

FORMULACIONES DE FGF-21

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO ELECTRÓNICAMENTE MEDIANTE EFS-WEB

[0001] El contenido del listado de secuencias presentado electrónicamente (nombre: 3338_133PC01_SeqListing.txt; tamaño: 5.532 bytes; y fecha de creación: 26 de junio de 2019) que se presenta con la solicitud se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

Campo

[0002] La presente solicitud se refiere, entre otras cosas, a formulaciones que comprenden un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, que se estabilizan usando quelantes (por ejemplo, DTPA), tensioactivos (por ejemplo, PS80), y que tienen rangos de pH específicos (por ejemplo, alrededor de 7,1), para la administración a través de diversas vías, que incluyen, por ejemplo, administración subcutánea.

Antecedentes

[0003] Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) son polipéptidos ampliamente expresados en tejidos en desarrollo y adultos (Baird *et al.*, Cancer Cells, 3:239-243, 1991) que cumplen funciones esenciales en múltiples funciones fisiológicas (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). De acuerdo con la literatura, la familia FGF consiste en al menos 22 miembros (Reuss *et al.*, Cell Tissue Res. 313:139-157 (2003)).

[0004] FGF-21 puede usarse para el tratamiento de enfermedades y afecciones asociadas a fibrosis. La fibrosis es la formación de un exceso de tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido. El exceso en el depósito de tejido fibroso se asocia a condiciones patológicas que pueden producir una disfunción orgánica o tisular. Los órganos afectados pueden incluir pulmones (fibrosis pulmonar o de pulmón), hígado (fibrosis hepática o de hígado), riñón (fibrosis renal o de riñón) y corazón (fibrosis cardíaca). La fibrosis también puede afectar otros tejidos y órganos que incluyen articulaciones, piel, intestino, médula ósea, entre otros. Algunos ejemplos de afecciones o enfermedades fibróticas incluyen, entre otras, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), que afecta al hígado; enfermedad renal diabética o nefropatía diabética, que afecta al riñón; e insuficiencia cardíaca metabólica, que afecta al corazón. Por ejemplo, NASH se

caracteriza por la acumulación de grasa, inflamación y daño en el hígado en personas que consumen poco o nada de alcohol, y la enfermedad puede producir cirrosis hepática. Es común que se diagnostique NASH en personas de mediana edad obesas o con sobrepeso que suelen tener niveles altos de algunos lípidos en sangre y diabetes o prediabetes.

[0005] Se informó que FGF-21 tiende a experimentar proteínólisis *in vivo*, formar agregados *in vitro* y experimentar desamidación (Gimeno y Moller, Trends Endocrinol Metab., junio de 2014; 25(6):303-11; patente estadounidense N.º 8.361.963; Hecht *et al.*, PLoS One. 2012; 7(11):e49345; publicación de patente estadounidense N.º 2007/0293430; WO 2006/0065582), que limita potencialmente la vida útil de composiciones farmacéuticas que contienen FGF-21. Los agregados y las formas desamidadas de los polipéptidos terapéuticos pueden aumentar potencialmente la inmunogenicidad (ver U.S. Department of Health and Human Services, “Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products”, agosto de 2014; Subramanyam (ed.), “Therapeutic Protein Immunogenicity Focus Group Newsletter”, American Association of Pharmaceutical Scientists, vol. 1, edición 3 (diciembre de 2011)).

[0006] La presente divulgación se refiere, por ejemplo, a la necesidad de formulaciones farmacéuticas que aborden los problemas relacionados con la producción de formulaciones farmacéuticas que comprendan polipéptidos FGF-21, y, en particular, polipéptidos FGF-21 modificados.

BREVE SÍNTESIS

[0007] La presente divulgación proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21), por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, y un quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico, tal como ácido dietilentriaminpentacético (también denominado ácido pentético o DTPA), en donde la formulación tiene una estabilidad mejorada en comparación con una formulación de referencia que no contiene el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico. Estas formulaciones farmacéuticas presentan una o más mejoras con respecto a formulaciones alternativas conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo, menor velocidad de desamidación, por ejemplo, cuando se almacena a 40 °C durante alrededor de un mes, y/o menor velocidad de agregación de alto peso molecular (HMW) cuando se almacena, por ejemplo, a 40 °C durante alrededor de un mes.

[0008] La presencia de un quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico en la formulación divulgada también mitiga la oxidación del polipéptido FGF-21 y, en

particular, la oxidación de metionina. Por ejemplo, la presencia de DTPA en la formulación puede mitigar o prevenir la oxidación de una o más metioninas de FGF-21 correspondientes al aminoácido 1 y/o aminoácido 169 de SEQ ID NO: 3 (o las metioninas correspondientes en SEQ ID NO: 1 y 2) a 25 °C y/o 40 °C.

[0009] En algunos aspectos, el quelante de cationes DTPA está presente en una cantidad entre alrededor de 10 µM y alrededor de 100 µM de DTPA, entre alrededor de 20 µM y alrededor de 90 µM de DTPA, entre alrededor de 30 µM y alrededor de 80 µM de DTPA, entre alrededor de 25 µM y alrededor de 75 µM de DTPA, entre alrededor de 40 µM y alrededor de 60 µM de DTPA, entre alrededor de 30 µM y alrededor de 70 µM de DTPA o entre alrededor de 40 µM y alrededor de 70 µM de DTPA. En otros aspectos, el quelante de cationes DTPA está presente en una cantidad de alrededor de 40 µM, alrededor de 45 µM, alrededor de 50 µM, alrededor de 55 µM o alrededor de 60 µM de DTPA.

[0010] En algunos aspectos de las formulaciones farmacéuticas divulgadas en la presente, el pH de la formulación es mayor de 6,5, mayor de 6,6, mayor de 6,7, mayor de 6,8, mayor de 6,9, mayor de 7,0, mayor de 7,1, mayor de 7,2, mayor de 7,3, mayor de 7,4 o mayor de 7,5.

[0011] En algunos aspectos, el pH está entre alrededor de 6,7 y alrededor de 7,5, entre alrededor de 6,8 y alrededor de 7,5, entre alrededor de 6,9 y alrededor de 7,4, entre alrededor de 7,0 y alrededor de 7,3, entre alrededor de 7,1 y 7,2, entre alrededor de 7,1 y alrededor de 7,3, entre alrededor de 7,1 y alrededor de 7,4, o entre alrededor de 7,1 y alrededor de 7,5. En algunos aspectos, el pH es alrededor de 6,7, alrededor de 6,8, alrededor de 6,9, alrededor de 7,0, alrededor de 7,1, alrededor de 7,2, alrededor de 7,3, alrededor de 7,4 o alrededor de 7,5. En algunos aspectos, la formulación farmacéutica es más estable que una formulación de referencia con un pH de 6,5.

[0012] En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas divulgadas en la presente también comprenden un tensioactivo, por ejemplo, un tensioactivo no iónico. En algunos aspectos, el tensioactivo no iónico es un polisorbato, por ejemplo, monooleato de polioxietileno (20) sorbitán (polisorbato 80). En algunos aspectos, el tensioactivo polisorbato 80 está presente en una cantidad de alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor de 0,02 % a alrededor de 0,09 % (p/v), alrededor de 0,03 % a alrededor de 0,08 % (p/v), alrededor de 0,04 % a alrededor de 0,07 % (p/v) o alrededor de 0,05 % a alrededor de 0,06 % (p/v).

[0013] En algunos aspectos, el tensioactivo polisorbato 80 está presente en una cantidad de al menos alrededor de 0,01 % (p/v), al menos alrededor de 0,02 % (p/v), al

menos alrededor de 0,03 % (p/v), al menos alrededor de 0,04 % (p/v), al menos alrededor de 0,05 % (p/v), al menos alrededor de 0,06 % (p/v), al menos alrededor de 0,07 % (p/v), al menos alrededor de 0,08 % (p/v), al menos alrededor de 0,09 % (p/v) o al menos alrededor de 0,1 % (p/v). En algunos aspectos, el tensioactivo mitiga la formación de partículas y/o burbujas de aire, por ejemplo, al agitarse en un agitador.

[0014] En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas divulgadas en la presente también comprenden un agente amortiguador de aminoácido, por ejemplo, histidina. En algunos aspectos, el agente amortiguador de histidina está presente en una cantidad de alrededor de 10 mM a alrededor de 100 mM de histidina, alrededor de 20 mM a alrededor de 90 mM de histidina, alrededor de 30 mM a alrededor de 80 mM de histidina, alrededor de 40 mM a alrededor de 70 mM de histidina, alrededor de 10 mM a alrededor de 30 mM de histidina, alrededor de 15 mM a alrededor de 25 mM de histidina, alrededor de 17,5 a alrededor de 22,5 de histidina o alrededor de 40 mM a alrededor de 60 mM de histidina. En algunos aspectos, el agente amortiguador de histidina está presente en una cantidad de alrededor de 10 mM de histidina, alrededor de 15 mM de histidina, alrededor de 20 mM de histidina, alrededor de 25 mM de histidina, alrededor de 30 mM de histidina, alrededor de 35 mM de histidina, alrededor de 40 mM de histidina, alrededor de 45 mM de histidina o alrededor de 50 mM de histidina.

[0015] En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas divulgadas en la presente también comprenden un regulador osmótico, por ejemplo, un azúcar. En algunos aspectos, el azúcar es sacarosa. En algunos aspectos, el regulador osmótico sacarosa está presente en una cantidad de alrededor de 100 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 200 mM a alrededor de 900 mM de sacarosa, alrededor de 300 mM a alrededor de 800 mM de sacarosa, alrededor de 400 mM a alrededor de 700 mM de sacarosa, o alrededor de 500 mM a alrededor de 600 mM de sacarosa. En algunos aspectos, el regulador osmótico sacarosa está presente en una cantidad de alrededor de 100 mM de sacarosa, alrededor de 200 mM de sacarosa, alrededor de 300 mM de sacarosa, alrededor de 400 mM de sacarosa, alrededor de 500 mM de sacarosa, alrededor de 600 mM de sacarosa, alrededor de 700 mM de sacarosa, alrededor de 800 mM de sacarosa, alrededor de 900 mM de sacarosa o alrededor de 1 M de sacarosa.

[0016] En algunos aspectos de las formulaciones farmacéuticas divulgadas en la presente, el polipéptido FGF-21 comprende, consiste en, o consiste esencialmente en un polipéptido FGF-21 modificado. En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 modificado comprende un polipéptido que tiene al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos

alrededor de 96 %, al menos alrededor de 97 %, al menos alrededor de 98 % o al menos alrededor de 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, en donde el polipéptido tiene actividad de FGF-21.

[0017] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 modificado está ligado a una porción de extensión de semivida. En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 modificado está ligado a la porción de extensión de semivida por medio de la cadena lateral de un aminoácido codificado de manera no natural en la secuencia del polipéptido FGF-21. En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida comprende albúmina, una región constante de inmunoglobulina o una porción de esta, un polipéptido de unión a inmunoglobulina, una inmunoglobulina G (IgG), un polipéptido de unión a albúmina (ABP), una porción de PASilación, una porción de HESilación, XTEN, una región Fc, y cualquier combinación de estos. En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida comprende un polímero hidrosoluble. En algunos aspectos, el polímero hidrosoluble es un polietilenglicol (PEG). En algunos aspectos, el PEG tiene un peso molecular promedio entre alrededor de 10 kDa y alrededor de 40 kDa. En algunos aspectos, el PEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 30 kDa.

[0018] En algunos aspectos de las formulaciones divulgadas en la presente, el aminoácido codificado de manera no natural es un derivado de fenilalanina. En algunos aspectos, el derivado de fenilalanina es para-acetil-L-fenilalanina. En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida está ligada al aminoácido codificado de manera no natural por medio de un enlace oxima. En algunos aspectos, el aminoácido codificado de manera no natural reemplaza al aminoácido glutamina 109 de SEQ ID NO: 3.

[0019] En algunos aspectos de las formulaciones divulgadas en la presente, el polipéptido FGF-21 está presente en una concentración entre alrededor de 1 mg/ml y alrededor de 40 mg/ml. En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 está presente en una concentración de alrededor de 10 mg/ml o alrededor de 20 mg/ml. En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 está presente en una cantidad entre alrededor de 1 mg y alrededor de 40 mg por dosis. En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 está presente en una cantidad de alrededor de 1 mg por dosis, alrededor de 5 mg por dosis, alrededor de 10 mg por dosis, alrededor de 20 mg por dosis, o alrededor de 40 mg por dosis.

[0020] En algunos aspectos, la formulación se formula para administración subcutánea. En algunos aspectos, la formulación se formula para administración subcutánea con una jeringa de seguridad. En algunos aspectos, la formulación se formula para administración diaria o semanal. En algunos aspectos, la formulación es una formulación

acuosa. En algunos aspectos de las formulaciones divulgadas en la presente, el polipéptido FGF-21 es PEG-FGF-21 (SEQ ID NO: 2).

[0021] La presente divulgación proporciona una formulación farmacéutica que comprende (i) un polipéptido FGF-21; (ii) histidina en una concentración entre alrededor de 10 mM y alrededor de 50 mM; (iii) sacarosa en una concentración entre alrededor de 100 mM y alrededor de 1 M; (iv) polisorbato 80 en una concentración entre alrededor de 0,01 % y alrededor de 0,1 % (p/v); y (v) DTPA en una concentración entre alrededor de 10 µM y alrededor de 100 µM; en donde el pH de la formulación está entre alrededor de 6,7 y alrededor de 7,5.

[0022] La presente divulgación también proporciona una formulación farmacéutica que comprende (i) un polipéptido FGF-21; (ii) histidina en una concentración de alrededor de 20 mM; (iii) sacarosa en una concentración de alrededor de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una concentración de alrededor de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una concentración de alrededor de 50 µM; en donde el pH es alrededor de 7,1. También se proporciona una formulación farmacéutica que comprende (i) un polipéptido FGF-21; (ii) histidina en una concentración de 20 mM; (iii) sacarosa en una concentración de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una concentración de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una concentración de 50 µM; en donde el pH es 7,1.

[0023] La presente divulgación también proporciona una formulación farmacéutica que comprende (i) un polipéptido FGF-21; (ii) histidina en una concentración de alrededor de 20 mM; y (iii) sacarosa en una concentración de alrededor de 600 mM; en donde el pH es alrededor de 7,0. También se proporciona una formulación farmacéutica que comprende (i) un polipéptido FGF-21; (ii) histidina en una concentración de 20 mM; y (iii) sacarosa en una concentración de 600 mM; en donde el pH es 7,0.

[0024] También se proporciona una formulación farmacéutica que comprende (i) PEG-FGF-21 en una concentración de alrededor de 10 mg/ml; (ii) histidina en una concentración de alrededor de 20 mM; (iii) sacarosa en una concentración de alrededor de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una concentración de alrededor de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una concentración de alrededor de 50 µM; en donde el pH es alrededor de 7,1.

[0025] También se proporciona una formulación farmacéutica que comprende (i) PEG-FGF-21 en una concentración de alrededor de 20 mg/ml; (ii) histidina en una concentración de alrededor de 20 mM; (iii) sacarosa en una concentración de alrededor de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una concentración de alrededor de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una concentración de alrededor de 50 µM; en donde el pH es alrededor de

7,1.

[0026] También se proporciona una formulación farmacéutica que comprende (i) PEG-FGF-21 en una concentración de 10 mg/ml; (ii) histidina en una concentración de 20 mM; (iii) sacarosa en una concentración de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una concentración de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una concentración de 50 uM; en donde el pH es 7,1.

[0027] También se proporciona una formulación farmacéutica que comprende (i) PEG-FGF21 en una concentración de 20 mg/ml; (ii) histidina en una concentración de 20 mM; (iii) sacarosa en una concentración de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una concentración de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una concentración de 50 uM; en donde el pH es 7,1.

[0028] La presente divulgación también proporciona métodos para mejorar la estabilidad de una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 que comprenden mezclar un quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico, en donde la formulación tiene una estabilidad mejorada en comparación con una formulación de referencia que no contiene el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico. En un aspecto, la mejora en la estabilidad comprende (i) un aumento en la estabilidad física, (ii) un aumento en la estabilidad química, o (iii) una combinación de estos. En un aspecto, el aumento en la estabilidad física comprende (i) prevención o disminución de agregación de polipéptido, (ii) prevención o disminución de fragmentación de polipéptido, o (iii) una combinación de estos. En algunos aspectos, el aumento en estabilidad química comprende (i) prevención o disminución de desamidación, (ii) prevención o disminución de oxidación, o (iii) una combinación de estos. En algunos aspectos, la mejora en la estabilidad comprende uno o más de:

- (a) una menor velocidad de desamidación cuando se almacena a 40 °C durante alrededor de un mes con respecto a la formulación de referencia;
- (b) una menor velocidad de agregación de alto peso molecular (HMW) cuando se almacena a 40 °C durante alrededor de un mes con respecto a la formulación de referencia; o
- (c) ambos (a) y (b).

[0029] En algunos aspectos de los métodos para mejorar la estabilidad de una formulación farmacéutica divulgada en la presente, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico mitiga la oxidación de una o más metioninas correspondientes al aminoácido 1 y/o aminoácido 169 de SEQ ID NO: 3 (o las metioninas correspondientes en SEQ ID: 1 o SEQ ID NO: 2, u otros polipéptidos FGF-21 modificados) a 25 °C y/o 40 °C. En algunos aspectos, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico es

DTPA. En algunos aspectos, el quelante de cationes DTPA está presente en una cantidad entre alrededor de 10 μM y alrededor de 100 μM de DTPA, entre alrededor de 20 μM y alrededor de 90 μM de DTPA, entre alrededor de 25 μM y alrededor de 75 μM de DTPA, entre alrededor de 40 μM y alrededor de 60 μM de DTPA, entre alrededor de 30 μM y alrededor de 70 μM de DTPA, entre alrededor de 30 μM y alrededor de 80 μM de DTPA, o entre alrededor de 40 μM y alrededor de 70 μM de DTPA. En algunos aspectos, el quelante de cationes DTPA está presente en una cantidad de alrededor de 40 μM , alrededor de 45 μM , alrededor de 50 μM , alrededor de 55 μM , o alrededor de 60 μM de DTPA.

[0030] En algunos aspectos, los métodos para mejorar la estabilidad de una formulación farmacéutica divulgada en la presente también comprenden ajustar el pH de la formulación por encima de 6,5, por encima de 6,6, por encima de 6,7, por encima de 6,8, por encima de 6,9 o por encima de 7,0. En algunos aspectos, el pH se ajusta a un valor de pH entre alrededor de 6,8 y alrededor de 7,5, o alrededor de 6,9 y alrededor de 7,4, o alrededor de 7,0 y alrededor de 7,3, o alrededor de 7,1 y 7,2, o alrededor de 7,1 y alrededor de 7,3, o alrededor de 7,1 y alrededor de 7,4, o alrededor de 7,1 y alrededor de 7,5. En algunos aspectos, el pH ajustado es alrededor de 6,8, alrededor de 6,9, alrededor de 7,0, alrededor de 7,1, alrededor de 7,2, alrededor de 7,3, alrededor de 7,4, o alrededor de 7,5. En algunos aspectos, la formulación con pH ajustado es más estable que una formulación de referencia (es decir, una formulación con los mismos componentes en las mismas concentraciones pero con un pH diferente) que tiene un pH de 6,5.

[0031] En algunos aspectos, los métodos para mejorar la estabilidad de una formulación farmacéutica divulgada en la presente también comprenden mezclar un tensioactivo. En algunos aspectos, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico, por ejemplo, un polisorbato. En algunos aspectos, el polisorbato es polisorbato 80. En algunos aspectos, el tensioactivo polisorbato 80 se mezcla en una cantidad de alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor de 0,02 % a alrededor de 0,09 % (p/v), alrededor de 0,03 % a alrededor de 0,08 % (p/v), alrededor de 0,04 % a alrededor de 0,07 % (p/v) o alrededor de 0,05 % a alrededor de 0,06 % (p/v). En algunos aspectos, el tensioactivo polisorbato 80 se mezcla en una cantidad de al menos alrededor de 0,01 % (p/v), al menos alrededor de 0,02 % (p/v), al menos alrededor de 0,03 % (p/v), al menos alrededor de 0,04 % (p/v), al menos alrededor de 0,05 % (p/v), al menos alrededor de 0,06 % (p/v), al menos alrededor de 0,07 % (p/v), al menos alrededor de 0,08 % (p/v), al menos alrededor de 0,09 % (p/v) o al menos alrededor de 0,1 % (p/v). En algunos

aspectos, el tensioactivo mitiga la formación de partículas y/o burbujas de aire cuando la formulación se agita, por ejemplo, en un agitador.

[0032] En algunos aspectos, los métodos para mejorar la estabilidad de una formulación farmacéutica divulgada en la presente también comprenden mezclar un agente amortiguador de aminoácido, por ejemplo, histidina. En algunos aspectos, el agente amortiguador de histidina se mezcla en una cantidad de alrededor de 10 mM a alrededor de 100 mM de histidina, alrededor de 20 mM a alrededor de 90 mM de histidina, alrededor de 30 mM a alrededor de 80 mM de histidina, alrededor de 40 mM a alrededor de 70 mM de histidina, alrededor de 10 mM a alrededor de 30 mM de histidina, alrededor de 15 mM a alrededor de 25 mM de histidina, alrededor de 17,5 mM a alrededor de 22,5 mM de histidina o alrededor de 40 mM a alrededor de 60 mM de histidina. En algunos aspectos, el agente amortiguador de histidina se mezcla en una cantidad de alrededor de 10 mM de histidina, alrededor de 15 mM de histidina, alrededor de 20 mM de histidina, alrededor de 25 mM de histidina, alrededor de 30 mM de histidina, alrededor de 35 mM de histidina, alrededor de 40 mM de histidina, alrededor de 45 mM de histidina o alrededor de 50 mM de histidina.

