиля (например, желаемой продолжительности замедленного высвобождения, эффектов, если таковые имеются, на биологическую активность, простоты обращения, степени или отсутствия антигенности и других известных эффектов полиэтиленгликоля на белок или аналог). В некоторых аспектах молекулярная масса ПЭГ составляет приблизительно 28 кДа, приблизительно 29 кДа, приблизительно 30 кДа, приблизительно 31 кДа или приблизительно 32 кДа. В некоторых аспектах молекулярная масса ПЭГ составляет от приблизительно 28 кДа до приблизительно 29 кДа, от приблизительно 29 кДа до приблизительно 30 кДа, от приблизительно 30 кДа до приблизительно 31 кДа или от приблизительно 31 кДа до приблизительно 32 кДа. Способы определения молекулярной массы ПЭГ (а также конъюгатов FGF-21) хорошо известны в данной области техники.



приблизительно 790 этиленгликолевых звеньев или от приблизительно 790 этиленгликолевых звеньев до приблизительно 800 этиленгликолевых звеньев.

[0156] В некоторых аспектах ПЭГ содержит 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699 или 700 этиленгликолевых звеньев.

[0157] В некоторых конкретных аспектах фрагмент ПЭГ связан с вариантом полипептида FGF-21 по настоящему изобретению (например, полипептидом FGF-21 с SEQ ID NO:1) через оксимную связь. В некоторых аспектах фрагмент ПЭГ связан с вариантом полипептида FGF-21 по настоящему изобретению (например, вариантом полипептида FGF-21 с SEQ ID NO:1) через оксимную связь, образованную между реакционноспособной группой молекулы ПЭГ (например, аминооксигруппой молекулы метил-ПЭГ<sub>681</sub>-аминокси с М.м. 30 кДа, представленной на фиг. 7) и реакционноспособной группой не встречающейся в природе аминокислоты в варианте полипептида FGF-21 (например, ацетильной группой п-ацетилфенилаланина, например, в аминокислотном положении 109 последовательности варианта полипептида FGF-21). В некоторых аспектах не встречающаяся в природе аминокислота представляет собой пара-ацетил-L-фенилаланин, заменяющий Gln109 в SEQ ID NO:3. В некоторых аспектах фрагмент ПЭГ содержит дистальную метоксигруппу (-O-CH<sub>3</sub>).

[0158] В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 в раскрытом здесь препарате представляет собой ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2, т.е. FGF-21 с SEQ ID NO:1, в котором глутамин 109 FGF-21 дикого типа (SEQ ID NO:3) был заменен пара-ацетил-L-фенилаланином, а фрагмент ПЭГ, например, линейный ПЭГ с молекулярной массой от приблизительно 28 кДа до приблизительно 32 кДа, например, приблизительно 30 кДа, был ковалентно присоединен к пара-ацетил-L-фенилаланину через оксимную связь. В некоторых аспектах фрагмент ПЭГ содержит дистальную метоксигруппу (-O-CH<sub>3</sub>).

[0159] В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 в раскрытом здесь препарате представляет собой ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2, т.е. конъюгат FGF-21, содержащий (i) FGF-21 с SEQ ID NO:1, в котором пара-ацетил-L-фенилаланин заменяет глутамин 109 FGF-21 дикого типа (SEQ ID NO:3), и (ii) фрагмент ПЭГ, например, линейный ПЭГ с молекулярной массой от приблизительно 28 кДа до приблизительно 32 кДа, например, приблизительно 30 кДа, ковалентно присоединенный к пара-ацетил-L-фенилаланину через оксимную связь. В некоторых аспектах фрагмент ПЭГ содержит дистальную метоксигруппу (-O-CH<sub>3</sub>).

[0160] В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 в раскрытом здесь препарате представляет собой ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:4, т.е. FGF-21 с SEQ ID NO:1, в котором глутамин 109 FGF-21 дикого типа (SEQ ID NO:3) был заменен пара-ацетил-L-фенилаланином, а фрагмент ПЭГ, содержащий 681 этиленгликолевое звено, ковалентно присоединен к пара-ацетил-L-фенилаланину через оксимную связь. В некоторых аспектах фрагмент ПЭГ содержит дистальную метоксигруппу (-O-CH<sub>3</sub>).

[0161] В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 в раскрытом здесь препарате представляет собой ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:4, т.е. конъюгат FGF-21, содержащий (i) FGF-21 с SEQ ID NO:1, в котором пара-ацетил-L-фенилаланин заменил глутамин 109 в FGF-21 дикого типа (SEQ ID NO:3), и (ii) фрагмент ПЭГ, содержащий 681 этиленгликолевое звено, ковалентно присоединенный к пара-ацетил-L-фенилаланину через оксимную связь. В некоторых аспектах фрагмент ПЭГ содержит дистальную метоксигруппу (-O-CH<sub>3</sub>).

[0162] Таким образом, в некоторых конкретных аспектах настоящего изобретения конъюгат FGF-21 в раскрытом здесь препарате содержит (i) фрагмент полипептида FGF-21 с SEQ ID NO:1 и (ii) фрагмент ПЭГ с 681 этиленгликолевым звеном, т.е. фрагмент ПЭГ с молекулярной массой=приблизительно 30 кДа, причем фрагмент ПЭГ ковалентно присоединен к пара-ацетил-L-фенилаланину в положении 109 через оксимную связь. В некоторых аспектах фрагмент ПЭГ содержит дистальную метоксигруппу (-O-CH<sub>3</sub>).

[0163] В некоторых аспектах оксимная связь образуется в результате химической реакции между реакционноспособной группой не встречающейся в природе аминокислоты, присутствующей в варианте FGF-21 (например, ацетильной группой п-ацетилфенилаланина), и реакционноспособной группой молекулы ПЭГ (например, аминооксигруппой молекулы ПЭГ<sub>681</sub>-аминокси с молекулярной массой 30 кДа, содержащей дистальную метоксигруппу, как представлено на фиг. 7). В некоторых аспектах не встречающаяся в природе аминокислота может быть включена в вариант полипептида FGF-21 рекомбинантно (например, при экспрессии в культуре прокариотических клеток) с использованием транскрипции и трансляции *in vitro*, с использованием химического синтеза или с использованием любых способов, известных в данной области техники. В некоторых аспектах молекула ПЭГ может быть химически связана с аминокислотой (например, п-ацетилфенилаланином), и ПЭГ-аминокислота впоследствии включается в полипептид FGF-21, например, посредством химического синтеза. В некоторых аспектах молекула ПЭГ содержит дистальную метоксигруппу (-O-CH<sub>3</sub>).

[0164] В прошлом продукция полипептидов FGF-21 посредством экспрессии в дрожжах была затруднена из-за наличия O-связанного гликозилирования, которое требовало сайт-специфического мутагенеза для удаления сайтов O-связанного гликозилирования. Полипептиды FGF-21 также демонстрируют значительную степень гликозилирования при рекомбинантной продукции в культурах клеток млекопитающих. Таким образом, в некоторых аспектах варианты полипептидов FGF-21 по настоящему изобретению продуцируются рекомбинантно в культурах прокариотических клеток. Соответственно, в некоторых аспектах варианты полипептида FGF-21 по настоящему изобретению не являются гликозилированными.

[0165] Как описано выше, настоящим изобретением предоставляются фармацевтические препараты, содержащие раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6, и комплексон для катионов в

виде аминополикарбонической кислоты, например, диэтилентриаминпентауксусную кислоту (ДТРА). Термины «комплексон» или «комплексон для катионов» взаимозаменяемы и относятся к любому веществу, которое способно удалять ион металла из системы растворения путем образования нового комплексного иона, химические свойства которого отличаются от свойств исходного иона металла. В частности, раскрытые здесь комплексоны для катионов представляют собой комплексоны, которые специфически связывают двухвалентные металлы, например  $\text{Ca}^{++}$ .

[0166] В некоторых аспектах раскрытые здесь препараты конъюгатов FGF-21 демонстрируют одно или более улучшений стабильности, например, более низкую скорость дезамидирования и/или более низкую скорость агрегации. Например, включение комплексона для катионов в виде аминополикарбонической кислоты, такого как ДТРА, в препарат конъюгата FGF-21 может снижать скорость дезамидирования раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6, при хранении при определенной температуре (например,  $40^{\circ}\text{C}$ ) в течение определенного периода времени (например, 1 месяца) относительно эталонного препарата.

[0167] В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде аминополикарбонической кислоты (например, ДТРА) может снижать скорость дезамидирования раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6, в фармацевтическом препарате, хранящемся при температуре, составляющей приблизительно  $25^{\circ}\text{C}$ , приблизительно  $30^{\circ}\text{C}$ , приблизительно  $35^{\circ}\text{C}$ , приблизительно  $40^{\circ}\text{C}$  или приблизительно  $45^{\circ}\text{C}$ , относительно эталонного препарата. В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде аминополикарбонической кислоты (например, ДТРА) может снижать скорость дезамидирования раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6, в фармацевтическом препарате, хранящемся при температуре выше  $25^{\circ}\text{C}$ , выше  $30^{\circ}\text{C}$ , выше  $35^{\circ}\text{C}$ , приблизительно  $40^{\circ}\text{C}$  или приблизительно  $45^{\circ}\text{C}$ , относительно эталонного препарата.

[0168] В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде аминополикарбонической кислоты (например, ДТРА) может снижать скорость дезамидирования раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4 в фармацевтическом препарате, хранящемся при температуре от приблизительно  $20^{\circ}\text{C}$  до приблизительно  $25^{\circ}\text{C}$ , от приблизительно  $25^{\circ}\text{C}$  до приблизительно  $30^{\circ}\text{C}$ , от приблизительно  $30^{\circ}\text{C}$  до приблизительно  $35^{\circ}\text{C}$  или от приблизительно  $40^{\circ}\text{C}$  до приблизительно  $45^{\circ}\text{C}$ , относительно эталонного препарата.

[0169] В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде аминополикарбонической кислоты (например, ДТРА) может снижать скорость дезамидирования раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4 в фармацевтическом препарате при температуре или диапазоне температур, указанных выше, после хранения в течение приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 3 недель, приблизительно 1 месяца,

приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев или приблизительно 4 месяцев относительно эталонного препарата.

[0170] В конкретном аспекте комплексон для катионов в виде аминокполикарбоновой кислоты (например, ДТРА) может снижать скорость дезамидирования раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, в фармацевтическом препарате, хранящемся при 40°C в течение приблизительно месяца относительно эталонного препарата.

[0171] В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде аминокполикарбоновой кислоты (например, ДТРА) может снижать скорость агрегации высокомолекулярного (HMW) полипептида в виде раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, в фармацевтическом препарате, хранящемся при температуре, составляющей приблизительно 25°C, приблизительно 30°C, приблизительно 35°C, приблизительно 40°C или приблизительно 45°C, относительно эталонного препарата. В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде аминокполикарбоновой кислоты (например, ДТРА) может снижать скорость агрегации высокомолекулярного (HMW) полипептида в виде раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, в фармацевтическом препарате, хранящемся при температуре выше 25°C, выше 30°C, выше 35°C, приблизительно 40°C или приблизительно 45°C, относительно эталонного препарата.

[0172] В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде аминокполикарбоновой кислоты (например, ДТРА) может снижать скорость агрегации HMW полипептида в виде раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, в фармацевтическом препарате, хранящемся при температуре от приблизительно 20°C до приблизительно 25°C, от приблизительно 25°C до приблизительно 30°C, от приблизительно 30°C до приблизительно 35°C или от приблизительно 40°C до приблизительно 45°C, относительно эталонного препарата.

[0173] В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде аминокполикарбоновой кислоты (например, ДТРА) может снижать скорость агрегации HMW полипептида в виде раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6, в фармацевтическом препарате при температуре или диапазоне температур, указанных выше, после хранения в течение приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 3 недель, приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев или приблизительно 4 месяцев относительно эталонного препарата. В конкретном аспекте комплексон для катионов в виде аминокполикарбоновой кислоты (например, ДТРА) может снижать скорость агрегации HMW полипептида в виде раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, в фармацевтическом препарате, хранящемся при температуре 40°C в течение приблизительно месяца, относительно эталонного препарата.

[0174] В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде

аминополикарбоновой кислоты, например, ДТРА, предотвращает или уменьшает окисление одной или более аминокислот, например, метионинов, в раскрытом здесь конъюгате FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4. В конкретных аспектах комплексон для катионов в виде аминополикарбоновой кислоты, например, ДТРА, предотвращает или уменьшает окисление аминокислоты 1 и/или аминокислоты 169 в SEQ ID NO:3 (или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO:1, 2 или 4) при 25°C и/или 40°C.

[0175] В некоторых конкретных аспектах комплексон для катионов в виде аминополикарбоновой кислоты представляет собой ДТРА. Триамин пентауксусной кислоты или диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТРА) представляет собой аминополикарбоновую кислоту, состоящую из остова в виде диэтилентриамина с пятью карбоксиметильными группами. Сопряженное основание ДТРА обладает высоким сродством к катионам металлов. Таким образом, пентаанион ДТРА<sup>5-</sup> потенциально является октадентатным лигандом, если предположить, что каждый азотный центр и каждая группа COO<sup>-</sup> принимаются за координационный центр. Константы образования его комплексов приблизительно в 100 раз выше таковых в случае EDTA.

[0176] В качестве комплексообразующего агента ДТРА окутывает ион металла, образуя до восьми связей. Однако переходные металлы обычно образуют менее восьми координационных связей. Так, после образования комплекса с металлом, ДТРА все еще обладает способностью связываться с другими реагентами, на что указывает ее производное пендетид. Например, в своем комплексе с медью(II) ДТРА связывается гексадентатным образом, используя три аминокетона и три из пяти карбоксилатов.

[0177] В некоторых других аспектах комплексон для катионов в виде аминополикарбоновой кислоты может представлять собой другой комплексон для катионов в виде аминополикарбоновой кислоты, такой как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N, N,N',N'-тетрауксусная кислота (EGTA), 1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота (DOTA) или родственное соединение, например, тиуксетан (модифицированный вариант ДТРА, углеродный остов которого содержит изотиоцианатобензильную и метильную группу). Другими известными в данной области техники комплексообразующими агентами, родственными ДТРА и EDTA, являются те, в которых атомы азота амидных групп могут быть замещены одной или более C<sub>1-18</sub>-алкильных групп, например, ДТРА.ВМА и EDTA.ВМА.

[0178] В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде ДТРА присутствует в количестве от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 100 мкМ, от 15 мкМ до приблизительно 95 мкМ, от приблизительно 20 мкМ до приблизительно 90 мкМ, от приблизительно 25 мкМ до приблизительно 85 мкМ, от приблизительно 30 мкМ до приблизительно 80 мкМ, от приблизительно 35 мкМ до приблизительно 75 мкМ, от приблизительно 40 мкМ до приблизительно 70 мкМ, от приблизительно 45 мкМ до приблизительно 65 мкМ, от приблизительно 50 мкМ до приблизительно 60 мкМ, от

приблизительно 25 мкМ до приблизительно 75 мкМ, от приблизительно 40 мкМ до приблизительно 60 мкМ, от приблизительно 30 мкМ до приблизительно 70 мкМ или от приблизительно 40 мкМ до приблизительно 75 мкМ.

[0179] В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде ДТРА присутствует в количестве, составляющей приблизительно 10 мкМ, приблизительно 15 мкМ, приблизительно 20 мкМ, приблизительно 25 мкМ, приблизительно 30 мкМ, приблизительно 35 мкМ, приблизительно 40 мкМ, приблизительно 45 мкМ, приблизительно 50 мкМ, приблизительно 55 мкМ, приблизительно 60 мкМ, приблизительно 65 мкМ, приблизительно 70 мкМ, приблизительно 75 мкМ, приблизительно 80 мкМ, приблизительно 85 мкМ, приблизительно 90 мкМ, приблизительно 95 мкМ или приблизительно 100 мкМ.

[0180] В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде ДТРА присутствует в количестве, составляющем по крайней мере приблизительно 15 мкМ, по крайней мере приблизительно 20 мкМ, по крайней мере приблизительно 25 мкМ, по крайней мере приблизительно 30 мкМ, по крайней мере приблизительно 35 мкМ, по крайней мере приблизительно 40 мкМ, по крайней мере приблизительно 45 мкМ, по крайней мере приблизительно 50 мкМ, по крайней мере приблизительно 55 мкМ, по крайней мере приблизительно 60 мкМ, по крайней мере приблизительно 65 мкМ, по крайней мере приблизительно 70 мкМ или по крайней мере приблизительно 75 мкМ.

[0181] В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде аминокполикарбоновой кислоты, например, ДТРА, присутствует в количестве, составляющем 50 мкМ.

[0182] В некоторых аспектах рН раскрытого здесь препарата превышает приблизительно 6,7, приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, приблизительно 7,3, приблизительно 7,4 или приблизительно 7,5. В некоторых аспектах рН препарата превышает 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 или 7,5. В некоторых аспектах рН препарата составляет приблизительно 6,5, приблизительно 6,6, приблизительно 6,7, приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, приблизительно 7,3, приблизительно 7,4 или приблизительно 7,5.

[0183] В некоторых аспектах рН препарата составляет от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,5, от приблизительно 6,6 до приблизительно 7,5, от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,5, от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,5, от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,5, от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,5, от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,5, от приблизительно 7,2 до приблизительно 7,5, от приблизительно 7,3 до приблизительно 7,5, от приблизительно 7,4 до приблизительно 7,5, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,4, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,3, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,2, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,1, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,0, от приблизительно 6,5 до приблизительно 6,9, от приблизительно 6,5 до приблизительно 6,8, от

приблизительно 6,5 до приблизительно 6,7, от приблизительно 6,6 до приблизительно 7,4, от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,4, от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,4, от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,4, от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,4, от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,4, от приблизительно 7,2 до приблизительно 7,4, от приблизительно 7,3 до приблизительно 7,4, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,3, от приблизительно 6,6 до приблизительно 7,3, от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,3, от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,3, от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,3, от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,3, от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,3, от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,3, от приблизительно 7,2 до приблизительно 7,3, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,2, от приблизительно 6,6 до приблизительно 7,2, от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,2, от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,2, от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,2, от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,2, от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,2, от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,1 или от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,1.

[0184] В некоторых аспектах рН препарата составляет приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, приблизительно 7,3, приблизительно 7,4 или приблизительно 7,5. В некоторых аспектах фармацевтический препарат является более стабильным, чем эталонный препарат с рН 6,5.

[0185] В некоторых аспектах фармацевтический препарат содержит, кроме того, поверхностно-активное вещество. Используемый здесь термин «поверхностно-активное вещество» означает любое соединение, обычно амфипатическую молекулу, которое снижает поверхностное натяжение при растворении или суспендировании в воде или водных растворах, или которое снижает поверхностное натяжение на границе двух жидкостей или на границе раздела жидкости и твердого тела.

[0186] В контексте настоящего изобретения поверхностно-активное вещество представляет собой любое соединение, которое снижает поверхностное натяжение и межслоевой срез в растворе, содержащем раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6.

[0187] В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество, т.е. поверхностно-активное вещество, которое, как правило, не имеет результирующего заряда в нейтральных растворах. В некоторых аспектах неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат. Полисорбаты являются важным классом неионогенных поверхностно-активных веществ, широко используемых в белковых фармацевтических препаратах для стабилизации белков от агрегации, индуцируемой границей раздела, и для сведения к минимуму поглощения поверхностью белков (Wang W 2005. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. Int J Pharm 289 (1-2):1-30). Полисорбаты представляют собой амфифильные неионогенные поверхностно-активные вещества, состоящие из

полиоксиэтилевых (POE) эфиров сорбита и жирных кислот. Имеющиеся в продаже полисорбаты представляют собой химически разнообразные смеси, содержащие в основном POE эфиры сорбита и жирной кислоты

[0188] Используемый здесь термин «полисорбат» относится к эфирам олеиновой кислоты и сорбита и его ангидридов, обычно сополимеризованным с этиленоксидом. Приводимые в качестве примера полисорбаты включают полисорбат 20 (TWEEN 20; PS20) (полиоксиэтилен(20)сорбитанмонолаурат); полисорбат 40 (TWEEN 40; PS40) (полиоксиэтилен(20)сорбитанмонопальмитат); полисорбат 60 (TWEEN 60; PS60) (полиоксиэтилен(20)сорбитанмоностеарат); и полисорбат 80 (TWEEN 80; PS80) (полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеат).

[0189] Число 20, следующее за частью «полиоксиэтилен», относится к общему числу оксиэтиленовых групп  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})-$ , обнаруживаемых в молекуле. Число, следующее за частью «полисорбат», имеет отношение к типу жирной кислоты, связанной с частью молекулы, относящейся к полиоксиэтиленсорбитану. Монолаурат обозначается числом 20, монопальмитат обозначается числом 40, моностеарат - числом 60, и моноолеат - числом 80. В некоторых аспектах неионогенное поверхностно-активное вещество присутствует в количестве, превышающем критическую концентрацию мицеллообразования (СМС), которая для полиоксиэтилевых эфиров сорбита и жирных кислот является приблизительно количеством, составляющим по крайней мере 0,01 мг/мл. Смотрите Wan and Lee, Journal of Pharm Sci, 63, p.136, 1974. Концентрации поверхностно-активных веществ (%) на протяжении настоящего описания соответствуют (весу к объему).

[0190] В некоторых аспектах полисорбат представляет собой полисорбат 80 (PS80). В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество полисорбат 80 присутствует в количестве от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,02% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,03% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,04% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,06% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,07% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,08% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,09% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,02% до приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,03% до приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,04% до приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,06% до приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,07% до приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,08% до приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему), от

приблизительно 0,03% до приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,04% до приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,06% до приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,07% до приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,04% до приблизительно 0,07% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,07% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,06% до приблизительно 0,07% (в отношении веса к объему) или от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,06% (в отношении веса к объему).

[0191] В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество полисорбат 80 присутствует в количестве, составляющем по крайней мере приблизительно 0,01% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,02% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,03% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,04% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,06% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,07% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему) или по крайней мере приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему).

[0192] В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество, например, полисорбат 80, уменьшает образование (макро)частиц и/или пузырьков воздуха, например, при перемешивании препарата на шейкере. В некоторых аспектах присутствие поверхностно-активного вещества, например полисорбата 80, в препарате может уменьшить образование (макро)частиц на по крайней мере 10%, по крайней мере 15%, по крайней мере 20%, по крайней мере 25%, по крайней мере 30%, по крайней мере 35%, по крайней мере 40%, по крайней мере 45%, по крайней мере 50%, по крайней мере 55%, по крайней мере 60%, по крайней мере 65%, по крайней мере 70%, по крайней мере 75%, по крайней мере 80%, по крайней мере 85%, по крайней мере 90%, по крайней мере 95% или 100% по сравнению с уровнем образования (макро)частиц в эталонном препарате. В некоторых аспектах присутствие поверхностно-активного вещества, например полисорбата 80, в препарате может уменьшить образование пузырьков воздуха на по крайней мере 10%, по крайней мере 15%, по крайней мере 20%, по крайней мере 25%, по крайней мере 30%, по крайней мере 35%, по крайней мере 40%, по крайней мере 45%, по крайней мере 50%, по крайней мере 55%, по крайней мере 60%, по крайней мере 65%, по крайней мере 70%, по крайней мере 75%, по крайней мере 80%, по крайней мере 85%, по крайней мере 90%, по крайней мере 95% или 100% по сравнению с уровнем образования пузырьков в эталонном препарате.