[0033] En algunos aspectos, los métodos para mejorar la estabilidad de una formulación farmacéutica divulgada en la presente también comprenden mezclar un regulador osmótico, por ejemplo, un azúcar. En algunos aspectos, el azúcar es sacarosa. En algunos aspectos, el regulador osmótico sacarosa se mezcla en una cantidad de alrededor de 100 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 200 mM a alrededor de 900 mM de sacarosa, alrededor de 300 mM a alrededor de 800 mM de sacarosa, alrededor de 400 mM a alrededor de 700 mM de sacarosa o alrededor de 500 mM a alrededor de 600 mM de sacarosa. En algunos aspectos, el regulador osmótico sacarosa se mezcla en una cantidad de alrededor de 100 mM de sacarosa, alrededor de 200 mM de sacarosa, alrededor de 300 mM de sacarosa, alrededor de 400 mM de sacarosa, alrededor de 500 mM de sacarosa, alrededor de 600 mM de sacarosa, alrededor de 700 mM de sacarosa, alrededor de 800 mM de sacarosa, alrededor de 900 mM de sacarosa o alrededor de 1 M de sacarosa.

[0034] En algunos aspectos de los métodos para mejorar la estabilidad de una formulación farmacéutica divulgada en la presente, el polipéptido FGF-21 es un polipéptido FGF-21 modificado. En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 modificado comprende una secuencia de polipéptido FGF-21 que tiene al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 96 %, al menos alrededor de 97 %, al menos alrededor de 98

% o al menos alrededor de 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, en donde el polipéptido tiene actividad de FGF-21. En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 modificado está ligado a una porción de extensión de semivida. En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 modificado está ligado a la porción de extensión de semivida por medio de la cadena lateral de un aminoácido codificado de manera no natural en la secuencia del polipéptido FGF-21.

[0035] En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida comprende, por ejemplo, albúmina, una región constante de inmunoglobulina o una porción de esta, un polipéptido de unión a albúmina, una IgG, ABP, una porción de PASilación, una porción de HESilación, XTEN, una región Fc, y cualquier combinación de estos. En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida comprende un polímero hidrosoluble. En algunos aspectos, el polímero hidrosoluble es PEG. En algunos aspectos, el PEG tiene un peso molecular promedio entre alrededor de 10 kDa y alrededor de 40 kDa. En algunos aspectos, el PEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 30 kDa. En algunos aspectos, el aminoácido codificado de manera no natural es un derivado de fenilalanina. En algunos aspectos, el derivado de fenilalanina es para-acetil-L-fenilalanina. En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida está ligada al aminoácido codificado de manera no natural por medio de un enlace oxima. En algunos aspectos, el aminoácido codificado de manera no natural reemplaza al aminoácido glutamina 109 de SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 está presente en una concentración entre alrededor de 1 mg/ml y alrededor de 40 mg/ml. En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 está presente en una concentración de alrededor de 10 mg/ml o alrededor de 20 mg/ml. En algunos aspectos, la formulación es una formulación acuosa. En algunos aspectos de los métodos divulgados anteriormente, el polipéptido FGF-21 es PEG-FGF-21 (SEQ ID NO: 2).

[0036] La presente divulgación también proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende un polipéptido FGF-21, en donde el método comprende mezclar (i) histidina en una concentración entre alrededor de 10 mM y alrededor de 50 mM; (ii) sacarosa en una concentración entre alrededor de 100 mM y alrededor de 1 M; (iii) polisorbato 80 en una concentración entre alrededor de 0,01 % y alrededor de 0,1 % (p/v); y (iv) DTPA en una concentración entre alrededor de 10 µM y alrededor de 100 µM; en donde el pH de la formulación está entre alrededor de 6,7 y alrededor de 7,5. También se proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende un polipéptido FGF-21, en donde el método comprende

mezclar (i) histidina en una concentración de alrededor de 20 mM; (ii) sacarosa en una concentración de alrededor de 600 mM; (iii) polisorbato 80 en una concentración de alrededor de 0,05 % (p/v); y (iv) DTPA en una concentración de alrededor de 50 μ M; en donde el pH es alrededor de 7,1. También se proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende un polipéptido FGF-21, en donde el método comprende mezclar (i) histidina en una concentración de 20 mM; (ii) sacarosa en una concentración de 600 mM; (iii) polisorbato 80 en una concentración de 0,05 % (p/v); y (iv) DTPA en una concentración de 50 μ M; en donde el pH es 7,1.

[0037] La presente divulgación también proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende un polipéptido FGF-21, en donde el método comprende mezclar (i) histidina en una concentración de alrededor de 20 mM; (ii) sacarosa en una concentración de alrededor de 600 mM; en donde el pH es alrededor de 7,0. La presente divulgación también proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende un polipéptido FGF-21, en donde el método comprende mezclar (i) histidina en una concentración de 20 mM; (ii) sacarosa en una concentración de 600 mM; en donde el pH es 7,0. También se proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende PEG-FGF-21 en una concentración de alrededor de 10 mg/ml, en donde el método comprende mezclar (i) histidina en una concentración de alrededor de 20 mM; (ii) sacarosa en una concentración de alrededor de 600 mM; (iii) polisorbato 80 en una concentración de alrededor de 0,05 % (p/v); y (iv) DTPA en una concentración de alrededor de 50 μ M; en donde el pH es alrededor de 7,1.

[0038] La presente divulgación también proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende PEG-FGF-21 en una concentración de alrededor de 20 mg/ml, en donde el método comprende mezclar (i) histidina en una concentración de alrededor de 20 mM; (ii) sacarosa en una concentración de alrededor de 600 mM; (iii) polisorbato 80 en una concentración de alrededor de 0,05 % (p/v); y (iv) DTPA en una concentración de alrededor de 50 μ M; en donde el pH es alrededor de 7,1. También se proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende PEG-FGF-21 en una concentración de alrededor de 10 mg/ml, en donde el método comprende mezclar (i) histidina en una concentración de 20 mM; (ii) sacarosa en una concentración de 600 mM; (iii) polisorbato 80 en una concentración de 0,05 % (p/v); y (iv) DTPA en una concentración de 50 μ M; en donde el pH es 7,1.

[0039] También se proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende PEG-FGF-21 en una concentración de alrededor de 20

mg/ml, en donde el método comprende mezclar (i) histidina en una concentración de 20 mM; (ii) sacarosa en una concentración de 600 mM; (iii) polisorbato 80 en una concentración de 0,05 % (p/v); y (iv) DTPA en una concentración de 50 uM; en donde el pH es 7,1.

[0040] La presente divulgación también proporciona una formulación farmacéutica preparada de acuerdo con cualquiera de los métodos para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende FGF-21 (por ejemplo, FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) divulgada en la presente. También se proporciona un kit que comprende (i) una formulación farmacéutica que comprende FGF-21 (por ejemplo, un FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) divulgado en la presente, y (ii) instrucciones para su uso.

[0041] La presente divulgación también proporciona métodos para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada a fibrosis y/o diabetes en un sujeto que lo necesita que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende FGF-21 (por ejemplo, un FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) divulgada en la presente. En algunos aspectos, la enfermedad o afección es diabetes. En algunos aspectos, la diabetes es diabetes de tipo 2. En algunos aspectos, la enfermedad o afección es esteatohepatitis no alcohólica (NASH). En algunos aspectos, la administración de una cantidad eficaz de la formulación farmacéutica que comprende FGF-21 (por ejemplo, un FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) divulgada en la presente al sujeto disminuye la rigidez hepática, disminuye el porcentaje de grasa corporal, disminuye el peso corporal, disminuye la relación de peso del hígado con respecto a peso corporal, disminuye el contenido de lípidos en el hígado, disminuye el área de fibrosis hepática, disminuye los niveles de glucosa en sangre en ayunas, disminuye los niveles de triglicéridos en ayunas, disminuye los niveles de colesterol LDL, disminuye los niveles de ApoB, disminuye los niveles de ApoC, aumenta el colesterol HDL, o cualquier combinación de estos. En algunos aspectos, se administran entre alrededor de 1 mg y alrededor de 40 mg de polipéptido FGF-21 por dosis. En algunos aspectos, se administran alrededor de 1 mg, alrededor de 5 mg, alrededor de 10 mg, alrededor de 20 mg o alrededor de 40 mg de polipéptido FGF-21 por dosis. En algunos aspectos, la formulación farmacéutica se administra por vía subcutánea. En algunos aspectos, la formulación farmacéutica se administra por vía subcutánea usando una jeringa de seguridad. En algunos aspectos, la formulación farmacéutica se administra diaria o semanalmente.

[0042] En algunos aspectos, la administración de la formulación farmacéutica que comprende FGF-21 (por ejemplo, un FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21)

divulgada en la presente de acuerdo con los métodos de tratamiento divulgados en la presente al sujeto produce (i) reducción en los niveles de grasa hepática; (ii) reducción en los niveles de lesión hepática; (iii) reducción en los niveles de fibrosis; (iv) disminución en los niveles de biomarcador para fibrosis Pro-C3 en suero (propéptido de colágeno tipo III de terminal N); (v) disminución en los niveles de alanina aminotransferasa (ALT); (vi) disminución en los niveles de aspartato aminotransferasa (AST); (vii) aumento en los niveles de adiponectina en suero; (viii) disminución en los niveles de LDL en plasma, aumento en los niveles de HDL en plasma; (ix) disminución en los niveles de triglicérido en plasma; (x) reducción en el nivel de rigidez hepática; o (xi) cualquier combinación de estos, en comparación con los niveles en sujetos no tratados o con el sujeto antes de la administración de la formulación farmacéutica.

[0043] En algunos aspectos, la formulación farmacéutica se elabora por medio del proceso de mezclar (i) PEG-FGF-21 en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 10 mg/ml; (ii) histidina en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 20 mM; (iii) sacarosa en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 50 uM; y ajustar el pH a alrededor de 7,1.

[0044] En algunos aspectos, la formulación farmacéutica se elabora por medio del proceso de mezclar (i) PEG-FGF-21 en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 20 mg/ml; (ii) histidina en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 20 mM; (iii) sacarosa en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 50 uM; y ajustar el pH a alrededor de 7,1.

[0045] En algunos aspectos, la formulación farmacéutica se elabora por medio del proceso de mezclar (i) PEG-FGF-21 en una cantidad para alcanzar una concentración final de 10 mg/ml; (ii) histidina en una cantidad para alcanzar una concentración final de 20 mM; (iii) sacarosa en una cantidad para alcanzar una concentración final de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una cantidad para alcanzar una concentración final de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una cantidad para alcanzar una concentración final de 50 uM; y ajustar el pH a alrededor de 7,1.

[0046] En algunos aspectos, la formulación farmacéutica se elabora por medio del

proceso de mezclar (i) PEG-FGF-21 en una cantidad para alcanzar una concentración final de 20 mg/ml; (ii) histidina en una cantidad para alcanzar una concentración final de 20 mM; (iii) sacarosa en una cantidad para alcanzar una concentración final de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una cantidad para alcanzar una concentración final de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una cantidad para alcanzar una concentración final de 50 μ M; y ajustar el pH a alrededor de 7,1.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0047] Las Figuras 1A y 1B muestran la desamidación de PEG-FGF-21 como una función de la composición de formulación. La Figura 1A muestra desamidación en una formulación sin ácido pentético (DTPA) o polisorbato 80. La Figura 1B muestra desamidación en una formulación que comprende ácido pentético (DTPA) y polisorbato 80.

[0048] Las Figuras 2A y 2B muestran oxidación catalizada por metal de polipéptido PEG-FGF-21 en metionina 1 (Figura 2A) y metionina 169 (Figura 2B) en presencia y ausencia de 50 μ M de DTPA (también denominado ácido pentético).

[0049] Las Figuras 3A y 3B muestran el efecto del pH sobre la agregación de PEG-FGF-21. La Figura 3A muestra la agregación como una función de tiempo, pH y sistema de amortiguadores usados. La Figura 3B muestra agregación a diferentes temperaturas y puntos temporales (5 °C, 14 meses; 25 °C, 1 mes; 40 °C, 1 día) y diferente pH.

[0050] Las Figuras 4A y 4B muestran la agregación de PEG-FGF-21 como una función de la composición de formulación. La Figura 4A muestra agregación en una formulación sin ácido pentético (DTPA) o polisorbato 80. La Figura 4B muestra agregación en una formulación con ácido pentético (DTPA) y polisorbato 80.

[0051] La Figura 5 muestra que PEG-FGF-21 a una mayor concentración sin PS80 se volvió turbio luego de agitación a 300 rpm en un agitador orbital durante 24 h (izquierda) o un agitador WristAction durante 6 h (derecha). La adición de polisorbato 80 entre 0,01 % y 0,1 % (p/v) redujo la turbidez de las muestras.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0052] La presente divulgación proporciona una formulación farmacéutica estabilizada que comprende un polipéptido factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21), por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21 (SEQ ID NO: 2). Se observó que la presencia de un quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico, tal como DTPA, mitiga la oxidación de uno o más residuos de aminoácido en el polipéptido FGF-21, por ejemplo, metioninas. La incorporación de DTPA en la formulación de FGF-21 también disminuye la velocidad de desamidación del polipéptido FGF-21 durante el

almacenamiento, y también reduce la velocidad de agregación de alto peso molecular durante el almacenamiento. Una estabilización adicional puede lograrse al ajustar el pH de la formulación hasta 7,1. Además, la formulación puede estabilizarse adicionalmente al agregar un tensioactivo, tal como polisorbato 80.

[0053] La divulgación también proporciona métodos para elaborar la formulación divulgada, así como formulaciones producidas mediante la aplicación del método divulgado. También se proporcionan métodos de tratamiento o profilaxis de enfermedades asociadas a fibrosis, por ejemplo, NASH y diabetes, que comprenden la administración de las formulaciones estabilizadas divulgadas a un sujeto que lo necesita.

Definiciones

[0054] A fin de comprender mejor la presente divulgación, primero se definen algunos términos. Como se usa en la presente solicitud, a menos que se indique lo contrario, cada uno de los siguientes términos tendrá el significado que se indica a continuación. A lo largo de la solicitud se establecen definiciones adicionales.

[0055] La divulgación incluye aspectos en donde exactamente un miembro del grupo está presente, se usa o es de otro modo relevante en un producto o proceso determinado. La divulgación incluye aspectos en donde más de uno o todos los miembros del grupo están presentes, se usan o son de otro modo relevantes en un producto o proceso determinado.

[0056] Las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Las expresiones "un" (o "una"), así como "uno o más" y "al menos uno" se pueden usar de manera indistinta en la presente. En algunos aspectos, las expresiones "un" o "una" significan "único". En otros aspectos, las expresiones "un" o "una" incluyen "dos o más" o "múltiples". Por lo tanto, por ejemplo, cuando se mencionan "FGF-21" o "polipéptido FGF-21", se hace referencia a una o más de tales proteínas e incluyen equivalentes de estas conocidos por las personas del oficio de nivel medio, etcétera.

[0057] Además, "y/o", en donde se usa en la presente, se debe entender como una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por lo tanto, la expresión "y/o", como se usa en una frase tal como "A y/o B" en la presente, incluye "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). Del mismo modo, la expresión "y/o", como se usa en una frase tal como "A, B y/o C" abarca cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y

B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

[0058] Como se usa en la presente, la expresión “alrededor de” se refiere a un valor o composición que se encuentra dentro de un margen de error aceptable para el valor o composición en particular según lo determina una persona del oficio de nivel medio, que dependerá, en parte, de cómo se mide o se determina el valor o composición, es decir, de las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, “alrededor de” puede significar dentro de 1 o más de 1 de desviación estándar, de acuerdo con la práctica en el estado de la técnica. De manera alternativa, “alrededor de” puede referirse a un rango de hasta 20 %. Además, en particular, con respecto a sistemas o procesos biológicos, los términos pueden referirse a hasta un orden de magnitud o hasta 5 veces un valor. Cuando se brindan valores o composiciones particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, se supone que el significado de “alrededor de” se encuentra dentro de un margen de error aceptable para dicho valor o composición en particular. Cuando la expresión “alrededor de” se usa junto con un rango numérico, modifica el rango extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. Por ende, “alrededor de 10-20” significa “alrededor de 10 a alrededor de 20.” En general, la expresión “alrededor de” puede modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado con una varianza de, por ejemplo, 10 %, hacia arriba o hacia abajo (mayor o menor).

[0059] A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que le otorga habitualmente una persona del oficio de nivel medio a quien se refiere esta invención. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2.^a ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3.^a ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan a una persona del oficio de nivel medio un diccionario general de muchas de las expresiones usadas en la presente divulgación.

[0060] Se entiende que, siempre que se describan aspectos en la presente con la expresión “que comprende”, también se proporcionan aspectos de otro modo análogos descritos en términos de “que consiste en” y/o “que consiste esencialmente en”.

[0061] Las unidades, los prefijos y los símbolos se indican en la forma aceptada por el Système International de Unites (SI). Los rangos numéricos incluyen los números que definen el rango. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha orientadas de amino a carboxi. Los títulos que se proporcionan en la presente no limitan los diversos aspectos de la divulgación, que se

pueden obtener por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad. En consecuencia, los términos que se definen a continuación se definen en mayor detalle por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

[0062] En la presente, se puede hacer referencia a los aminoácidos ya sea mediante su símbolo de tres letras comúnmente conocido o mediante los símbolos de una letra, según recomienda la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha orientadas de amino a carboxi.

[0063] *Agregación*: El término “agregación” se refiere a la tendencia de un polipéptido, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 divulgado en la presente de formar complejos ligados de manera no covalente a otras moléculas (tales como otras moléculas del mismo polipéptido) y así formar complejos de alto peso molecular. Los ejemplos de métodos para medir la formación de agregados incluyen la cromatografía de exclusión por tamaño analítica descrita en los Ejemplos de la presente. Las cantidades relativas de agregación se pueden determinar con respecto a un compuesto de referencia, por ejemplo, para identificar un polipéptido que tiene menor agregación. Las cantidades relativas de agregación también se pueden determinar con respecto a una formulación de referencia, por ejemplo, para identificar una formulación en donde un polipéptido FGF-21 tiene agregación reducida.

[0064] *Sustitución de aminoácido*: La expresión “sustitución de aminoácido” se refiere al reemplazo de un residuo de aminoácido presente en una secuencia de origen o de referencia (por ejemplo, una secuencia de tipo silvestre) por otro residuo de aminoácido. Un aminoácido puede sustituirse en una secuencia de origen o de referencia (por ejemplo, una secuencia de polipéptidos de tipo silvestre), por ejemplo, por medio de síntesis de péptidos química o por medio de métodos recombinantes conocidos en el estado de la técnica. En consecuencia, una referencia a una “sustitución en la posición X” se refiere a la sustitución de un aminoácido presente en la posición X con un residuo de aminoácido alternativo. En algunos aspectos, los patrones de sustitución pueden describirse de acuerdo con el esquema AnY, en donde A es el código de una sola letra correspondiente al aminoácido presente natural u originalmente en la posición n, e Y es el residuo de aminoácido sustituyente. En otros aspectos, los patrones de sustitución pueden describirse de acuerdo con el esquema An(YZ), en donde A es el código de una sola letra correspondiente al residuo de aminoácido que sustituye al aminoácido presente natural u originalmente en la posición n, e Y y Z son residuos de aminoácido sustituyentes alternativos que pueden reemplazar a A.

[0065] En el contexto de la presente divulgación, las sustituciones (incluso cuando se mencionan como sustitución de aminoácidos) se llevan a cabo en el nivel del ácido nucleico, es decir, la sustitución de un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido alternativo se lleva a cabo al sustituir el codón que codifica el primer aminoácido con un codón que codifica el segundo aminoácido.

[0066] *Aproximadamente*: Como se usa en la presente, el término “aproximadamente”, aplicado a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia indicado. En algunos aspectos, el término “aproximadamente” se refiere a un rango de valores que se encuentran dentro de 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos, en cualquier dirección (mayor o menor) del valor de referencia indicado a menos que se indique lo contrario o que sea evidente en el contexto (excepto que dicho número exceda 100 % de un valor posible).

[0067] *Asociado a*: Como se usa en la presente con respecto a una enfermedad, la expresión “asociado a” se refiere a que el síntoma, medición, característica o estado en cuestión está ligado al diagnóstico, desarrollo, presencia o progresión de dicha enfermedad. Una asociación puede estar causalmente ligada, pero no necesariamente, a la enfermedad.

[0068] *Biológicamente activo*: La expresión “biológicamente activa” como se aplica a una molécula divulgada en la presente, por ejemplo, un polipéptido FGF-21, significa cualquier sustancia que puede afectar cualquier propiedad física o bioquímica de un sistema biológico, vía, molécula o interacción con respecto a un ser vivo. En particular, como se usa en la presente, las moléculas biológicamente activas incluyen, entre otras, cualquier sustancia utilizada para diagnosticar, curar, mitigar, tratar o prevenir enfermedades o afecciones, por ejemplo, enfermedades o afecciones asociadas a fibrosis, en seres humanos u otros animales, o para mejorar el bienestar físico o mental de seres humanos o animales.

[0069] *Sustitución conservadora de aminoácidos*: Una “sustitución conservadora de aminoácidos” es una en la que el residuo de aminoácido es reemplazado por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares se definieron en el estado de la técnica, lo que incluye cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina o histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina o cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina o triptófano), cadenas laterales

ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano o histidina). Por lo tanto, si un aminoácido en un polipéptido se reemplaza por otro aminoácido de la misma familia de cadenas laterales, la sustitución de aminoácido se considera conservadora. En otro aspecto, una serie de aminoácidos puede reemplazarse de manera conservadora con una serie estructuralmente similar que difiera en orden y/o composición de los miembros de la familia de la cadena lateral.

[0070] Las sustituciones no conservadoras de aminoácido incluyen aquellas en que (i) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva (por ejemplo, Arg, His o Lys) se sustituye por, o con, un residuo electronegativo (por ejemplo, Glu o Asp), (ii) un residuo hidrófilo (por ejemplo, Ser o Thr) se sustituye por, o con, un residuo hidrófobo (por ejemplo, Ala, Leu, Ile, Phe o Val), (iii) una cisteína o prolina se sustituye por, o con, cualquier otro residuo, o (iv) un residuo que tiene una cadena lateral aromática o hidrófoba voluminosa (por ejemplo, Val, His, Ile o Trp) se sustituye por, o con, uno que tiene una cadena lateral más corta (por ejemplo, Ala o Ser) o no tiene una cadena lateral (por ejemplo, Gly).