[0193] В некоторых аспектах фармацевтический препарат содержит, кроме того, буферный агент в виде аминокислоты. Аминокислоты могут с успехом использоваться в качестве буферов в фармацевтике, поскольку они в природных условиях представляют

собой вещества, которые легко метаболизируются. Кроме того, аминокислоты, используемые в качестве буферов, могут также защищать белки в аморфной фазе, если препарат подвергается лиофилизации. Подходящий аминокислотный буфер может содержать гистидин, лизин и/или аргинин. Гистидин обладает достаточной буферной емкостью вокруг рН 7.

[0194] Используемый здесь термин «гистидин» включает либо L-гистидин, либо D-гистидин, сольватированную форму гистидина, гидратированную форму (например, моногидрат) гистидина или безводную форму гистидина или их смесь. Другие подходящие буферы в препаратах по настоящему изобретению включают глутамат, Tris или сукцинат, и это лишь некоторые из них.

[0195] В некоторых конкретных аспектах буферный агент в виде аминокислоты представляет собой L-гистидин.

[0196] В некоторых аспектах буферный агент в виде гистидина присутствует в количестве от приблизительно 10 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 15 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 25 мМ до приблизительно 100 мМ, от приблизительно 30 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 35 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 40 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 45 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 50 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 55 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 60 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 65 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 70 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 75 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 80 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 85 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 90 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина или от приблизительно 95 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина.

[0197] В некоторых аспектах буферный агент в виде гистидина присутствует в количестве от приблизительно 20 мМ до приблизительно 90 мМ гистидина, от приблизительно 25 мМ до приблизительно 90 мМ гистидина, от приблизительно 30 мМ до приблизительно 90 мМ гистидина, от приблизительно 35 мМ до приблизительно 90 мМ гистидина, от приблизительно 40 мМ до приблизительно 90 мМ гистидина, от приблизительно 45 мМ до приблизительно 90 мМ гистидина, от приблизительно 50 мМ до приблизительно 90 мМ гистидина, от приблизительно 55 мМ до приблизительно 90 мМ гистидина, от приблизительно 60 мМ до приблизительно 90 мМ гистидина, от приблизительно 65 мМ до приблизительно 90 мМ гистидина, от приблизительно 70 мМ до приблизительно 90 мМ гистидина, от приблизительно 75 мМ до приблизительно 90 мМ гистидина, от приблизительно 80 мМ до приблизительно 90 мМ гистидина, от приблизительно 85 мМ до приблизительно 90 мМ гистидина, от приблизительно 30 мМ до приблизительно 80 мМ гистидина, от приблизительно 35 мМ до приблизительно 80 мМ



мМ гистидина, приблизительно 37 мМ гистидина, приблизительно 38 мМ гистидина, приблизительно 39 мМ гистидина, приблизительно 40 мМ гистидина, приблизительно 41 мМ гистидина, приблизительно 42 мМ гистидина, приблизительно 43 мМ гистидина, приблизительно 44 мМ гистидина, приблизительно 45 мМ гистидина, приблизительно 46 мМ гистидина, приблизительно 47 мМ гистидина, приблизительно 48 мМ гистидина, приблизительно 49 мМ гистидина или приблизительно 50 мМ гистидина.

[0201] В некоторых аспектах фармацевтический препарат содержит, кроме того, осморегулятор (также известные в данной области техники как регулятор тоничности). В соответствии с настоящим изобретением осморегулятор (регулятор тоничности) может включать полиол, сахарид, углевод, соль, такую как хлорид натрия, или их смеси. Приводимые в качестве примера полиолы включают полиолы с М.м. менее приблизительно 600 кДа (например, в диапазоне от 120 до 400 кДа), например, маннит, трегалозу, сорбит, эритрит, изомальт, лактит, мальтит, ксилит, глицерин, лактит, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, инозит или их смеси.

[0202] Осморегуляторы в виде сахаридов или углеводов включают моносахариды, дисахариды и полисахариды или их смеси. В некоторых аспектах сахарид или углевод выбирают из группы, состоящей из фруктозы, глюкозы, маннозы, сахарозы, сорбозы, ксилозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, декстрана, пуллулана, декстрина, циклодекстринов, растворимого крахмала, гидроксипулулана, водорастворимых глюканов и их смесей.

[0203] В некоторых аспектах осморегулятор включает сахарид, выбранный из группы восстанавливающих сахаров или невосстанавливающих сахаров или их смесей. В некоторых аспектах осморегулятор (регулятор тоничности) включает сахарид, который представляет собой невосстанавливающий сахар, предпочтительно сахар, выбранный из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы и их смесей. В некоторых конкретных аспектах невосстанавливающий сахар представляет собой сахарозу.

[0204] В некоторых аспектах осморегулятор в виде сахарозы присутствует в количестве от приблизительно 100 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 200 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 300 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 400 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 500 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 600 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 700 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 800 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 900 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 200 мМ до приблизительно 900 мМ сахарозы, от приблизительно 300 мМ до приблизительно 900 мМ сахарозы, от приблизительно 400 мМ до приблизительно 900 мМ сахарозы, от приблизительно 500 мМ до приблизительно 900 мМ сахарозы, от приблизительно 600 мМ до приблизительно 900 мМ сахарозы, от приблизительно 700 мМ до приблизительно 900 мМ сахарозы, от приблизительно 800 мМ до приблизительно 900 мМ сахарозы, от приблизительно 300 мМ до приблизительно 800 мМ сахарозы, от

приблизительно 400 мМ до приблизительно 800 мМ сахарозы, от приблизительно 500 мМ до приблизительно 800 мМ сахарозы, от приблизительно 600 мМ до приблизительно 800 мМ сахарозы, от приблизительно 700 мМ до приблизительно 800 мМ сахарозы, от приблизительно 400 мМ до приблизительно 700 мМ сахарозы, от приблизительно 500 мМ до приблизительно 700 мМ сахарозы, от приблизительно 600 мМ до приблизительно 700 мМ или от приблизительно 500 мМ до приблизительно 600 мМ сахарозы.

[0205] В некоторых аспектах осморегулятор в виде сахарозы присутствует в количестве, составляющем приблизительно 100 мМ сахарозы, приблизительно 150 мМ сахарозы, приблизительно 200 мМ сахарозы, приблизительно 250 мМ сахарозы, приблизительно 300 мМ сахарозы, приблизительно 350 мМ сахарозы, приблизительно 400 мМ сахарозы, приблизительно 450 мМ сахарозы, приблизительно 500 мМ сахарозы, приблизительно 550 мМ сахарозы, приблизительно 600 мМ сахарозы, приблизительно 650 мМ сахарозы, приблизительно 700 мМ сахарозы, приблизительно 750 мМ сахарозы, приблизительно 800 мМ сахарозы, приблизительно 850 мМ сахарозы, приблизительно 900 мМ сахарозы, приблизительно 950 мМ сахарозы или приблизительно 1 М сахарозы.

[0206] В некоторых аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6, присутствует в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 40 мг/мл. В некоторых аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6, присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 30 мг/мл или приблизительно 40 мг/мл. В некоторых аспектах концентрация конъюгата FGF-21 в фармацевтическом препарате, раскрытом здесь, основана на измерении с помощью угловой спектроскопии, например, спектрофотометра УФ-видимой области Agilent Cary 60, оснащенного SoloVPE Fibrette (C Technologies, Inc.; P/N OF0002-P50) (одноразовым пластиковым сосудом для УФ-излучения SoloVPE (C Technologies, Inc.; P/N OC0009-1)), при 280 нм с коэффициентом поглощения=0,87 (мл/(мг\*см)).

[0207] В некоторых аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO: 4, присутствует в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до 5 мг/мл, от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 10 мг/мл, от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 15 мг/мл, от приблизительно 15 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл, от приблизительно 20 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл, от приблизительно 25 мг/мл до приблизительно 30 мг/мл, от приблизительно 30 мг/мл до приблизительно 35 мг/мл или от приблизительно 35 мг/мл до приблизительно 40 мг/мл.

[0208] В некоторых аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 1 мг/мл, приблизительно 2 мг /мл, приблизительно 3 мг/мл, приблизительно 4 мг/мл, приблизительно 5 мг/мл, приблизительно 6 мг/мл, приблизительно 7 мг/мл, приблизительно 8 мг/мл, приблизительно 9 мг/мл,

приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 11 мг/мл, приблизительно 12 мг/мл, приблизительно 13 мг/мл, приблизительно 14 мг/мл, приблизительно 15 мг/мл, приблизительно 16 мг/мл, приблизительно 17 мг/мл, приблизительно 18 мг/мл, приблизительно 19 мг/мл, приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 21 мг/мл, приблизительно 22 мг/мл, приблизительно 23 мг/мл, приблизительно 24 мг/мл, приблизительно 25 мг/мл, приблизительно 26 мг/мл, приблизительно 27 мг/мл, приблизительно 28 мг/мл, приблизительно 29 мг/мл, приблизительно 30 мг/мл, приблизительно 31 мг/мл, приблизительно 32 мг/мл, приблизительно 33 мг/мл, приблизительно 34 мг/мл, приблизительно 35 мг/мл, приблизительно 36 мг/мл, приблизительно 37 мг/мл, приблизительно 38 мг/мл, приблизительно 39 мг/мл или приблизительно 40 мг/мл. В конкретном аспекте раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 10 мг/мл. В конкретном аспекте раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 20 мг/мл.

[0209] В некоторых аспектах концентрацию раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, определяют в соответствии со способами, известными в данной области техники, или конкретными способами, раскрытыми в разделе «Примеры» настоящей спецификации.

[0210] В некоторых аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, присутствует в раскрытом здесь препарате в количестве от приблизительно 1 мг до приблизительно 40 мг в каждой дозе. В некоторых аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, присутствует в раскрытом здесь препарате в количестве от приблизительно 1 мг до приблизительно 5 мг в каждой дозе, от приблизительно 5 мг до приблизительно 10 мг в каждой дозе, или от приблизительно 10 мг до приблизительно 15 мг в каждой дозе, от приблизительно 15 мг до приблизительно 20 мг в каждой дозе, или от приблизительно 20 мг до приблизительно 25 мг в каждой дозе, от приблизительно 25 мг до приблизительно 30 мг в каждой дозе, или от приблизительно 30 мг до приблизительно 35 мг в каждой дозе, или от приблизительно 35 мг до приблизительно 40 мг в каждой дозе. В некоторых аспектах доза представляет собой фиксированную дозу. В некоторых аспектах количество конъюгата FGF-21 в фармацевтическом препарате, раскрытом здесь, основано на измерении с помощью угловой спектроскопии, например, спектрофотометра УФ-видимой области Agilent Cary 60, оснащенного SoloVPE Fibrette (C Technologies, Inc.; P/N OF0002-P50) (одноразовым пластиковым сосудом для УФ-излучения SoloVPE (C Technologies, Inc.; P/N OC0009-1)), при 280 нм с коэффициентом поглощения=0,87 (мл/(мг\*см)).

[0211] В некоторых аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, присутствует в раскрытом здесь препарате в количестве от приблизительно 19 мг до приблизительно 21 мг в каждой дозе, от приблизительно 18 мг до приблизительно 22 мг в каждой дозе, от приблизительно 17 мг

до приблизительно 23 мг в каждой дозе, от приблизительно 16 мг до приблизительно 24 мг в каждой дозе, от приблизительно 15 мг до приблизительно 25 мг в каждой дозе, от приблизительно 14 мг до приблизительно 26 мг в каждой дозе, от приблизительно 13 мг до приблизительно 27 мг в каждой дозе, от приблизительно 12 мг до приблизительно 28 мг в каждой дозе, от приблизительно 11 мг до приблизительно 29 мг в каждой дозе или от приблизительно 10 мг до приблизительно 30 мг в каждой дозе. В некоторых аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO: 4, присутствует в раскрытом здесь препарате в количестве, превышающем 40 мг в каждой дозе. В некоторых аспектах доза является фиксированной дозой.

[0212] В некоторых аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, присутствует в раскрытом здесь препарате в количестве, составляющем приблизительно 1 мг в каждой дозе, приблизительно 2 мг в каждой дозе, приблизительно 3 мг в каждой дозе, приблизительно 4 мг в каждой дозе, приблизительно 5 мг в каждой дозе, приблизительно 6 мг в каждой дозе, приблизительно 7 мг в каждой дозе, приблизительно 8 мг в каждой дозе, приблизительно 9 мг в каждой дозе, приблизительно 10 мг в каждой дозе, приблизительно 11 мг в каждой дозе, приблизительно 12 мг в каждой дозе, приблизительно 13 мг в каждой дозе, приблизительно 14 мг в каждой дозе, приблизительно 15 мг в каждой дозе, приблизительно 16 мг в каждой дозе, приблизительно 17 мг в каждой дозе, приблизительно 18 мг в каждой дозе, приблизительно 19 мг в каждой дозе, приблизительно 20 мг в каждой дозе, приблизительно 21 мг в каждой дозе, приблизительно 22 мг в каждой дозе, приблизительно 23 мг в каждой дозе, приблизительно 24 мг в каждой дозе, приблизительно 25 мг в каждой дозе, приблизительно 26 мг в каждой дозе, приблизительно 27 мг в каждой дозе, приблизительно 28 мг в каждой дозе, приблизительно 29 мг в каждой дозе, приблизительно 30 мг в каждой дозе, приблизительно 31 мг в каждой дозе, приблизительно 32 мг в каждой дозе, приблизительно 33 мг в каждой дозе, приблизительно 34 мг в каждой дозе, приблизительно 35 мг в каждой дозе, приблизительно 36 мг в каждой дозе, приблизительно 37 мг в каждой дозе, приблизительно 38 мг в каждой дозе, приблизительно 39 мг в каждой дозе или приблизительно 40 мг в каждой дозе. В конкретных аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO: 4, присутствует в раскрытом здесь препарате в количестве, составляющем приблизительно 10 мг в каждой дозе. В конкретных аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, присутствует в раскрытом здесь препарате в количестве, составляющем приблизительно 20 мг в каждой дозе. В некоторых аспектах доза является фиксированной дозой.

[0213] В некоторых аспектах фармацевтический препарат составлен для подкожного введения. Как обсуждается ниже, другие фармацевтические препараты, раскрытые здесь, могут вводиться другими путями. В некоторых аспектах

фармацевтический препарат составлен для подкожного введения, например, с помощью безопасного шприца. В некоторых аспектах препарат составлен для ежедневного или еженедельного введения, например, каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6 дней, каждую неделю или каждые две недели. В некоторых аспектах препарат представляет собой водный препарат.

[0214] В некоторых аспектах настоящим изобретением предоставляется фармацевтический препарат, содержащий (i) раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4; (ii) гистидин в концентрации от приблизительно 10 мМ до приблизительно 50 мМ; (iii) сахарозу в концентрации от приблизительно 100 мМ до приблизительно 1М; (iv) полисорбат 80 в концентрации от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему); и (v) ДТРА в концентрации от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 100 мкМ; причем pH препарата составляет от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,5.

[0215] В некоторых аспектах настоящим изобретением предоставляется фармацевтический препарат, содержащий (i) раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6; (ii) гистидин в концентрации от приблизительно 10 мМ до приблизительно 50 мМ; (iii) сахарозу в концентрации от приблизительно 100 мМ до приблизительно 1М; (iv) полисорбат 80 в концентрации от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему); и (v) ДТРА в концентрации от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 100 мкМ; причем pH препарата составляет от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,5.

[0216] Также предоставляется фармацевтический препарат, содержащий (i) раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6; (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ; (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ; (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и (v) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ; причем pH составляет приблизительно 7,1.

[0217] Также предоставляется фармацевтический препарат, содержащий (i) раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6; (ii) гистидин в концентрации, составляющей 20 мМ; (iii) сахарозу в концентрации, составляющей 600 мМ; (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей 0,05% (в отношении веса к объему); и (v) ДТРА в концентрации, составляющей 50 мкМ; причем pH составляет 7,1.

[0218] Также предоставляется фармацевтический препарат, содержащий (i) раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6; (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ; и (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ; причем pH составляет приблизительно 7,0.

[0219] Также предоставляется фармацевтический препарат, содержащий (i) раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ

ID NO:4 или 6; (ii) гистидин в концентрации, составляющей 20 мМ; и (iii) сахарозу в концентрации, составляющей 600 мМ; причем pH составляет 7,0.

[0220] В некоторых конкретных аспектах настоящим изобретением предоставляется фармацевтический препарат, содержащий (i) раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6, в концентрации приблизительно 10 мг/мл; (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ; (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ; (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и (v) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ; причем pH составляет приблизительно 7,1. В некоторых аспектах концентрацию конъюгата FGF-21 в фармацевтическом препарате, раскрытом здесь, измеряют с помощью угловой спектроскопии, например, спектрофотометра УФ-видимой области Agilent Cary 60, оснащенного SoloVPE Fibrette (C Technologies, Inc.; P/N OF0002-P50) (одноразовым пластиковым сосудом для УФ-излучения SoloVPE (C Technologies, Inc.; P/N OC0009-1)), при 280 нм с коэффициентом поглощения=0,87 (мл/(мг\*см)).

[0221] Также предоставляется фармацевтический препарат, содержащий (i) раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6, в концентрации, составляющей приблизительно 20 мг/мл; (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ; (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ; (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и (v) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ; причем pH составляет приблизительно 7,1. В некоторых аспектах концентрацию конъюгата FGF-21 в фармацевтическом препарате, раскрытом здесь, измеряют с помощью угловой спектроскопии, например, спектрофотометра УФ-видимой области Agilent Cary 60, оснащенного SoloVPE Fibrette (C Technologies, Inc.; P/N OF0002-P50) (одноразовым пластиковым сосудом для УФ-излучения SoloVPE (C Technologies, Inc.; P/N OC0009-1)), при 280 нм с коэффициентом поглощения=0,87 (мл/(мг\*см)).

[0222] Также предоставляется фармацевтический препарат, содержащий (i) раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6, в концентрации, составляющей 10 мг/мл; (ii) гистидин в концентрации, составляющей 20 мМ; (iii) сахарозу в концентрации, составляющей 600 мМ; (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей 0,05% (в отношении веса к объему); и (v) ДТРА в концентрации, составляющей 50 мкМ; причем pH составляет 7,1.

[0223] Также предоставляется фармацевтический препарат, содержащий (i) раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6, в концентрации, составляющей 20 мг/мл; (ii) гистидин в концентрации, составляющей 20 мМ; (iii) сахарозу в концентрации, составляющей 600 мМ; (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей 0,05% (в отношении веса к объему); и (v) ДТРА в концентрации, составляющей 50 мкМ; причем pH составляет 7,1.

[0224] Настоящим изобретением также предоставляется фармацевтический препарат, приготовленный в соответствии с любым из способов улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6.

[0225] В конкретном аспекте настоящим изобретением предоставляется фармацевтический препарат, содержащий конъюгат FGF-21 с SEQ ID NO:4 или 6 в концентрации, составляющей 20 г/л, в 20 мМ гистидине, 600 мМ сахарозе, 50 мкМ DTPA и 0,05% PS80, pH 7,1. В конкретном аспекте настоящим изобретением предоставляется фармацевтический препарат, содержащий конъюгат FGF-21 с SEQ ID NO:4 или 6 в концентрации, составляющей 10 г/л, в 20 мМ гистидине, 600 мМ сахарозе, 50 мкМ DTPA и 0,05% PS80 (в отношении веса к объему), pH 7,1. В некоторых аспектах концентрацию конъюгата FGF-21 в фармацевтическом препарате, раскрытом здесь, измеряют с помощью угловой спектроскопии, например, спектрофотометра УФ-видимой области Agilent Cary 60, оснащенного SoloVPE Fibrette (C Technologies, Inc.; P/N OF0002-P50) (одноразовым пластиковым сосудом для УФ-излучения SoloVPE (C Technologies, Inc.; P/N OC0009-1)), при 280 нм с коэффициентом поглощения=0,87 (мл/(мг\*см)).

[0226] В некоторых аспектах препарат является замороженным. В некоторых аспектах препарат хранится в пакете, например пакете типа раковины (пакете, который состоит из двух половинок соединенных вместе). В некоторых аспектах пакет, например пакет типа раковины, имеет объем от 6 л до 12 л.

[0227] В некоторых аспектах препарат содержится во флаконе. В некоторых аспектах препарат содержится в шприце. В некоторых аспектах шприц представляет собой безопасный шприц. В некоторых аспектах шприц представляет собой предварительно наполняемый шприц. В некоторых аспектах шприц представляет собой предварительно наполняемый шприц BD НЕОПАК™. В некоторых аспектах препарат содержится в устройстве для самостоятельной инъекции.

[0228] В некоторых аспектах шприц (например, предварительно наполняемый шприц) или устройство для самостоятельной инъекции содержит 1 мл фармацевтического препарата, содержащего конъюгат FGF-21 с SEQ ID NO:4 или 6 в концентрации, составляющей 10 г/л, в 20 мМ гистидине, 600 мМ сахарозе, 50 мкМ DTPA и 0,05% PS80 (в отношении веса к объему), pH 7,1. В некоторых аспектах шприц (например, предварительно наполняемый шприц) или устройство для самостоятельной инъекции содержит 1 мл фармацевтического препарата, содержащего конъюгат FGF-21 с SEQ ID NO:4 или 6 в концентрации, составляющей 20 г/л, в 20 мМ гистидине, 600 мМ сахарозе, 50 мкМ DTPA и 0,05% PS80, pH 7,1. В некоторых аспектах концентрацию конъюгата FGF-21 в раскрытом здесь фармацевтическом препарате измеряют с помощью угловой спектроскопии, например, спектрофотометра УФ-видимой области Agilent Cary 60, оснащенного SoloVPE Fibrette (C Technologies, Inc.; P/N OF0002-P50) (одноразовым пластиковым сосудом для УФ-излучения SoloVPE (C Technologies, Inc.; P/N OC0009-1)), при 280 нм с коэффициентом поглощения=0,87 (мл/(мг\*см)).

## II. Способы производства

[0229] Настоящим изобретением также предоставляются способы улучшения или повышения стабильности фармацевтического препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ LD NO:4 или 6, включающий примешивание комплексона для катионов в виде аминополикарбоневой кислоты, например, ДТРА, причем препарат обладает улучшенной стабильностью по сравнению с эталонным препаратом, который не содержит комплексон для катионов в виде аминополикарбоневой кислоты. Эти способы стабилизации включают (i) примешивание к препарату комплексона для катионов в виде аминополикарбоневой кислоты, (ii) примешивание поверхностно-активного вещества в виде полисорбата, например, полисорбата 80, (iii) доведение pH препарата до приблизительно 7,1, или (iv) любую их комбинацию.

[0230] В некоторых аспектах фармацевтический препарат, описанный здесь, получают с помощью процесса примешивания (i) раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6, в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации, составляющей приблизительно 10 мг/мл; (ii) гистидина в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ; (iii) сахарозы в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ; (iv) полисорбата 80 в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и (v) ДТРА в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ; и доводят pH до приблизительно 7,1.

[0231] В некоторых аспектах фармацевтический препарат, описанный здесь, получают с помощью процесса примешивания (i) раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6, в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации, составляющей приблизительно 20 мг/мл; (ii) гистидина в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ; (iii) сахарозы в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ; (iv) полисорбата 80 в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и (v) ДТРА в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ; и доводят pH до приблизительно 7,1.

[0232] В некоторых аспектах фармацевтический препарат, описанный здесь, получают с помощью процесса примешивания (i) раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6, в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации, составляющей 10 мг/мл; (ii) гистидина в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации, составляющей 20 мМ; (iii) сахарозы в количестве, достаточном для достижения конечной

концентрации, составляющей 600 мМ; (iv) полисорбата 80 в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации, составляющей 0,05% (в отношении веса к объему); и (v) ДТРА в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации, составляющей 50 мкМ; и доводят рН до 7,1.

[0233] В некоторых аспектах фармацевтический препарат, описанный здесь, получают с помощью процесса примешивания (i) раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 5 или SEQ ID NO:4 или 6, в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации, составляющей 20 мг/мл; (ii) гистидина в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации, составляющей 20 мМ; (iii) сахарозы в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации, составляющей 600 мМ; (iv) полисорбата 80 в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации, составляющей 0,05% (в отношении веса к объему); и (v) ДТРА в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации 50 мкМ; и доводят рН до 7,1.

[0234] Используемый здесь термин «примешивание» относится к комбинации компонентов раскрытых здесь препаратов в не определенном заранее порядке для достижения раскрытых концентраций любыми способами, известными в данной области техники. Например, наполнители в фармацевтическом препарате, раскрытом здесь, могут быть последовательно или одновременно добавлены в раствор, содержащий раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4. Альтернативно, концентрированный раствор, содержащий раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может быть добавлен в раствор, содержащий все или часть наполнителей в препарате. В других аспектах наполнители могут быть включены в препарат, используя, например, диализ или фильтрацию.

[0235] В некоторых аспектах улучшения стабильности в результате применения раскрытого способа включают, например, (i) повышение физической стойкости относительно эталонного препарата, (ii) повышение химической стойкости относительно эталонного препарата или (iii) их комбинацию.

[0236] В некоторых аспектах повышение физической стойкости включает (i) предотвращение или уменьшение агрегации полипептида FGF-21, (ii) предотвращение или уменьшение фрагментации полипептида FGF-21 или (iii) их комбинацию.

[0237] В некоторых аспектах агрегация полипептида FGF-21, наблюдаемая в фармацевтической композиции, раскрытой здесь, составляет приблизительно 90%, приблизительно 85%, приблизительно 80%, приблизительно 75%, приблизительно 70%, приблизительно 65%, приблизительно 60%, приблизительно 55%, приблизительно 50%, приблизительно 45%, приблизительно 40%, приблизительно 35%, приблизительно 30%, приблизительно 25%, приблизительно 20%, приблизительно 15% или приблизительно 10% от агрегации полипептида FGF-21, наблюдаемой в случае эталонного препарата.

[0238] В некоторых аспектах агрегация полипептида FGF-21, наблюдаемая в

фармацевтической композиции, раскрытой здесь, составляет менее 90%, менее 85%, менее 80%, менее 75%, менее 70%, менее 65%, менее 60%, менее 55%, менее 50%, менее 45%, менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15% или менее 10% от агрегации полипептида FGF-21, наблюдаемой в случае эталонного препарата.

[0239] В некоторых аспектах фрагментация полипептида FGF-21, наблюдаемая в фармацевтической композиции, раскрытой здесь, составляет приблизительно 90%, приблизительно 85%, приблизительно 80%, приблизительно 75%, приблизительно 70%, приблизительно 65%, приблизительно 60%, приблизительно 55%, приблизительно 50%, приблизительно 45%, приблизительно 40%, приблизительно 35%, приблизительно 30%, приблизительно 25%, приблизительно 20%, приблизительно 15% или приблизительно 10% от фрагментации полипептида FGF-21, наблюдаемой в случае эталонного препарата.

[0240] В некоторых аспектах фрагментация полипептида FGF-21, наблюдаемая в фармацевтической композиции, раскрытой здесь, составляет менее 90%, менее 85%, менее 80%, менее 75%, менее 70%, менее 65%, менее 60%, менее 55%, менее 50%, менее 45%, менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15% или менее 10% от фрагментации полипептида FGF-21, наблюдаемой в случае эталонного препарата.

[0241] В некоторых аспектах повышение химической стойкости включает (i) предотвращение или уменьшение дезамидирования полипептида FGF-21, (ii) предотвращение или уменьшение окисления полипептида FGF-21 или (iii) их комбинацию. В некоторых аспектах дезамидирование полипептида FGF-21, наблюдаемое в фармацевтической композиции, раскрытой здесь, составляет приблизительно 90%, приблизительно 85%, приблизительно 80%, приблизительно 75%, приблизительно 70%, приблизительно 65%, приблизительно 60%, приблизительно 55%, приблизительно 50%, приблизительно 45%, приблизительно 40%, приблизительно 35%, приблизительно 30%, приблизительно 25%, приблизительно 20%, приблизительно 15% или приблизительно 10% от дезамидирования полипептида FGF-21, наблюдаемого в случае эталонного препарата.

[0242] В некоторых аспектах дезамидирование полипептида FGF-21, наблюдаемое в фармацевтической композиции, раскрытой здесь, составляет менее 90%, менее 85%, менее 80%, менее 75%, менее 70%, менее 65%, менее 60%, менее 55%, менее 50%, менее 45%, менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15% или менее 10% от дезамидирования полипептида FGF-21, наблюдаемого в случае эталонного препарата.

[0243] В некоторых аспектах окисление полипептида FGF-21, наблюдаемое в фармацевтической композиции, раскрытой здесь, составляет приблизительно 90%, приблизительно 85%, приблизительно 80%, приблизительно 75%, приблизительно 70%, приблизительно 65%, приблизительно 60%, приблизительно 55%, приблизительно 50%, приблизительно 45%, приблизительно 40%, приблизительно 35%, приблизительно 30%, приблизительно 25%, приблизительно 20%, приблизительно 15% или приблизительно 10% от окисления полипептида FGF-21, наблюдаемого в случае эталонного препарата.

[0244] В некоторых аспектах окисление полипептида FGF-21, наблюдаемое в фармацевтической композиции, раскрытой здесь, составляет менее 90%, менее 85%, менее 80%, менее 75%, менее 70%, менее 65%, менее 60%, менее 55%, менее 50%, менее 45%, менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15% или менее 10% от окисления полипептида FGF-21, наблюдаемого в случае эталонного препарата.

[0245] В некоторых аспектах способы стабилизации (улучшения или повышения стабильности) раскрытого здесь препарата могут снижать не только уровень деградации, но и скорость деградации: например, раскрытые способы могут снижать скорость дезамидирования полипептида, снижать скорость окисления полипептида FGF-21, снижать скорость агрегации полипептида FGF-21, снижать скорость протеолитической деградации полипептида FGF-21 или вызывать любую их комбинацию, относительно эталонного препарата.

[0246] Например, примешивание комплексона для катионов в виде аминокполикарбонической кислоты, такого как ДТРА, к фармацевтическому препарату, раскрытому здесь, может снижать скорость дезамидирования раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, при хранении при определенной температуре в течение определенного периода времени относительно эталонного препарата.

[0247] В некоторых аспектах примешивание комплексона для катионов в виде аминокполикарбонической кислоты (например, ДТРА) к фармацевтическому препарату, содержащему раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может снижать скорость дезамидирования конъюгата FGF-21 при хранении фармацевтического препарата, например, при температуре, составляющей приблизительно 25°C, приблизительно 30°C, приблизительно 35°C, приблизительно 40°C или приблизительно 45°C, относительно эталонного препарата.

[0248] В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде аминокполикарбонической кислоты (например, ДТРА) может снижать скорость дезамидирования раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, когда фармацевтический препарат хранится при температуре выше 25°C, выше 30°C, выше 35°C, приблизительно 40°C или приблизительно 45°C, относительно эталонного препарата.

[0249] В некоторых аспектах комплексон для катионов в виде аминокполикарбонической кислоты (например, ДТРА) может снижать скорость дезамидирования раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, когда фармацевтический препарат хранится при температуре от приблизительно 20°C до приблизительно 25°C, от приблизительно 25°C до приблизительно 30°C, от приблизительно 30°C до приблизительно 35°C или от приблизительно 40°C до приблизительно 45°C, относительно эталонного препарата.

[0250] В некоторых аспектах примешивание комплексона для катионов в виде аминокполикарбонической кислоты (например, ДТРА) к фармацевтическому препарату,

содержащему раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может снижать скорость дезамидирования конъюгата FGF-21, когда фармацевтический препарат хранится при температуре или диапазоне температур, указанных выше, в течение приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 3 недель, приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев или приблизительно 4 месяцев, относительно эталонного препарата.

[0251] В конкретном аспекте примешивание комплексона для катионов в виде аминокполикарбонической кислоты (например, ДТРА) к фармацевтическому препарату, содержащему раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может снижать скорость дезамидирования конъюгата FGF-21, когда фармацевтический препарат хранится при температуре, составляющей 40°C, в течение приблизительно месяца, относительно эталонного препарата.

[0252] В некоторых аспектах примешивание комплексона для катионов в виде аминокполикарбонической кислоты (например, ДТРА) к фармацевтическому препарату, содержащему раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может снижать скорость агрегации высокомолекулярного (НМВ) полипептида в виде конъюгата FGF-21, когда фармацевтический препарат хранится при температуре, составляющей приблизительно 25°C, приблизительно 30°C, приблизительно 35°C, приблизительно 40°C или приблизительно 45°C, относительно эталонного препарата.

[0253] В некоторых аспектах примешивание комплексона для катионов в виде аминокполикарбонической кислоты (например, ДТРА) к фармацевтическому препарату, содержащему раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может снижать скорость агрегации НМВ полипептида в виде конъюгата FGF-21, когда фармацевтический препарат хранится при температуре выше 25°C, выше 30°C, выше 35°C, приблизительно 40°C или приблизительно 45°C, относительно эталонного препарата.

[0254] В некоторых аспектах примешивание комплексона для катионов в виде аминокполикарбонической кислоты (например, ДТРА) к фармацевтическому препарату, содержащему раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может снижать скорость агрегации НМВ полипептида в виде конъюгата FGF-21, когда фармацевтический препарат хранится при температуре от приблизительно 20°C до приблизительно 25°C, от приблизительно 25°C до приблизительно 30°C, от приблизительно 30°C до приблизительно 35°C или от приблизительно 40°C до приблизительно 45°C, относительно эталонного препарата.

[0255] В некоторых аспектах примешивание комплексона для катионов в виде аминокполикарбонической кислоты (например, ДТРА) к фармацевтическому препарату, содержащему раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может снижать скорость агрегации НМВ полипептида в виде

конъюгата FGF-21, когда фармацевтический препарат хранится при температуре или диапазоне температур, указанных выше, в течение приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 3 недель, приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев или приблизительно 4 месяцев, относительно эталонного препарата.

[0256] В конкретном аспекте примешивание комплексона для катионов в виде аминокполикарбонной кислоты (например, ДТРА) к фармацевтическому препарату, содержащему раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может снижать скорость агрегации НМВ полипептида в виде конъюгата FGF-21, когда фармацевтический препарат хранится при температуре, составляющей 40°C, в течение приблизительно месяца, относительно эталонного препарата.

[0257] В некоторых аспектах примешивание комплексона для катионов в виде аминокполикарбонной кислоты (например, ДТРА) к фармацевтическому препарату, содержащему раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может предотвращать или уменьшать окисление одного или более метионинов в конъюгате FGF-21.

[0258] В конкретных аспектах примешивание комплексона для катионов в виде аминокполикарбонной кислоты (например, ДТРА) к фармацевтическому препарату, содержащему раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может предотвращать или уменьшать окисление аминокислоты 1 и/или аминокислоты 169 в SEQ ID NO:3 (FGF-21 дикого типа) или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO:1, 2, 4 или любом другом конъюгате FGF-21 в соответствии с настоящим изобретением, например, при 25°C и/или при 40°C.

[0259] В раскрытых способах может использоваться ДТРА в качестве комплексона для катионов в виде аминокполикарбонной кислоты. Однако в некоторых других аспектах комплексон для катионов в виде аминокполикарбонной кислоты может представлять собой, например, другой комплексон для катионов в виде аминокполикарбонной кислоты, такой как EDTA, EGTA, DOTA, родственное ДТРА соединение, такое как тиуксетан, или любые родственные ДТРА и EDTA комплексообразующие агенты, известные в данной области техники, например ДТРА.ВМА и EDTA.ВМА.

[0260] В некоторых аспектах комплексон для катионов ДТРА может примешиваться в количестве от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 100 мкМ, от 15 мкМ до приблизительно 95 мкМ, от приблизительно 20 мкМ до приблизительно 90 мкМ, от приблизительно 25 мкМ до приблизительно 85 мкМ, от приблизительно 30 мкМ до приблизительно 80 мкМ, от приблизительно 35 мкМ до приблизительно 75 мкМ, от приблизительно 40 мкМ до приблизительно 70 мкМ, от приблизительно 45 мкМ до приблизительно 65 мкМ, от приблизительно 50 мкМ до приблизительно 60 мкМ, от приблизительно 25 мкМ до приблизительно 75 мкМ, от приблизительно 40 мкМ до приблизительно 60 мкМ, от приблизительно 30 мкМ до приблизительно 70 мкМ или от

приблизительно 40 мкМ до приблизительно 75 мкМ.

[0261] В некоторых аспектах комплексон для катионов ДТРА может примешиваться в количестве, составляющем приблизительно 10 мкМ, приблизительно 15 мкМ, приблизительно 20 мкМ, приблизительно 25 мкМ, приблизительно 30 мкМ, приблизительно 35 мкМ, приблизительно 40 мкМ, приблизительно 45 мкМ, приблизительно 50 мкМ, приблизительно 55 мкМ, приблизительно 60 мкМ, приблизительно 65 мкМ, приблизительно 70 мкМ, приблизительно 75 мкМ, приблизительно 80 мкМ, приблизительно 85 мкМ, приблизительно 90 мкМ, приблизительно 95 мкМ или приблизительно 100 мкМ.

[0262] В некоторых аспектах комплексон для катионов ДТРА может примешиваться в количестве, составляющем по крайней мере приблизительно 15 мкМ, по крайней мере приблизительно 20 мкМ, по крайней мере приблизительно 25 мкМ, по крайней мере приблизительно 30 мкМ, по крайней мере приблизительно 35 мкМ, по крайней мере приблизительно 40 мкМ, по крайней мере приблизительно 45 мкМ, по крайней мере приблизительно 50 мкМ, по крайней мере приблизительно 55 мкМ, по крайней мере приблизительно 60 мкМ, по крайней мере приблизительно 65 мкМ, по крайней мере приблизительно 70 мкМ или по крайней мере приблизительно 75 мкМ.

[0263] В конкретном аспекте комплексон для катионов в виде аминополикарбоновой кислоты, например, ДТРА, примешивают в количестве, составляющем 50 мкМ.

[0264] В некоторых аспектах раскрытых здесь способов рН препарата доводят до рН, превышающего приблизительно 6,5, приблизительно 6,6, приблизительно 6,7, приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, приблизительно 7,3, приблизительно 7,4 или приблизительно 7,5.

[0265] В некоторых аспектах рН препарата доводят до рН выше 6,5, выше 6,6, выше 6,7, выше 6,8, выше 6,9, выше 7,0, выше 7,1, выше 7,2, выше 7,3, выше 7,4 или выше 7,5.

[0266] В некоторых аспектах рН препарата доводят до рН 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 или 7,5.

[0267] В некоторых аспектах рН препарата доводят до рН от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,5, от приблизительно 6,6 до приблизительно 7,5, от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,5, от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,5, от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,5, от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,5, от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,5, от приблизительно 7,2 до приблизительно 7,5, от приблизительно 7,3 до приблизительно 7,5, от приблизительно 7,4 до приблизительно 7,5, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,4, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,3, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,2, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,1, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,0, от приблизительно 6,5 до приблизительно 6,9, от приблизительно 6,5 до приблизительно 6,8, от приблизительно 6,5 до приблизительно 6,7, от приблизительно 6,6 до приблизительно 7,4,

от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,4, от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,4, от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,4, от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,4, от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,4, от приблизительно 7,2 до приблизительно 7,4, от приблизительно 7,3 до приблизительно 7,4, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,3, от приблизительно 6,6 до приблизительно 7,3, от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,3, от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,3, от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,3, от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,3, от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,3, от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,3, от приблизительно 7,2 до приблизительно 7,3, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,2, от приблизительно 6,6 до приблизительно 7,2, от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,2, от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,2, от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,2, от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,2, от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,2, от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,1 или от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,1.

[0268] В некоторых аспектах рН препарата доводят до рН, составляющего приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, приблизительно 7,3, приблизительно 7,4 или приблизительно 7,5. В некоторых аспектах фармацевтический препарат после доведения рН является более стабильным, чем эталонный препарат с рН 6,5.

[0269] В некоторых аспектах рН препарата доводят до рН 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 или 7,5. В некоторых аспектах фармацевтический препарат после доведения рН является более стабильным, чем эталонный препарат с рН 6,5.

[0270] В некоторых аспектах способ улучшения стабильности фармацевтического препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, включает, кроме того, примешивание поверхностно-активного вещества. В некоторых аспектах примешиваемое поверхностно-активное вещество представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество, т.е. поверхностно-активное вещество, которое, как правило, не имеет результирующего заряда в нейтральных растворах. В некоторых аспектах примешиваемое неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат. В некоторых аспектах неионогенное поверхностно-активное вещество примешивают в количестве, превышающем критическую концентрацию мицеллообразования (СМС), которая для сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана и жирной кислоты является приблизительно количеством, составляющим по крайней мере 0,01 мг/мл. Смотрите Wan and Lee, Journal of Pharm Sci, 63, p.136, 1974. В некоторых аспектах способов настоящего изобретения полисорбат представляет собой полисорбат 80 (PS80).

[0271] В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество PS80 примешивают к фармацевтическому препарату в количестве от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,02% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,03% до

приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,04% до  
 приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,05% до  
 приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,06% до  
 приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,07% до  
 приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,08% до  
 приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,09% до  
 приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,02% до  
 приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,03% до  
 приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,04% до  
 приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,05% до  
 приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,06% до  
 приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,07% до  
 приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,08% до  
 приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,03% до  
 приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,04% до  
 приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,05% до  
 приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,06% до  
 приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,07% до  
 приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,04% до  
 приблизительно 0,07% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,05% до  
 приблизительно 0,07% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,06% до  
 приблизительно 0,07% (в отношении веса к объему) или от приблизительно 0,05% до  
 приблизительно 0,06% (в отношении веса к объему).

[0272] В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество полисорбат 80 примешивают в количестве, составляющем по крайней мере приблизительно 0,01% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,02% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,03% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,04% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,06% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,07% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему) или по крайней мере приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему). В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество, например, PS80, примешивают в количестве, достаточном для уменьшения или предотвращения образования (макро)частиц и/или образования пузырьков воздуха, например, при перемешивании препарата (например, на шейкере).

[0273] В некоторых аспектах способ улучшения стабильности фармацевтического препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, включает, кроме того, примешивание буферного агента в виде аминокислоты, например, гистидина (т.е., L-гистидина, D-гистидина,



приблизительно 15 мМ до приблизительно 30 мМ гистидина, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 30 мМ гистидина, от приблизительно 25 мМ до приблизительно 30 мМ гистидина, от приблизительно 15 мМ до приблизительно 25 мМ гистидина, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 25 мМ, от приблизительно 15 мМ до приблизительно 20 мМ гистидина, от приблизительно 40 мМ до приблизительно 60 мМ гистидина, от приблизительно 45 мМ до приблизительно 60 мМ гистидина, от приблизительно 50 мМ до приблизительно 60 мМ гистидина, от приблизительно 15,5 мМ до приблизительно 24,5 мМ гистидина, от приблизительно 16 мМ до приблизительно 24 мМ гистидина, от приблизительно 16,5 мМ до приблизительно 23,5 мМ гистидина, от приблизительно 17 мМ до приблизительно 23 мМ гистидина, от приблизительно 17,5 мМ до приблизительно 22,5 мМ гистидина, от приблизительно 18 мМ до приблизительно 22 мМ гистидина, от приблизительно 18,5 мМ до приблизительно 21,5 мМ гистидина, от приблизительно 19 мМ до приблизительно 21 мМ или от приблизительно 19,5 мМ до приблизительно 20,5 мМ гистидина.

[0275] В некоторых аспектах буферный агент в виде гистидина примешивают в количестве, составляющем приблизительно 10 мМ гистидина, приблизительно 11 мМ гистидина, приблизительно 12 мМ гистидина, приблизительно 13 мМ гистидина, приблизительно 14 мМ гистидина, приблизительно 15 мМ гистидина, приблизительно 16 мМ гистидина, приблизительно 17 мМ гистидина, приблизительно 18 мМ гистидина, приблизительно 19 мМ гистидина, приблизительно 20 мМ гистидина, приблизительно 21 мМ гистидина, приблизительно 22 мМ гистидина, приблизительно 23 мМ гистидина, приблизительно 24 мМ гистидина, приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 26 мМ гистидина, приблизительно 27 мМ гистидина, приблизительно 28 мМ гистидина, приблизительно 29 мМ гистидина, приблизительно 30 мМ гистидина, приблизительно 31 мМ гистидина, приблизительно 32 мМ гистидина, приблизительно 33 мМ гистидина, приблизительно 34 мМ гистидина, приблизительно 35 мМ гистидина, приблизительно 36 мМ гистидина, приблизительно 37 мМ гистидина, приблизительно 38 мМ гистидина, приблизительно 39 мМ гистидина, приблизительно 40 мМ гистидина, приблизительно 41 мМ гистидина, приблизительно 42 мМ гистидина, приблизительно 43 мМ гистидина, приблизительно 44 мМ гистидина, приблизительно 45 мМ гистидина, приблизительно 46 мМ гистидин, приблизительно 47 мМ гистидина, приблизительно 48 мМ гистидина, приблизительно 49 мМ гистидина или приблизительно 50 мМ гистидина.

[0276] В некоторых аспектах способ улучшения стабильности фармацевтического препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, включает, кроме того, примешивание осморегулятора (регулятора тоничности). В соответствии с настоящим изобретением осморегулятор (регулятор тоничности) может включать полиол, сахарид, углевод, соль, такую как хлорид натрия, или их смеси. Приводимые в качестве примера полиолы включают полиолы с М.м., составляющей менее приблизительно 600 кДа (например, в диапазоне от 120 до 400 кДа), например, маннит, трегалозу, сорбит, эритрит, изомальт, лактит, мальтит, ксилит,

глицерин, лактит, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, инозит или их смеси. Осморегуляторы в виде сахаридов или углеводов включают моносахариды, дисахариды и полисахариды или их смеси.