[0071] También pueden usarse otras sustituciones de aminoácido. Por ejemplo, para el aminoácido alanina, una sustitución puede seleccionarse de cualquiera de D-alanina, glicina, beta-alanina, L-cisteína y D-cisteína. Para lisina, un reemplazo puede ser cualquiera de D-lisina, arginina, D-arginina, homo-arginina, metionina, D-metionina, ornitina o D-ornitina. Por lo general, las sustituciones en regiones funcionalmente importantes que se puede esperar que induzcan cambios en las propiedades de polipéptidos aislados son aquellas en que (i) un residuo polar, por ejemplo, serina o treonina, se sustituye por (o con) un residuo hidrófobo, por ejemplo, leucina, isoleucina, fenilalanina o alanina; (ii) un residuo de cisteína se sustituye por (o con) cualquier otro residuo; (iii) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisina, arginina o histidina, se sustituye por (o con) un residuo que tiene una cadena lateral electronegativa, por ejemplo, ácido glutámico o ácido aspártico; o (iv) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye por (o con) uno que no tiene dicha cadena lateral, por ejemplo, glicina. La probabilidad de que una de las sustituciones no conservadoras anteriores pueda alterar las propiedades funcionales de la proteína también se correlaciona con la posición de la sustitución con respecto a las regiones funcionalmente importantes de la proteína: por lo tanto, algunas sustituciones no conservadoras pueden tener un efecto escaso o nulo sobre las propiedades biológicas.

[0072] *Conservado*: Como se usa en la presente, el término “conservado” se refiere a residuos de aminoácidos de una secuencia de polipéptidos, respectivamente, que son aquellos que se presentan inalterados en la misma posición de dos o más secuencias que se comparan. Los aminoácidos que están relativamente conservados son aquellos que están conservados entre más secuencias relacionadas que los nucleótidos o aminoácidos que aparecen en otra parte de las secuencias.

[0073] En algunos aspectos, se considera que dos o más secuencias están “completamente conservadas” o son “idénticas” si son 100 % idénticas entre sí. En algunos aspectos, se considera que dos o más secuencias están “altamente conservadas” si son al menos 70 % idénticas, al menos 80 % idénticas, al menos 90 % idénticas o al menos 95 % idénticas entre sí. En algunos aspectos, se considera que dos o más secuencias están “altamente conservadas” si son alrededor de 70 % idénticas, alrededor de 80 % idénticas, alrededor de 90 % idénticas, alrededor de 95 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idénticas entre sí. En algunos aspectos, se considera que dos o más secuencias están “conservadas” si son al menos 30 % idénticas, al menos 40 % idénticas, al menos 50 % idénticas, al menos 60 % idénticas, al menos 70 % idénticas, al menos 80 % idénticas, al menos 90 % idénticas o al menos 95 % idénticas entre sí. En algunos aspectos, se considera que dos o más secuencias están “conservadas” si son alrededor de 30 % idénticas, alrededor de 40 % idénticas, alrededor de 50 % idénticas, alrededor de 60 % idénticas, alrededor de 70 % idénticas, alrededor de 80 % idénticas, alrededor de 90 % idénticas, alrededor de 95 % idénticas, alrededor de 98 % idénticas o alrededor de 99 % idénticas entre sí. La conservación de secuencia puede aplicar a la longitud total de un polinucleótido o polipéptido o puede aplicar a una parte, región o característica de esta.

[0074] *Desamidación*: El término “desamidación” se refiere a la tendencia de los residuos de aminoácidos dentro de un polipéptido para experimentar la reacción de desamidación de manera espontánea, y así cambiar la estructura química del aminoácido y afectar potencialmente la función del polipéptido. Los métodos de ejemplo para medir la desamidación se divulgan en los Ejemplos de la presente. La cantidad relativa de desamidación se puede determinar con respecto a un compuesto de referencia, por ejemplo, para identificar un polipéptido que tiene menor desamidación. Las cantidades relativas de desamidación también se puede determinar con respecto a una formulación de referencia, por ejemplo, para identificar una formulación en donde un polipéptido FGF-21 tiene desamidación reducida.

[0075] *Enfermedad asociada a fibrosis*: La expresión “enfermedad asociada a fibrosis”

incluye enfermedades, trastornos y afecciones en las que se observó que se presenta fibrosis o a las que se sabe o se cree que la fibrosis está asociada o contribuye a la etiología, progresión y síntomas de enfermedad, o en las que se sabe o se cree que la fibrosis se presenta a medida que la enfermedad avanza.

[0076] La fibrosis puede afectar un órgano o tejido, tal como páncreas, pulmón, corazón, riñón, hígado, ojos, sistema nervioso, médula ósea, ganglios linfáticos, endomiocardio o retroperitoneo. Algunos ejemplos de enfermedades asociadas a la fibrosis incluyen, entre otros, } no alcohólica (NASH), fibrosis hepática, precirrosis, cirrosis, enfermedad pulmonar parenquimatosa difusa, fibrosis quística, fibrosis pulmonar o de pulmón, fibrosis masiva progresiva, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis por inyección, fibrosis renal o de riñón, enfermedad renal crónica, enfermedad renal diabética, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, nefropatía membranosa, nefropatía por IgA, mielofibrosis, insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca metabólica, fibrosis cardíaca, fibrosis por cataratas, cataratas, cicatrización ocular, fibrosis pancreática, fibrosis dérmica, fibrosis intestinal, estenosis intestinal, fibrosis endomiocárdica, fibrosis auricular, fibrosis mediastínica, enfermedad de Crohn, fibrosis retroperitoneal, queloide, fibrosis sistémica nefrogénica, escleroderma, esclerosis sistémica, artrofibrosis, síndrome de Peyronie, contractura de Dupuytren, neuropatía diabética, capsulitis adhesiva, enfermedad hepática alcohólica, hepatoesteatosis, hepatitis viral, enfermedad biliar, hemocromatosis primaria, cirrosis relacionada con los fármacos, cirrosis criptógena, enfermedad de Wilson, y deficiencia de alfa 1-antitripsina, enfermedad pulmonar intersticial (ILD), enfermedad pulmonar fibrótica humana, degeneración macular, retinopatía retinal, retinopatía vítrea, fibrosis miocárdica, oftalmopatía de Grave, ergotismo inducido por fármacos, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis/reestenosis, cicatrices hipertróficas, mielofibrosis primaria o idiopática y enfermedad intestinal inflamatoria (que incluye, entre otras, colitis colagenosa). En algunos aspectos, la enfermedad asociada a la fibrosis puede incluir fibrosis hepática, fibrosis renal o de riñón, fibrosis pulmonar o de pulmón y fibrosis cardíaca o del corazón. En algunos aspectos, la enfermedad asociada a la fibrosis puede ser fibrosis hepática. En algunos aspectos, la enfermedad asociada a la fibrosis puede ser NASH.

[0077] *Cantidad eficaz:* Como se usa en la presente, la expresión “cantidad eficaz” de una formulación de FGF-21 es una cantidad suficiente para producir los resultados beneficiosos o deseados, por ejemplo, resultados clínicos y, como tal, una “cantidad eficaz” depende del contexto en que se aplique. Por ejemplo, en el contexto de administrar un polipéptido FGF-21 que trata NASH, una cantidad eficaz del polipéptido

FGF-21 es, por ejemplo, una cantidad suficiente para mejorar grasa hepática, lesión hepática o fibrosis (por ejemplo, una reducción en grasa hepática, lesión hepática o fibrosis con respecto a niveles en sujetos no tratados o con respecto a niveles en el sujeto antes de la administración del tratamiento).

[0078] En algunos aspectos, una cantidad eficaz de un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, para tratar NASH puede cambiar el nivel de uno o más biomarcadores de fibrosis: por ejemplo, disminución de Pro-C3 en suero; disminución de ALT o AST; aumento de adiponectina en suero; disminución de LDL en plasma; aumento de HDL en plasma; disminución de los niveles de triglicérido en plasma, o cualquier combinación de estos, con respecto a niveles en sujetos no tratados o con respecto a niveles en el sujeto antes de la administración del tratamiento.

[0079] La expresión “cantidad eficaz” puede usarse de manera indistinta con “dosis eficaz”, “cantidad terapéuticamente eficaz” o “dosis terapéuticamente eficaz”.

[0080] *Actividad de FGF-21:* La expresión “actividad de FGF-21” se refiere a al menos una actividad biológica de un polipéptido FGF-21. La expresión “actividad biológica” se refiere a la capacidad de una molécula, por ejemplo, un polipéptido FGF-21, para afectar cualquier propiedad física o bioquímica de un sistema biológico, vía, molécula o interacción en relación con un organismo, que incluye, entre otros, virus, bacterias, bacteriófagos, transposón, prión, insectos, hongos, plantas, animales y seres humanos.

[0081] Por ejemplo, en el contexto de un FGF-21 modificado o no modificado, la actividad biológica incluye cualquiera de las funciones biológicas realizadas por FGF-21. Los ejemplos de métodos para determinar si una molécula tiene al menos una actividad biológica de FGF-21 de tipo silvestre (tal como el polipéptido FGF-21 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 3) pueden incluir cualquier ensayo funcional conocido en el estado de la técnica, que incluye los métodos divulgados en el Ejemplo 5 y 17 de la publicación de solicitud estadounidense N.º 2017/0189486, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

[0082] El nivel relativo de actividad biológica se puede determinar con respecto a un compuesto de referencia, por ejemplo, para identificar un polipéptido que tiene actividad biológica o que tiene actividad biológica lo suficientemente alta para un uso terapéutico deseado, por ejemplo, que tiene una EC_{50} menos de 5 veces, menos de 10 veces, menos de 20 veces, menos de 50 veces o menos de 100 veces mayor que la EC_{50} de un compuesto de referencia. El nivel relativo de actividad biológica también se puede determinar con respecto a una formulación de referencia, por ejemplo, para identificar una formulación en donde un polipéptido FGF-21 tiene actividad biológica o tiene

actividad biológica lo suficientemente alta para un uso terapéutico deseado, por ejemplo, que tiene una EC_{50} menos de 5 veces, menos de 10 veces, menos de 20 veces, menos de 50 veces o menos de 100 veces mayor que la EC_{50} de un polipéptido FGF-21 en la formulación de referencia.

[0083] El compuesto de referencia descrito en la presente puede ser una secuencia de FGF-21 que no tenga una modificación, tal como una modificación descrita en la presente. Por ejemplo, el compuesto de referencia puede ser FGF-21 de tipo silvestre o la misma secuencia de polipéptido FGF-21 modificado sin un componente de fusión, por ejemplo, sin PEG. Los compuestos de referencia de ejemplo para PEG-FGF-21 incluyen, entre otros, polipéptido FGF-21 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 3, y el polipéptido FGF-21 modificado de SEQ ID NO: 1.

[0084] En algunos aspectos, el compuesto de referencia puede contener al menos un aminoácido codificado de manera no natural, que puede estar ligado a un ligador, polímero, molécula biológicamente activa, péptido, polipéptido o porción de extensión de semivida descritos en la presente (por ejemplo, PEG). En algunos aspectos, un compuesto de referencia puede contener al menos un aminoácido codificado de manera no natural, que puede no estar ligado a un ligador, polímero, molécula biológicamente activa, péptido, polipéptido o porción de extensión de semivida descritos en la presente (por ejemplo, PEG). En algunos aspectos, un compuesto de referencia puede contener sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos adicionales. En algunos aspectos, la comparación se puede realizar con una forma pegilada o no pegilada del polipéptido; en el caso anterior, la comparación se puede realizar con un polipéptido que comprende o no comprende un aminoácido codificado de manera no natural.

[0085] *Polipéptido FGF-21*: La expresión “polipéptido FGF-21” se refiere a un polipéptido FGF-21 de tipo silvestre y un polipéptido FGF-21 modificado.

[0086] *Porción de extensión de semivida*: La expresión “porción de extensión de semivida” (también denominada “HLEM”) se refiere a una porción, un dominio o una molécula aceptables desde el punto de vista farmacéutico ligados en forma covalente (“conjugados” o “fusionados”) al polipéptido FGF-21, por ejemplo, el polipéptido FGF-21 modificado descrito en la presente, opcionalmente mediante un aminoácido codificado de manera no natural, directamente o a través de un ligador, que previene o atenúa la degradación proteolítica *in vivo* u otra modificación química que reduce la actividad del polipéptido FGF-21 modificado, aumenta la semivida y/o mejora o altera otras propiedades farmacocinéticas o biofísicas que incluyen, entre otras, aumentar la velocidad de absorción, reducir la toxicidad, mejorar la solubilidad, reducir la agregación

de proteínas, aumentar la actividad biológica y/o la selectividad diana del polipéptido FGF-21 modificado, aumentar la facilidad de fabricación y/o reducir la inmunogenicidad del polipéptido FGF-21 modificado, en comparación con un compuesto de referencia, tal como una forma no conjugada del polipéptido FGF-21 modificado o el polipéptido FGF-21 de tipo silvestre.

[0087] *Identidad*: Como se usa en la presente, el término “identidad” se refiere a la conservación monomérica general entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de polipéptido. El término “idéntica” sin otros calificativos, por ejemplo, la proteína A es idéntica a la proteína B, implica que las secuencias son 100 % idénticas (100 % de identidad de secuencia). Describir dos secuencias como, por ejemplo, “70 % idénticas” es equivalente a describirlas como que tienen, por ejemplo, “70 % de identidad de secuencia”.

[0088] El cálculo de porcentaje de identidad de dos secuencias de polipéptido, por ejemplo, se puede llevar a cabo mediante la alineación de dos secuencias para fines de comparación óptima (por ejemplo, espacios que se pueden introducir en una o ambas de una primera y una [omisión en el texto fuente] secuencias de polipéptido para la alineación óptima, y se pueden desestimar las secuencias no idénticas para fines comparativos). En algunos aspectos, la longitud de una secuencia alineada para fines comparativos es al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Luego, se comparan los aminoácidos en las correspondientes posiciones de aminoácido.

[0089] Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo aminoácido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, las moléculas son idénticas a esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta la cantidad de espacios, y la longitud de cada espacio, que necesita introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden lograr con el uso de un algoritmo matemático.

[0090] Los programas de software adecuados se pueden adquirir de diversas fuentes, y para la alineación de secuencias de proteína y de nucleótidos. Un programa adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia es bl2seq, parte del paquete de programas BLAST disponible del sitio web de BLAST del National Center for Biotechnology Information del gobierno estadounidense (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Bl2seq

lleva a cabo una comparación entre dos secuencias usando el algoritmo BLASTN o BLASTP. BLASTN se usa para comparar secuencias de ácido nucleico, mientras que BLASTP se usa para comparar secuencias de aminoácidos. Otros programas adecuados son, por ejemplo, Needle, Stretcher, Water o Matcher, parte del paquete de programas de bioinformática EMBOSS y también disponible del European Bioinformatics Institute (EBI) en www.ebi.ac.uk/Tools/psa. Las alineaciones de secuencia puede llevarse a cabo usando métodos conocidos en el estado de la técnica, tales como MAFFT, Clustal (ClustalW, Clustal X o Clustal Omega), MUSCLE, etc.

[0091] Distintas regiones dentro de una sola secuencia diana de polipéptidos que se alinea con una secuencia de polipéptidos de referencia pueden tener, cada una, su propio porcentaje de identidad de secuencia. Cabe destacar que el valor del porcentaje de identidad de secuencia se redondea al décimo más cercano. Por ejemplo, 80,11, 80,12, 80,13 y 80,14 se redondean hacia abajo a 80,1, mientras que 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 y 80,19 se redondean hacia arriba, a 80,2. También cabe destacar que el valor de longitud siempre será un entero.

[0092] En algunos aspectos, el porcentaje de identidad (% ID) o de una primera secuencia de aminoácidos con respecto a una segunda secuencia de aminoácidos se calcula como $\% \text{ ID} = 100 \times (Y/Z)$, en donde Y es la cantidad de residuos de aminoácidos que se obtuvieron como coincidencias idénticas en el alineamiento de la primera y segunda secuencia (según se alinearon mediante inspección visual o un programa de alineamiento de secuencias particular), y Z es la cantidad total de residuos en la segunda secuencia. Si la longitud de una primera secuencia es mayor que aquella de la segunda secuencia, el porcentaje de identidad de la primera secuencia con respecto a la segunda secuencia será más alto que el porcentaje de identidad de la segunda secuencia con respecto a la primera secuencia.

[0093] Una persona del oficio de nivel medio apreciará que la generación de una alineación de secuencia para el cálculo de un porcentaje de identidad de secuencia no se limita a comparaciones de secuencia-secuencia binaria impulsadas exclusivamente por datos de secuencias primarias. También se apreciará que las alineaciones de secuencia pueden generarse al integrar datos de secuencias con datos de fuentes heterogéneas, tales como datos estructurales (por ejemplo, estructuras de proteínas cristalográficas), datos funcionales (por ejemplo, ubicación de mutaciones) o datos filogenéticos. Un programa adecuado que integra datos heterogéneos para generar alineaciones de secuencias múltiples es T-Coffee, disponible en www.tcoffee.org y, de manera alternativa, disponible, por ejemplo, de EBI. Asimismo, cabe destacar que la

alineación final usada para calcular el porcentaje de identidad de secuencia puede curarse de manera automática o manual.

[0094] *Degradación proteolítica in vivo*: La expresión “degradación proteolítica *in vivo*” se refiere a la escisión de un polipéptido cuando se introduce en un sistema viviente (por ejemplo, cuando se inyecta en un organismo), que puede ser el resultado de proteasas presentes en dicho organismo. La proteinólisis puede afectar potencialmente la actividad biológica o la semivida de un polipéptido. Por ejemplo, el FGF-21 de tipo silvestre puede experimentar escisión en el terminal C, lo que da como resultado un polipéptido inactivo truncado. Un ejemplo de método para medir proteólisis *in vivo* de FGF-21 es el ensayo de inmunoabsorción electroquimioluminiscente (ECLIA) basado en Meso Scale Discovery (MSD) descrito en el Ejemplo 10 de la solicitud estadounidense N.º US2017/0189486. La cantidad relativa de proteinólisis *in vivo* o *in vitro* se puede determinar con respecto a un compuesto de referencia, por ejemplo, para identificar un polipéptido que tiene una reducción de proteinólisis *in vivo*. La cantidad relativa de proteólisis *in vivo* también se puede determinar con respecto a una formulación de referencia, es decir, para identificar una formulación en la que el polipéptido FGF-21 tiene una disminución de proteólisis *in vitro*.

[0095] *Aislado*: Como se usa en la presente, el término “aislado” se refiere a una sustancia o entidad (por ejemplo, un polipéptido) que fue separada de al menos algunos de los componentes con los que se la asoció (ya sea en la naturaleza o en un contexto experimental). Las sustancias aisladas (por ejemplo, proteínas) pueden tener niveles variados de pureza con respecto a las sustancias con las que se las asoció.

[0096] *Ligado*: Como se usa en la presente, los términos “ligada” o “unida” se refieren a una secuencia de aminoácidos conectada de manera covalente o no covalente a una molécula, por ejemplo, un polímero hidrosoluble. El término “ligado” se refiere no solo a una fusión o concatenación de una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, un polipéptido FGF-21) con una segunda secuencia de aminoácidos (por ejemplo, un prolongador de semivida de albúmina), en el terminal C o el terminal N. También incluye la inserción de una secuencia de aminoácidos completa (por ejemplo, un prolongador de semivida de XTEN) en dos aminoácidos cualquiera en una segunda secuencia de aminoácidos (por ejemplo, un polipéptido FGF-21). En algunos aspectos, la unión puede llevarse a cabo entre una cadena lateral de un aminoácido en una primera secuencia de aminoácidos (por ejemplo, un polipéptido FGF-21) y una segunda molécula (por ejemplo, una segunda secuencia de aminoácidos o un polímero soluble, tal como PEG). En el contexto de la presente divulgación, los términos “fusionado” o “fusión” indican que

al menos dos cadenas de polipéptido se ligaron operativamente y se expresaron de manera recombinante. En algunos aspectos, dos cadenas de polipéptido pueden “fusionarse” como resultado de síntesis química. En el contexto de la presente divulgación, los términos “conjugado” o “conjugación” indican que dos entidades moleculares (por ejemplo, dos polipéptidos, o un polipéptido y un polímero, tal como PEG) se ligaron químicamente.

[0097] *Polipéptido FGF-21 modificado*: Como se usa en la presente, “polipéptido FGF-21 modificado”, “factor de crecimiento de fibroblastos 21 modificado” o “FGF-21 modificado” y formas de estos sin guión se usan de manera indistinta e incluyen los polipéptidos y proteínas distintos de FGF-21 de tipo silvestre (por ejemplo, FGF-21 humano de tipo silvestre de SEQ ID NO: 3) y, en general, tienen al menos una actividad biológica de un factor de crecimiento de fibroblastos 21, así como análogos de FGF-21, isoformas de FGF-21, miméticos de FGF-21, fragmentos de FGF-21, proteínas de FGF-21 híbridas, proteínas de fusión, oligómeros y multímeros, homólogos, variantes de patrones de glucosilación, variantes, variantes de empalme, y muteínas de estos, independientemente de su actividad biológica. Los polipéptidos FGF-21 modificados comprendidos por esta definición se describen con mayor detalle a continuación.

[0098] *Mutación*: En el contexto de la presente divulgación, las expresiones “mutación” y “sustitución de aminoácido” como se definieron anteriormente (en ocasiones denominadas simplemente “sustitución”) se consideran intercambiables.

[0099] *Aminoácido codificados de manera no natural*: Un “aminoácido codificado de manera no natural” se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes, ni pirrolisina o selenocisteína. Otra expresión que se puede usar como sinónimo de “aminoácido codificado de manera no natural” es “aminoácido no natural”. La expresión “aminoácido codificado de manera no natural” también incluye, por ejemplo, aminoácidos que se producen por modificación (por ejemplo, modificaciones después de la traducción) de un aminoácido codificado de manera natural (que incluye, entre otros, los 20 aminoácidos comunes), pero que no se incorporan naturalmente en una cadena de polipéptidos de crecimiento por medio del complejo de traducción. Los ejemplos de tales aminoácidos codificados de manera no natural incluyen, entre otros, N-acetilglucosaminil-L-serina, N-acetilglucosaminil-L-treonina y O-fosfotirosina. En un aspecto específico de la presente divulgación, un aminoácido codificado de manera no natural es para-acetil-L-fenilalanina.

[0100] *Paciente*: Como se usa en la presente, “paciente” se refiere a un sujeto que puede buscar o que necesita tratamiento, que requiere tratamiento, que está recibiendo

tratamiento, recibirá tratamiento o un sujeto que está bajo el cuidado de un profesional capacitado por una enfermedad o afección particular.

[0101] *Composición farmacéutica*: La expresión “composición farmacéutica” se refiere a una preparación que se encuentra en una forma tal que permite que la actividad biológica del ingrediente activo (un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales (por ejemplo, excipientes y agua) que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administraría la composición. Tal composición puede ser estéril.

[0102] *Aceptable desde el punto de vista farmacéutico*: La expresión “aceptable desde el punto de vista farmacéutico” se emplea en la presente para referirse a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosis que, dentro del alcance del criterio médico sensato, son adecuados para usar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin provocar excesiva toxicidad, irritación, reacción alérgica u otros problemas o complicaciones proporcionales con una relación riesgo/beneficio razonable. En general la aprobación por parte de un ente regulador de los gobiernos federales o estatales (o enumerados en la farmacopea estadounidense u otras farmacopeas generalmente reconocidas) para el uso en animales, y, más en particular, en seres humanos, implica que dichos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación sean aceptables desde el punto de vista farmacéutico. Los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son generalmente aceptables como seguros para fines terapéuticos son “terapéuticamente aceptables”.

[0103] *Excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico*: Como se usa en la presente, la frase “excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico”, se refiere a cualquier ingrediente distinto de los compuestos activos descritos en la presente (por ejemplo, un vehículo capaz de suspender o disolver el compuesto activo) y que tiene las propiedades de ser sustancialmente no tóxico y no inflamatorio en un sujeto. Los excipientes pueden incluir, por ejemplo, quelantes, tensioactivos, agentes de amortiguación, reguladores osmóticos, antioxidantes, emulgentes, agentes de relleno (diluyentes), conservantes, sorbentes, agentes de suspensión o dispersión, endulzantes y aguas para hidratación. Los excipientes que son generalmente aceptados como seguros para fines terapéuticos son “excipientes terapéuticamente aceptables”.

[0104] *Sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico*: La presente divulgación también incluye sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de los compuestos descritos en la presente. Como se usa en la presente, “sales aceptables

desde el punto de vista farmacéutico” se refiere a derivados de los compuestos divulgados en donde el compuesto de origen se modifica al convertir una porción básica o ácida existente en su forma de sal (por ejemplo, al hacer reaccionar el grupo base libre con un ácido orgánico adecuado). Los ejemplos de sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico incluyen, entre otros, sales ácidas minerales u orgánicas de residuos básicos, tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos, tales como ácidos carboxílicos; y similares.

[0105] *Polipéptido*: Los términos “polipéptido”, “péptido y “proteína” se usan de manera indistinta en la presente para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede comprender aminoácidos modificados. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se modificó naturalmente o mediante intervención; por ejemplo formación de puentes de disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de rotulación. En la definición también se incluyen, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (que incluyen, por ejemplo, aminoácidos no naturales, tales como homocisteína, ornitina, p-acetilfenilalanina, D-aminoácidos y creatina), así como otras modificaciones conocidas en el estado de la técnica.

[0106] Como se usa en la presente, el término se refiere a proteínas, polipéptidos y péptidos de cualquier tamaño, estructura o función. Los polipéptidos incluyen productos génicos, polipéptidos naturales, polipéptidos sintéticos, homólogos, ortólogos, parálogos, fragmentos y otros equivalentes, variantes y análogos de los anteriores. Un polipéptido puede ser un solo polipéptido o puede ser un complejo multimolecular, tal como un dímero, trímero o tetramero. También puede comprender polipéptidos monocatenarios o multicatenarios. Por lo general, los enlaces disulfuro se encuentran en polipéptidos multicatenarios. El término “polipéptido” también se puede aplicar a polímeros de aminoácidos en donde uno o más residuos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido natural correspondiente. En algunos aspectos, un “péptido” puede ser menor o igual a 50 aminoácidos de longitud, por ejemplo, alrededor de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos de longitud.

[0107] *Prevenir*: Como se usa en la presente, el término “prevenir” se refiere a demorar parcial o completamente el inicio de una enfermedad, un trastorno y/o una afección; demorar parcial o completamente el inicio de uno o más síntomas, características o manifestaciones clínicas de una enfermedad, trastorno y/o afección en particular; demorar parcial o completamente el inicio de uno o más síntomas, características o

manifestaciones de una enfermedad, trastorno y/o afección en particular; demorar parcial o completamente la progresión de una enfermedad particular, trastorno y/o afección; y/o disminuir el riesgo de desarrollar una patología asociada con la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunos aspectos, la formulación farmacéutica divulgada en la presente solicitud puede usarse para prevenir el inicio, prevenir los síntomas o prevenir complicaciones de las enfermedades o afecciones asociadas a fibrosis, tales como NASH o diabetes.

[0108] *Profiláctico*: Como se usa en la presente, “profiláctico” se refiere a un agente terapéutico o medida usados para prevenir el inicio de una enfermedad o afección, o para prevenir o retrasar un síntoma de una enfermedad o afección asociada a fibrosis, por ejemplo, NASH. En un aspecto, las formulaciones farmacéuticas divulgadas en la presente solicitud pueden usarse profilácticamente.

[0109] *Profilaxis*: Como se usa en la presente, “profilaxis” se refiere a una medida tomada para mantener la salud y prevenir o retrasar el inicio de una enfermedad o afección asociada a fibrosis, por ejemplo, NASH o diabetes, o prevenir o retrasar síntomas asociados a una enfermedad o afección.

[0110] *Recombinante*: Un polipéptido o proteína “recombinante” se refiere a un polipéptido o proteína producido por medio de tecnología de ADN recombinante. Los polipéptidos y proteínas producidos de manera recombinante expresados en células huésped modificadas por ingeniería genérica se consideran aislados para los fines de la divulgación, dado que son polipéptidos nativos o recombinantes que se separaron, fraccionaron o purificaron parcial o sustancialmente por medio de cualquier técnica adecuada. Los polipéptidos FGF-21 divulgados en la presente pueden producirse usando métodos conocidos en el estado de la técnica. Las proteínas y péptidos divulgados en la presente también pueden sintetizarse químicamente.

[0111] *Similitud*: Como se usa en la presente, el término “similitud” se refiere a la relación general entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de polipéptido. El cálculo de porcentaje de similitud entre sí de moléculas poliméricas se puede realizar de la misma manera que un cálculo de porcentaje de identidad, con la excepción de que el cálculo de porcentaje de similitud tiene en cuenta las sustituciones conservadoras, como se comprende en el estado de la técnica.

[0112] *Solubilidad*: El término “solubilidad” se refiere a la cantidad de una sustancia que se puede disolver en otra sustancia, por ejemplo, la cantidad de un polipéptido FGF-21 modificado o no modificado que se puede disolver en una solución acuosa. Un ejemplo de método para medir la solubilidad de un polipéptido FGF-21 modificado o no

modificado es la prueba de solubilidad en flujo de tapón descrita en el Ejemplo 8 de la publicación de solicitud estadounidense N.º US2017/0189486. La solubilidad relativa se puede determinar con respecto a un compuesto de referencia, por ejemplo, para identificar un polipéptido que tiene mayor solubilidad. En algunos aspectos, la solubilidad relativa se puede determinar con respecto a una formulación de referencia, por ejemplo, para identificar una formulación en donde el polipéptido tiene solubilidad aumentada.

[0113] *Sujeto*: Los términos "sujeto", "individuo", "animal" o "mamífero" se refieren a cualquier sujeto, en particular, un sujeto que es un mamífero, para quien se desea el diagnóstico, pronóstico o tratamiento. Los sujetos mamíferos incluyen, entre otros, seres humanos, animales domésticos, animales de granja, animales de zoológico, animales de deporte, mascotas, tales como perros, gatos, conejillos de Indias, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas; primates, tales como chimpancés, simios, orangutanes y monos; cánidos, tales como perros y lobos; félidos, tales como gatos, leones y tigres, équidos, tales como caballos, asnos y cebras; osos, animales para consumo, tales como vacas, cerdos y ovejas; ungulados, tales como ciervos y jirafas; roedores, tales como ratones, ratas, hámsteres y conejillos de Indias; entre otros. En algunos aspectos, el mamífero es un sujeto humano. En otros aspectos, un sujeto es un paciente humano. En un aspecto en particular, un sujeto es un paciente humano o células de este, ya sea *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*, que responde a los métodos descritos en la presente.

[0114] *Que tiene*: Un individuo que "tiene" una enfermedad, un trastorno y/o una afección recibió un diagnóstico o muestra uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas divulgadas en la presente pueden administrarse a un sujeto que tiene una enfermedad o afección asociada a fibrosis, tal como NASH o diabetes.

[0115] *Susceptible de*: Un individuo que es "susceptible de" una enfermedad, un trastorno y/o una afección no recibió un diagnóstico y/o puede no exhibir síntomas de la enfermedad, el trastorno y/o la afección, pero alberga una propensión a tener una enfermedad o sus síntomas. En algunos aspectos, un individuo que es susceptible de una enfermedad, un trastorno y/o una afección (por ejemplo, cáncer) puede tener una o más de las siguientes características: (1) una mutación genética asociada al desarrollo de la enfermedad, el trastorno y/o la afección; (2) un polimorfismo genético asociado al desarrollo de la enfermedad, el trastorno y/o la afección; (3) mayor y/o menor expresión y/o actividad de una proteína y/o ácido nucleico asociado a la enfermedad, el trastorno y/o la afección; (4) hábitos y/o estilos de vida asociados al desarrollo de la enfermedad,

el trastorno y/o la afección; (5) antecedentes familiares de la enfermedad, el trastorno y/o la afección; y (6) exposición a y/o infección por un microbio asociado al desarrollo de la enfermedad, el trastorno y/o la afección.

[0116] En algunos aspectos, un individuo que es susceptible de una enfermedad, un trastorno y/o una afección tendrá la enfermedad, el trastorno y/o la afección. En algunos aspectos, un individuo que es susceptible de una enfermedad, un trastorno y/o una afección no tendrá la enfermedad, el trastorno y/o la afección. En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas divulgadas en la presente pueden administrarse a un sujeto que es susceptible de una enfermedad o afección asociada a fibrosis, tal como NASH o diabetes.

[0117] *Agente terapéutico*: Las expresiones “agente terapéutico” o “agente” se refieren a una entidad molecular que, cuando se administra a un sujeto, tiene un efecto terapéutico, diagnóstico y/o profiláctico y/o genera un efecto biológico y/o farmacéutico deseado. Por ejemplo, en algunos aspectos, un polipéptido FGF-21 divulgado en la presente (por ejemplo, PEG-FGF-21) puede ser un agente terapéutico. En algunos aspectos, un agente es otra molécula que se coadministra como parte de un tratamiento conjunto con al menos uno de los polipéptidos FGF-21 divulgados en la presente.

[0118] *Cantidad terapéuticamente eficaz*: Como se usa en la presente, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una cantidad de un agente que se debe administrar (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 divulgado en la presente o una formulación que comprende el polipéptido) que es suficiente, cuando se administra a un sujeto que tiene o es susceptible de una infección, una enfermedad, un trastorno y/o una afección, para tratar, mejorar los síntomas, diagnosticar, prevenir y/o retrasar la aparición de la infección, la enfermedad, el trastorno y/o la afección. En general, se prevé que la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz produzca un resultado terapéuticamente eficaz.

[0119] *Resultado terapéuticamente eficaz*: Como se usa en la presente, la expresión “resultado terapéuticamente eficaz” significa un resultado que es suficiente en un sujeto que tiene o es susceptible de una infección, una enfermedad, un trastorno y/o una afección, para tratar, aliviar los síntomas de, diagnosticar, prevenir y/o retrasar la aparición de la infección, la enfermedad, el trastorno y/o la afección.

[0120] *Tratar, tratamiento, terapia*: Como se usa en la presente, los términos “tratar” o “tratamiento” o “terapia” o sus variantes gramaticales se refieren a prevenir, aliviar, mejorar, retrasar la aparición de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad o

afección asociada a fibrosis, por ejemplo, NASH o diabetes. Por ejemplo, “tratar” una enfermedad asociada a fibrosis puede referirse a prevenir síntomas, mejorar síntomas, retrasar el inicio de la enfermedad o afección o sus síntomas, etc. El tratamiento se puede administrar a un sujeto que no presenta signos de una enfermedad, un trastorno y/o una afección y/o a un sujeto que solo presenta signos tempranos de una enfermedad, un trastorno y/o una afección a fin de disminuir el riesgo de desarrollar patologías asociadas a la enfermedad, el trastorno y/o la afección.

[0121] ug, uM, ul: Como se usa en la presente, las expresiones “ug”, “uM” y “ul” se usan indistintamente con “μg”, “μM” y “μl”, respectivamente.

[0122] *Polímero hidrosoluble*: Como se usa en la presente, la expresión “polímero hidrosoluble” se refiere a cualquier polímero que es soluble en solventes acuosos. El enlace de polímeros hidrosolubles con polipéptidos FGF-21 modificados puede dar como resultado cambios que incluyen, entre otros, mayor semivida en suero (*in vivo*) o semivida en suero (*in vivo*) modulada, o mayor semivida terapéutica o semivida terapéutica modulada, con respecto a la forma no modificada, toxicidad o inmunogenicidad modulada, características de asociación física modulada, tales como agregación y formación de multímeros, unión al receptor alterada, unión alterada a uno o más componentes de unión, y dimerización o multimerización del receptor alterada.

[0123] El polímero hidrosoluble puede o no tener su propia actividad biológica, y se puede usar como un ligador para unir el FGF-21 modificado a otras sustancias, que incluyen, entre otros, uno o más polipéptidos FGF-21 modificados o no modificados, o una o más moléculas biológicamente activas. Los polímeros adecuados incluyen, entre otros, polietilenglicol, polietilenglicol propionaldehído, mono C1-C10 alcoxi o derivados de ariloxi de estos (descritos en la patente estadounidense N.º 5.252.714 que se incorpora en la presente por referencia), monometoxi-polietilenglicol, PEG discreto, polivinilpirrolidona, polivinilalcohol, poliaminoácidos, anhídrido maleico diviniléter, N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida, dextrano, derivados de dextrano que incluyen sulfato de dextrano, polipropilenglicol, copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, poliol polioxietilado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, oligosacáridos, glucanos, celulosa y derivados de celulosa, que incluyen, entre otros, metilcelulosa y carboximetilcelulosa, almidón y derivados de almidón, polipéptidos, polialquilenglicol y derivados de estos, copolímeros de polialquilenglicoles y derivados de estos, poliviniletiléteres y alfa-beta-poli[(2-hidroxietil)-DL-aspartamida, y similares, o mezclas de estos. Los ejemplos de tales polímeros hidrosolubles incluyen, entre otros, polietilenglicol y albúmina de suero.

[0124] Varios aspectos de la divulgación se describen en mayor detalle en las siguientes subsecciones.

I. Formulaciones de FGF-21

[0125] La presente divulgación proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21), por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, y un quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico, por ejemplo, ácidodietilentriaminopentaacético (DTPA), en donde las formulaciones tienen estabilidad mejorada en comparación con una formulación de referencia, es decir, una formulación correspondiente que contiene los mismos componentes excepto que no tiene el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico.

[0126] Las expresiones "quelante" o "quelante de cationes" son intercambiables y se refieren a cualquier sustancia que puede eliminar un ión de metal de un sistema de solución al formar un nuevo ión complejo que tiene propiedades químicas diferentes que aquellas del ión de metal original. En particular, los quelantes de cationes divulgados en la presente son quelantes que se unen específicamente a metales divalentes, por ejemplo, Ca^{++} .

[0127] En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas divulgadas en la presente exhiben una o más mejoras en la estabilidad, por ejemplo, una menor velocidad de desamidación y/o una menor velocidad de agregación. Por ejemplo, la inclusión de un quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico tal como DTPA en la formulación farmacéutica puede disminuir la velocidad de desamidación del polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) cuando se almacena a determinada temperatura (por ejemplo, 40 °C) durante un período determinado (por ejemplo, 1 mes) con respecto a la formulación de referencia.

[0128] En algunos aspectos, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) puede disminuir la velocidad de desamidación de un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) en una formulación farmacéutica almacenada a alrededor de 25 °C, a alrededor de 30 °C, a alrededor de 35 °C, a alrededor de 40 °C o a alrededor de 45 °C con respecto a la formulación de referencia. En algunos aspectos, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) puede disminuir la velocidad de desamidación de un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) en una formulación farmacéutica almacenada a una temperatura por

encima de 25 °C, por encima de 30 °C, por encima de 35 °C, alrededor de 40 °C o alrededor de 45 °C con respecto a la formulación de referencia.

[0129] En algunos aspectos, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) puede disminuir la velocidad de desamidación de un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) en una formulación farmacéutica almacenada entre alrededor de 20 °C y alrededor de 25 °C, alrededor de 25 °C y alrededor de 30 °C, alrededor de 30 °C y alrededor de 35 °C, o alrededor de 40 °C y alrededor de 45 °C con respecto a la formulación de referencia.

[0130] En algunos aspectos, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) puede disminuir la velocidad de desamidación de un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) en una formulación farmacéutica a una temperatura o rango de temperatura divulgado anteriormente después del almacenamiento durante alrededor de 1 semana, alrededor de 2 semanas, alrededor de 3 semanas, alrededor de 1 mes, alrededor de 2 meses, alrededor de 3 meses o alrededor de 4 meses con respecto a la formulación de referencia. En un aspecto específico, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) puede disminuir la velocidad de desamidación de un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) en una formulación farmacéutica almacenada a 40 °C durante alrededor de un mes con respecto a la formulación de referencia.

[0131] En algunos aspectos, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) puede disminuir la velocidad de agregación de alto peso molecular (HMW) de un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) en una formulación farmacéutica almacenada a alrededor de 25 °C, a alrededor de 30 °C, a alrededor de 35 °C, a alrededor de 40 °C o a alrededor de 45 °C con respecto a la formulación de referencia. En algunos aspectos, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) puede disminuir la velocidad de agregación de HMW de un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) en una formulación farmacéutica almacenada a una temperatura por encima de 25 °C, por encima de 30 °C, por encima de 35 °C, alrededor de 40 °C o alrededor de 45 °C con respecto a la formulación de referencia.

[0132] En algunos aspectos, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) puede disminuir la velocidad de agregación de HMW de un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) en una

formulación farmacéutica almacenada entre alrededor de 20 °C y alrededor de 25 °C, alrededor de 25 °C y alrededor de 30 °C, alrededor de 30 °C y alrededor de 35 °C, o alrededor de 40 °C y alrededor de 45 °C con respecto a la formulación de referencia.

[0133] En algunos aspectos, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) puede disminuir la velocidad de agregación de HMW de un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) en una formulación farmacéutica a una temperatura o rango de temperatura divulgado anteriormente después del almacenamiento durante alrededor de 1 semana, alrededor de 2 semanas, alrededor de 3 semanas, alrededor de 1 mes, alrededor de 2 meses, alrededor de 3 meses o alrededor de 4 meses con respecto a la formulación de referencia. En un aspecto específico, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) puede disminuir la velocidad de agregación de HMW de un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) en una formulación farmacéutica almacenada a 40 °C durante alrededor de un mes con respecto a la formulación de referencia.

[0134] En algunos aspectos, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico, por ejemplo, DTPA, previene o mitiga la oxidación de uno o más aminoácidos, por ejemplo, metioninas, en el polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21). En aspectos particulares, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico, por ejemplo, DTPA, previene o mitiga la oxidación del aminoácido 1 y/o aminoácido 169 de SEQ ID NO: 3 (o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o cualquier otro polipéptido FGF-21) a 25 °C y/o 40 °C.

[0135] En algunos aspectos específicos, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico es DTPA. El ácido pentético o ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) es un ácido aminopolicarboxílico que consiste en una estructura principal de dietilentriamina con cinco grupos carboximetilo. La base conjugada de DTPA tiene una afinidad alta a los cationes de metal. De este modo, el penta-anión DTPA^{5-} es potencialmente un ligando de octadentato suponiendo que cada centro de nitrógeno y cada grupo COO^- cuenta como centro para coordinación. Las constantes de formación para sus complejos son alrededor de 100 veces mayores que para EDTA. Como agente quelante, DTPA se envuelve alrededor del ión de metal formando hasta ocho enlaces. Sin embargo, los metales de transición forman por lo general menos de ocho enlaces de coordinación. Por lo tanto, después de formar un complejo con un metal, el DTPA todavía puede unirse a otros reactivos, como muestra pendentado derivado. Por ejemplo, en el complejo con cobre(II), el DTPA se une de manera hexadentada utilizando los tres

centros amina y tres de los cinco carboxilatos.

[0136] En otros aspectos, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico puede ser otro quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico, tal como ácido etilendiamintetraacético (EDTA), ácido etilen glicol-bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), o compuesto relacionado, por ejemplo, tiuxetano (una versión modificada de DTPA cuya estructura principal de carbono contiene un isotiocianatobencilo y un grupo metilo). Otros agentes quelantes relacionados con DTPA y EDTA conocidos en el estado de la técnica son aquellos en los que los nitrógenos de los grupos amida se pueden sustituir con uno o más grupos C₁₋₁₈ alquilo, por ejemplo, DTPA.BMA y EDTA.BMA.

[0137] En algunos aspectos, el quelante de cationes DTPA está presente en una cantidad entre alrededor de 10 μ M y alrededor de 100 μ M, entre 15 μ M y alrededor de 95 μ M, entre alrededor de 20 μ M y alrededor de 90 μ M, entre alrededor de 25 μ M y alrededor de 85 μ M, entre alrededor de 30 μ M y alrededor de 80 μ M, entre alrededor de 35 μ M y alrededor de 75 μ M, entre alrededor de 40 μ M y alrededor de 70 μ M, entre alrededor de 45 μ M y alrededor de 65 μ M, entre alrededor de 50 μ M y alrededor de 60 μ M, entre alrededor de 25 μ M y alrededor de 75 μ M, entre alrededor de 40 μ M y alrededor de 60 μ M, entre alrededor de 30 μ M y alrededor de 70 μ M o entre alrededor de 40 μ M y alrededor de 75 μ M.

[0138] En algunos aspectos, el quelante de cationes DTPA está presente en una cantidad de alrededor de 10 μ M, alrededor de 15 μ M, alrededor de 20 μ M, alrededor de 25 μ M, alrededor de 30 μ M, alrededor de 35 μ M, alrededor de 40 μ M, alrededor de 45 μ M, alrededor de 50 μ M, alrededor de 55 μ M, alrededor de 60 μ M, alrededor de 65 μ M, alrededor de 70 μ M, alrededor de 75 μ M, alrededor de 80 μ M, alrededor de 85 μ M, alrededor de 90 μ M, alrededor de 95 μ M o alrededor de 100 μ M.