[0277] В некоторых аспектах сахарид или углевод выбирают из группы, состоящей из фруктозы, глюкозы, маннозы, сахарозы, сорбозы, ксилозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, декстрана, пуллулана, декстрина, циклодекстринов, растворимого крахмала, гидроксипулулана, водорастворимых глюканов и их смесей. В некоторых аспектах осморегулятор включает сахарид, выбранный из группы восстанавливающих сахаров или невосстанавливающих сахаров или их смесей. В некоторых аспектах осморегулятор (регулятор тоничности) включает сахарид, который представляет собой невосстанавливающий сахар, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы и их смесей. В некоторых конкретных аспектах невосстанавливающий сахар представляет собой сахарозу.

[0278] В некоторых аспектах осморегулятор в виде сахарозы примешивают в количестве от приблизительно 100 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 200 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 300 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 400 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 500 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 600 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 700 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 800 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 900 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 200 мМ до приблизительно 900 мМ сахарозы, от приблизительно 300 мМ до приблизительно 900 мМ сахарозы, от приблизительно 400 мМ до приблизительно 900 мМ сахарозы, от приблизительно 500 мМ до приблизительно 900 мМ сахарозы, от приблизительно 600 мМ до приблизительно 900 мМ сахарозы, от приблизительно 700 мМ до приблизительно 900 мМ сахарозы, от приблизительно 800 мМ до приблизительно 900 мМ сахарозы, от приблизительно 300 мМ до приблизительно 800 мМ сахарозы, от приблизительно 400 мМ до приблизительно 800 мМ сахарозы, от приблизительно 500 мМ до приблизительно 800 мМ сахарозы, от приблизительно 600 мМ до приблизительно 800 мМ сахарозы, от приблизительно 700 мМ до приблизительно 800 мМ сахарозы, от приблизительно 400 мМ до приблизительно 700 мМ сахарозы, от приблизительно 500 мМ до приблизительно 700 мМ сахарозы, от приблизительно 600 мМ до приблизительно 700 мМ или от приблизительно 500 мМ до приблизительно 600 мМ сахарозы.

[0279] В некоторых аспектах осморегулятор в виде сахарозы примешивают в количестве, составляющем приблизительно 100 мМ сахарозы, приблизительно 150 мМ сахарозы, приблизительно 200 мМ сахарозы, приблизительно 250 мМ сахарозы, приблизительно 300 мМ сахарозы, приблизительно 350 мМ сахарозы, приблизительно 400 мМ сахарозы, приблизительно 450 мМ сахарозы, приблизительно 500 мМ сахарозы, приблизительно 550 мМ сахарозы, приблизительно 600 мМ сахарозы, приблизительно 650 мМ сахарозы, приблизительно 700 мМ сахарозы, приблизительно 750 мМ сахарозы,

приблизительно 800 мМ сахарозы, приблизительно 850 мМ сахарозы, приблизительно 900 мМ сахарозы, приблизительно 950 мМ сахарозы или приблизительно 1 М сахарозы.

[0280] В некоторых аспектах конъюгат FGF-21, применимый в раскрытых здесь способах, содержит полипептид FGF-21, идентичный по аминокислотной последовательности на по крайней мере приблизительно 70%, по крайней мере приблизительно 75%, по крайней мере приблизительно 80%, по крайней мере приблизительно 85%, по крайней мере приблизительно 90%, по крайней мере приблизительно 95%, по крайней мере приблизительно 96%, по крайней мере приблизительно 97%, по крайней мере приблизительно 98% или по крайней мере приблизительно 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3 (FGF-21 человека дикого типа), причем полипептид FGF-21 обладает активностью FGF-21.

[0281] В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 представляет собой ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2, т.е. FGF-21 с SEQ ID NO:1, в котором глутамин 109 FGF-21 дикого типа (SEQ ID NO:3) был заменен пара-ацетил-L-фенилаланином, а фрагмент ПЭГ, например линейный ПЭГ с молекулярной массой от приблизительно 28 кДа до приблизительно 32 кДа, например, приблизительно 30 кДа, был ковалентно присоединен к пара-ацетил-L-фенилаланину через оксимную связь. В некоторых аспектах конъюгат FGF-21 представляет собой ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:4, т.е. FGF-21 с SEQ ID NO:1, в котором глутамин 109 FGF-21 дикого типа (SEQ ID NO:3) был заменен пара-ацетил-L-фенилаланином, а фрагмент ПЭГ, содержащий 681 этиленгликолевое звено, был ковалентно присоединен к пара-ацетил-L-фенилаланину через оксимную связь.

[0282] В некоторых аспектах раскрытых здесь способов конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, присутствует в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 40 мг/мл. В некоторых аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 30 мг/мл или приблизительно 40 мг/мл. В некоторых конкретных аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 10 мг/мл. В некоторых конкретных аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 20 мг/мл.

[0283] В некоторых аспектах препарат содержит приблизительно 1 мл раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, в концентрации, составляющей приблизительно 10 мг/мл. В некоторых аспектах препарат содержит приблизительно 1 мл раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, в концентрации, составляющей приблизительно 20 мг/мл.

[0284] В некоторых аспектах концентрацию раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, определяют в соответствии со

способами, известными в данной области техники, или конкретными способами, раскрытыми в разделе «Примеры» настоящей спецификации.

[0285] В некоторых аспектах раскрытых здесь способов препарат составлен для подкожного введения. В некоторых аспектах препарат составлен для подкожного введения с помощью безопасного шприца. В некоторых аспектах препарат составлен для ежедневного или еженедельного введения. В некоторых аспектах препарат представляет собой водный препарат.

[0286] Настоящим изобретением предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или S SEQ ID NO:4 (например, в концентрации 10 мг/мл или 20 мг/мл), включающий примешивание (i) гистидина в концентрации от приблизительно 10 мМ до приблизительно 50 мМ; (ii) сахарозы в концентрации от приблизительно 100 мМ до приблизительно 1М; (iii) полисорбата 80 в концентрации от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему); и (iv) ДТРА в концентрации от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 100 мкМ; причем рН препарата составляет от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,5.

[0287] Настоящим изобретением предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4 (например, в концентрации 10 мг/мл или 20 мг/мл), включающий примешивание (i) гистидина в концентрации от приблизительно 15 мМ до приблизительно 45 мМ; (ii) сахарозы в концентрации от приблизительно 200 мМ до приблизительно 900 мМ; (iii) полисорбата 80 в концентрации от приблизительно 0,02% до приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему); и (iv) ДТРА в концентрации от приблизительно 20 мкМ до приблизительно 90 мкМ; причем рН препарата составляет от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,4.

[0288] Настоящим изобретением предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4 (например, в концентрации 10 мг/мл или 20 мг/мл), включающий примешивание (i) гистидина в концентрации от приблизительно 15 мМ до приблизительно 40 мМ; (ii) сахарозы в концентрации от приблизительно 300 мМ до приблизительно 800 мМ; (iii) полисорбата 80 в концентрации от приблизительно 0,03% до приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему); и (iv) ДТРА в концентрации от приблизительно 30 мкМ до приблизительно 80 мкМ; причем рН препарата составляет от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,3.

[0289] Настоящим изобретением предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4 (например, в концентрации 10 мг/мл или 20 мг/мл), включающий примешивание (i) гистидина в концентрации от приблизительно 15 мМ до приблизительно 30 мМ; (ii) сахарозы в концентрации от приблизительно 400 мМ до приблизительно 800 мМ; (iii) полисорбата 80 в концентрации от приблизительно 0,04% до

приблизительно 0,07% (в отношении веса к объему); и (iv) ДТРА в концентрации от приблизительно 40 мкМ до приблизительно 70 мкМ; причем рН препарата составляет от приблизительно 7 до приблизительно 7,2.

[0290] Настоящим изобретением предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4 (например, в концентрации 10 мг/мл или 20 мг/мл), включающий примешивание (i) гистидина в концентрации от приблизительно 15 мМ до приблизительно 25 мМ; (ii) сахарозы в концентрации от приблизительно 500 мМ до приблизительно 700 мМ; (iii) полисорбата 80 в концентрации от приблизительно 0,04% до приблизительно 0,06% (в отношении веса к объему); и (iv) ДТРА в концентрации от приблизительно 45 мкМ до приблизительно 55 мкМ; причем рН препарата составляет от приблизительно 7 до приблизительно 7,1. В некоторых аспектах концентрацию конъюгата FGF-21 в раскрытом здесь фармацевтическом препарате измеряют с помощью угловой спектроскопии, например, спектрофотометра УФ-видимой области Agilent Cary 60, оснащенного SoloVPE Fibrette (C Technologies, Inc.; P/N OF0002-P50) (одноразовым пластиковым сосудом для УФ-излучения SoloVPE (C Technologies, Inc.; P/N OC0009-1)), при 280 нм с коэффициентом поглощения=0,87 (мл/(мг\*см)).

[0291] Настоящим изобретением также предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4 (например, в концентрации 10 мг/мл или 20 мг/мл), включающий примешивание (i) гистидина в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ; (ii) сахарозы в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ; (iii) полисорбата 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и (iv) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ; причем рН составляет приблизительно 7,1.

[0292] Настоящим изобретением также предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4 (например, в концентрации 10 мг/мл или 20 мг/мл), включающий примешивание (i) гистидина в концентрации, составляющей 20 мМ; (ii) сахарозы в концентрации, составляющей 600 мМ; (iii) полисорбата 80 в концентрации, составляющей 0,05% (в отношении веса к объему); и (iv) ДТРА в концентрации, составляющей 50 мкМ; причем рН составляет 7,1.

[0293] Настоящим изобретением предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4 (например, в концентрации 10 мг/мл или 20 мг/мл), включающий примешивание (i) гистидина в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ; и (ii) сахарозы в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ; причем рН составляет приблизительно 7,0.

[0294] Настоящим изобретением предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с

SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4 (например, в концентрации 10 мг/мл или 20 мг/мл), включающий примешивание (i) гистидина в концентрации, составляющей 20 мМ; и (ii) сахарозы в концентрации, составляющей 600 мМ; причем рН составляет 7,0.

[0295] Настоящим изобретением предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, в концентрации=приблизительно 10 мг/мл, включающий примешивание (i) гистидина в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ; (ii) сахарозы в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ; (iii) полисорбата 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и (iv) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ; причем рН составляет приблизительно 7,1.

[0296] Настоящим изобретением предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, в концентрации=приблизительно 20 мг/мл, включающий примешивание (i) гистидина в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ, (ii) сахарозы в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ; (iii) полисорбата 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и (iv) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ; причем рН составляет приблизительно 7,1.

[0297] Настоящим изобретением предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, в концентрации=приблизительно 10 мг/мл, включающий примешивание (i) гистидина в концентрации, составляющей 20 мМ; (ii) сахарозы в концентрации, составляющей 600 мМ; (iii) полисорбата 80 в концентрации, составляющей 0,05% (в отношении веса к объему); и (iv) ДТРА в концентрации, составляющей 50 мкМ; причем рН составляет 7,1.

[0298] Настоящим изобретением предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, в концентрации=приблизительно 20 мг/мл, включающий примешивание (i) гистидина в концентрации, составляющей 20 мМ; (ii) сахарозы в концентрации, составляющей 600 мМ; (iii) полисорбата 80 в концентрации, составляющей 0,05% (в отношении веса к объему); и (iv) ДТРА в концентрации, составляющей 50 мкМ; причем рН составляет 7,1.

[0299] Настоящим изобретением также предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6 (например, в концентрация 10 мг/мл или 20 мг/мл), включающий примешивание (i) гистидина в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ; (ii) сахарозы в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ; (iii) полисорбата 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и (iv) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно

50 мкМ; причем рН составляет приблизительно 7,1.

[0300] Настоящим изобретением также предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6 (например, в концентрации 10 мг/мл или 20 мг/мл), включающий примешивание (i) гистидина в концентрации, составляющей 20 мМ; (ii) сахарозы в концентрации, составляющей 600 мМ; (iii) полисорбата 80 в концентрации, составляющей 0,05% (в отношении веса к объему); и (iv) ДТРА в концентрации, составляющей 50 мкМ; причем рН составляет 7,1.

[0301] Настоящим изобретением предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6 (например, в концентрации 10 мг/мл или 20 мг/мл), включающий примешивание (i) гистидина в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ; и (ii) сахарозы в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ; причем рН составляет приблизительно 7,0.

[0302] Настоящим изобретением предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6 (например, в концентрации 10 мг/мл или 20 мг/мл), включающий примешивание (i) гистидина в концентрации, составляющей 20 мМ; и (ii) сахарозы в концентрации, составляющей 600 мМ; причем рН составляет 7,0.

[0303] Настоящим изобретением предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6, в концентрации=приблизительно 10 мг/мл, включающий примешивание (i) гистидина в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ; (ii) сахарозы в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ; (iii) полисорбата 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и (iv) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ; причем рН составляет приблизительно 7,1.

[0304] Настоящим изобретением предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6, в концентрации=приблизительно 20 мг/мл, включающий примешивание (i) гистидина в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ; (ii) сахарозы в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ; (iii) полисорбата 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и (iv) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ; причем рН составляет приблизительно 7,1.

[0305] Настоящим изобретением предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6, в концентрации=приблизительно 10 мг/мл, включающий примешивание (i) гистидина в концентрации, составляющей 20 мМ; (ii) сахарозы в концентрации, составляющей 600 мМ; (iii) полисорбата 80 в концентрации, составляющей

0,05% (в отношении веса к объему); и (iv) ДТРА в концентрации, составляющей 50 мкМ; причем рН составляет 7,1.

[0306] Настоящим изобретением предоставляется способ улучшения стабильности препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6, в концентрации=приблизительно 20 мг/мл, включающий примешивание (i) гистидина в концентрации, составляющей 20 мМ; (ii) сахарозы в концентрации, составляющей 600 мМ; (iii) полисорбата 80 в концентрации, составляющей 0,05% (в отношении веса к объему); и (iv) ДТРА в концентрации, составляющей 50 мкМ; причем рН составляет 7,1.

[0307] В некоторых вариантах осуществления концентрация отдельных наполнителей, включенных в фармацевтический препарат, (например, ДТРА, PS80, гистидина, сахарозы или их комбинаций), может быть определена/рассчитана как количество (например, вес, моли и т.д.) отдельного наполнителя, добавляемого в фармацевтический препарат в процессе его производства, на единицу конечного объема готового фармацевтического препарата. В других вариантах осуществления концентрация наполнителей, включаемых в фармацевтический препарат, (например, ДТРА, PS80, гистидина, сахарозы или их комбинаций), основана на фактическом количестве отдельного наполнителя в фармацевтическом препарате.

[0308] В некоторых аспектах раскрытые здесь способы производства включают, кроме того, перенос раскрытого здесь препарата, например, препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, в концентрации=приблизительно 10 мг/мл или приблизительно 20 мг/мл, гистидин в концентрации=20 мМ, сахарозу в концентрации=600 мМ, полисорбат 80 в концентрации=0,05% (в отношении веса к объему) и ДТРА в концентрации=50 мкМ, причем рН составляет 7,1, в контейнер. В некоторых аспектах раскрытые здесь способы производства включают, кроме того, перенос раскрытого здесь препарата, например, препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6, в концентрации=приблизительно 10 мг/мл или приблизительно 20 мг/мл, гистидин в концентрации=20 мМ, сахарозу в концентрации=600 мМ, полисорбат 80 в концентрации=0,05% (в отношении веса к объему) и ДТРА в концентрации=50 мкМ, причем рН составляет 7,1, в контейнер. В некоторых аспектах контейнер представляет собой флакон. В некоторых аспектах контейнер представляет собой пакет, например, пакет типа раковины. В некоторых аспектах пакет, например пакет типа раковины, имеет объем от 6 л до 12 л. В некоторых аспектах контейнер представляет собой шприц. В некоторых аспектах шприц представляет собой безопасный шприц. В некоторых аспектах шприц представляет собой предварительно наполняемый шприц. В некоторых аспектах шприц представляет собой предварительно наполняемый шприц BD Неорак™. В некоторых аспектах контейнер представляет собой устройство для самостоятельной инъекции. В некоторых аспектах приблизительно 1 мл препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2

или SEQ ID NO:4, в концентрации приблизительно 10 мг/мл или приблизительно 20 мг/мл помещается в контейнер (например, флакон, шприц или устройство для самостоятельной инъекции). В некоторых аспектах приблизительно 1 мл препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6, в концентрации приблизительно 10 мг/мл или приблизительно 20 мг/мл помещается в контейнер (например, флакон, шприц или устройство для самостоятельной инъекции). В некоторых аспектах контейнер содержит несколько доз, например, несколько доз по 1 мл.

### **III. Способы лечения**

[0309] Настоящим изобретением также предоставляются способы лечения или предотвращения заболевания или состояния, связанного с фиброзом и/или диабетом, у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.

[0310] В некоторых аспектах заболевание или состояние представляет собой диабет, например, диабет 2 типа. В некоторых аспектах заболевание или состояние представляет собой неалкогольный стеатогепатит (NASH).

[0311] В некоторых аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может использоваться в способах лечения или предотвращения, раскрытых здесь, в количестве от приблизительно 1 мг до приблизительно 40 мг в каждой дозе (например, 1-мл дозе или кратной ей дозе). В некоторых аспектах количество конъюгата FGF-21 в каждой дозе основано на измерении с помощью угловой спектроскопии, например, спектрофотометра УФ-видимой области Agilent Cary 60, оснащенного SoloVPE Fibrette (C Technologies, Inc.; P/N OF0002-P50) (одноразовым пластиковым сосудом для УФ-излучения SoloVPE (C Technologies, Inc.; P/N OC0009-1)), при 280 нм с коэффициентом поглощения=0,87 (мл/(мг\*см)). В некоторых аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может использоваться в способах лечения или предотвращения, раскрытых здесь, в количестве от приблизительно 1 мг до приблизительно 5 мг в каждой дозе, или от приблизительно 5 мг до приблизительно 10 мг в каждой дозе, или от приблизительно 10 мг до приблизительно 15 мг в каждой дозе, или от приблизительно 15 мг до приблизительно 20 мг в каждой дозе, или от приблизительно 20 мг до приблизительно 25 мг в каждой дозе, или от приблизительно 25 мг до приблизительно 30 мг в каждой дозе, или от приблизительно 30 мг до приблизительно 35 мг в каждой дозе, или от приблизительно 35 мг до приблизительно 40 мг в каждой дозе (например, 1-мл дозе или кратной ей дозе). В некоторых аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может использоваться в способах лечения или предотвращения, раскрытых здесь, в количестве, превышающем 40 мг в каждой дозе (например, 1-мл дозе или кратной ей дозе). В некоторых аспектах доза является фиксированной дозой.

[0312] В некоторых аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-

FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может использоваться в способах лечения или предотвращения, раскрытых здесь, в количестве, составляющем приблизительно 1 мг, приблизительно 2 мг, приблизительно 3 мг, приблизительно 4 мг, приблизительно 5 мг, приблизительно 6 мг, приблизительно 7 мг, приблизительно 8 мг, приблизительно 9 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 11 мг, приблизительно 12 мг, приблизительно 13 мг, приблизительно 14 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 16 мг, приблизительно 17 мг, приблизительно 18 мг, приблизительно 19 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 21 мг, приблизительно 22 мг, приблизительно 23 мг, приблизительно 24 мг, приблизительно 25 мг, приблизительно 26 мг, приблизительно 27 мг, приблизительно 28 мг, приблизительно 29 мг, приблизительно 30 мг, приблизительно 31 мг, приблизительно 32 мг, приблизительно 33 мг, приблизительно 34 мг, приблизительно 35 мг, приблизительно 36 мг, приблизительно 37 мг, приблизительно 38 мг, приблизительно 39 мг или приблизительно 40 мг в каждой дозе. В конкретных аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может использоваться в способах лечения или предотвращения, раскрытых здесь, в количестве, составляющем приблизительно 10 мг в каждой дозе (например, 1-мл дозе или кратной ей дозе). В конкретных аспектах раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может использоваться в способах лечения или предотвращения, раскрытых здесь, в количестве, составляющем приблизительно 20 мг в каждой дозе (например, 1-мл дозе или кратной ей дозе). В некоторых аспектах доза представляет собой фиксированную дозу.

[0313] В некоторых аспектах фармацевтический препарат вводят подкожно, например, используя безопасный шприц или автоинжектор. В некоторых аспектах фармацевтический препарат вводят ежедневно или еженедельно.

[0314] В некоторых аспектах введение субъекту эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, уменьшает жесткость печени, снижает процентное содержание жира в организме, уменьшает вес тела, уменьшает отношение веса печени к весу тела, снижает содержание липидов в печени, уменьшает площадь фиброза в печени, снижает уровни глюкозы в крови натощак, снижает уровни триглицеридов натощак, снижает уровни холестерина LDL, снижает уровни ApoB, снижает уровни ApoC, повышает уровни холестерина HDL или вызывает любую их комбинацию.

[0315] В некоторых аспектах введение субъекту фармацевтического препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, в соответствии с раскрытыми здесь способами лечения приводит к следующему: (i) снижению уровня жира в печени; (ii) снижению уровня повреждения печени; (iii) снижению уровня фиброза; (iv) снижению уровней биомаркера фиброза Pro-C3 (N-концевого пропептида коллагена III типа) в сыворотке; (v) снижению уровней аланинаминотрансферазы (ALT); (vi) снижению уровней аспаратаминотрансферазы

(AST); (vii) повышению уровней адипонектина в сыворотке; (viii) снижению уровней LDL в плазме; (ix) повышению уровней HDL в плазме; (x) снижению уровней триглицеридов в плазме; (xi) уменьшению степени жесткости печени; или (xii) вызову любой их комбинации; по сравнению с уровнями у не подвергнутых лечению субъектов или у субъекта до введения фармацевтического препарата.

[0316] Настоящим изобретением предоставляется способ лечения заболевания, связанного с фиброзом, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту, эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.