[0139] En algunos aspectos, el quelante de cationes DTPA está presente en una cantidad de al menos alrededor de 15 μ M, al menos alrededor de 20 μ M, al menos alrededor de 25 μ M, al menos alrededor de 30 μ M, al menos alrededor de 35 μ M, al menos alrededor de 40 μ M, al menos alrededor de 45 μ M, al menos alrededor de 50 μ M, al menos alrededor de 55 μ M, al menos alrededor de 60 μ M, al menos alrededor de 65 μ M, al menos alrededor de 70 μ M o al menos alrededor de 75 μ M.

[0140] En aspectos específicos, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico, por ejemplo, DTPA, está presente en una cantidad de 50 μ M.

[0141] En algunos aspectos, el pH de una formulación divulgada en la presente está por encima de alrededor de 6,5, por encima de alrededor de 6,6, por encima de

alrededor de 6,7, por encima de alrededor de 6,8, por encima de alrededor de 6,9, por encima de alrededor de 7,0, por encima de alrededor de 7,1, por encima de alrededor de 7,2, por encima de alrededor de 7,3, por encima de alrededor de 7,4 o por encima de alrededor de 7,5. En algunos aspectos, el pH de la formulación está por encima de 6,5, por encima de 6,6, por encima de 6,7, por encima de 6,8, por encima de 6,9, por encima de 7,0, por encima de 7,1, por encima de 7,2, por encima de 7,3, por encima de 7,4 o por encima de 7,5. En algunos aspectos, el pH de la formulación es alrededor de 6,5, alrededor de 6,6, alrededor de 6,7, alrededor de 6,8, alrededor de 6,9, alrededor de 7,0, alrededor de 7,1, alrededor de 7,2, alrededor de 7,3, alrededor de 7,4 o alrededor de 7,5.

[0142] En algunos aspectos, el pH de la formulación está entre alrededor de 6,5 y alrededor de 7,5, alrededor de 6,6 y alrededor de 7,5, alrededor de 6,7 y alrededor de 7,5, alrededor de 6,8 y alrededor de 7,5, alrededor de 6,9 y alrededor de 7,5, alrededor de 7,0 y alrededor de 7,5, alrededor de 7,1 y alrededor de 7,5, alrededor de 7,2 y alrededor de 7,5, alrededor de 7,3 y alrededor de 7,5, alrededor de 7,4 y alrededor de 7,5, alrededor de 6,5 y alrededor de 7,4, alrededor de 6,5 y alrededor de 7,3, alrededor de 6,5 y alrededor de 7,2, alrededor de 6,5 y alrededor de 7,1, alrededor de 6,5 y alrededor de 7,0, alrededor de 6,5 y alrededor de 6,9, alrededor de 6,5 y alrededor de 6,8, alrededor de 6,5 y alrededor de 6,7, alrededor de 6,6 y alrededor de 7,4, alrededor de 6,7 y alrededor de 7,4, alrededor de 6,8 y alrededor de 7,4, alrededor de 6,9 y alrededor de 7,4, alrededor de 7,0 y alrededor de 7,4, alrededor de 7,1 y alrededor de 7,4, alrededor de 7,2 y alrededor de 7,4, alrededor de 7,3 y alrededor de 7,4, alrededor de 6,5 y alrededor de 7,3, alrededor de 6,6 y alrededor de 7,3, alrededor de 6,7 y alrededor de 7,3, alrededor de 6,7 y alrededor de 7,3, alrededor de 6,8 y alrededor de 7,3, alrededor de 6,9 y alrededor de 7,3, alrededor de 7,0 y alrededor de 7,3, alrededor de 7,1 y alrededor de 7,3, alrededor de 7,2 y alrededor de 7,3, alrededor de 6,5 y alrededor de 7,2, alrededor de 6,6 y alrededor de 7,2, alrededor de 6,7 y alrededor de 7,2, alrededor de 6,8 y alrededor de 7,2, alrededor de 6,9 y alrededor de 7,2, alrededor de 7,0 y alrededor de 7,2, alrededor de 7,1 y alrededor de 7,2, alrededor de 6,9 y alrededor de 7,1 o alrededor de 7,0 y alrededor de 7,1.

[0143] En algunos aspectos, el pH de la formulación es alrededor de 6,8, alrededor de 6,9, alrededor de 7,0, alrededor de 7,1, alrededor de 7,2, alrededor de 7,3, alrededor de 7,4, o alrededor de 7,5. En algunos aspectos, la formulación farmacéutica es más estable que una formulación de referencia con un pH de 6,5.

[0144] En algunos aspectos, la formulación farmacéutica además comprende un

tensioactivo. La expresión "tensioactivo", como se usa en la presente, significa cualquier compuesto, generalmente una molécula anfipática, que reduce la tensión en superficie cuando se disuelve o suspende en agua o soluciones de agua, o que reduce la tensión interfacial entre dos líquidos, o entre un líquido y un sólido. En el contexto de la presente divulgación, un tensioactivo es cualquier compuesto que disminuye la tensión y cizallamiento interfacial en una solución que comprende un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21.

[0145] En algunos aspectos, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico, es decir, es un tensioactivo que tiende a no tener carga neta en soluciones neutras. En algunos aspectos, el tensioactivo no aniónico es un polisorbato. Los polisorbatos son una clase importante de tensioactivos no iónicos usados ampliamente en productos farmacéuticos de proteína para estabilizar las proteínas contra la agregación inducida por interfaz y para minimizar la adsorción en superficie de proteínas (Wang W 2005. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. Int J Pharm 289 (1-2):1-30). Los polisorbatos son tensioactivos anfipáticos no iónicos compuestos por ésteres de ácido graso de polioxietileno (POE) sorbitán. Los polisorbatos disponibles en el comercio son mezclas químicamente diversas, principalmente ésteres de ácido graso de POE sorbitán.

[0146] Como se usa en la presente, la expresión "polisorbato" se refiere a ésteres de oleato de sorbitol y sus anhídridos, generalmente copolimerizados con óxido de etileno. Los polisorbatos de ejemplo incluyen polisorbato 20 (TWEEN 20; PS20) (monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán); polisorbato 40 (TWEEN 40; PS40) (monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitán); polisorbato 60 (TWEEN 60; PS60) (monoestearato de polioxietileno (20) sorbitán); y polisorbato 80 (TWEEN 80; PS80) (monooleato de polioxietileno (20) sorbitán).

[0147] El número 20 luego de la parte de "polioxietileno" se refiere al número total de los grupos de oxietileno $-(CH_2CH_2O)-$ que se encuentran en la molécula. El número que sigue a la parte de "polisorbato" se refiere al tipo ácido graso asociado a la parte de polioxietileno sorbitán de la molécula. El monolaurato se indica con 20, monopalmitato se indica con 40, monostearato con 60 y monooleato con 80. En algunos aspectos, el tensioactivo no iónico está presente en una cantidad por encima de la concentración micelar crítica (CMC), que para ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitán es aproximadamente una cantidad de al menos 0,01 mg/ml. Ver Wan and Lee, Journal of Pharm Sci, 63, p.136, 1974.

[0148] En algunos aspectos, el polisorbato es polisorbato 80 (PS80). En algunos

aspectos, el tensioactivo polisorbato 80 está presente en una cantidad de alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor 0,02 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor 0,03 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor 0,04 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor 0,05 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor 0,06 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor 0,07 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor 0,08 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor 0,09 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor 0,02 % a alrededor de 0,09 % (p/v), alrededor 0,03 % a alrededor de 0,09 % (p/v), alrededor 0,04 % a alrededor de 0,09 % (p/v), alrededor 0,05 % a alrededor de 0,09 % (p/v), alrededor 0,06 % a alrededor de 0,09 % (p/v), alrededor 0,07 % a alrededor de 0,09 % (p/v), alrededor 0,08 % a alrededor de 0,09 % (p/v), alrededor 0,03 % a alrededor de 0,08 % (p/v), alrededor 0,04 % a alrededor de 0,08 % (p/v), alrededor 0,05 % a alrededor de 0,08 % (p/v), alrededor 0,06 % a alrededor de 0,08 % (p/v), alrededor 0,07 % a alrededor de 0,08 % (p/v), alrededor 0,04 % a alrededor de 0,07 % (p/v), alrededor 0,05 % a alrededor de 0,07 % (p/v), alrededor 0,06 % a alrededor de 0,07 % (p/v) o alrededor 0,05 % a alrededor de 0,06 % (p/v).

[0149] En algunos aspectos, el tensioactivo polisorbato 80 está presente en una cantidad de al menos alrededor de 0,01 % (p/v), al menos alrededor de 0,02 % (p/v), al menos alrededor de 0,03 % (p/v), al menos alrededor de 0,04 % (p/v), al menos alrededor de 0,05 % (p/v), al menos alrededor de 0,06 % (p/v), al menos alrededor de 0,07 % (p/v), al menos alrededor de 0,08 % (p/v), al menos alrededor de 0,09 % (p/v) o al menos alrededor de 0,1 % (p/v).

[0150] En algunos aspectos, el tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80, mitiga la formación de partículas y/o burbujas de aire, por ejemplo, cuando la formulación se agita en un agitador. En algunos aspectos, la presencia del tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80, en la formulación puede reducir la formación de partículas al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % en comparación con el nivel de formación de partículas en una formulación de referencia. En algunos aspectos, la presencia del tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80, en la formulación puede reducir la formación de burbujas de aire al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % en comparación con el nivel de formación de

burbujas en una formulación de referencia.

[0151] En algunos aspectos, la formulación farmacéutica también comprende un agente amortiguador de aminoácidos. Los aminoácidos se pueden usar, de manera ventajosa, como amortiguadores en aplicaciones farmacéuticas porque presentan naturalmente sustancias que se pueden metabolizar fácilmente. Asimismo, los aminoácidos que se usan como amortiguadores también pueden proteger proteínas en la fase amorfa si la formulación es liofilizada. Un amortiguador de aminoácidos adecuado puede contener histidina, lisina y/o arginina. La histidina tiene una buena capacidad de amortiguación alrededor de pH 7.

[0152] Como se usa en la presente, el término "histidina" comprende ya sea L-histidina o D-histidina, una forma solvatada de histidina, una forma hidratada (por ejemplo, monohidrato) de histidina o una forma anhidra de histidina, o una mezcla de estas. Otros amortiguadores adecuados en las formulaciones de la presente divulgación son glutamato, Tris o succinato, solo por mencionar algunos.

[0153] En algunos aspectos específicos, el agente amortiguador de aminoácidos es L-histidina.

[0154] En algunos aspectos, el agente amortiguador de histidina está presente en una cantidad de alrededor de 10 mM a alrededor de 100 mM de histidina, alrededor de 15 mM a alrededor de 100 mM de histidina, alrededor de 20 mM a alrededor de 100 mM de histidina, alrededor de 25 mM a alrededor de 100 mM, alrededor de 30 mM a alrededor de 100 mM de histidina, alrededor de 35 mM a alrededor de 100 mM de histidina, alrededor de 40 mM a alrededor de 100 mM de histidina, alrededor de 45 mM a alrededor de 100 mM de histidina, alrededor de 50 mM a alrededor de 100 mM de histidina, alrededor de 55 mM a alrededor de 100 mM de histidina, alrededor de 60 mM a alrededor de 100 mM de histidina, alrededor de 65 mM a alrededor de 100 mM de histidina, alrededor de 70 mM a alrededor de 100 mM de histidina, alrededor de 75 mM a alrededor de 100 mM de histidina, alrededor de 80 mM a alrededor de 100 mM de histidina, alrededor de 85 mM a alrededor de 100 mM de histidina, alrededor de 90 mM a alrededor de 100 mM de histidina o alrededor de 95 mM a alrededor de 100 mM de histidina.

[0155] En algunos aspectos, el agente amortiguador de histidina está presente en una cantidad de alrededor de 20 mM a alrededor de 90 mM de histidina, alrededor de 25 mM a alrededor de 90 mM de histidina, alrededor de 30 mM a alrededor de 90 mM de histidina, alrededor de 35 mM a alrededor de 90 mM de histidina, alrededor de 40 mM a alrededor de 90 mM de histidina, alrededor de 45 mM a alrededor de 90 mM de histidina, alrededor de 50 mM a alrededor de 90 mM de histidina, alrededor de 55 mM a alrededor

de 90 mM de histidina, alrededor de 60 mM a alrededor de 90 mM de histidina, alrededor de 65 mM a alrededor de 90 mM de histidina, alrededor de 70 mM a alrededor de 90 mM de histidina, alrededor de 75 mM a alrededor de 90 mM de histidina, alrededor de 80 mM a alrededor de 90 mM de histidina, alrededor de 85 mM a alrededor de 90 mM de histidina, alrededor de 30 mM a alrededor de 80 mM de histidina, alrededor de 35 mM a alrededor de 80 mM de histidina, alrededor de 40 mM a alrededor de 80 mM de histidina, alrededor de 45 mM a alrededor de 80 mM de histidina.

[0156] En algunos aspectos, el agente amortiguador de histidina está presente en una cantidad de alrededor de 50 mM a alrededor de 80 mM de histidina, alrededor de 55 mM a alrededor de 80 mM de histidina, alrededor de 60 mM a alrededor de 80 mM de histidina, alrededor de 65 mM a alrededor de 80 mM de histidina, alrededor de 70 mM a alrededor de 80 mM de histidina, alrededor de 75 mM a alrededor de 80 mM de histidina, alrededor de 40 mM a alrededor de 70 mM de histidina, alrededor de 45 mM a alrededor de 70 mM de histidina, alrededor de 50 mM a alrededor de 70 mM de histidina, alrededor de 55 mM a alrededor de 70 mM de histidina, alrededor de 60 mM a alrededor de 70 mM de histidina, alrededor de 65 mM a alrededor de 70 mM de histidina, alrededor de 10 mM a alrededor de 30 mM de histidina, alrededor de 15 mM a alrededor de 30 mM de histidina, alrededor de 20 mM a alrededor de 30 mM de histidina, alrededor de 25 mM a alrededor de 30 mM de histidina, alrededor de 15 mM a alrededor de 25 mM de histidina o alrededor de 20 mM a alrededor de 25 mM.

[0157] En algunos aspectos, el agente amortiguador de histidina está presente en una cantidad de alrededor de 15 mM a alrededor de 20 mM de histidina, alrededor de 40 mM a alrededor de 60 mM de histidina, alrededor de 45 mM a alrededor de 60 mM de histidina, alrededor de 50 mM a alrededor de 60 mM de histidina, alrededor de 15,5 mM a alrededor de 24,5 mM de histidina, alrededor de 16 mM a alrededor de 24 mM de histidina, alrededor de 16,5 mM a alrededor de 23,5 mM de histidina, alrededor de 17 mM a alrededor de 23 mM de histidina, alrededor de 17,5 mM a alrededor de 22,5 mM de histidina, alrededor de 18 mM a alrededor de 22 mM de histidina, alrededor de 18,5 mM a alrededor de 21,5 mM de histidina, alrededor de 19 mM a alrededor de 21 mM de histidina o alrededor de 19,5 mM a alrededor de 20,5 mM de histidina.

[0158] En algunos aspectos, el agente amortiguador de histidina está presente en una cantidad de alrededor de 10 mM de histidina, alrededor de 11 mM de histidina, alrededor de 12 mM de histidina, alrededor de 13 mM de histidina, alrededor de 14 mM de histidina, alrededor de 15 mM de histidina, alrededor de 16 mM de histidina, alrededor de 17 mM de histidina, alrededor de 18 mM de histidina, alrededor de 19 mM de histidina, alrededor

de 20 mM de histidina, alrededor de 21 mM de histidina, alrededor de 22 mM de histidina, alrededor de 23 mM de histidina, alrededor de 24 mM de histidina, alrededor de 25 mM de histidina, alrededor de 26 mM de histidina, alrededor de 27 mM de histidina, alrededor de 28 mM de histidina, alrededor de 29 mM de histidina, alrededor de 30 mM de histidina, alrededor de 31 mM de histidina, alrededor de 32 mM de histidina, alrededor de 33 mM de histidina, alrededor de 34 mM de histidina, alrededor de 35 mM de histidina, alrededor de 36 mM de histidina, alrededor de 37 mM de histidina, alrededor de 38 mM de histidina, alrededor de 39 mM de histidina, alrededor de 40 mM de histidina, alrededor de 41 mM de histidina, alrededor de 42 mM de histidina, alrededor de 43 mM de histidina, alrededor de 44 mM de histidina, alrededor de 45 mM de histidina, alrededor de 46 mM de histidina, alrededor de 47 mM de histidina, alrededor de 48 mM de histidina, alrededor de 49 mM de histidina o alrededor de 50 mM de histidina.

[0159] En algunos aspectos, la formulación farmacéutica también comprende un regulador osmótico (también conocido en el estado de la técnica como agente de tonicidad). De acuerdo con la presente divulgación, el regulador osmótico (agente de tonicidad) puede comprender un poliol, un sacárido, un carbohidrato, una sal, tal como cloruro de sodio, o mezclas de estos. Los polioles de ejemplo comprenden aquellos con un peso molecular que es menor de alrededor de 600 kD (por ejemplo, en el rango de 120 a 400 kD), por ejemplo, manitol, trehalosa, sorbitol, eritritol, isomalta, lactitol, maltitol, xilitol, glicerol, lactitol, propilenglicol, polietilenglicol, inositol, o mezclas de estos.

[0160] Los reguladores osmóticos de sacáridos o carbohidratos comprenden monosacáridos, disacáridos y polisacáridos, o mezclas de estos. En algunos aspectos, el sacárido o carbohidrato se selecciona del grupo que consiste en fructosa, glucosa, manosa, sacarosa, sorbosa, xilosa, lactosa, maltosa, sacarosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrinas, almidón soluble, hidroxietil-almidón, glucanos hidrosolubles, y mezclas de estos.

[0161] En algunos aspectos, el regulador osmótico comprende un sacárido seleccionado del grupo de azúcar reductor o azúcar no reductor o mezclas de estos. En algunos aspectos, el regulador osmótico, el agente de tonicidad, comprende un sacárido que es un azúcar no reductor, preferentemente, un azúcar seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa y mezclas de estos. En algunos aspectos específicos, el azúcar no reductor es sacarosa.

[0162] En algunos aspectos, el regulador osmótico sacarosa está presente en una cantidad de alrededor de 100 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 200 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 300 mM a alrededor de 1 M de

sacarosa, alrededor de 400 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 500 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 600 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 700 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 800 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 900 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 200 mM a alrededor de 900 mM de sacarosa, alrededor de 300 mM a alrededor de 900 mM de sacarosa, alrededor de 400 mM a alrededor de 900 mM de sacarosa, alrededor de 500 mM a alrededor de 900 mM de sacarosa, alrededor de 600 mM a alrededor de 900 mM de sacarosa, alrededor de 700 mM a alrededor de 900 mM de sacarosa, alrededor de 800 mM a alrededor de 900 mM de sacarosa, alrededor de 300 mM a alrededor de 800 mM de sacarosa, alrededor de 400 mM a alrededor de 800 mM de sacarosa, alrededor de 500 mM a alrededor de 800 mM de sacarosa, alrededor de 600 mM a alrededor de 800 mM de sacarosa, alrededor de 700 mM a alrededor de 800 mM de sacarosa, alrededor de 400 mM a alrededor de 700 mM de sacarosa, alrededor de 500 mM a alrededor de 700 mM de sacarosa, alrededor de 600 mM a alrededor de 700 mM de sacarosa o alrededor de 500 mM a alrededor de 600 mM de sacarosa.

[0163] En algunos aspectos, el regulador osmótico sacarosa está presente en una cantidad de alrededor de 100 mM de sacarosa, alrededor de 150 mM de sacarosa, alrededor de 200 mM de sacarosa, alrededor de 250 mM de sacarosa, alrededor de 300 mM de sacarosa, alrededor de 350 mM de sacarosa, alrededor de 400 mM de sacarosa, alrededor de 450 mM de sacarosa, alrededor de 500 mM de sacarosa, alrededor de 550 mM de sacarosa, alrededor de 600 mM de sacarosa, alrededor de 650 mM de sacarosa, alrededor de 700 mM de sacarosa, alrededor de 750 mM de sacarosa, alrededor de 800 mM de sacarosa, alrededor de 850 mM de sacarosa, alrededor de 900 mM de sacarosa, alrededor de 950 mM de sacarosa o alrededor de 1M de sacarosa.

[0164] En algunos aspectos de las formulaciones farmacéuticas divulgadas en la presente, el polipéptido FGF-21 es un polipéptido FGF-21 modificado. Numerosos polipéptidos FGF-21 modificados conocidos en el estado de la técnica se pueden usar en las formulaciones divulgadas en la presente, por ejemplo, aquellos divulgados en las patentes estadounidenses N.º 8.012.931 y 9.434.788, que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad. El factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) se describió en la literatura (Nishimura et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1492:203-206 (2000); WO 01/36640; y WO 01/18172 y la publicación de patente estadounidense N.º 20040259780, que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad). A diferencia de otros FGF, se informó que FGF-21 no tiene efectos proliferativos u oncógenos (Ornitz e Itoh, *Genome Biology* 2001, 2(3): reseñas 3005.1-3005.12).

[0165] Determinados polipéptidos FGF-21 y usos de estos se describen en la publicación de patente estadounidense N.º 20010012628, patente estadounidense N.º 6.716.626, publicación de patente estadounidense N.º 2004/0259780, WO 03/011213, Kharitononkov *et al.* J Clin Invest., junio de 2005; 115(6): 1627-35, WO 03/059270, publicación de patente estadounidense N.º 2005/0176631, WO 2005/091944, WO 2007/0293430, publicación de patente estadounidense N.º 2007/0293430, WO/2008/121563, patente estadounidense N.º 4.904.584, WO 99/67291, WO 99/03887, WO 00/26354 y patente estadounidense N.º 5.218.092, que se incorporan por referencia en la presente en su totalidad.

[0166] FGF-21 adicionales se pueden formular como se divulga en la presente solicitud como se describe con mayor detalle a continuación.

[0167] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 modificado comprende un polipéptido que tiene al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 96 %, al menos alrededor de 97 %, al menos alrededor de 98 % o al menos alrededor de 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, en donde el polipéptido tiene actividad de FGF-21.

[0168] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 modificado consiste, o consiste esencialmente, en un polipéptido que tiene al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 96 %, al menos alrededor de 97 %, al menos alrededor de 98 %, o al menos alrededor de 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, en donde el polipéptido tiene actividad de FGF-21.

[0169] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 modificado está ligado a una porción de extensión de semivida, por ejemplo, por medio de la cadena lateral de un aminoácido codificado de manera no natural en la secuencia del polipéptido FGF-21. Las porciones de extensión de semivida que se pueden unir a un polipéptido FGF-21 modificado de la presente divulgación, por ejemplo, el polipéptido FGF-21 de SEQ ID NO: 1, comprende, por ejemplo, albúmina, una región constante de inmunoglobulina o una porción de esta, un polipéptido de unión a inmunoglobulina, una inmunoglobulina G (IgG), un polipéptido de unión a albúmina (ABP), una porción de PASilación, una porción de HESilación, XTEN, una región Fc, y cualquier combinación de estos. Las porciones de extensión de semivida que se pueden usar para modificar los polipéptidos FGF-21 se describen con

mayor detalle a continuación.

[0170] En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida comprende un polímero hidrosoluble, por ejemplo, un polietilenglicol (PEG). En algunos aspectos, el PEG tiene un peso molecular promedio entre alrededor de 10 kDa y alrededor de 40 kDa. De este modo, en algunos aspectos, el PEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 10 kDa, alrededor de 15 kDa, alrededor de 20 kDa, alrededor de 25 kDa, alrededor de 30 kDa, alrededor de 35 kDa o alrededor de 40 kDa.

[0171] En algunos aspectos, el PEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 30 kDa. En algunos aspectos, el PEG tiene un peso molecular promedio entre alrededor de 15 kDa y alrededor de 40 kDa, entre alrededor de 20 kDa y alrededor de 40 kDa, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 40 kDa, entre alrededor de 30 kDa y alrededor de 40 kDa, entre alrededor de 35 kDa y alrededor de 40 kDa, entre alrededor de 15 kDa y alrededor de 35 kDa, entre alrededor de 15 kDa y alrededor de 30 kDa, entre alrededor de 15 kDa y alrededor de 25 kDa, entre alrededor de 15 kDa y alrededor de 20 kDa, entre alrededor de 20 kDa y alrededor de 35 kDa, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 35 kDa, o entre alrededor de 30 kDa y alrededor de 35 kDa.

[0172] En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida, por ejemplo, PEG, se une al polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2) por medio de un aminoácido codificado no natural, por ejemplo, un derivado de fenilalanina. En algunos aspectos, el derivado de fenilalanina es para-acetil-L-fenilalanina. En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida está ligada al aminoácido codificado de manera no natural por medio de un enlace oxima. En algunos aspectos, el aminoácido codificado de manera no natural reemplaza al aminoácido glutamina 109 de SEQ ID NO: 3 (FGF-21 de tipo silvestre).

[0173] En algunos aspectos específicos de la presente divulgación, el polipéptido FGF-21 es PEG-FGF-21 (SEQ ID NO: 2), es decir, un derivado del FGF-21 modificado de SEQ ID NO: 1 en donde la glutamina 109 de FGF-21 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 3) se reemplazó con para-acetil-L-fenilalanina y una cadena de PEG de 30 kDa se unió de manera covalente a la para-acetil-L-fenilalanina en la posición 109 por medio de un enlace de oxima.

[0174] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 (por ejemplo, polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) está presente en una concentración entre alrededor de 1 mg/ml y alrededor de 40 mg/ml. En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 está presente en una concentración de alrededor de 10 mg/ml, alrededor de 20 mg/ml, alrededor de 30 mg/ml o alrededor de 40 mg/ml. En algunos aspectos, el polipéptido

FGF-21 (por ejemplo, polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) está presente en una concentración entre alrededor de 1 mg/ml y 5 mg/ml, entre alrededor de 5 mg/ml y alrededor de 10 mg/ml, entre alrededor de 10 mg/ml y alrededor de 15 mg/ml, entre alrededor de 15 mg/ml y alrededor de 20 mg/ml, entre alrededor de 20 mg/ml y alrededor de 25 mg/ml, entre alrededor de 25 mg/ml y alrededor de 30 mg/ml, entre alrededor de 30 mg/ml y alrededor de 35 mg/ml o entre alrededor de 35 mg/ml y alrededor de 40 mg/ml.

[0175] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 (por ejemplo, polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) está presente en una concentración de 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml, 20 mg/ml, 21 mg/ml, 22 mg/ml, 23 mg/ml, 24 mg/ml, 25 mg/ml, 26 mg/ml, 27 mg/ml, 28 mg/ml, 29 mg/ml, 30 mg/ml, 31 mg/ml, 32 mg/ml, 33 mg/ml, 34 mg/ml, 35 mg/ml, 36 mg/ml, 37 mg/ml, 38 mg/ml, 39 mg/ml o 40 mg/ml. En algunos aspectos, la concentración del polipéptido FGF-21 se determina de acuerdo con métodos conocidos en el estado de la técnica, o los métodos específicos divulgados en la sección de Ejemplos de la presente memoria descriptiva.

[0176] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) está presente en una formulación divulgada en la presente en una cantidad entre alrededor de 1 mg y alrededor de 40 mg por dosis. En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) está presente en una formulación divulgada en la presente en una cantidad entre alrededor de 1 mg y alrededor de 5 mg por dosis, entre alrededor de 5 mg y alrededor de 10 mg por dosis, o entre alrededor de 10 mg y alrededor de 15 mg por dosis, entre alrededor de 15 mg y alrededor de 20 mg por dosis, o entre alrededor de 20 mg y alrededor de 25 mg por dosis, entre alrededor de 25 mg y alrededor de 30 mg por dosis, o entre alrededor de 30 mg y alrededor de 35 mg por dosis, o entre alrededor de 35 mg y alrededor de 40 mg por dosis. En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, está presente en una formulación divulgada en la presente en una cantidad mayor de 40 mg por dosis.

[0177] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) está presente en una formulación divulgada en la presente en una cantidad de alrededor de 1 mg por dosis, alrededor de 2 mg por dosis, alrededor de 3 mg por dosis, alrededor de 4 mg por dosis, alrededor de 5 mg por

dosis, alrededor de 6 mg por dosis, alrededor de 7 mg por dosis, alrededor de 8 mg por dosis, alrededor de 9 mg por dosis, alrededor de 10 mg por dosis, alrededor de 11 mg por dosis, alrededor de 12 mg por dosis, alrededor de 13 mg por dosis, alrededor de 14 mg por dosis, alrededor de 15 mg por dosis, alrededor de 16 mg por dosis, alrededor de 17 mg por dosis, alrededor de 18 mg por dosis, alrededor de 19 mg por dosis, alrededor de 20 mg por dosis, alrededor de 21 mg por dosis, alrededor de 22 mg por dosis, alrededor de 23 mg por dosis, alrededor de 24 mg por dosis, alrededor de 25 mg por dosis, alrededor de 26 mg por dosis, alrededor de 27 mg por dosis, alrededor de 28 mg por dosis, alrededor de 29 mg por dosis, alrededor de 30 mg por dosis, alrededor de 31 mg por dosis, alrededor de 32 mg por dosis, alrededor de 33 mg por dosis, alrededor de 34 mg por dosis, alrededor de 35 mg por dosis, alrededor de 36 mg por dosis, alrededor de 37 mg por dosis, alrededor de 38 mg por dosis, alrededor de 39 mg por dosis o alrededor de 40 mg por dosis.

[0178] En algunos aspectos, la formulación farmacéutica se formula para administración subcutánea. Como se analiza a continuación, otras de las formulaciones farmacéuticas divulgadas en la presente se pueden administrar por otras vías. En algunos aspectos, la formulación farmacéutica se formula para administración subcutánea, por ejemplo, con una jeringa de seguridad. En algunos aspectos, la formulación se formula para administración diaria o semanal, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, días, una vez por semana o una vez cada dos semanas. En algunos aspectos, la formulación es una formulación acuosa.

[0179] En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona una formulación farmacéutica que comprende (i) un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21; (ii) histidina en una concentración entre alrededor de 10 mM y alrededor de 50 mM; (iii) sacarosa en una concentración entre alrededor de 100 mM y alrededor de 1M; (iv) polisorbato 80 en una concentración entre alrededor de 0,01 % y alrededor de 0,1 % (p/v); y (v) DTPA en una concentración entre alrededor de 10 μ M y alrededor de 100 μ M; en donde el pH de la formulación está entre alrededor de 6,7 y alrededor de 7,5.

[0180] También se proporciona una formulación farmacéutica que comprende (i) un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21; (ii) histidina en una concentración de alrededor de 20 mM; (iii) sacarosa en una concentración de alrededor de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una concentración de alrededor de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una concentración de alrededor de 50 μ M; en donde el pH es alrededor de 7,1.

[0181] También se proporciona una formulación farmacéutica que comprende (i) un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21; (ii) histidina en una concentración de 20 mM; (iii) sacarosa en una concentración de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una concentración de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una concentración de 50 μ M; en donde el pH es 7,1.

[0182] También se proporciona una formulación farmacéutica que comprende (i) un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21; (ii) histidina en una concentración de alrededor de 20 mM; y (iii) sacarosa en una concentración de alrededor de 600 mM; en donde el pH es alrededor de 7,0.

[0183] También se proporciona una formulación farmacéutica que comprende (i) un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21; (ii) histidina en una concentración de 20 mM; y (iii) sacarosa en una concentración de 600 mM; en donde el pH es 7,0.

[0184] En algunos aspectos específicos, la presente divulgación proporciona una formulación farmacéutica que comprende (i) PEG-FGF-21 (SEQ ID NO: 2) en una concentración de alrededor de 10 mg/ml; (ii) histidina en una concentración de alrededor de 20 mM; (iii) sacarosa en una concentración de alrededor de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una concentración de alrededor de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una concentración de alrededor de 50 μ M; en donde el pH es alrededor de 7,1.

[0185] También se proporciona una formulación farmacéutica que comprende (i) PEG-FGF-21 en una concentración de alrededor de 20 mg/ml; (ii) histidina en una concentración de alrededor de 20 mM; (iii) sacarosa en una concentración de alrededor de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una concentración de alrededor de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una concentración de alrededor de 50 μ M; en donde el pH es alrededor de 7,1.

[0186] También se proporciona una formulación farmacéutica que comprende (i) PEG-FGF-21 en una concentración de 10 mg/ml; (ii) histidina en una concentración de 20 mM; (iii) sacarosa en una concentración de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una concentración de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una concentración de 50 μ M; en donde el pH es 7,1.

[0187] También se proporciona una formulación farmacéutica que comprende (i) PEG-FGF21 en una concentración de 20 mg/ml; (ii) histidina en una concentración de 20 mM; (iii) sacarosa en una concentración de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una concentración de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una concentración de 50 μ M; en donde el pH es 7,1.

[0188] La presente divulgación también proporciona una formulación farmacéutica

preparada de acuerdo con cualquiera de los métodos para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende FGF-21 (por ejemplo, FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) divulgada a continuación.

II. Métodos de elaboración

[0189] La presente divulgación también proporciona métodos para mejorar o aumentar la estabilidad de una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, que comprenden mezclar un quelante de cationes ácido aminopolicarboxílico, por ejemplo, DTPA, en donde la formulación tiene una estabilidad mejorada en comparación con una formulación de referencia que no contiene el quelante de cationes ácido aminopolicarboxílico. Estos métodos de estabilización comprenden (i) la mezcla de un quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico con la formulación, (ii) la mezcla de un polisorbato tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80, (iii) ajustar el pH de la formulación a aproximadamente 7,1, o (iv) cualquier combinación de estos.

[0190] En algunos aspectos, una formulación farmacéutica descrita en la presente se elabora por medio del proceso de mezclar (i) PEG-FGF-21 en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 10 mg/ml; (ii) histidina en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 20 mM; (iii) sacarosa en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 50 uM; y ajustar el pH a alrededor de 7,1.

[0191] En algunos aspectos, una formulación farmacéutica descrita en la presente se elabora por medio del proceso de mezclar (i) PEG-FGF-21 en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 20 mg/ml; (ii) histidina en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 20 mM; (iii) sacarosa en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una cantidad para alcanzar una concentración final de alrededor de 50 uM; y ajustar el pH a alrededor de 7,1.

[0192] En algunos aspectos, una formulación farmacéutica descrita en la presente se elabora por medio del proceso de mezclar (i) PEG-FGF-21 en una cantidad para alcanzar una concentración final de 10 mg/ml; (ii) histidina en una cantidad para alcanzar una concentración final de 20 mM; (iii) sacarosa en una cantidad para alcanzar una concentración final de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una cantidad para alcanzar una

concentración final de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una cantidad para alcanzar una concentración final de 50 uM; y ajustar el pH a alrededor de 7,1.

[0193] En algunos aspectos, una formulación farmacéutica descrita en la presente se elabora por medio del proceso de mezclar (i) PEG-FGF-21 en una cantidad para alcanzar una concentración final de 20 mg/ml; (ii) histidina en una cantidad para alcanzar una concentración final de 20 mM; (iii) sacarosa en una cantidad para alcanzar una concentración final de 600 mM; (iv) polisorbato 80 en una cantidad para alcanzar una concentración final de 0,05 % (p/v); y (v) DTPA en una cantidad para alcanzar una concentración final de 50 uM; y ajustar el pH a alrededor de 7,1.

[0194] Como se usa en la presente, el término "mezclar" se refiere a la combinación de los componentes de las formulaciones divulgadas en la presente sin orden predeterminado para lograr las concentraciones divulgadas mediante cualquier medio conocido en el estado de la técnica. Por ejemplo, los excipientes en una formulación farmacéutica divulgada en la presente se pueden agregar de manera secuencial o simultánea a una solución de polipéptido FGF-21. De manera alternativa, una solución concentrada de polipéptido FGF-21 se puede agregar a una solución que comprende la totalidad o parte de los excipientes en la formulación. En otros aspectos, los excipientes se pueden incorporar a la formulación usando, por ejemplo, diálisis o filtración.

[0195] En algunos aspectos, las mejoras en la estabilidad que derivan de la aplicación del método divulgado comprenden, por ejemplo, (i) un aumento en la estabilidad física con respecto a una formulación de referencia, (ii) un aumento en la estabilidad química con respecto a una formulación de referencia, o (iii) una combinación de estos.

[0196] En algunos aspectos, el aumento en la estabilidad física comprende (i) prevención o disminución de agregación de polipéptido, (ii) prevención o disminución de fragmentación de polipéptido, o (iii) una combinación de estos. En algunos aspectos, la agregación de polipéptidos observada en una composición farmacéutica divulgada en la presente es alrededor de 90 %, alrededor de 85 %, alrededor de 80 %, alrededor de 75 %, alrededor de 70 %, alrededor de 65 %, alrededor de 60 %, alrededor de 55 %, alrededor de 50 %, alrededor de 45 %, alrededor de 40 %, alrededor de 35 %, alrededor de 30 %, alrededor de 25 %, alrededor de 20 %, alrededor de 15 % o alrededor de 10 % de la agregación observada en una formulación de referencia. En algunos aspectos, la agregación de polipéptidos observada en una composición farmacéutica divulgada en la presente es menor de 90 %, menor de 85 %, menor de 80 %, menor de 75 %, menor de 70 %, menor de 65 %, menor de 60 %, menor de 55 %, menor de 50 %, menor de 45 %, menor de 40 %, menor de 35 %, menor de 30 %, menor de 25 %, menor de 20

%, menor de 15 % o menor de 10 % de la agregación observada en una formulación de referencia. En algunos aspectos, la fragmentación de polipéptidos observada en una composición farmacéutica divulgada en la presente es alrededor de 90 %, alrededor de 85 %, alrededor de 80 %, alrededor de 75 %, alrededor de 70 %, alrededor de 65 %, alrededor de 60 %, alrededor de 55 %, alrededor de 50 %, alrededor de 45 %, alrededor de 40 %, alrededor de 35 %, alrededor de 30 %, alrededor de 25 %, alrededor de 20 %, alrededor de 15 % o alrededor de 10 % de la fragmentación observada en una formulación de referencia. En algunos aspectos, la fragmentación de polipéptidos observada en una composición farmacéutica divulgada en la presente es menor de 90 %, menor de 85 %, menor de 80 %, menor de 75 %, menor de 70 %, menor de 65 %, menor de 60 %, menor de 55 %, menor de 50 %, menor de 45 %, menor de 40 %, menor de 35 %, menor de 30 %, menor de 25 %, menor de 20 %, menor de 15 % o menor de 10 % de la fragmentación observada en una formulación de referencia.

[0197] En algunos aspectos, el aumento en estabilidad química comprende (i) prevención o disminución de desamidación de polipéptidos, (ii) prevención o disminución de oxidación de polipéptidos, o (iii) una combinación de estos. En algunos aspectos, la desamidación de polipéptidos observada en una composición farmacéutica divulgada en la presente es alrededor de 90 %, alrededor de 85 %, alrededor de 80 %, alrededor de 75 %, alrededor de 70 %, alrededor de 65 %, alrededor de 60 %, alrededor de 55 %, alrededor de 50 %, alrededor de 45 %, alrededor de 40 %, alrededor de 35 %, alrededor de 30 %, alrededor de 25 %, alrededor de 20 %, alrededor de 15 % o alrededor de 10 % de la desamidación observada en una formulación de referencia. En algunos aspectos, la desamidación de polipéptidos observada en una composición farmacéutica divulgada en la presente es menor de 90 %, menor de 85 %, menor de 80 %, menor de 75 %, menor de 70 %, menor de 65 %, menor de 60 %, menor de 55 %, menor de 50 %, menor de 45 %, menor de 40 %, menor de 35 %, menor de 30 %, menor de 25 %, menor de 20 %, menor de 15 % o menor de 10 % de la desamidación de polipéptidos observada en una formulación de referencia. En algunos aspectos, la oxidación de polipéptidos observada en una composición farmacéutica divulgada en la presente es alrededor de 90 %, alrededor de 85 %, alrededor de 80 %, alrededor de 75 %, alrededor de 70 %, alrededor de 65 %, alrededor de 60 %, alrededor de 55 %, alrededor de 50 %, alrededor de 45 %, alrededor de 40 %, alrededor de 35 %, alrededor de 30 %, alrededor de 25 %, alrededor de 20 %, alrededor de 15 % o alrededor de 10 % de la oxidación de polipéptidos observada en una formulación de referencia. En algunos aspectos, la oxidación de polipéptidos observada en una composición farmacéutica divulgada en la

presente es menor de 90 %, menor de 85 %, menor de 80 %, menor de 75 %, menor de 70 %, menor de 65 %, menor de 60 %, menor de 55 %, menor de 50 %, menor de 45 %, menor de 40 %, menor de 35 %, menor de 30 %, menor de 25 %, menor de 20 %, menor de 15 % o menor de 10 % de la oxidación de polipéptidos observada en una formulación de referencia.

[0198] En algunos aspectos, los métodos para estabilizar (mejorar o aumentar la estabilidad de) una formulación divulgada en la presente pueden disminuir no solo el nivel de degradación, sino también la velocidad de degradación: por ejemplo, los métodos divulgados pueden disminuir la velocidad de desamidación de polipéptidos, disminuir la velocidad de oxidación de polipéptidos, disminuir la velocidad de agregación de polipéptidos, disminuir la velocidad de degradación proteolítica, o cualquier combinación de estos, con respecto a una formulación de referencia.

[0199] Por ejemplo, la mezcla de un quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico tal como DTPA en una formulación farmacéutica divulgada en la presente puede disminuir la velocidad de desamidación del polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, cuando se almacena a determinada temperatura durante un periodo de tiempo determinado con respecto a la formulación de referencia.

[0200] En algunos aspectos, la mezcla de una quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) con una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) puede disminuir la velocidad de desamidación del polipéptido FGF-21 cuando la formulación farmacéutica se almacena, por ejemplo, a alrededor de 25 °C, a alrededor de 30 °C, a alrededor de 35 °C, a alrededor de 40 °C o a alrededor de 45 °C con respecto a la formulación de referencia. En algunos aspectos, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) puede disminuir la velocidad de desamidación del polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, cuando la formulación farmacéutica se almacena a una temperatura por encima de 25 °C, por encima de 30 °C, por encima de 35 °C, alrededor de 40 °C o alrededor de 45 °C con respecto a la formulación de referencia. En algunos aspectos, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) puede disminuir la velocidad de desamidación del polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, cuando la formulación farmacéutica se almacena entre alrededor de 20 °C y alrededor de 25 °C, alrededor de 25 °C y alrededor de 30 °C, alrededor de 30 °C y alrededor de 35 °C, o

alrededor de 40 °C y alrededor de 45 °C con respecto a la formulación de referencia.

[0201] En algunos aspectos, la mezcla de un quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) con una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) puede disminuir la velocidad de desamidación del polipéptido FGF-21 cuando la formulación farmacéutica se almacena a una temperatura o rango de temperatura divulgado anteriormente durante alrededor de 1 semana, alrededor de 2 semanas, alrededor de 3 semanas, alrededor de 1 mes, alrededor de 2 meses, alrededor de 3 meses o alrededor de 4 meses con respecto a la formulación de referencia.

[0202] En un aspecto específico, la mezcla de un quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) con una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) puede disminuir la velocidad de desamidación del polipéptido FGF-21 cuando la formulación farmacéutica se almacena a 40 °C durante alrededor de un mes con respecto a la formulación de referencia.

[0203] En algunos aspectos, la mezcla de un quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (*por ejemplo*, DTPA) con una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) puede disminuir la velocidad de agregación de alto peso molecular (HMW) del polipéptido FGF-21 cuando la formulación farmacéutica se almacena a alrededor de 25 °C, a alrededor de 30 °C, a alrededor de 35 °C, a alrededor de 40 °C o a alrededor de 45 °C con respecto a la formulación de referencia.