[0317] В некоторых аспектах заболевание, связанное с фиброзом, может поражать орган или ткань, такое(ую) как поджелудочная железа, легкое, сердце, почка, печень, глаза, нервная система, костный мозг, лимфатические узлы, эндомиокард или брюшинное пространство. В некоторых аспектах заболевание, связанное с фиброзом, может быть фиброзом печени или предциррозным состоянием. В некоторых аспектах заболевание, связанное с фиброзом, может быть выбрано из: неалкогольного стеатогепатита (NASH), цирроза печени, диффузного паренхиматозного заболевания легких, кистозного фиброза, легочного фиброза, прогрессирующего массивного фиброза, идиопатического легочного фиброза, фиброза после инъекций, почечного фиброза, хронической болезни почек, диабетической болезни почек, фокально-сегментарного гломерулосклероза, мембранозной нефропатии, IgA-нефропатии, миелофиброза, сердечной недостаточности, острой сердечной недостаточности, хронической сердечной недостаточности, связанной с метаболическими изменениями сердечной недостаточности, сердечного фиброза, фиброза при катаракте, катаракты, рубцевания роговицы, фиброза поджелудочной железы, фиброза кожи, фиброза кишечника, сужений просвета кишечника, эндомиокардиального фиброза, фиброза предсердий, медиастинального фиброза, болезни Крона, ретроперитонеального фиброза, келоида, нефрогенного системного фиброза, склеродермии, системного склероза, артрофиброза, болезни Пейрони, контрактуры Дюпюитрена, диабетической невропатии, адгезивного капсулита, алкогольной болезни печени, гепатостеатоза, вирусного гепатита, заболевания желчевыводящих путей, первичного гемохроматоза, связанного с лекарственными средствами цирроза, криптогенного цирроза, болезни Вильсона и дефицита альфа-1-антитрипсина, интерстициального заболевания легких (ILD), фиброза легких человека, фиброза печени, дегенерации желтого пятна, ретинопатии сетчатки, витреоретинопатии, миокардиального фиброза, офтальмопатии Грейвса, вызванного лекарственными средствами эрготизма, сердечнососудистого заболевания, атеросклероза/рестеноза, гипертрофических рубцов, первичного или идиопатического миелофиброза и воспалительного заболевания кишечника (включая, но без ограничения этим, коллагеновый колит). В некоторых аспектах заболевание, связанное с фиброзом, возникает в результате одного или более из заболевания легких, рака легкого, фармакотерапии, химиотерапии или лучевой терапии. В некоторых аспектах заболевание,

связанное с фиброзом, возникает в результате одного или более из старения, сердечного приступа, инсульта, повреждения миокарда или дисфункции левого желудочка. В некоторых аспектах заболевание, связанное с фиброзом, может быть выбрано из почечного фиброза, гломерулярного нефрита, хронического заболевания почек, хронической почечной недостаточности и нефрита, связанного с системной волчанкой, раком, физическими обструкциями, токсинами, нарушением обмена веществ, иммунологическими заболеваниями или диабетической нефропатией. В некоторых аспектах заболевание, связанное с фиброзом, возникает в результате одного или более из травмы, повреждения позвоночника, инфекции, хирургического вмешательства, ишемического повреждения, сердечного приступа, ожогов, воздействия загрязнителей окружающей среды, пневмонии, туберкулеза или острого респираторного дистресс-синдрома. В некоторых аспектах заболевание, связанное с фиброзом, может быть выбрано из легочного фиброза, интерстициального заболевания легких, фиброза легких человека, идиопатического фиброза легких, фиброза печени, сердечного фиброза, миокардиального фиброза, дегенерации желтого пятна, ретинопатии сетчатки, витреоретинопатии, офтальмопатии Грейвса, вызванного лекарственными средствами эрготизма, сердечнососудистого заболевания, атеросклероза/рестеноза, келоидов и гипертрофических рубцов, первичного или идиопатического миелофиброза, воспалительного заболевания кишечника, коллагенового колита, рубцевания роговицы и фиброза при катаракте. В некоторых аспектах заболевание, связанное с фиброзом, может быть выбрано из NASH, фиброза печени и цирроза. В некоторых аспектах заболевание, связанное с фиброзом, может представлять собой NASH. В некоторых аспектах заболевание, связанное с фиброзом, может быть выбрано из диабетической болезни почек, хронического заболевания почек и почечного фиброза. В некоторых аспектах заболевание, связанное с фиброзом, может быть выбрано из связанной с метаболическими изменениями сердечной недостаточности и сердечного фиброза. В некоторых аспектах заболевание, связанное с фиброзом, может представлять собой фиброз легких.

[0318] В некоторых аспектах настоящим изобретением предоставляется способ уменьшения доли жира в печени у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, причем необязательно субъект подвержен риску развития NASH, или у него диагностирован NASH.

[0319] В некоторых аспектах настоящим изобретением предоставляется способ уменьшения жесткость печени, снижения процентного содержания жира в организме, уменьшения веса тела, уменьшения отношения веса печени к весу тела, снижения содержания липидов в печени, уменьшения площади фиброза в печени, снижения уровней глюкозы в крови натощак, снижения уровней триглицеридов натощак, снижения уровней холестерина LDL, снижения уровней ApoB, снижение уровней ApoC и/или повышение уровней холестерина HDL у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение

субъекту эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, причем необязательно субъект подвержен риску развития NASH, или у него диагностирован NASH.

[0320] В некоторых аспектах настоящим изобретением предоставляется способ повышения уровней адипонектина у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, причем необязательно указанный субъект подвержен риску развития NASH, или у него диагностирован NASH.

[0321] В некоторых аспектах настоящим изобретением предоставляется способ лечения одного или более симптомов, связанных с NASH, у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.

[0322] Здесь также предоставляются способы лечения или предотвращения NASH у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества раскрытого здесь фармацевтического препарата, содержащего вариант полипептида FGF-21, включающий SEQ ID NO:1, не встречающийся в природе остаток п-ацетилфенилаланин которого связан оксимной связью с фрагментом ПЭГ с молекулярной массой от приблизительно 28 кДа до приблизительно 32 кДа. В некоторых аспектах не встречающийся в природе п-ацетилфенилаланин заменяет глутамин 109 в FGF-21 дикого типа (SEQ ID NO:3). В некоторых аспектах фрагмент ПЭГ имеет молекулярную массу, составляющую приблизительно 30 кДа. В некоторых аспектах фрагмент ПЭГ содержит от приблизительно 600 до приблизительно 800 этиленгликолевых звеньев. В некоторых аспектах фрагмент PEG представляет собой ПЭГ<sub>681</sub>.

[0323] В некоторых конкретных аспектах настоящим изобретением предоставляются способы лечения или предотвращения NASH у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества раскрытого здесь фармацевтического препарата, содержащего конъюгат FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.

[0324] В некоторых аспектах субъект может иметь стадию 1-3 фиброза в соответствии с системой оценки CRN NASH, которая необязательно определяется с помощью биопсии печени. В некоторых аспектах до лечения субъект может иметь индекс жировой дистрофии печени, равный по крайней мере приблизительно 60. В некоторых аспектах, до лечения субъект может иметь процентное содержание жира в печени, составляющее по крайней мере 10%, что необязательно определяется с помощью магнитно-резонансной томографии.

[0325] В некоторых аспектах настоящим изобретением предоставляется способ

лечения диабета типа I или диабета типа 2 у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.

[0326] В некоторых аспектах настоящим изобретением предоставляется способ лечения ожирения у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.

[0327] В некоторых аспектах настоящим изобретением предоставляется способ регулирования по крайней мере одного из гомеостаза глюкозы и липидного гомеостаза, поглощения глюкозы, экспрессии GLUT 1 и/или концентраций глюкозы, триглицеридов, инсулина или глюкагона в сыворотке у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.

[0328] В некоторых аспектах настоящим изобретением предоставляется способ повышения чувствительности к инсулину, повышения уровней адипонектина, снижения уровней глюкозы в крови, снижения уровней глюкагона, снижения уровней триглицеридов, снижения уровней фруктозамина, снижения уровней холестерина липопротеинов низкой плотности, или снижение уровней С-реактивного белка у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.

[0329] В некоторых аспектах настоящим изобретением предоставляется способ лечения состояния или нарушения, выбранного из ожирения, диабета, панкреатита, устойчивости к инсулину, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, метаболического синдрома, нарушения толерантности к глюкозе, несоответствующего клиренса глюкозы, высокого уровня глюкозы в крови и синдрома Прадера-Вилли, у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.

[0330] В некоторых аспектах настоящим изобретением предоставляется способ лечения связанного с инсулином состояния или нарушения, выбранного из устойчивости к инсулину типа А, устойчивости к инсулину типа С (также известной как синдром HAIR-AN), синдрома Рабсона-Менденхолла, синдрома Донохью или лепреучанизма, гиперандрогении, гирсутизма или акантокератодермии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.

[0331] В некоторых аспектах фармацевтические препараты, содержащие раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, могут вводиться с помощью инъекции. В некоторых аспектах фармацевтические препараты, содержащие раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, могут вводиться с помощью подкожной инъекции, внутривенной инъекции, внутривенной инъекции или внутримышечной инъекции, например, используя шприц (такой как безопасный шприц) или автоинжектор.

[0332] В некоторых аспектах фармацевтические препараты, содержащие раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, могут вводиться с частотой приблизительно один раз в день или реже, чем приблизительно один раз в день. В некоторых аспектах фармацевтические препараты, содержащие раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, могут вводиться с частотой приблизительно два раза в неделю или реже, чем приблизительно два раза в неделю. В некоторых аспектах фармацевтические препараты, содержащие раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, могут вводиться с частотой приблизительно один раз в неделю или реже, чем приблизительно два раза в неделю. В некоторых аспектах фармацевтические препараты, содержащие раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, могут вводиться с частотой приблизительно один раз в две недели или реже, чем приблизительно два раза в неделю.

[0333] В некоторых аспектах фармацевтические препараты, содержащие раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, могут вводиться с частотой приблизительно один раз в три недели или реже, чем приблизительно два раза в неделю.

[0334] В некоторых аспектах фармацевтические препараты, содержащие раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, могут вводиться с частотой приблизительно один раз в месяц или реже, чем приблизительно один раз в месяц.

[0335] В некоторых аспектах фармацевтические препараты, содержащие раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, могут вводиться с частотой один раз на четыре недели.

[0336] В некоторых аспектах фармацевтические препараты, содержащие раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, могут вводиться с частотой приблизительно один раз в день.

[0337] В некоторых аспектах фармацевтические препараты, содержащие раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, могут вводиться с частотой приблизительно один раз в неделю.

[0338] В некоторых аспектах фармацевтические препараты, содержащие раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, могут вводиться в количестве, выбранном из приблизительно 1 мг, приблизительно

2 мг, приблизительно 5 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 25 мг, приблизительно 30 мг, приблизительно 35 мг, приблизительно 40 мг, приблизительно 45 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 55 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 65 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 75 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 85 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 95 и приблизительно 100 мг раскрытого здесь конъюгата FGF-21 в каждой дозе. В конкретных аспектах фармацевтические препараты, содержащие раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, могут вводиться в количестве, составляющем приблизительно 10 мг/дозе (например, 1-мл дозе или кратной ей дозе). В конкретных аспектах фармацевтические препараты, содержащие раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, могут вводиться в количестве, составляющем приблизительно 20 мг/дозе (например, 1-мл дозе или кратной ей дозе). В некоторых аспектах доза является фиксированной дозой.

[0339] Например, фармацевтический препарат, содержащий раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может вводиться субъекту в концентрации от приблизительно 0,1 до 100 мг/кг веса тела субъекта-реципиента. В некоторых аспектах фармацевтический препарат, содержащий раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может вводиться субъекту в концентрации раскрытого здесь конъюгата FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, составляющей приблизительно 0,5-5 мг/кг веса тела субъекта-реципиента. В другом аспекте фармацевтический препарат, содержащий раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, может вводиться субъекту-реципиенту с частотой от одного раза в день до одного раза в две недели, например, приблизительно один или два раза в неделю, один раз каждые два дня, один раз каждые три дня, один раз каждые четыре дня, один раз каждые пять дней или один раз каждые шесть дней.

[0340] Фармацевтические препараты по настоящему изобретению, т.е. препараты, содержащие раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, могут вводиться любым традиционным способом, подходящим для белков или пептидов, в том числе, но без ограничения этим, парентерально, например, с помощью инъекций, в том числе, но без ограничения этим, подкожно или внутривенно, или любой другой формы инъекций или инфузий. В некоторых аспектах фармацевтический препарат может вводиться, используя шприц, например безопасный шприц. В некоторых аспектах фармацевтический препарат может вводиться, используя автоинжектор.

#### **IV. Изделия и наборы**

[0341] Настоящим изобретением также предоставляется изделие или набор, включающее(ий) (i) фармацевтический препарат FGF-21, содержащий раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, и (ii)

инструкции по применению. В некоторых аспектах изделие или набор может включать контейнер. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и пробирки. В некоторых аспектах контейнер может быть изготовлен из различных материалов, таких как стекло, пластик или металлы. В некоторых аспектах в контейнере содержится фармацевтический препарат, например, жидкий препарат, содержащий раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4. В некоторых аспектах в контейнере содержится фармацевтический препарат, например, жидкий препарат, содержащий раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6.

[0342]

[0343] На этикетке на контейнере или на связанной с контейнером этикетке могут быть представлены инструкции по восстановлению и/или применению. Например, на этикетке может быть указано, что фармацевтический препарат, содержащий раскрытый здесь конъюгат FGF-21, например, ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, должен быть разведен до концентраций белка, описанной выше. На этикетке может быть дополнительно указано, что препарат является препаратом для подкожного введения, применимым или предназначенным для подкожного введения.

[0344] В некоторых аспектах контейнер, в котором содержится препарат, может представлять собой флакон для многократного применения, который делает возможными повторные введения (например, от 2 до 6 введений или более), например, препарата для подкожного введения. В качестве альтернативы контейнер может представлять собой предварительно наполненный шприц, содержащий, например, препарат для подкожного введения.

[0345] Изделие или набор может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий, например, растворитель. Изделие может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включающие другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковки, вместе с инструкциями по применению. В некоторых аспектах набор или изделие включает шприц (например, безопасный шприц). В некоторых аспектах набор или изделие включает автоинжектор.

[0346] Следует понимать, что раздел «Подробное описание настоящего изобретения», а не разделы «Краткое изложение сущности настоящего изобретения» и «Реферат», предназначен для использования для толкования формулы изобретения. Разделы «Краткое изложение сущности настоящего изобретения» и «Реферат», могут излагать один или более, но не все приводимые в качестве примера аспекты настоящего изобретения, как это предполагалось авторами настоящего изобретения, и, таким образом, никоим образом не предназначены для ограничения настоящего изобретения и прилагаемой формулы изобретения.

[0347] Настоящее изобретение было описано выше с помощью функциональных компоновочных блоков, иллюстрирующих реализацию заданных функций и их

взаимосвязей. Границы этих функциональных компоновочных блоков были определены здесь произвольно для удобства описания. Альтернативные границы могут быть определены при условии, что заданные функции и их взаимосвязи исполняются надлежащим образом.

[0348] Предшествующее описание конкретных аспектов настолько полно раскрывает общий характер раскрытия, что другие могут, применяя знания в рамках данной области техники, легко модифицировать и/или адаптировать для различных приложений такие конкретные аспекты без чрезмерного экспериментирования, не выходя за рамки общей идеи настоящего раскрытия. Поэтому предполагается, что такие адаптации и модификации находятся в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых аспектов, основанных на идеях и рекомендациях, представленных здесь. Следует понимать, что фразеология или терминология здесь предназначена для целей описания, а не ограничения, так что терминология или фразеология настоящей спецификации должны интерпретироваться специалистом в данной области техники в свете указанных идей и рекомендаций.

[0349] Широта и объем настоящего изобретения не должны ограничиваться каким-либо из вышеописанных, приводимых в качестве примера аспектов, а должны определяться только в соответствии со следующей формулой изобретения и ее эквивалентами.

[0350] Содержание всех приведенных ссылок (включающих литературные ссылки, патенты, заявки на патенты и веб-сайты), которые могут приводиться на протяжении этой заявки, таким образом прямо включено посредством ссылки во всей их полноте для любых целей, как и приведенные в них ссылки.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1**

#### **Разработка препарата ПЭГ-FGF-21**

[0351] Для начальных исследований готовили ПЭГ-FGF-21 в концентрации 7,5 мг/мл в 20 mM Tris, 250 mM сахарозе, pH 8,3. Высокие скорости дезамидирования, наблюдаемые в этом препарате, привели к необходимости хранения готовой лекарственной формы в замороженном виде при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Поэтому была проведена дополнительная работа по разработке готового к применению (RTU) препарата, позволяющего хранить готовую лекарственную форму при  $2-8^{\circ}\text{C}$ .

[0352] ПЭГ-FGF-21 (SEQ ID NO:2) получали путем присоединения линейного фрагмента ПЭГ с М.м. 30 кДа, содержащего дистальную метоксигруппу, как показано на фиг. 6, к варианту FGF-21 (SEQ ID NO:1) сайт-специфическим образом, что приводило к структуре молекулярного конъюгата, показанной на фиг. 6, в которой пара-ацетилфенилаланин имеет L-конформацию. Для достижения сайт-специфического ПЭГилирования активированный ПЭГ подвергали реакции способами, известными в данной области техники, с не встречающейся в природе аминокислотой, пара-ацетил-L-фенилаланином (pAF), в положении 109 молекулы FGF-21 с образованием химически

стойкого конъюгата ПЭГ с белком, связанных через оксимную связь. Активированный ПЭГ коммерчески доступен из многих источников, в том числе, например, от Nirron Oil & Fats Co., Ltd., Токуо, Япония.

[0353] Было установлено, что более низкий рН препарата увеличивает скорости агрегации молекулы, в то время как более высокий рН препарата увеличивает скорости дезамидирования. Было обнаружено, что при целевой концентрации белка=10 мг/мл рН 7,0 обеспечивается наилучший баланс между скоростями агрегации и дезамидирования. Было установлено, что увеличение концентрации сахарозы дополнительно стабилизирует молекулу, придавая ей устойчивость к агрегации.

[0354] Выбранный для дальнейших исследований препарат представлял собой 10 мг/мл ПЭГ-FGF-21 в 20 мМ гистидине, 600 мМ сахарозе, рН 7,0. Учитывая предполагаемую недельную дозу=20 мг на пациента, была разработана готовая лекарственная форма с более высокой концентрацией в предварительно наполненном шприце. Для получения готовой лекарственной формы с более высокой концентрацией была необходима дальнейшая оптимизация препарата.

[0355] Первоначальная разработка препарата с более высокой концентрацией проводилась в 3 мл стеклянных флаконах типа I. При перемешивании ПЭГ-FGF-21 с концентрацией 15 мг/мл и 22 мг/мл в 20 мМ L-гистидине, 600 мМ сахарозе, рН 7,0 наблюдали захват пузырьков воздуха, и растворы становились все более мутными (фиг. 5, левое изображение). В попытке уменьшить проблему использовали полисорбат 80. Полисорбат 80 был способен предотвратить захват пузырьков воздуха (фиг. 5, правые изображения). Поэтому полисорбат 80 добавляли в концентрации 0,05% (в отношении веса к объему) к препарату с высокой концентрацией ПЭГ-FGF-21.

[0356] Окисление является критическим признаком качества ПЭГ-FGF-21, и окисление метионина-169 вблизи С-конца отменяет связывание с рецептором и, таким образом, активность молекулы. Катализируемое металлами окисление является одним из механизмов, с помощью которых может окисляться белок. Ультрамалые концентрации металлов могут присутствовать в препарате белка из-за переноса из клеточной культуры, контакта с сосудами из нержавеющей стали, примесей в наполнителях, процесса приготовления предварительно наполняемых шприцев и т.д.

[0357] Для проверки того, чувствителен ли ПЭГ-FGF-21 к катализируемому металлами окислению, образцы с добавлением и без добавления коктейля металлов (250 частей на миллион Fe, 10 частей на миллион Cu, 15 частей на миллион Cr, 15 частей на миллион Ni, 10 частей на миллион Mo) в присутствии или в отсутствие 0,05 мМ триамина пентауксусной кислоты (диэтилентриамина пентауксусной кислоты, ДТРА) инкубировали в течение одного месяца при 25°C и в течение двух недель при 40°C, соответственно, и определяли уровни окисления метионина 1 и метионина 169 посредством картирования триптических пептидов (фиг. 2А и 2В).

[0358] В отсутствие триамина пентауксусной кислоты (ДТРА) значительное окисление обоих остатков метионина наблюдалось даже в образцах без добавления

металла, в то время как в образцах с добавлением коктейля металлов уровни окисления были даже выше. В образцах с 50 мкМ триамина пентауксусной кислоты не наблюдалось увеличения уровней окисления ни для одного из метионинов. Это говорит о том, что ПЭГ-FGF-21 чувствителен к катализируемому металлами окислению, и что в препарате уже присутствуют ультрамалые уровни металлов. Триамин пентауксусной кислоты эффективно образовывал комплексы с металлами, присутствующими в препарате, а также дополнительные металлы, добавленные в препарат, и предотвращал катализируемое металлами окисление метионинов 1 и 169. Поэтому 50 мкМ триамин пентауксусной кислоты добавляли в препарат с высокой концентрацией ПЭГ-FGF-21.

[0359] Для оптимизации pH препарата с более высокой концентрацией были рассмотрены данные об агрегации ПЭГ-FGF-21, собранные при значениях pH от 6,3 до 8,5, показывающие, что скорости агрегации быстро увеличиваются при pH ниже 6,8 (фиг. 3А и 3В). Поэтому целевое значение pH для препарата с высокой концентрацией было увеличено с pH 7,0 до pH 7,1.

[0360] Для сравнения препарата с высокой концентрацией с предыдущим препаратом, ПЭГ-FGF-21 в концентрации 20 мг/мл в 20 мМ L-гистидине, 600 мМ сахарозе, 0,05 мМ триамине пентауксусной кислоты, 0,05% (в отношении веса к объему) полисорбата 80, pH 7,0 (до оптимизации pH) размещали для определения стабильности и сравнивали с ПЭГ-FGF-21 в концентрации 22,5 мг/мл в 20 мМ L-гистидине, 600 мМ сахарозе, pH 7,0.

[0361] Как показано на фиг. 4А и 4В, фиг. 1А и 1В, добавление полисорбата 80 и триамина пентауксусной кислоты к препарату ПЭГ-FGF-21 приводило к снижению скоростей агрегации при всех температурах и меньшему дезамидированию при 40°C.

### **Способы проверки**

[0362] *Агрегация:* Агрегацию исследовали с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии на имеющейся в продаже системе (например, системе ВЭЖХ серии Agilent Technologies 1100 с детектором PDA или ВЭЖХ серии Waters Alliance e2695 с детектором PDA), оснащенной имеющейся в продаже аналитической колонкой (гель G3000SWXL Tosoh TSK, 7,8×300 мм, P/N: 08541). Подвижную фазу из 95% фосфатно-солевого буфера (PBS) и 5% этанола со скоростью потока 0,8 мл/мин использовали для отделения высокомолекулярных объектов от мономера белка. Образцы разводили до концентрации белка=0,5 мг/мл с помощью PBS, и вводили 0,01 мг (0,02 мл) в случае каждого эксперимента. Количество агрегата определяли путем деления площади пиков, соответствующих высокомолекулярным объектам, на общую площадь всех наблюдаемых пиков, используя приборное программное обеспечение.

[0363] *Дезамидирование:* Дезамидирование исследовали с помощью анионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии на имеющейся в продаже системе (например, системе ВЭЖХ серии Agilent Technologies 1100 с детектором PDA или ВЭЖХ серии Waters Alliance e2695 с детектором PDA), снабженной имеющейся

в продаже аналитической колонкой (Agilent Bio WAX, непористой, колонка 5 мкм, 4,6×250 мм, P/N: 5190-2487). Подвижная фаза А состояла из 20 mM Tris, pH 8,2, а подвижная фаза В состояла из 20 mM Tris, 500 mM хлорида натрия, pH 8,2. Для разделения заряженных вариантов белка использовали линейный градиент от 2% В до 67% В в течение 20 минут со скоростью потока 1,0 мл/мин. Образцы разводили подвижной фазой А до концентрации белка=1 мг/мл, и вводили 0,075 мг (0,075 мл) в случае каждого эксперимента. Степень дезамидирования определяли путем деления площади пиков, соответствующих кислым вариантам, на общую площадь всех наблюдаемых пиков, используя приборное программное обеспечение.

[0364] *Окисление*: Окисление исследовали посредством картированием триптических пептидов. После расщепления образцов белка трипсином полученные в результате пептиды разделяли с помощью сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой на имеющейся в продаже системе (например, системе UPLC (СВЭЖХ) Waters Acquity), снабженной имеющейся в продаже аналитической колонкой (колонкой С18 ВЕН Peptide для СВЭЖХ с обращенной фазой, Waters Acquity, 2,1×150 мм, размер частиц 1,7 мкм, размер пор 130-А (артикул: 186003556)). Подвижная фаза А состояла из 0,2% трифторуксусной кислоты (ТФА) в воде, а подвижная фаза В состояла из 0,2% ТФА в ацетонитриле. Для разделения триптических пептидов использовали сложный градиент от 10% В до 40% В в течение 27 минут при температуре 60°C и скорости потока 0,3 мл/мин. Степень окисления определяли путем деления площади пиков, соответствующих окисленным пептидам, на общую площадь пиков, соответствующих окисленным и неокисленным пептидам, используя приборное программное обеспечение.

[0365] Образование (макро)частиц и образование пузырьков воздуха: визуальное наблюдение.

[0366] *Концентрация ПЭГ-FGF-21*: Концентрацию ПЭГ-FGF-21 в раскрытых здесь фармацевтических препаратах измеряли с помощью угловой спектроскопии, например, на спектрофотометра УФ-видимой области Agilent Cary 60, оснащенном SoloVPE Fibrette (C Technologies, Inc.; P/NOF0002-P50) (одноразовым пластиковым сосудом для УФ-излучения SoloVPE (C Technologies, Inc.; P/N OC0009-1)), при 280 нм с коэффициентом поглощения=0,87 (мл/(мг\*см)). Величины доз ПЭГ-FGF-21 в описании настоящего изобретения основаны на фармацевтических препаратах, измеренных таким образом. Угловая спектроскопия также применима к любым конъюгатам FGF-21 в целом, а не только к ПЭГ-FGF-21.

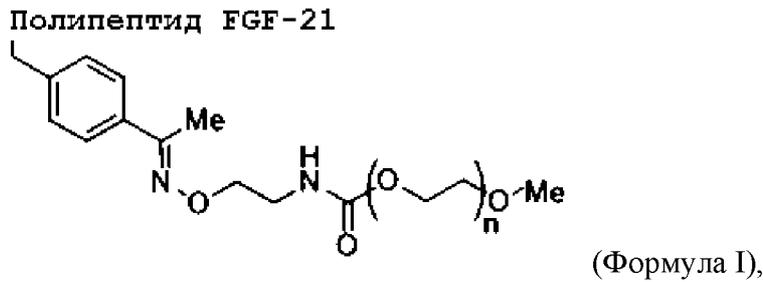
[0367] *Определение pH*: pH определяли в соответствии со стандартными способами (USP<791>).

[0368] *Концентрация наполнителей*. Концентрацию отдельных наполнителей в раскрытом здесь фармацевтическом препарате (например, ДТРА, PS80, гистидина, сахарозы), определяли/рассчитывали как количество (вес, моли и т.д.) отдельного наполнителя, добавляемое в фармацевтический препарат в ходе его производства на

единицу конечного объема готового фармацевтического препарата. В качестве альтернативы концентрация наполнителей может основываться на фактическом количестве отдельного наполнителя в фармацевтическом препарате.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтический препарат, содержащий (i) полипептид в виде фактора роста фибробластов 21 (FGF-21), конъюгированный с фрагментом полиэтиленгликоля (ПЭГ) («конъюгат FGF-21»), и (ii) комплексон для катионов в виде аминополикарбонической кислоты, причем препарат обладает улучшенной стабильностью по сравнению с эталонным препаратом, который не содержит комплексон для катионов в виде аминополикарбонической кислоты, причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:



и где  $n$  является любым целым числом.

2. Фармацевтический препарат по п. 1, в котором фрагмент ПЭГ конъюгирован с не встречающейся в природе аминокислотой в полипептиде FGF-21.

3. Фармацевтический препарат по п. 1 или 2, в котором не встречающаяся в природе аминокислота в полипептиде FGF-21 представляет собой производное фенилаланина.

4. Фармацевтический препарат по п. 3, в котором производное фенилаланина представляет собой пара-ацетил-L-фенилаланин.

5. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-4, в котором полипептид FGF-21 включает аминокислотную последовательность, идентичную на по крайней мере приблизительно 80%, по крайней мере приблизительно 85%, по крайней мере приблизительно 90%, по крайней мере приблизительно 95%, по крайней мере приблизительно 96%, по крайней мере приблизительно 97%, по крайней мере приблизительно 98% или по крайней мере приблизительно 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3, причем этот полипептид обладает активностью FGF-21.

6. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 2-5, в котором не встречающаяся в природе аминокислота находится в положении 109 аминокислотного остатка, соответствующем SEQ ID NO:3.

7. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-6, в котором полипептид FGF-21 включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:1.

8. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-7, в котором конъюгат FGF-21 соответствует соединению с SEQ ID NO:2.

9. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-8, в котором  $n$  составляет от приблизительно 500 до приблизительно 900 этиленгликолевых звеньев, от приблизительно 600 до приблизительно 800 этиленгликолевых звеньев, от приблизительно 650 до приблизительно 750 этиленгликолевых звеньев или от приблизительно 670 до приблизительно 690 этиленгликолевых звеньев.

10. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-9, в котором n составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681.

11. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-10, в котором конъюгат FGF-21 соответствует соединению с SEQ ID NO:4.

12. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-11, в котором конъюгат FGF-21 находится в L-конформации.

13. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-12, в котором конъюгат FGF-21 присутствует в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 40 мг/мл.

14. Фармацевтический препарат по п. 13, в котором конъюгат FGF-21 присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 10 мг/мл или приблизительно 20 мг/мл.

15. Фармацевтический препарат по п. 14, в котором конъюгат FGF-21 присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 20 мг/мл.

16. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-15, в котором конъюгат FGF-21 присутствует в количестве от приблизительно 1 мг до приблизительно 40 мг в стандартной дозе.

17. Фармацевтический препарат по п. 16, в котором конъюгат FGF-21 присутствует в количестве, составляющем приблизительно 1 мг в стандартной дозе, приблизительно 5 мг в стандартной дозе, приблизительно 10 мг в стандартной дозе, приблизительно 20 мг в стандартной дозе или приблизительно 40 мг в стандартной дозе.

18. Фармацевтический препарат по п. 16, в котором конъюгат FGF-21 присутствует в количестве, составляющем приблизительно 10 мг или приблизительно 20 мг в стандартной дозе.

19. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-18, который демонстрирует одно или более из следующего:

(a) более низкую скорость дезамидирования полипептида при хранении при 40°C в течение приблизительно месяца относительно эталонного препарата;

(b) более низкую скорость агрегации высокомолекулярного (HMW) полипептида при хранении при 40°C в течение приблизительно месяца относительно эталонного препарата; или

(c) как (a), так и (b).

20. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-19, в котором комплексон для катионов в виде аминополикарбоновой кислоты предотвращает или уменьшает окисление одного или более метионинов.

21. Фармацевтический препарат по п. 20, в котором метионины соответствуют Met1 и/или Met169 полипептида FGF-21.

22. Фармацевтический препарат по п. 20 или 21, в котором окисление метионинов предотвращается или уменьшается при 25°C и/или 40°C.

23. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-22, в котором комплексон для катионов в виде аминополикарбоновой кислоты представляет собой диэтилентриаминпентауксусную кислоту (ДТРА).

24. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-23, в котором комплексон для катионов в виде ДТРА присутствует в количестве от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 100 мкМ ДТРА, от приблизительно 20 мкМ до приблизительно 90 мкМ ДТРА, от приблизительно 30 мкМ до приблизительно 80 мкМ ДТРА, от приблизительно 25 мкМ до приблизительно 75 мкМ ДТРА, или от приблизительно 40 мкМ до приблизительно 60 мкМ ДТРА, или от приблизительно 30 мкМ до приблизительно 70 мкМ ДТРА, или от приблизительно 40 мкМ до приблизительно 70 мкМ ДТРА.

25. Фармацевтический препарат по п. 23 или 24, в котором комплексон для катионов в виде ДТРА присутствует в количестве, составляющем приблизительно 40 мкМ, приблизительно 45 мкМ, приблизительно 50 мкМ, приблизительно 55 мкМ или приблизительно 60 мкМ ДТРА.

26. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-25, рН которого превышает 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 или 7,5.

27. Фармацевтический препарат по п. 26, рН которого составляет от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,5, от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,5, от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,4, от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,3, от приблизительно 7,1 до 7,2, от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,3, от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,4 или приблизительно 7,1 и приблизительно 7,5.

28. Фармацевтический препарат по п. 27, рН которого составляет приблизительно 6,7, приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, приблизительно 7,3, приблизительно 7,4 или приблизительно 7,5.

29. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 26-28, который является более стабильным, чем эталонный препарат с рН 6,5.

30. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-29, который дополнительно содержит поверхностно-активное вещество.

31. Фармацевтический препарат по п. 30, в котором поверхностно-активное вещество представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество.

32. Фармацевтический препарат по п. 31, в котором неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат.

33. Фармацевтический препарат по п. 32, в котором полисорбат представляет собой полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеат (полисорбат 80).

34. Фармацевтический препарат по п. 33, в котором поверхностно-активное вещество полисорбат 80 присутствует в количестве от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,02% до приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,03% до приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,04% до приблизительно 0,07% (в отношении веса к объему) или от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,06% (в отношении веса к объему).

35. Фармацевтический препарат по п. 33 или 34, в котором поверхностно-активное вещество полисорбат 80 присутствует в количестве, составляющем по крайней мере

приблизительно 0,01% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,02% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,03% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,04% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,06% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,07% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему) или по крайней мере приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему).

36. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 30-35, в котором поверхностно-активное вещество уменьшает образование (макро)частиц и/или пузырьков воздуха при встряхивании на шейкере.

37. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-36, который дополнительно содержит буферный агент в виде аминокислоты.

38. Фармацевтический препарат по п. 37, в котором буферный агент в виде аминокислоты представляет собой гистидин.

39. Фармацевтический препарат по п. 38, в котором буферный агент в виде гистидина присутствует в количестве от приблизительно 10 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 90 мМ гистидина, от приблизительно 30 мМ до приблизительно 80 мМ гистидина, от приблизительно 40 мМ до приблизительно 70 мМ гистидина, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 30 мМ гистидина, от приблизительно 15 мМ до приблизительно 25 мМ гистидина, от приблизительно 17,5 до приблизительно 22,5 мМ или от приблизительно 40 мМ до приблизительно 60 мМ гистидина.

40. Фармацевтический препарат по п. 38 или 39, в котором буферный агент в виде гистидина присутствует в количестве, составляющем приблизительно 10 мМ гистидина, приблизительно 15 мМ гистидина, приблизительно 20 мМ гистидина, приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 30 мМ гистидина, приблизительно 35 мМ гистидина, приблизительно 40 мМ гистидина, приблизительно 45 мМ гистидина или приблизительно 50 мМ гистидина.

41. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-40, который дополнительно содержит осморегулятор.

42. Фармацевтический препарат по п. 41, в котором осморегулятор включает сахар.

43. Фармацевтический препарат по п. 42, в котором сахар представляет собой сахарозу.

44. Фармацевтический препарат по п. 43, в котором осморегулятор в виде сахарозы присутствует в количестве от приблизительно 100 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 200 мМ до приблизительно 900 мМ, от приблизительно 300 мМ до приблизительно 800 мМ, от приблизительно 400 мМ до приблизительно 700 мМ или от приблизительно 500 мМ до приблизительно 600 мМ.

45. Фармацевтический препарат по п. 43 или 44, в котором осморегулятор в виде

сахарозы присутствует в количестве, составляющем приблизительно 100 мМ сахарозы, приблизительно 200 мМ сахарозы, приблизительно 300 мМ сахарозы, приблизительно 400 мМ сахарозы, приблизительно 500 мМ сахарозы, приблизительно 600 мМ сахарозы, приблизительно 700 мМ сахарозы, приблизительно 800 мМ сахарозы, приблизительно 900 мМ сахарозы или приблизительно 1 М сахарозы.

46. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-45, который составлен для подкожного введения.

47. Фармацевтический препарат по п. 46, который составлен для подкожного введения с помощью безопасного шприца.

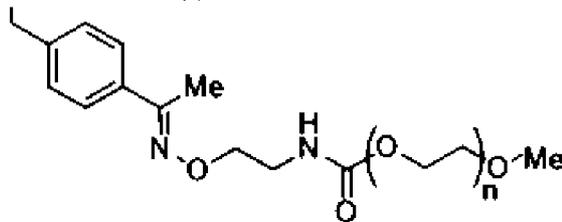
48. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-47, который составлен для ежедневного или еженедельного введения.

49. Фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-48, который представляет собой водный препарат.

50. Фармацевтический препарат, содержащий:

- (i) конъюгат FGF-21;
- (ii) гистидин в концентрации от приблизительно 10 мМ до приблизительно 50 мМ;
- (iii) сахарозу в концентрации от приблизительно 100 мМ до приблизительно 1М;
- (iv) полисорбат 80 в концентрации от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему); и
- (v) ДТРА в концентрации от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 100 мкМ; причем рН препарата составляет от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,5, причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



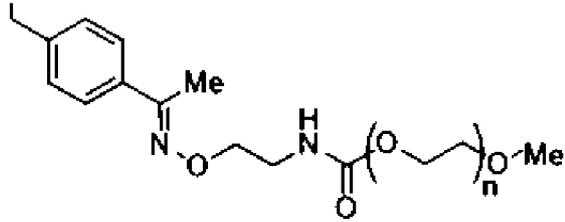
(Формула I),

где n составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

51. Фармацевтический препарат, содержащий:

- (i) конъюгат FGF-21;
- (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ;
- (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ;
- (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и
- (v) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ; причем рН составляет приблизительно 7,1, причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



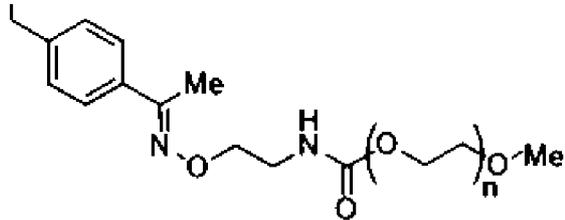
(Формула I),

где  $n$  составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

52. Фармацевтический препарат, содержащий:

- (i) конъюгат FGF-21;
  - (ii) гистидин в концентрации, составляющей 20 мМ;
  - (iii) сахарозу в концентрации, составляющей 600 мМ;
  - (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей 0,05% (в отношении веса к объему); и
  - (v) ДТРА в концентрации, составляющей 50 мкМ;
- причем рН составляет 7,1,  
причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



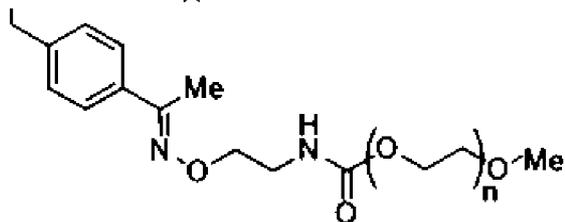
(Формула I),

где  $n$  составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

53. Фармацевтический препарат, содержащий:

- (i) конъюгат FGF-21,
  - (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ и
  - (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ,
- причем рН составляет приблизительно 7,0,  
причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



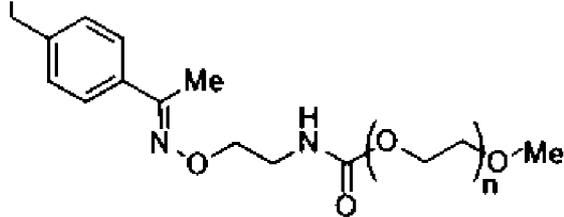
(Формула I),

где n составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

54. Фармацевтический препарат, содержащий:

- (i) конъюгат FGF-21,
  - (ii) гистидин в концентрации, составляющей 20 мМ; и
  - (iii) сахарозу в концентрации, составляющей 600 мМ,
- причем рН составляет 7,0,  
причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



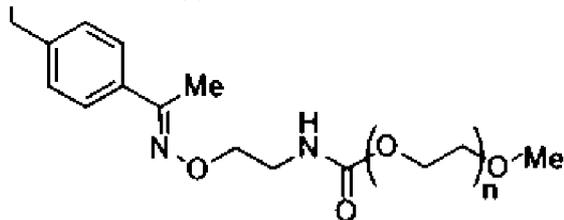
(Формула I)

где n составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

55. Фармацевтический препарат, содержащий:

- (i) конъюгат FGF-21 в концентрации, составляющей приблизительно 10 мг/мл;
  - (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ;
  - (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ;
  - (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и
  - (v) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ;
- причем рН составляет приблизительно 7,1,  
причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



(Формула I),

где n составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

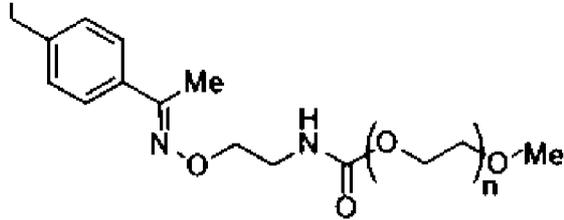
56. Фармацевтический препарат, содержащий:

- (i) конъюгат FGF-21 в концентрации, составляющей приблизительно 20 мг/мл;
- (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ;
- (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ;
- (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в

отношении веса к объему); и

(v) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ;  
 причем рН составляет приблизительно 7,1,  
 причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



(Формула I),

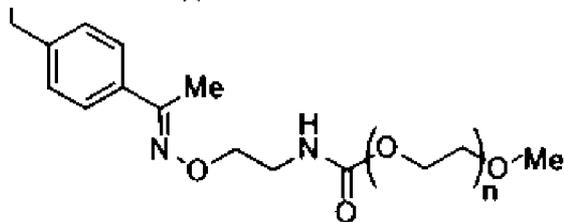
где n составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

57. Фармацевтический препарат, содержащий:

(i) конъюгат FGF-21 в концентрации, составляющей 10 мг/мл,  
 (ii) гистидин в концентрации, составляющей 20 мМ;  
 (iii) сахарозу в концентрации, составляющей 600 мМ;  
 (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей 0,05% (в отношении веса к объему), и

(v) ДТРА в концентрации, составляющей 50 мкМ;  
 причем рН составляет 7,0,  
 причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21

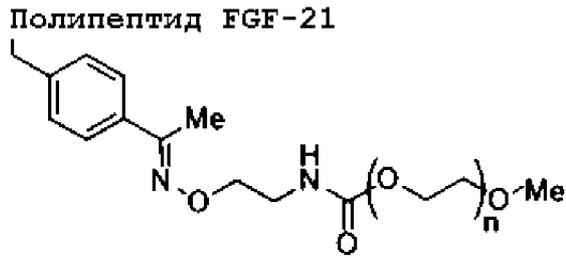


(Формула I),

где n составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

58. Фармацевтический препарат, содержащий:

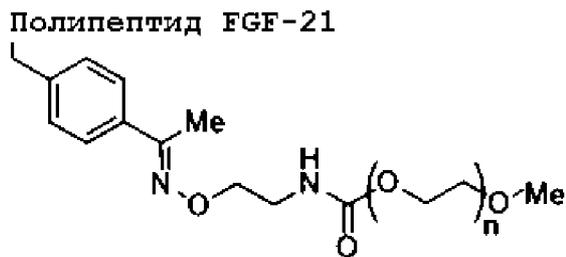
(i) ПЭГ-FGF-21 с SEQ ID NO:2 или 4 в концентрации, составляющей 20 мг/мл;  
 (ii) гистидин в концентрации, составляющей 20 мМ;  
 (iii) сахарозу в концентрации, составляющей 600 мМ;  
 (iv) полисорбат 80 в концентрации 0,05% (в отношении веса к объему); и  
 (v) ДТРА в концентрации, составляющей 50 мкМ;  
 причем рН составляет 7,0,  
 причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:



(Формула I),

где  $n$  находится в диапазоне от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

59. Способ улучшения стабильности фармацевтического препарата, содержащего полипептид в виде фактора роста фибробластов 21 (FGF-21), конъюгированный с фрагментом полиэтиленгликоля (ПЭГ) («конъюгат FGF-21»), при этом способ включает примешивание комплексона для катионов в виде аминокполикарбонной кислоты, причем препарат обладает улучшенной стабильностью по сравнению с эталонным препаратом, который не содержит комплексон для катионов в виде аминокполикарбонной кислоты, причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:



(Формула I),

где  $n$  составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

60. Способ по п. 59, в котором фрагмент ПЭГ конъюгирован с не встречающейся в природе аминокислотой в полипептиде FGF-21.

61. Способ по п. 60, в котором не встречающаяся в природе аминокислота в полипептиде FGF-21 представляет собой пара-ацетил-L-фенилаланин.

62. Способ по любому из п.п. 59-61, в котором полипептид FGF-21 представляет собой полипептид FGF-21 с SEQ ID NO:1.

63. Способ по любому из п.п. 59-62, в котором конъюгат FGF-21 находится в L-конформации.

64. Способ по любому из п.п. 59-63, в котором улучшение стабильности включает (i) повышение физической стойкости полипептида, (ii) повышение химической стойкости полипептида или (iii) как (i), так и (ii).

65. Способ по п. 64, в котором повышение физической стойкости включает (i) предотвращение или уменьшение агрегации полипептида, (ii) предотвращение или уменьшение фрагментации полипептида или (iii) как (i), так и (ii).

66. Способ по п. 65, в котором повышение химической стойкости включает (i)

предотвращение или уменьшение дезамидирования полипептида, (ii) предотвращение или уменьшение окисления полипептида или (iii) как (i), так и (ii).

67. Способ по любому из п.п. 59-66, в котором улучшение стабильности включает одно или более из следующего:

(a) более низкую скорость дезамидирования полипептида при хранении при 40°C в течение приблизительно месяца относительно эталонного препарата;

(b) более низкую скорость агрегации высокомолекулярного (HMW) полипептида при хранении при 40°C в течение приблизительно месяца относительно эталонного препарата; или

(c) как (a), так и (b).

68. Способ по любому из п.п. 59-67, в котором улучшение стабильности включает предотвращение или уменьшение окисления одного или более метионинов.

69. Способ по п. 68, в котором метионины соответствуют Met1 и/или Met169 в полипептиде FGF-21.

70. Способ по п. 68 или 69, в котором окисление метионинов предотвращается или уменьшается при 25°C и/или 40°C.