[0204] En algunos aspectos, la mezcla de un quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) con una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) puede disminuir la velocidad de agregación de HMW del polipéptido FGF-21 cuando la formulación farmacéutica se almacena a una temperatura por encima de 25 °C, por encima de 30 °C, por encima de 35 °C, alrededor de 40 °C o alrededor de 45 °C con respecto a la formulación de referencia. En algunos aspectos, la mezcla de un quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (*por ejemplo*, DTPA) con una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) puede disminuir la velocidad de agregación de HMW del polipéptido FGF-21 cuando la formulación farmacéutica se almacena entre una temperatura alrededor de 20 °C y alrededor de 25 °C, alrededor de

25 °C y alrededor de 30 °C, alrededor de 30 °C y alrededor de 35 °C, o alrededor de 40 °C y alrededor de 45 °C con respecto a la formulación de referencia.

[0205] En algunos aspectos, la mezcla de un quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) con una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) puede disminuir la velocidad de agregación de HMW del polipéptido FGF-21 cuando la formulación farmacéutica se almacena a una temperatura o rango de temperatura divulgado anteriormente durante alrededor de 1 semana, alrededor de 2 semanas, alrededor de 3 semanas, alrededor de 1 mes, alrededor de 2 meses, alrededor de 3 meses, o alrededor de 4 meses con respecto a la formulación de referencia.

[0206] En un aspecto específico, la mezcla de un quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) con una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) puede disminuir la velocidad de agregación de HMW del polipéptido FGF-21 cuando la formulación farmacéutica se almacena a 40 °C durante alrededor de un mes con respecto a la formulación de referencia.

[0207] En algunos aspectos, la mezcla de un quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) con una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) puede prevenir o mitigar la oxidación de una o más metioninas en el polipéptido FGF-21.

[0208] En aspectos particulares, la mezcla de un quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico (por ejemplo, DTPA) con una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) puede prevenir o mitigar la oxidación del aminoácido 1 y/o aminoácido 169 de SEQ ID NO: 3 (o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO:1, 2 o cualquier otro polipéptido FGF-21), por ejemplo, a 25 °C y/o a 40 °C.

[0209] Los métodos divulgados pueden usar el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico DTPA. Sin embargo, en algunos otros aspectos, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico puede ser, por ejemplo, otro quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico tal como EDTA, EGTA, DOTA, un compuesto relacionado con DTPA, tal como tiuxetano, o cualquier agente quelante relacionado con DTPA y EDTA conocido en el estado de la técnica, por ejemplo, DTPA.BMA y EDTA.BMA.

[0210] En algunos aspectos, el quelante de cationes DTPA se puede mezclar en una

cantidad entre alrededor de 10 μM y alrededor de 100 μM , entre 15 μM y alrededor de 95 μM , entre alrededor de 20 μM y alrededor de 90 μM , entre alrededor de 25 μM y alrededor de 85 μM , entre alrededor de 30 μM y alrededor de 80 μM , entre alrededor de 35 μM y alrededor de 75 μM , entre alrededor de 40 μM y alrededor de 70 μM , entre alrededor de 45 μM y alrededor de 65 μM , entre alrededor de 50 μM y alrededor de 60 μM , entre alrededor de 25 μM y alrededor de 75 μM , entre alrededor de 40 μM y alrededor de 60 μM , entre alrededor de 30 μM y alrededor de 70 μM , o entre alrededor de 40 μM y alrededor de 75 μM .

[0211] En algunos aspectos, el quelante de cationes DTPA se puede mezclar en una cantidad de alrededor de 10 μM , alrededor de 15 μM , alrededor de 20 μM , alrededor de 25 μM , alrededor de 30 μM , alrededor de 35 μM , alrededor de 40 μM , alrededor de 45 μM , alrededor de 50 μM , alrededor de 55 μM , alrededor de 60 μM , alrededor de 65 μM , alrededor de 70 μM , alrededor de 75 μM , alrededor de 80 μM , alrededor de 85 μM , alrededor de 90 μM , alrededor de 95 μM o alrededor de 100 μM .

[0212] En algunos aspectos, el quelante de cationes DTPA se puede mezclar en una cantidad de al menos alrededor de 15 μM , al menos alrededor de 20 μM , al menos alrededor de 25 μM , al menos alrededor de 30 μM , al menos alrededor de 35 μM , al menos alrededor de 40 μM , al menos alrededor de 45 μM , al menos alrededor de 50 μM , al menos alrededor de 55 μM , al menos alrededor de 60 μM , al menos alrededor de 65 μM , al menos alrededor de 70 μM o al menos alrededor de 75 μM .

[0213] En un aspecto específico, el quelante de cationes de ácido aminopolicarboxílico, por ejemplo, DTPA, se mezcla en una cantidad de 50 μM .

[0214] En algunos aspectos de los métodos divulgados en la presente, el pH de la formulación se ajusta a un pH por encima de alrededor de 6,5, por encima de alrededor de 6,6, por encima de alrededor de 6,7, por encima de alrededor de 6,8, por encima de alrededor de 6,9, por encima de alrededor de 7,0, por encima de alrededor de 7,1, por encima de alrededor de 7,2, por encima de alrededor de 7,3, por encima de alrededor de 7,4 o por encima de alrededor de 7,5.

[0215] En algunos aspectos, el pH de la formulación se ajusta a un pH por encima de 6,5, por encima de 6,6, por encima de 6,7, por encima de 6,8, por encima de 6,9, por encima de 7,0, por encima de 7,1, por encima de 7,2, por encima de 7,3, por encima de 7,4 o por encima de 7,5.

[0216] En algunos aspectos, el pH de la formulación se ajusta a una pH de 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 o 7,5.

[0217] En algunos aspectos, el pH de la formulación se ajusta a un pH entre alrededor

de 6,5 y alrededor de 7,5, alrededor de 6,6 y alrededor de 7,5, alrededor de 6,7 y alrededor de 7,5, alrededor de 6,8 y alrededor de 7,5, alrededor de 6,9 y alrededor de 7,5, alrededor de 7,0 y alrededor de 7,5, alrededor de 7,1 y alrededor de 7,5, alrededor de 7,2 y alrededor de 7,5, alrededor de 7,3 y alrededor de 7,5, alrededor de 7,4 y alrededor de 7,5, alrededor de 6,5 y alrededor de 7,4, alrededor de 6,5 y alrededor de 7,3, alrededor de 6,5 y alrededor de 7,2, alrededor de 6,5 y alrededor de 7,1, alrededor de 6,5 y alrededor de 7,0, alrededor de 6,5 y alrededor de 6,9, alrededor de 6,5 y alrededor de 6,8, alrededor de 6,5 y alrededor de 6,7, alrededor de 6,6 y alrededor de 7,4, alrededor de 6,7 y alrededor de 7,4, alrededor de 6,8 y alrededor de 7,4, alrededor de 6,9 y alrededor de 7,4, alrededor de 7,0 y alrededor de 7,4, alrededor de 7,1 y alrededor de 7,4, alrededor de 7,2 y alrededor de 7,4, alrededor de 7,3 y alrededor de 7,4, alrededor de 6,5 y alrededor de 7,3, alrededor de 6,6 y alrededor de 7,3, alrededor de 6,7 y alrededor de 7,3, alrededor de 6,7 y alrededor de 7,3, alrededor de 6,8 y alrededor de 7,3, alrededor de 6,9 y alrededor de 7,3, alrededor de 7,0 y alrededor de 7,3, alrededor de 7,1 y alrededor de 7,3, alrededor de 7,2 y alrededor de 7,3, alrededor de 6,5 y alrededor de 7,2, alrededor de 6,6 y alrededor de 7,2, alrededor de 6,7 y alrededor de 7,2, alrededor de 6,8 y alrededor de 7,2, alrededor de 6,9 y alrededor de 7,2, alrededor de 7,0 y alrededor de 7,2, alrededor de 7,1 y alrededor de 7,2, alrededor de 6,9 y alrededor de 7,1, o alrededor de 7,0 y alrededor de 7,1.

[0218] En algunos aspectos, el pH de la formulación se ajusta a un pH de alrededor de 6,8, alrededor de 6,9, alrededor de 7,0, alrededor de 7,1, alrededor de 7,2, alrededor de 7,3, alrededor de 7,4 o alrededor de 7,5. En algunos aspectos, la formulación farmacéutica, después de ajustar el pH, es más estable que una formulación de referencia con un pH de 6,5.

[0219] En algunos aspectos, el pH de la formulación se ajusta a un pH de 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 o 7,5. En algunos aspectos, la formulación farmacéutica, después de ajustar el pH, es más estable que una formulación de referencia con un pH de 6,5.

[0220] En algunos aspectos, el método para mejorar la estabilidad de una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) además comprende mezclar un tensioactivo. En algunos aspectos, el tensioactivo mezclado es un tensioactivo no iónico, es decir, un tensioactivo que tiende a no tener carga neta en soluciones neutrales. En algunos aspectos, el tensioactivo mezclado no aniónico es un polisorbato. En algunos aspectos, el tensioactivo no iónico se mezcla en una cantidad por encima de la concentración micelar crítica (CMC), que para ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitán es

aproximadamente una cantidad de al menos 0,01 mg/ml. Ver Wan and Lee, Journal of Pharm Sci, 63, p.136, 1974. En algunos aspectos de los presentes métodos, el polisorbato es polisorbato 80 (PS80).

[0221] En algunos aspectos, el tensioactivo PS80 se mezcla con la formulación farmacéutica en una cantidad de alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor 0,02 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor 0,03 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor 0,04 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor 0,05 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor 0,06 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor 0,07 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor 0,08 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor 0,09 % a alrededor de 0,1 % (p/v), alrededor 0,02 % a alrededor de 0,09 % (p/v), alrededor 0,03 % a alrededor de 0,09 % (p/v), alrededor 0,04 % a alrededor de 0,09 % (p/v), alrededor 0,05 % a alrededor de 0,09 % (p/v), alrededor 0,06 % a alrededor de 0,09 % (p/v), alrededor 0,07 % a alrededor de 0,09 % (p/v), alrededor 0,08 % a alrededor de 0,09 % (p/v), alrededor 0,03 % a alrededor de 0,08 % (p/v), alrededor 0,04 % a alrededor de 0,08 % (p/v), alrededor 0,05 % a alrededor de 0,08 % (p/v), alrededor 0,06 % a alrededor de 0,08 % (p/v), alrededor 0,07 % a alrededor de 0,08 % (p/v), alrededor 0,04 % a alrededor de 0,07 % (p/v), alrededor 0,05 % a alrededor de 0,07 % (p/v), alrededor 0,06 % a alrededor de 0,07 % (p/v) o alrededor 0,05 % a alrededor de 0,06 % (p/v).

[0222] En algunos aspectos, el tensioactivo polisorbato 80 se mezcla en una cantidad de al menos alrededor de 0,01 % (p/v), al menos alrededor de 0,02 % (p/v), al menos alrededor de 0,03 % (p/v), al menos alrededor de 0,04 % (p/v), al menos alrededor de 0,05 % (p/v), al menos alrededor de 0,06 % (p/v), al menos alrededor de 0,07 % (p/v), al menos alrededor de 0,08 % (p/v), al menos alrededor de 0,09 % (p/v) o al menos alrededor de 0,1 % (p/v). En algunos aspectos, el tensioactivo, por ejemplo, PS80, se mezcla en una cantidad suficiente para mitigar o prevenir la formación de partículas y/o burbujas de aire, por ejemplo, cuando la formulación se agita (por ejemplo, en un agitador).

[0223] En algunos aspectos, el método para mejorar la estabilidad de una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) también comprende mezclar un agente amortiguador de aminoácidos, por ejemplo, histidina (es decir, L-histidina, D-histidina, una histidina solvatada, una histidina hidratada, una histidina anhidra o una mezcla de estos).

[0224] En algunos aspectos, el agente amortiguador de histidina se mezcla en una cantidad de alrededor de 10 mM a alrededor de 100 mM de histidina, alrededor de 15

alrededor de 60 mM de histidina, alrededor de 45 mM a alrededor de 60 mM de histidina, alrededor de 50 mM a alrededor de 60 mM de histidina, alrededor de 15,5 mM a alrededor de 24,5 mM de histidina, alrededor de 16 mM a alrededor de 24 mM de histidina, alrededor de 16,5 mM a alrededor de 23,5 mM de histidina, alrededor de 17 mM a alrededor de 23 mM de histidina, alrededor de 17,5 mM a alrededor de 22,5 mM de histidina, alrededor de 18 mM a alrededor de 22 mM de histidina, alrededor de 18,5 mM a alrededor de 21,5 mM de histidina, alrededor de 19 mM a alrededor de 21 mM de histidina o alrededor de 19,5 mM a alrededor de 20,5 mM de histidina.

[0225] En algunos aspectos, el agente amortiguador de histidina se mezcla en una cantidad de alrededor de 10 mM de histidina, alrededor de 11 mM de histidina, alrededor de 12 mM de histidina, alrededor de 13 mM de histidina, alrededor de 14 mM de histidina, alrededor de 15 mM de histidina, alrededor de 16 mM de histidina, alrededor de 17 mM de histidina, alrededor de 18 mM de histidina, alrededor de 19 mM de histidina, alrededor de 20 mM de histidina, alrededor de 21 mM de histidina, alrededor de 22 mM de histidina, alrededor de 23 mM de histidina, alrededor de 24 mM de histidina, alrededor de 25 mM de histidina, alrededor de 26 mM de histidina, alrededor de 27 mM de histidina, alrededor de 28 mM de histidina, alrededor de 29 mM de histidina, alrededor de 30 mM de histidina, alrededor de 31 mM de histidina, alrededor de 32 mM de histidina, alrededor de 33 mM de histidina, alrededor de 34 mM de histidina, alrededor de 35 mM de histidina, alrededor de 36 mM de histidina, alrededor de 37 mM de histidina, alrededor de 38 mM de histidina, alrededor de 39 mM de histidina, alrededor de 40 mM de histidina, alrededor de 41 mM de histidina, alrededor de 42 mM de histidina, alrededor de 43 mM de histidina, alrededor de 44 mM de histidina, alrededor de 45 mM de histidina, alrededor de 46 mM de histidina, alrededor de 47 mM de histidina, alrededor de 48 mM de histidina, alrededor de 49 mM de histidina o alrededor de 50 mM de histidina.

[0226] En algunos aspectos, el método para mejorar la estabilidad de una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) además comprende mezclar un regulador osmótico (agente de tonicidad). De acuerdo con la presente divulgación, el regulador osmótico (agente de tonicidad) puede comprender un poliol, un sacárido, un carbohidrato, una sal, tal como cloruro de sodio, o mezclas de estos. Los polioles de ejemplo comprenden aquellos con un peso molecular que es menor de alrededor de 600 kD (por ejemplo, en el rango de 120 a 400 kD), por ejemplo, manitol, trehalosa, sorbitol, eritritol, isomaltita, lactitol, maltitol, xilitol, glicerol, lactitol, propilenglicol, polietilenglicol, inositol, o mezclas de estos. Los reguladores osmóticos de sacáridos o carbohidratos

comprenden monosacáridos, disacáridos y polisacáridos, o mezclas de estos. En algunos aspectos, el sacárido o carbohidrato se selecciona del grupo que consiste en fructosa, glucosa, manosa, sacarosa, sorbosa, xilosa, lactosa, maltosa, sacarosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrinas, almidón soluble, hidroxietil-almidón, glucanos hidrosolubles, y mezclas de estos. En algunos aspectos, el regulador osmótico comprende un sacárido seleccionado del grupo de azúcar reductor o azúcar no reductor o mezclas de estos. En algunos aspectos, el regulador osmótico, el agente de tonicidad, comprende un sacárido que es un azúcar no reductor, preferentemente, seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa y mezclas de estos. En algunos aspectos específicos, el azúcar no reductor es sacarosa.

[0227] En algunos aspectos, el regulador osmótico sacarosa se mezcla en una cantidad de alrededor de 100 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 200 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 300 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 400 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 500 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 600 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 700 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 800 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 900 mM a alrededor de 1 M de sacarosa, alrededor de 200 mM a alrededor de 900 mM de sacarosa, alrededor de 300 mM a alrededor de 900 mM de sacarosa, alrededor de 400 mM a alrededor de 900 mM de sacarosa, alrededor de 500 mM a alrededor de 900 mM de sacarosa, alrededor de 600 mM a alrededor de 900 mM de sacarosa, alrededor de 700 mM a alrededor de 900 mM de sacarosa, alrededor de 800 mM a alrededor de 900 mM de sacarosa, alrededor de 300 mM a alrededor de 800 mM de sacarosa, alrededor de 400 mM a alrededor de 800 mM de sacarosa, alrededor de 500 mM a alrededor de 800 mM de sacarosa, alrededor de 600 mM a alrededor de 800 mM de sacarosa, alrededor de 700 mM a alrededor de 800 mM de sacarosa, alrededor de 400 mM a alrededor de 700 mM de sacarosa, alrededor de 500 mM a alrededor de 700 mM de sacarosa, alrededor de 600 mM a alrededor de 700 mM de sacarosa o alrededor de 500 mM a alrededor de 600 mM de sacarosa.

[0228] En algunos aspectos, el regulador osmótico sacarosa se mezcla en una cantidad de alrededor de 100 mM de sacarosa, alrededor de 150 mM de sacarosa, alrededor de 200 mM de sacarosa, alrededor de 250 mM de sacarosa, alrededor de 300 mM de sacarosa, alrededor de 350 mM de sacarosa, alrededor de 400 mM de sacarosa, alrededor de 450 mM de sacarosa, alrededor de 500 mM de sacarosa, alrededor de 550 mM de sacarosa, alrededor de 600 mM de sacarosa, alrededor de 650 mM de sacarosa, alrededor de 700 mM de sacarosa, alrededor de 750 mM de sacarosa, alrededor de 800

mM de sacarosa, alrededor de 850 mM de sacarosa, alrededor de 900 mM de sacarosa, alrededor de 950 mM de sacarosa o alrededor de 1M de sacarosa.

[0229] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 es un polipéptido GF-21 modificado. Numerosos polipéptidos FGF-21 modificados conocidos en el estado de la técnica se pueden usar en los métodos divulgados en la presente, por ejemplo, aquellos divulgados en las patentes estadounidenses N.º 8.012.931 y 9.434.788, que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad. FGF-21 adicionales se pueden formular como se divulga en la presente solicitud como se describe con mayor detalle a continuación.

[0230] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 modificado útil en los métodos divulgados en la presente comprende un polipéptido que tiene al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 96 %, al menos alrededor de 97 %, al menos alrededor de 98 % o al menos alrededor de 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (FGF-21 humano de tipo silvestre), en donde el polipéptido tiene actividad de FGF-21.

[0231] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 modificado útil en los métodos divulgados en la presente consiste, o consiste esencialmente, en un polipéptido que tiene al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 96 %, al menos alrededor de 97 %, al menos alrededor de 98 % o al menos alrededor de 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (FGF-21 humano de tipo silvestre), en donde el polipéptido tiene actividad de FGF-21.

[0232] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 modificado útil en los métodos divulgados en la presente está ligado a una porción de extensión de semivida, por ejemplo, por medio de la cadena lateral de un aminoácido codificado de manera no natural en la secuencia del polipéptido FGF-21. Las porciones de extensión de semivida que se pueden unir a un polipéptido FGF-21 de la presente divulgación, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado de SEQ ID NO: 1 comprende, por ejemplo, albúmina, una región constante de inmunoglobulina o una porción de esta, un polipéptido de unión a inmunoglobulina, una IgG, un ABP, una porción de PASilación, una porción de HESilación, un XTEN, una región Fc, y cualquier combinación de estos. Las porciones de extensión de semivida que se pueden usar para modificar los polipéptidos FGF-21 se describen con mayor detalle a continuación.

[0233] En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida útil en los métodos divulgados en la presente comprende un polímero hidrosoluble, por ejemplo, un polietilenglicol (PEG). En algunos aspectos, el PEG tiene un peso molecular promedio entre alrededor de 10 kDa y alrededor de 40 kDa, por ejemplo, alrededor de 10 kDa, alrededor de 15 kDa, alrededor de 20 kDa, alrededor de 25 kDa, alrededor de 30 kDa, alrededor de 35 kDa o alrededor de 40 kDa. En algunos aspectos, el PEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 30 kDa. En algunos aspectos, el PEG tiene un peso molecular promedio entre alrededor de 15 kDa y alrededor de 40 kDa, entre alrededor de 20 kDa y alrededor de 40 kDa, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 40 kDa, entre alrededor de 30 kDa y alrededor de 40 kDa, entre alrededor de 35 kDa y alrededor de 40 kDa, entre alrededor de 15 kDa y alrededor de 35 kDa, entre alrededor de 15 kDa y alrededor de 30 kDa, entre alrededor de 15 kDa y alrededor de 25 kDa, entre alrededor de 15 kDa y alrededor de 20 kDa, entre alrededor de 20 kDa y alrededor de 35 kDa, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 35 kDa, o entre 30 kDa y alrededor de 35 kDa.

[0234] En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida, por ejemplo, PEG, se une al polipéptido FGF-21, por medio de un aminoácido codificado no natural, por ejemplo, un derivado de fenilalanina. En algunos aspectos, el derivado de fenilalanina es para-acetil-L-fenilalanina. En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida está ligada al aminoácido codificado de manera no natural por medio de un enlace oxima. En algunos aspectos, el aminoácido codificado de manera no natural reemplaza al aminoácido glutamina 109 de SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 es PEG-FGF-21 (SEQ ID NO: 2), es decir, el FGF-21 de SEQ ID NO: 3 en el que la glutamina 109 se reemplazó con para-acetil-L-fenilalanina y una cadena de PEG de 30 kDa se unió de manera covalente a la para-acetil-L-fenilalanina por medio de un enlace de oxima.

[0235] En algunos aspectos de los métodos divulgados en la presente, el polipéptido FGF-21 está presente en una concentración entre alrededor de 1 mg/ml y alrededor de 40 mg/ml. En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 está presente en una concentración de alrededor de 10 mg/ml, alrededor de 20 mg/ml, alrededor de 30 mg/ml o alrededor de 40 mg/ml. En algunos aspectos, la concentración del polipéptido FGF-21 se determina de acuerdo con métodos conocidos en el estado de la técnica, o los métodos específicos divulgados en la sección de Ejemplos de la memoria descriptiva.

[0236] En algunos aspectos de los métodos divulgados en la presente, la formulación se formula para administración subcutánea. En algunos aspectos, la formulación se formula para administración subcutánea con una jeringa de seguridad. En algunos

aspectos, la formulación se formula para administración diaria o semanal. En algunos aspectos, la formulación es una formulación acuosa.