71. Способ по любому из п.п. 59-70, в котором комплексон для катионов в виде аминокполикарбонической кислоты представляет собой DTPA.

72. Способ по п. 71, в котором комплексон для катионов в виде DTPA присутствует в количестве от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 100 мкМ DTPA, от приблизительно 20 мкМ до приблизительно 90 мкМ DTPA, от приблизительно 25 мкМ до приблизительно 75 мкМ DTPA, от приблизительно 40 мкМ до приблизительно 60 мкМ DTPA, от приблизительно 30 мкМ до приблизительно 70 мкМ DTPA, от приблизительно 30 мкМ до приблизительно 80 мкМ DTPA или от приблизительно 40 мкМ до приблизительно 70 мкМ.

73. Способ по п. 71 или 72, в котором комплексон для катионов в виде DTPA присутствует в количестве, составляющем приблизительно 40 мкМ, приблизительно 45 мкМ, приблизительно 50 мкМ, приблизительно 55 мкМ или приблизительно 60 мкМ DTPA.

74. Способ по любому из п.п. 59-73, который дополнительно включает доведение pH до значения, превышающего 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 или 7,0.

75. Способ по п. 74, в котором pH доводят до значения от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,5, или от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,4, или от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,3, или от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,2, или от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,3, или от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,4, или от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,5.

76. Способ по п. 75, в котором доведенный pH составляет приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, приблизительно 7,3, приблизительно 7,4 или приблизительно 7,5.

77. Способ по любому из п.п. 74-76, в котором препарат является более стабильным, чем эталонный препарат с pH 6,5.

78. Способ по любому из п.п. 59-77, который дополнительно включает примешивание поверхностно-активного вещества.

79. Способ по п. 78, в котором поверхностно-активное вещество представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество.

80. Способ по п. 79, в котором неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат.

81. Способ по п. 80, в котором полисорбат представляет собой полисорбат 80.

82. Способ по п. 81, в котором поверхностно-активное вещество полисорбат 80 примешивают в количестве от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,02% до приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,03% до приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), от приблизительно 0,04% до приблизительно 0,07% (в отношении веса к объему) или от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,06% (в отношении веса к объему).

83. Способ по п. 81 или 82, в котором поверхностно-активное вещество полисорбат 80 примешивают в количестве, составляющем по крайней мере приблизительно 0,01% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,02% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,03% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,04% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,06% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,07% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,08% (в отношении веса к объему), по крайней мере приблизительно 0,09% (в отношении веса к объему) или по крайней мере приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему).

84. Способ по любому из п.п. 79-83, в котором поверхностно-активное вещество уменьшает образование (макро)частиц и/или образование пузырьков воздуха при встряхивании на шейкере.

85. Способ по любому из п.п. 59-84, который дополнительно включает примешивание буферного агента в виде аминокислоты.

86. Способ по п. 85, в котором буферный агент в виде аминокислоты представляет собой гистидин.

87. Способ по п. 86, в котором буферный агент в виде гистидина примешивают в количестве от приблизительно 10 мМ до приблизительно 100 мМ гистидина, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 90 мМ гистидина, от приблизительно 30 мМ до приблизительно 80 мМ гистидина, от приблизительно 40 мМ до приблизительно 70 мМ гистидина, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 30 мМ гистидина, от приблизительно 15 мМ до приблизительно 25 мМ гистидина, от приблизительно 17,5 мМ до приблизительно 22,5 мМ или от приблизительно 40 мМ до приблизительно 60 мМ гистидина.

88. Способ по п. 86 или 87, в котором буферный агент в виде гистидина

примешивают в количестве, составляющем приблизительно 10 мМ гистидина, приблизительно 15 мМ гистидина, приблизительно 20 мМ гистидина, приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 30 мМ гистидина, приблизительно 35 мМ гистидина, приблизительно 40 мМ гистидина, приблизительно 45 мМ гистидина или приблизительно 50 мМ гистидина.

89. Способ по любому из п.п. 59-88, который дополнительно включает примешивание осморегулятора.

90. Способ по п. 89, в котором осморегулятор включает сахар.

91. Способ по п. 90, в котором сахар представляет собой сахарозу.

92. Способ по п. 91, в котором осморегулятор в виде сахарозы примешивают в количестве от приблизительно 100 мМ до приблизительно 1 М сахарозы, от приблизительно 200 мМ до приблизительно 900 мМ сахарозы, от приблизительно 300 мМ до приблизительно 800 мМ сахарозы, от приблизительно 400 мМ до приблизительно 700 мМ сахарозы, или от приблизительно 500 мМ до приблизительно 600 мМ сахарозы.

93. Способ по п. 91 или 92, в котором осморегулятор в виде сахарозы примешивают в количестве, составляющем приблизительно 100 мМ сахарозы, приблизительно 200 мМ сахарозы, приблизительно 300 мМ сахарозы, приблизительно 400 мМ сахарозы, приблизительно 500 мМ сахарозы, приблизительно 600 мМ сахарозы, приблизительно 700 мМ сахарозы, приблизительно 800 мМ сахарозы, приблизительно 900 мМ сахарозы или приблизительно 1 М сахарозы.

94. Способ по любому из п.п. 59-93, в котором препарат представляет собой водный препарат.

95. Фармацевтический препарат, приготовленный в соответствии со способом по любому из п.п. 59-94.

96. Флакон, содержащий:

(i) конъюгат FGF-21;

(ii) гистидин в концентрации от приблизительно 10 мМ до приблизительно 50 мМ;

(iii) сахарозу в концентрации от приблизительно 100 мМ до приблизительно 1М;

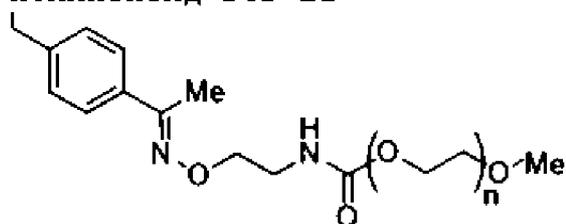
(iv) полисорбат 80 в концентрации от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1% (в отношении веса к объему); и

(v) ДТРА в концентрации от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 100 мкМ;

причем рН препарата составляет от приблизительно 6,7 до приблизительно 7,5,

причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



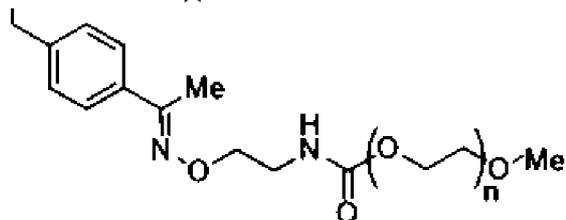
(Формула I),

где  $n$  составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

97. Флакон, содержащий:

- (i) от приблизительно 5 мг до приблизительно 20 мг конъюгата FGF-21;
  - (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ; и
  - (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ;
- причем рН составляет приблизительно 7,0,  
причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



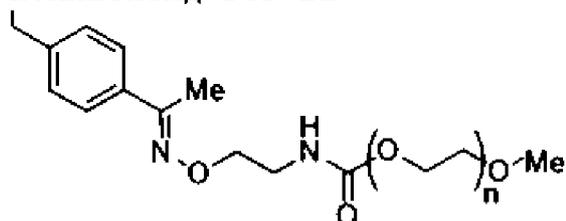
(Формула I),

где  $n$  составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

98. Флакон, содержащий:

- (i) от приблизительно 10 мг до приблизительно 20 мг конъюгата FGF-21;
  - (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ;
  - (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ;
  - (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему); и
  - (v) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ;
- причем рН составляет приблизительно 7,1,  
причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



(Формула I),

где  $n$  составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

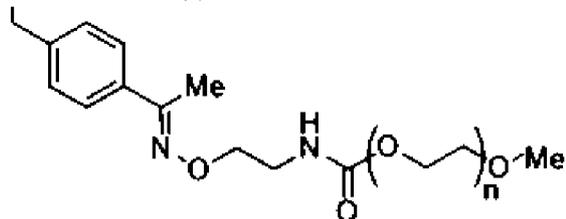
99. Флакон, содержащий:

- (i) приблизительно 10 мг конъюгата FGF-21;
- (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ;
- (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ;
- (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в

отношении веса к объему); и

(v) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ; причем рН составляет приблизительно 7,1, причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



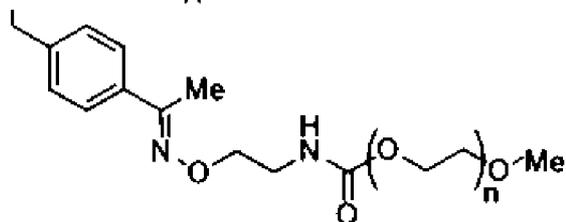
(Формула I),

где n составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

100. Флакон, содержащий:

- (i) приблизительно 20 мг конъюгата FGF-21;
- (ii) гистидин в концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ,
- (iii) сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 600 мМ,
- (iv) полисорбат 80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,05% (в отношении веса к объему), и
- (v) ДТРА в концентрации, составляющей приблизительно 50 мкМ; причем рН составляет приблизительно 7,1, причем конъюгат FGF-21 включает формулу I:

Полипептид FGF-21



(Формула I),

где n составляет от приблизительно 670 до приблизительно 690, например, приблизительно 681, и где полипептид FGF-21 включает SEQ ID NO:1.

101. Набор или изделие, включающий(ее) (i) фармацевтический препарат по любому из п.п. 1-58 и 95 или флакон по любому из п.п. 96-100, и (ii) инструкции по применению.

102. Способ лечения или предотвращения заболевания или состояния, связанного с фиброзом и/или диабетом, у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтического препарата по любому из п.п. 1-58 и 95, эффективного количества из флакона по любому из п.п. 96-100 или набора по п. 101.

103. Способ по п. 102, в котором заболевание или состояние представляет собой диабет.

104. Способ по п. 103, в котором диабет представляет собой диабет 2 типа.

105. Способ по п. 102, в котором заболевание или состояние представляет собой неалкогольный стеатогепатит (NASH).

106. Способ по любому из п.п. 102-105, в котором введение субъекту эффективного количества фармацевтического препарата уменьшает жесткость печени, снижает процентное содержание жира в организме, уменьшает вес тела, уменьшает отношение веса печени к весу тела, снижает содержание липидов в печени, уменьшает площадь фиброза в печени, снижает уровни глюкозы в крови натощак, снижает уровни триглицеридов натощак, снижает уровни холестерина LDL (ЛПНП), снижает уровни ApoB, снижает уровни ApoC, повышает уровни холестерина HDL (ЛПВП) или вызывает любую их комбинацию.

107. Способ по любому из п.п. 102-106, в котором конъюгат FGF-21 вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 20 мг.

108. Способ по п. 107, в котором конъюгат FGF-21 вводят с интервалом между введениями доз, составляющим неделю.

109. Способ по любому из п.п. 102-108, в котором фармацевтический препарат вводят подкожно.

110. Способ по п. 109, в котором фармацевтический препарат вводят подкожно, используя безопасный шприц.

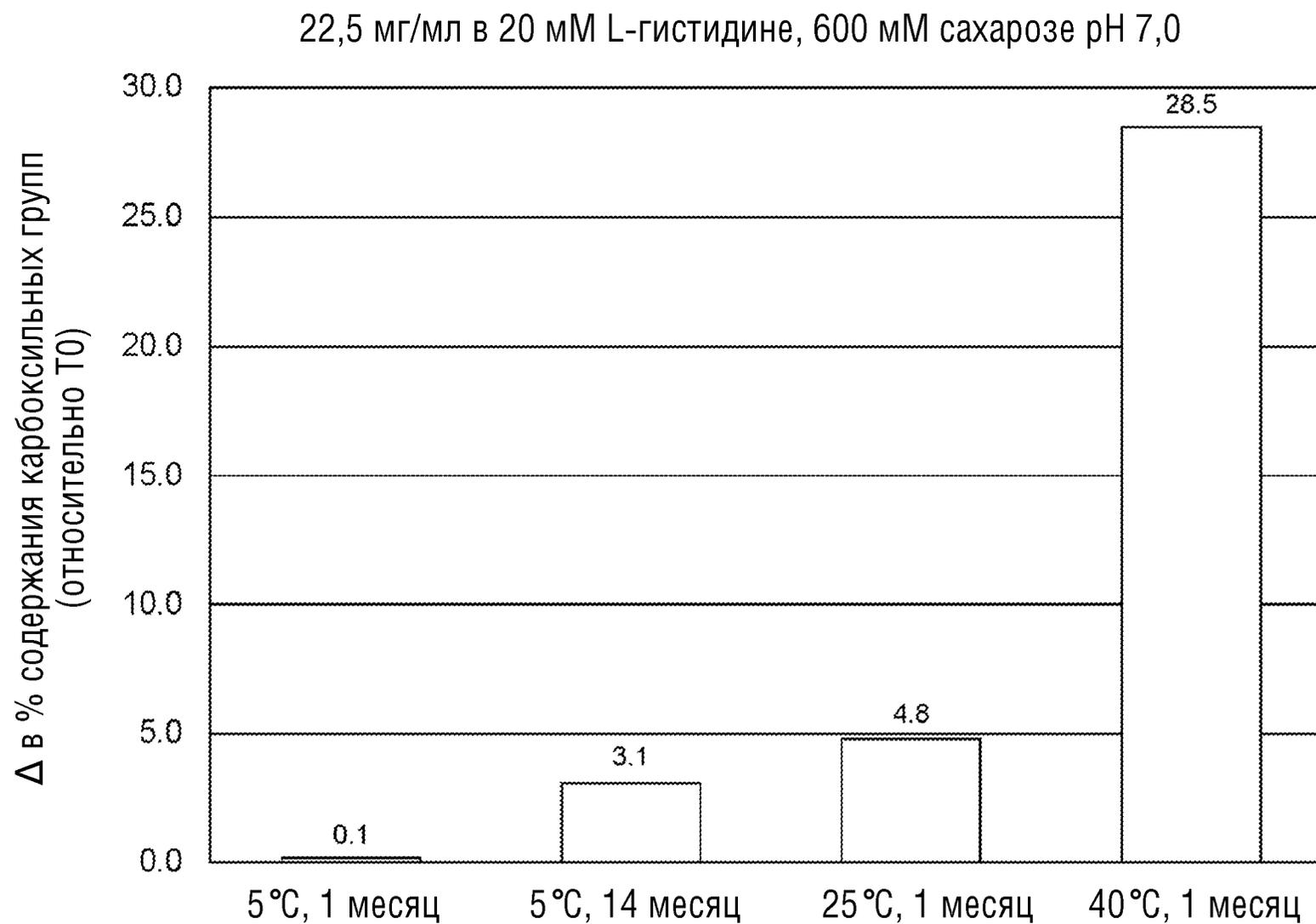
111. Способ по любому из п.п. 102-110, в котором введение фармацевтического препарата субъекту приводит к следующему:

- (i) снижению уровня жира в печени;
- (ii) снижению уровня повреждения печени;
- (iii) снижению уровня фиброза;
- (iv) снижению уровней биомаркера фиброза Pro-C3 (N-концевого пропептида коллагена III типа) в сыворотке;
- (v) снижению уровней аланинаминотрансферазы (ALT);
- (vi) снижению уровней аспартатаминотрансферазы (AST);
- (vii) повышению уровней адипонектина в сыворотке;
- (viii) снижению уровней LDL в плазме;
- (ix) повышению уровней HDL в плазме;
- (x) снижению уровней триглицеридов в плазме;
- (xi) уменьшению степени жесткости печени; или
- (xii) любой их комбинации;

по сравнению с уровнями у не подвергнутых лечению субъектов или у субъекта до введения фармацевтического препарата.

По доверенности

ФИГ.1А

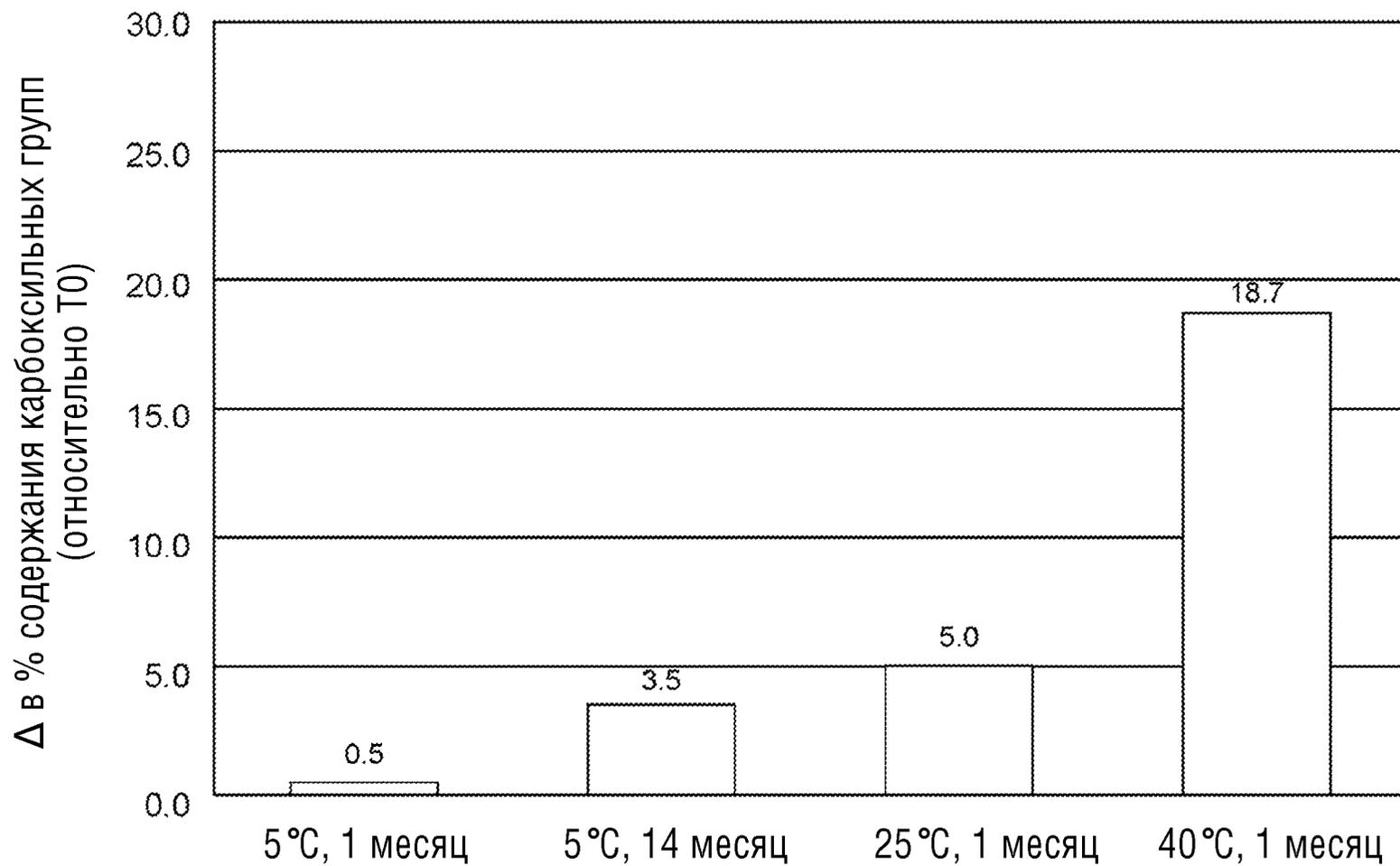


1/11

574971

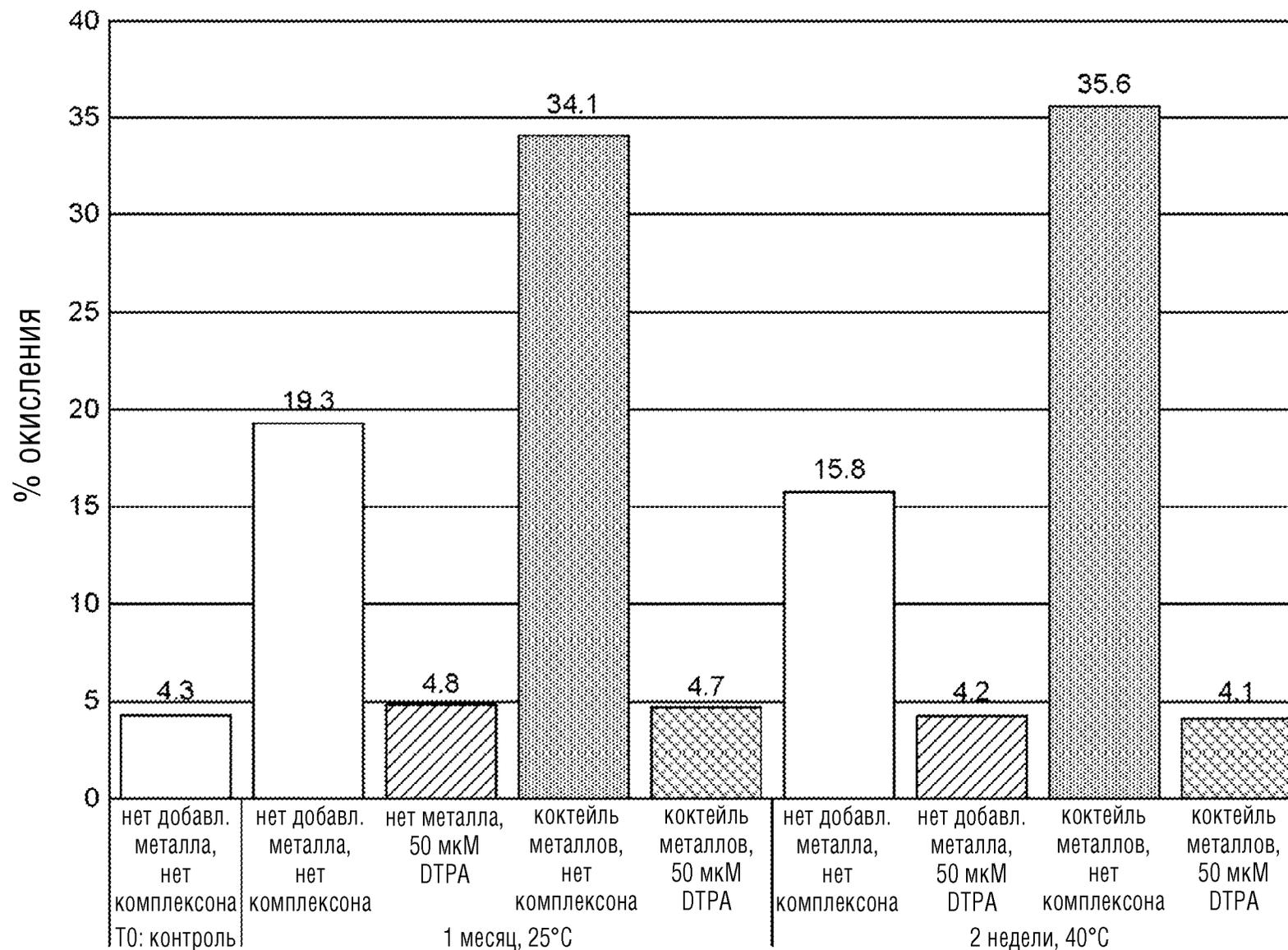
ФИГ.1В

20 мг/мл в 20 мМ L-гистидине, 600 мМ сахарозе, 0,05 мМ триамине  
пентауксусной кислоты, 0,05% PS80, pH 7,0



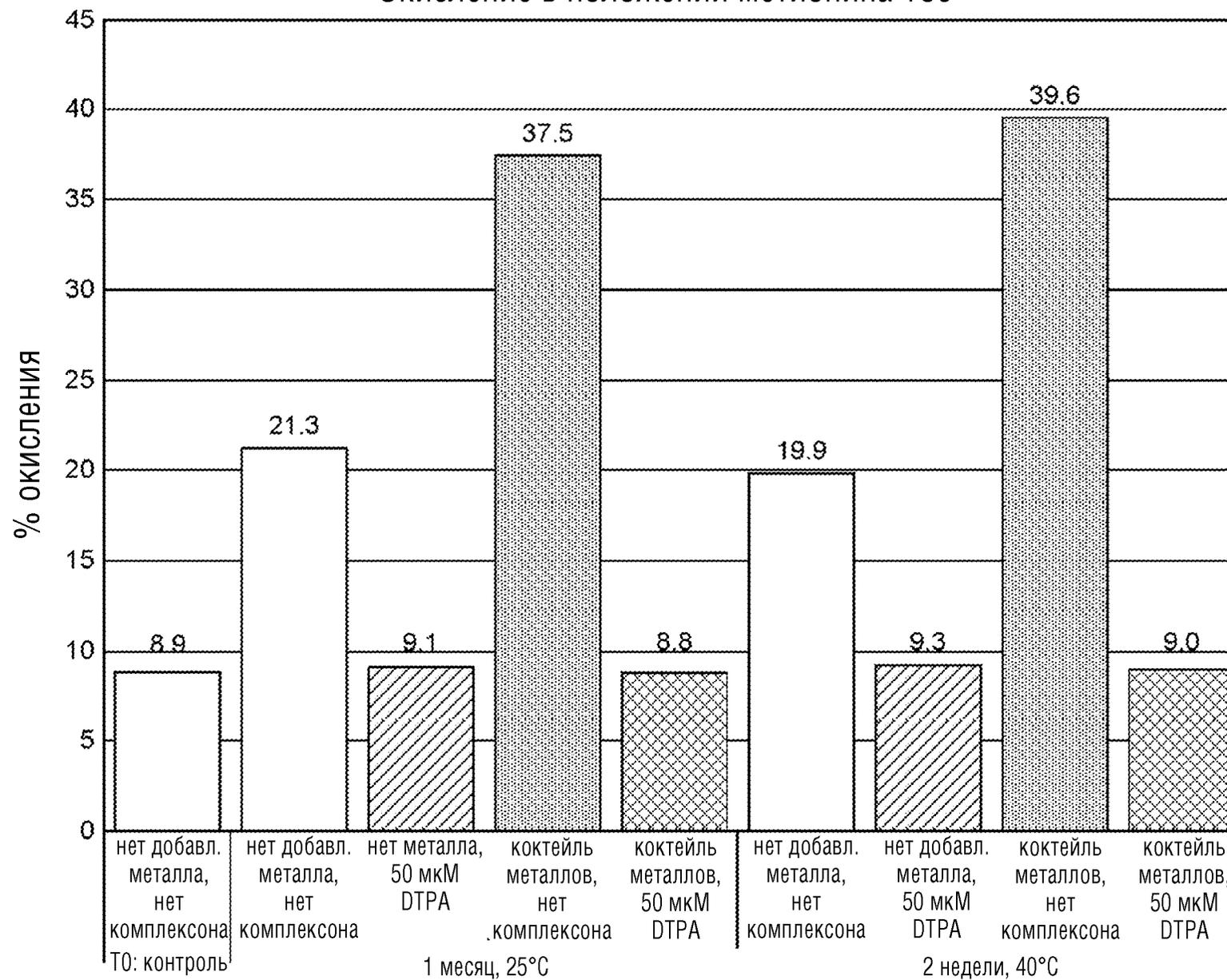
ФИГ.2А

Окисление в положении метионина 1

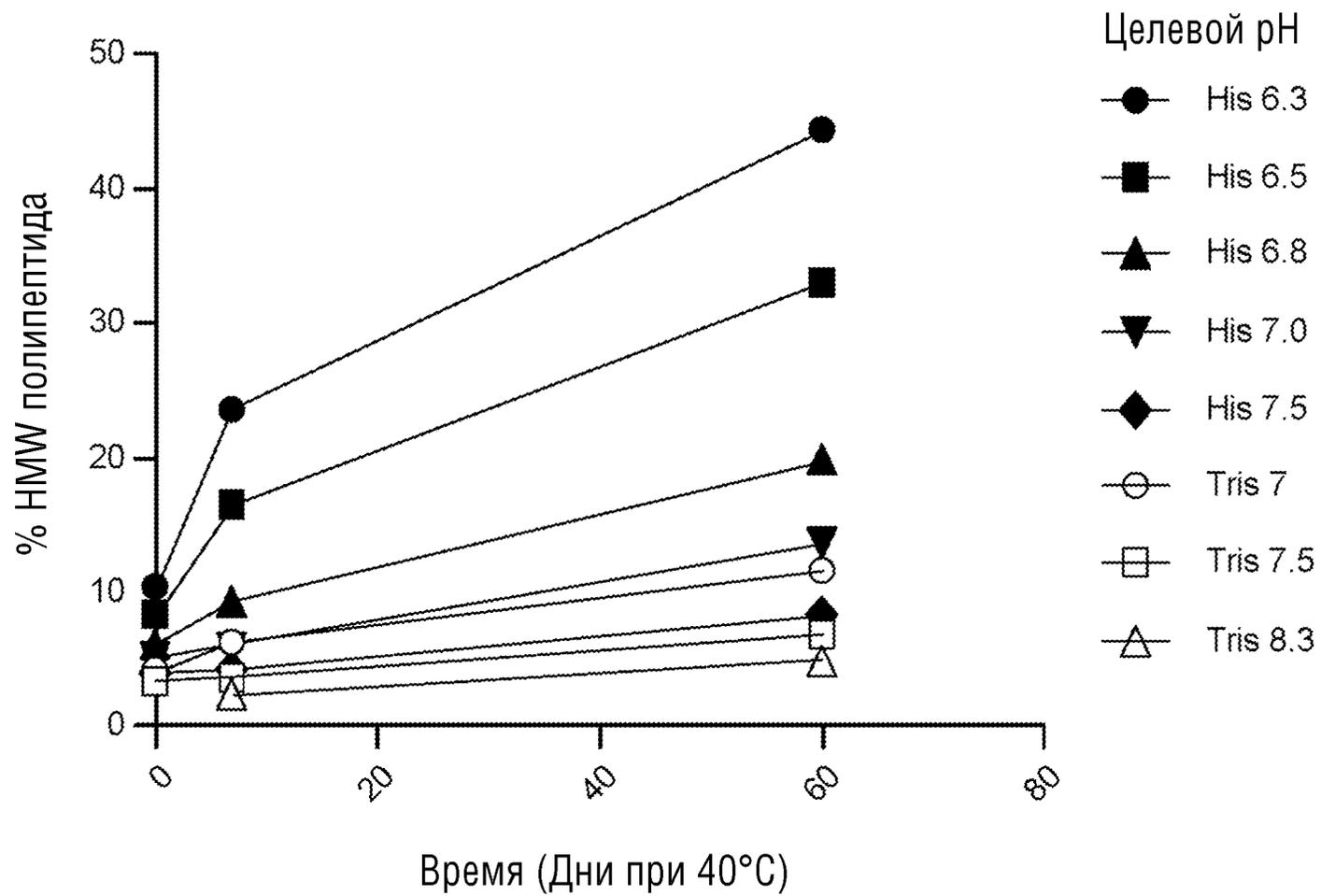


ФИГ.2В

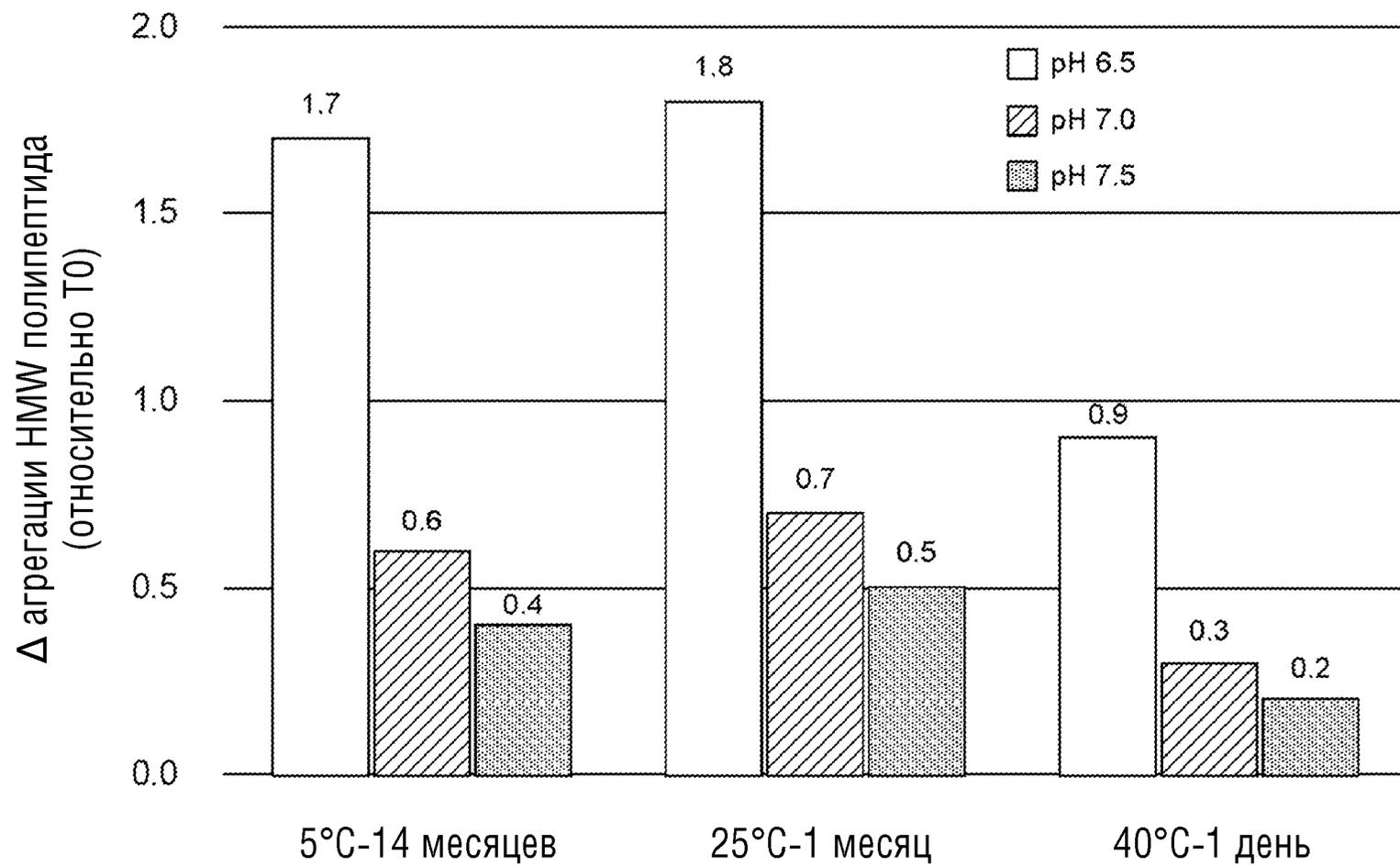
Окисление в положении метионина 169



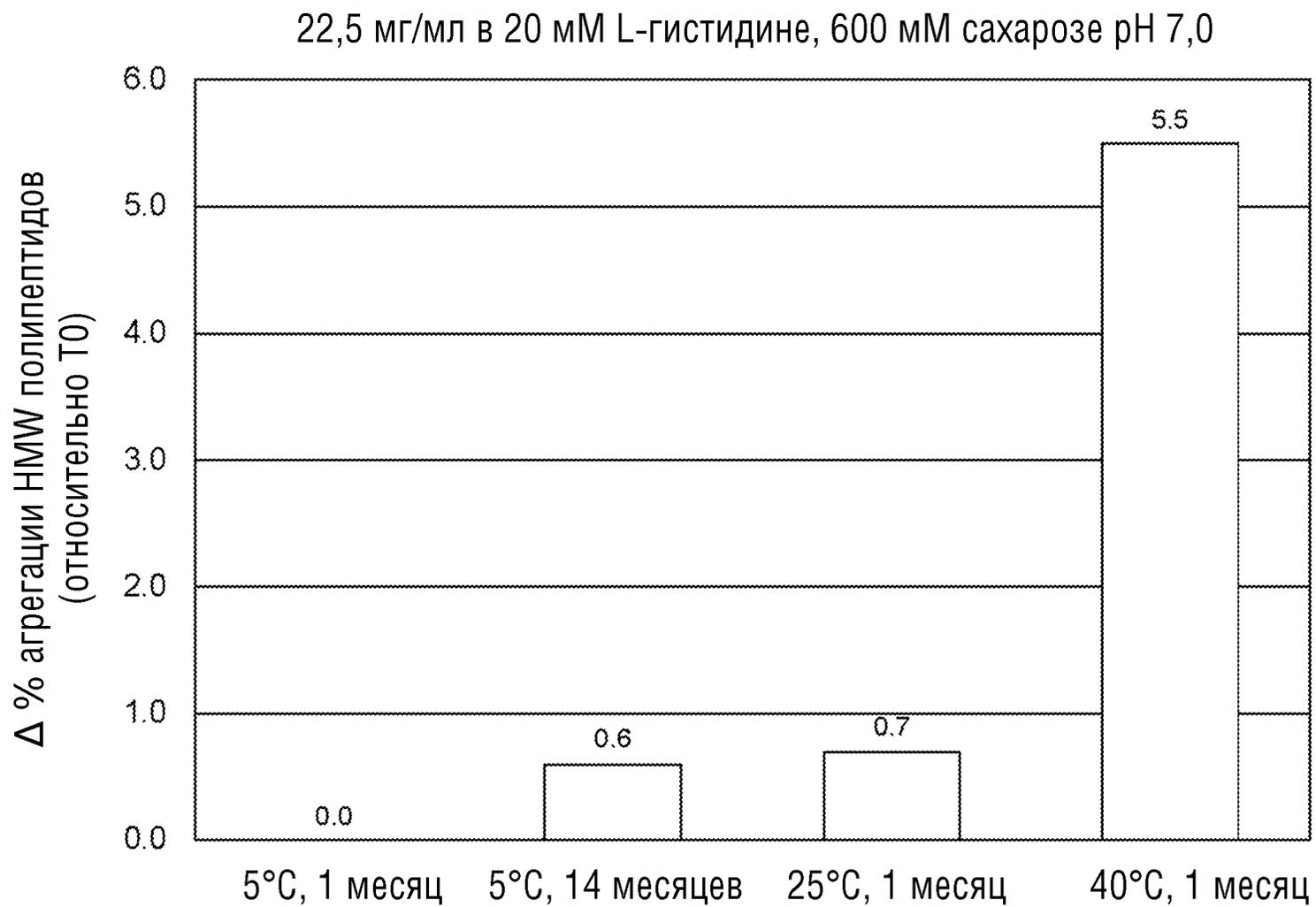
ФИГ.3А



ФИГ.3В

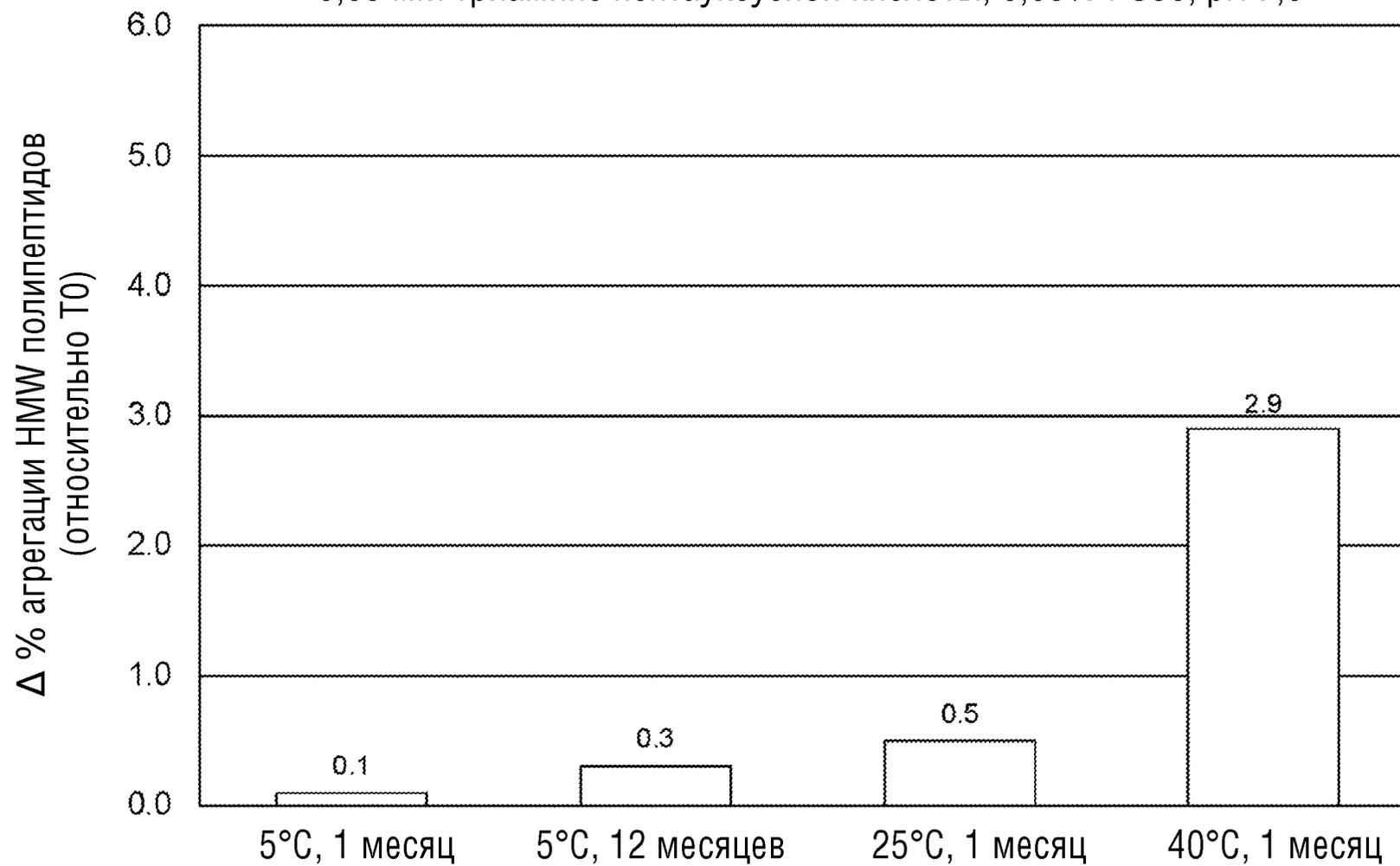


ФИГ.4А



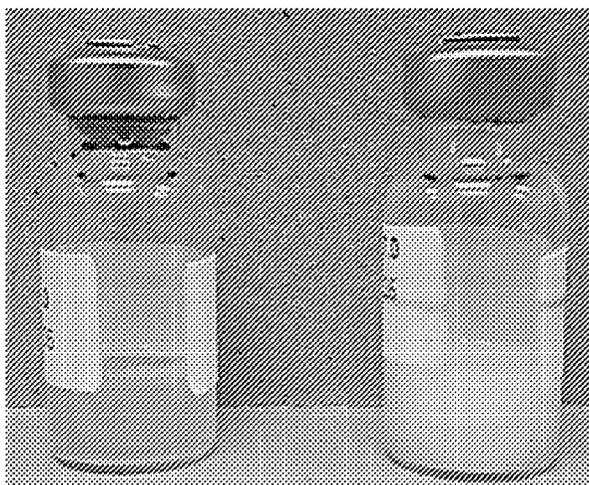
ФИГ.4В

20 мг/мл в 20 мМ L-гистидине, 600 мМ сахарозе,  
0,05 мМ триамине пентауксусной кислоты, 0,05% PS80, pH 7,0



# ФИГ.5

Нет PS80



15  
мг/мл

22  
мг/мл



0%  
PS80

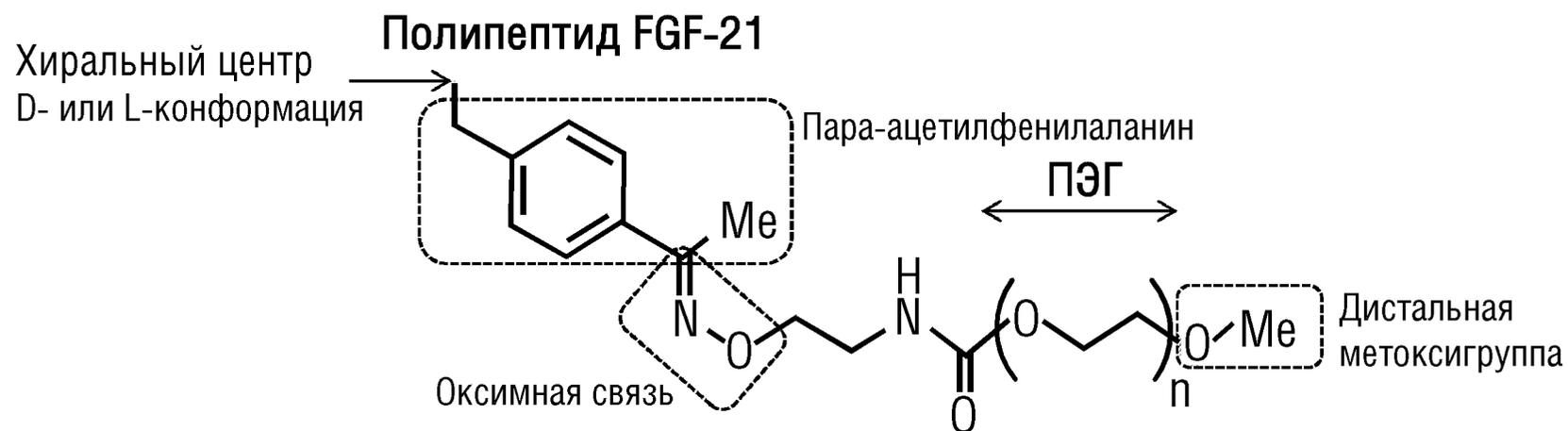
0.01%  
PS80

0.025%  
PS80

0.05%  
PS80

0.1%  
PS80

ФИГ.6



ПЭГ-FGF-21

ПЭГ ~ 28 кДа-32 кДа, например, 30 кДа  
n ~ 600-800, например, 681

ФИГ.7

Метил-ПЭГ<sub>681</sub>-аминокси с М.М. 30 кДа