[0237] La presente divulgación proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, que comprende mezclar (i) histidina en una concentración entre alrededor de 10 mM y alrededor de 50 mM; (ii) sacarosa en una concentración entre alrededor de 100 mM y alrededor de 1M; (iii) polisorbato 80 en una concentración entre alrededor de 0,01 % y alrededor de 0,1 % (p/v); y (iv) DTPA en una concentración entre alrededor de 10 μ M y alrededor de 100 μ M; en donde el pH de la formulación está entre alrededor de 6,7 y alrededor de 7,5.

[0238] La presente divulgación proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, que comprende mezclar (i) histidina en una concentración entre alrededor de 15 mM y alrededor de 45 mM; (ii) sacarosa en una concentración entre alrededor de 200 mM y alrededor de 900mM; (iii) polisorbato 80 en una concentración entre alrededor de 0,02 % y alrededor de 0,09 % (p/v); y (iv) DTPA en una concentración entre alrededor de 20 μ M y alrededor de 90 μ M; en donde el pH de la formulación está entre alrededor de 6,8 y alrededor de 7,4.

[0239] La presente divulgación proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, que comprende mezclar (i) histidina en una concentración entre alrededor de 15 mM y alrededor de 40 mM; (ii) sacarosa en una concentración entre alrededor de 300 mM y alrededor de 800mM; (iii) polisorbato 80 en una concentración entre alrededor de 0,03 % y alrededor de 0,08 % (p/v); y (iv) DTPA en una concentración entre alrededor de 30 μ M y alrededor de 80 μ M; en donde el pH de la formulación está entre alrededor de 6,9 y alrededor de 7,3.

[0240] La presente divulgación proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, que comprende mezclar (i) histidina en una concentración entre alrededor de 15 mM y alrededor de 30 mM; (ii) sacarosa en una concentración entre alrededor de 400 mM y alrededor de 800mM; (iii) polisorbato 80 en una concentración entre alrededor de 0,04 % y alrededor de 0,07 % (p/v); y (iv) DTPA en una concentración entre alrededor de 40 μ M y alrededor de 70 μ M; en donde el pH de la formulación está entre alrededor de 7 y alrededor de 7,2.

[0241] La presente divulgación proporciona un método para mejorar la estabilidad de

una formulación que comprende un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, que comprende mezclar (i) histidina en una concentración entre alrededor de 15 mM y alrededor de 25 mM; (ii) sacarosa en una concentración entre alrededor de 500 mM y alrededor de 700mM; (iii) polisorbato 80 en una concentración entre alrededor de 0,04 % y alrededor de 0,06 % (p/v); y (iv) DTPA en una concentración entre alrededor de 45 μ M y alrededor de 55 μ M; en donde el pH de la formulación está entre alrededor de 7 y alrededor de 7,1.

[0242] La presente divulgación también proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, que comprende mezclar (i) histidina en una concentración de alrededor de 20 mM; (ii) sacarosa en una concentración de alrededor de 600 mM; (iii) polisorbato 80 en una concentración de alrededor de 0,05 % (p/v); y (iv) DTPA en una concentración de alrededor de 50 μ M; en donde el pH es alrededor de 7,1.

[0243] La presente divulgación también proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, que comprende mezclar (i) histidina en una concentración de 20 mM; (ii) sacarosa en una concentración de 600 mM; (iii) polisorbato 80 en una concentración de 0,05 % (p/v); y (iv) DTPA en una concentración de 50 μ M; en donde el pH es 7,1.

[0244] La presente divulgación proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, que comprende mezclar (i) histidina en una concentración de alrededor de 20 mM; y (ii) sacarosa en una concentración de alrededor de 600 mM; en donde el pH es alrededor de 7,0.

[0245] La presente divulgación proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende un polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, que comprende mezclar (i) histidina en una concentración de 20 mM; y (ii) sacarosa en una concentración de 600 mM; en donde el pH es 7,0.

[0246] La presente divulgación proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende un PEG-FGF-21 (SEQ ID NO: 2) en una concentración de alrededor de 10 mg/ml que comprende mezclar (i) histidina en una concentración de alrededor de 20 mM; (ii) sacarosa en una concentración de alrededor de 600 mM; (iii) polisorbato 80 en una concentración de alrededor de 0,05 % (p/v); y (iv) DTPA en una

concentración de alrededor de 50 μ M; en donde el pH es alrededor de 7,1.

[0247] La presente divulgación proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende un PEG-FGF-21 (SEQ ID NO: 2) en una concentración de alrededor de 20 mg/ml que comprende mezclar (i) histidina en una concentración de alrededor de 20 mM; (ii) sacarosa en una concentración de alrededor de 600 mM; (iii) polisorbato 80 en una concentración de alrededor de 0,05 % (p/v); y (iv) DTPA en una concentración de alrededor de 50 μ M; en donde el pH es alrededor de 7,1.

[0248] La presente divulgación proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende un PEG-FGF-21 (SEQ ID NO: 2) en una concentración de alrededor de 10 mg/ml que comprende mezclar (i) histidina en una concentración de 20 mM; (ii) sacarosa en una concentración de 600 mM; (iii) polisorbato 80 en una concentración de 0,05 % (p/v); y (iv) DTPA en una concentración de 50 μ M; en donde el pH es 7,1.

[0249] La presente divulgación proporciona un método para mejorar la estabilidad de una formulación que comprende un PEG-FGF-21 (SEQ ID NO: 2) en una concentración de alrededor de 20 mg/ml que comprende mezclar (i) histidina en una concentración de 20 mM; (ii) sacarosa en una concentración de 600 mM; (iii) polisorbato 80 en una concentración de 0,05 % (p/v); y (iv) DTPA en una concentración de 50 μ M; en donde el pH es 7,1.

[0250] En algunas formas de realización, la concentración de excipientes individuales incluida en la formulación farmacéutica (por ejemplo, DTPA, PS80, histidina, sacarosa) se puede determinar/calcular para que sea la cantidad (peso, moles, etc.) del excipiente individual agregado a la formulación farmacéutica en el curso de su elaboración por unidad de volumen final de la formulación farmacéutica terminada. En otras formas de realización, la concentración de excipientes incluida en la formulación farmacéutica (por ejemplo, DTPA, PS80, histidina, sacarosa) se basa en la cantidad real del excipiente individual en la formulación farmacéutica.

III. Métodos de tratamiento

[0251] La presente divulgación también proporciona métodos para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada a fibrosis y/o diabetes en un sujeto que lo necesita que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende FGF-21 (por ejemplo, un FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) divulgada en la presente.

[0252] En algunos aspectos, la enfermedad o afección es diabetes, por ejemplo,

diabetes tipo 2. En algunos aspectos, la enfermedad o afección es esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

[0253] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, se puede usar en los métodos de tratamiento o prevención divulgados en la presente en una cantidad entre alrededor de 1 mg y alrededor de 40 mg por dosis. En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, se puede usar en los métodos de tratamiento o prevención divulgados en la presente en una cantidad entre alrededor de 1 mg y alrededor de 5 mg por dosis, o entre alrededor de 5 mg y alrededor de 10 mg por dosis, o entre alrededor de 10 mg y alrededor de 15 mg por dosis, o entre alrededor de 15 mg y alrededor de 20 mg por dosis, o entre alrededor de 20 mg y alrededor de 25 mg por dosis, o entre alrededor de 25 mg y alrededor de 30 mg por dosis, o entre alrededor de 30 mg y alrededor de 35 mg por dosis, o entre alrededor de 35 mg y alrededor de 40 mg por dosis. En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, se puede usar en los métodos de tratamiento o prevención divulgados en la presente en una cantidad mayor de 40 mg por dosis.

[0254] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21, por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21, se puede usar en los métodos de tratamiento o prevención divulgados en la presente en una cantidad de alrededor de 1 mg, alrededor de 2 mg, alrededor de 3 mg, alrededor de 4 mg, alrededor de 5 mg, alrededor de 6 mg, alrededor de 7 mg, alrededor de 8 mg, alrededor de 9 mg, alrededor de 10 mg, alrededor de 11 mg, alrededor de 12 mg, alrededor de 13 mg, alrededor de 14 mg, alrededor de 15 mg, alrededor de 16 mg, alrededor de 17 mg, alrededor de 18 mg, alrededor de 19 mg, alrededor de 20 mg, alrededor de 21 mg, alrededor de 22 mg, alrededor de 23 mg, alrededor de 24 mg, alrededor de 25 mg, alrededor de 26 mg, alrededor de 27 mg, alrededor de 28 mg, alrededor de 29 mg, alrededor de 30 mg, alrededor de 31 mg, alrededor de 32 mg, alrededor de 33 mg, alrededor de 34 mg, alrededor de 35 mg, alrededor de 36 mg, alrededor de 37 mg, alrededor de 38 mg, alrededor de 39 mg o alrededor de 40 mg por dosis.

[0255] En algunos aspectos, la formulación farmacéutica se administra por vía subcutánea, por ejemplo, usando una jeringa de seguridad. En algunos aspectos, la formulación farmacéutica se administra diaria o semanalmente.

[0256] En algunos aspectos, la administración de una cantidad eficaz de la formulación farmacéutica que comprende FGF-21 (por ejemplo, un FGF-21 modificado, tal como

PEG-FGF-21) divulgada en la presente al sujeto disminuye la rigidez hepática, disminuye el porcentaje de grasa corporal, disminuye el peso corporal, disminuye la relación de peso del hígado con respecto a peso corporal, disminuye el contenido de lípidos en el hígado, disminuye el área de fibrosis hepática, disminuye los niveles de glucosa en sangre en ayunas, disminuye los niveles de triglicéridos en ayunas, disminuye los niveles de colesterol LDL, disminuye los niveles de ApoB, disminuye los niveles de ApoC, aumenta el colesterol HDL, o cualquier combinación de estos.

[0257] En algunos aspectos, la administración de la formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un polipéptido FGF-21 modificado, tal como PEG-FGF-21) divulgada en la presente de acuerdo con los métodos de tratamiento divulgados en la presente al sujeto produce (i) reducción en los niveles de grasa hepática; (ii) reducción en los niveles de lesión hepática; (iii) reducción en los niveles de fibrosis; (iv) disminución en los niveles de biomarcador para fibrosis Pro-C3 en suero (propéptido de colágeno tipo III de terminal N); (v) disminución en los niveles de alanina aminotransferasa (ALT); (vi) disminución en los niveles de aspartato aminotransferasa (AST); (vii) aumento en los niveles de adiponectina en suero; (viii) disminución en los niveles de LDL en plasma; (ix) aumento en los niveles de HDL en plasma; (x) disminución en los niveles de triglicérido en plasma; (xi) reducción en el nivel de rigidez hepática; o (xii) cualquier combinación de estos, en comparación con los niveles en sujetos no tratados o con el sujeto antes de la administración de la formulación farmacéutica.

[0258] La presente divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad asociada a fibrosis que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 divulgado en la presente. En algunos aspectos, la enfermedad asociada a la fibrosis puede afectar un órgano o tejido, tal como el páncreas, pulmón, corazón, riñón, hígado, ojos, sistema nervioso, médula ósea, ganglios linfáticos, endomiocardio y/o retroperitoneo. En algunos aspectos, la enfermedad asociada a la fibrosis puede ser fibrosis hepática o precirrosis. En algunos aspectos, la enfermedad asociada a la fibrosis se puede seleccionar de: esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis, enfermedad pulmonar parenquimatosa difusa, fibrosis quística, fibrosis pulmonar, fibrosis masiva progresiva, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis por inyección, fibrosis renal, enfermedad renal crónica, enfermedad renal diabética, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, nefropatía membranosa, nefropatía por IgA, mielofibrosis, insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia

cardíaca metabólica, fibrosis cardíaca, fibrosis con cataratas, cataratas, cicatrización ocular, fibrosis pancreática, fibrosis dérmica, fibrosis intestinal, estenosis intestinal, fibrosis endomiocárdica, fibrosis auricular, fibrosis mediastínica, enfermedad de Crohn, fibrosis retroperitoneal, queloide, fibrosis sistémica nefrogénica, escleroderma, esclerosis sistémica, artrofibrosis, síndrome de Peyronie, contractura de Dupuytren, neuropatía diabética, capsulitis adhesiva, enfermedad hepática alcohólica, hepatoesteatosis, hepatitis viral, enfermedad biliar, hemocromatosis primaria, cirrosis relacionada con los fármacos, cirrosis criptógena, enfermedad de Wilson, y deficiencia de alfa 1-antitripsina, enfermedad pulmonar intersticial (ILD), enfermedad pulmonar fibrótica humana, fibrosis hepática, degeneración macular, retinopatía retiniana, retinopatía vítrea, fibrosis miocárdica, oftalmopatía de Grave, ergotismo inducido por fármacos, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis/reestenosis, cicatrices hipertróficas, mielofibrosis primaria o idiopática y enfermedad intestinal inflamatoria (que incluye, entre otras, colitis colagenosa). En algunos aspectos, la enfermedad asociada a la fibrosis resulta de uno o más de enfermedad pulmonar, cáncer de pulmón, farmacoterapia, quimioterapia o radioterapia. En algunos aspectos, la enfermedad asociada a la fibrosis resulta de uno o más de envejecimiento, ataque cardíaco, apoplejía, lesión miocárdica o disfunción del ventrículo izquierdo. En algunos aspectos, la enfermedad asociada a la fibrosis se puede seleccionar de fibrosis renal, nefritis glomerular, enfermedad renal crónica, insuficiencia renal crónica y nefritis asociada a lupus sistémico, cáncer, obstrucciones físicas, toxinas, enfermedades metabólicas, enfermedades inmunológicas o nefropatía diabética. En algunos aspectos, la enfermedad asociada a la fibrosis resulta de uno o más de traumatismo, lesión medular, infección, cirugía, lesión isquémica, infarto de miocardio, quemaduras, exposición a contaminación ambiental, neumonía, tuberculosis o síndrome de dificultad respiratoria aguda. En algunos aspectos, la enfermedad asociada a la fibrosis se puede seleccionar de fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad pulmonar fibrótica humana, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis hepática, fibrosis cardíaca, fibrosis miocárdica, degeneración macular, retinopatía retinal, retinopatía vítrea, oftalmopatía de Grave, ergotismo inducido por fármacos, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis/reestenosis, queloides y cicatrices hipertróficas, mielofibrosis primaria o idiopática, enfermedad intestinal inflamatoria, colitis colagenosa, cicatrización ocular y fibrosis con cataratas. En algunos aspectos, la enfermedad asociada a la fibrosis se puede seleccionar de NASH, fibrosis hepática y cirrosis. En algunos aspectos, la enfermedad asociada a la fibrosis puede ser NASH. En algunos aspectos, la

enfermedad asociada a la fibrosis se puede seleccionar de enfermedad renal diabética, enfermedad renal crónica y fibrosis renal. En algunos aspectos, la enfermedad asociada a la fibrosis se puede seleccionar de insuficiencia cardíaca metabólica y fibrosis cardíaca. En algunos aspectos, la enfermedad asociada a la fibrosis puede ser fibrosis pulmonar.

[0259] En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un método para disminuir la fracción de grasa hepática en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 descrito en la presente, en donde, opcionalmente, el sujeto está en riesgo de desarrollar, o se le diagnosticó, NASH.

[0260] En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un método para disminuir la rigidez hepática, disminuir el porcentaje de grasa corporal, disminuir el peso corporal, disminuir la relación del peso del hígado con respecto al peso corporal, disminuir el contenido lipídico hepático, disminuir el área de fibrosis hepática, disminuir los niveles de glucosa en sangre en ayunas, triglicéridos en ayunas, disminuir el colesterol LDL, disminuir ApoB, disminuir ApoC y/o aumentar el colesterol HDL en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 descrito en la presente, en donde, opcionalmente, el sujeto está en riesgo de desarrollar, o se le diagnosticó, NASH.

[0261] En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de adiponectina en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21, en donde, opcionalmente, dicho sujeto está en riesgo de desarrollar, o se le diagnosticó, NASH.

[0262] En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un método para tratar uno o más síntomas asociados a NASH en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21.

[0263] En la presente también se proporcionan métodos para tratar o prevenir NASH en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación farmacéutica divulgada en la presente que comprende un polipéptido FGF-21 modificado de SEQ ID NO: 1, en donde el residuo de pAF de este está ligado a una porción poli(etilenglicol) con un peso molecular de alrededor de 30 kDa (PEG-FGF-21).

[0264] En algunos aspectos, el sujeto puede presentar fibrosis por NASH CRN de fase 1-3, que, opcionalmente, se determina mediante una biopsia hepática. En algunos aspectos, antes del tratamiento, el sujeto puede presentar un índice de hígado graso de al menos de alrededor de 60. En algunos aspectos, antes del tratamiento, el sujeto puede presentar un porcentaje de fracción de grasa hepática de al menos 10 %, que, opcionalmente, se determina mediante imagen por resonancia magnética.

[0265] En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para tratar diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2 en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 descrito en la presente. En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para tratar la obesidad en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 descrito en la presente. En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para regular al menos uno de glucosa y homeostasis de lípidos, absorción de glucosa, expresión de GLUT 1 y/o concentraciones séricas de glucosa, triglicéridos, insulina o glucagón en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 descrito en la presente.

[0266] En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para aumentar la sensibilidad a la insulina, aumentar los niveles de adiponectina, reducir los niveles de glucosa en sangre, reducir los niveles de glucagón, reducir los niveles de triglicéridos, reducir los niveles de fructosamina, reducir los niveles de colesterol de baja densidad o reducir los niveles de proteína reactiva C en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 descrito en la presente.

[0267] En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para tratar una afección o un trastorno seleccionado de obesidad, diabetes, pancreatitis, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, síndrome metabólico, depuración inadecuada de glucosa, alto nivel de glucosa en sangre y síndrome de Prader-Willi en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 descrito en la presente.

[0268] En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para tratar una afección o un trastorno relacionados con la insulina seleccionados de resistencia a la insulina tipo A, resistencia a la insulina tipo C (también conocido como síndrome HAIR-

AN), síndrome de Rabson-Mendenhall, síndrome de Donohue o leprechaunismo, hiperandrogenismo, hirsutismo o acantosis pigmentaria en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 descrito en la presente.

[0269] En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido FGF-21 divulgado en la presente se pueden administrar mediante inyección. En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido FGF-21 divulgado en la presente se pueden administrar mediante inyección subcutánea, inyección IV, inyección intraperitoneal o inyección intramuscular.

[0270] En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido FGF-21 divulgado en la presente se pueden administrar a una frecuencia de alrededor de una vez por día, o con menor frecuencia que alrededor de una vez por día. En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido FGF-21 modificado descrito en la presente se pueden administrar con una frecuencia de alrededor de dos veces por semana, o con una frecuencia menor que alrededor de dos veces por semana. En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido FGF-21 modificado descrito en la presente se pueden administrar con una frecuencia de alrededor de una vez por semana, o con una frecuencia menor que alrededor de dos veces por semana. En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido FGF-21 modificado descrito en la presente se pueden administrar con una frecuencia de alrededor de una vez cada dos semanas, o con menor frecuencia que alrededor de dos veces por semana. En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido FGF-21 modificado descrito en la presente se pueden administrar con una frecuencia de alrededor de una vez cada tres semanas, o con una frecuencia menor que alrededor de dos veces por semana. En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido FGF-21 divulgado en la presente se pueden administrar con una frecuencia de alrededor de una vez por mes, o con una frecuencia menor que alrededor de una vez por mes. En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido FGF-21 divulgado en la presente se pueden administrar con una frecuencia de una vez cada cuatro semanas. En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido FGF-21 divulgado en la presente se pueden administrar con una frecuencia de alrededor de una vez por día. En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido FGF-21 descrito en la presente se pueden administrar con una frecuencia de alrededor

de una vez por semana.

[0271] En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido FGF-21 modificado descrito en la presente se puede administrar en una cantidad seleccionada de alrededor de 1 mg, alrededor de 2 mg, alrededor de 5 mg, alrededor de 10 mg, alrededor de 15 mg, alrededor de 20 mg, alrededor de 25 mg, alrededor de 30 mg, alrededor de 35 mg, alrededor de 40 mg, alrededor de 45 mg, alrededor de 50 mg, alrededor de 55 mg, alrededor de 60 mg, alrededor de 65 mg, alrededor de 70 mg, alrededor de 75 mg, alrededor de 80 mg, alrededor de 85 mg, alrededor de 90 mg, alrededor de 95 mg y alrededor de 100 mg de polipéptido FGF-21 por dosis.

[0272] Por ejemplo, una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 divulgado en la presente se puede administrar a un sujeto en una concentración de polipéptido FGF-21 de entre alrededor de 0,1 y 100 mg/kg de peso corporal del sujeto receptor. En algunos aspectos, una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 divulgado en la presente se puede administrar a un sujeto en una concentración de polipéptido FGF-21 de alrededor de 0,5-5 mg/kg de peso corporal del sujeto receptor. En otro aspecto, una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido FGF-21 divulgado en la presente se puede administrar a un sujeto receptor con una frecuencia de entre una vez por día y una vez cada dos semanas, por ejemplo, alrededor de una o dos veces por semana, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez cada cuatro días, una vez cada cinco días o una vez cada seis días.

[0273] Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden administrar mediante cualquier vía de administración convencional adecuada para proteínas o péptidos, que incluyen, entre otras, inyecciones, por ejemplo, parenterales, e incluyen, entre otras, subcutáneas o intravenosas, o cualquier otra forma de inyección o infusión.

IV. Polipéptidos FGF-21 modificados

[0274] Los polipéptidos FGF-21 modificados de la presente divulgación abarcan polipéptidos FGF-21 que comprenden una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. Por ejemplo, los polipéptidos FGF-21 modificados de la presente divulgación comprenden una o más sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, con aminoácidos naturales o no naturales), eliminaciones (eliminaciones terminales o internas) o modificaciones tales como la unión de una porción heteróloga (extremo C, extremo N o interna, ya sea mediante el intercalado/inserción en la secuencia de aminoácidos o mediante unión de cadena lateral). En algunos aspectos

específicos, el polipéptido FGF-21 modificado comprende una versión modificada de SEQ ID NO: 3 (FGF-21 de tipo silvestre), o SEQ ID NO: 1 (secuencia de tipo silvestre modificada mediante la sustitución de glutamina 109 con para-acetil-L-fenilalanina). En algunos aspectos específicos, el polipéptido FGF-21 modificado es un derivado de SEQ ID NO: 1, por ejemplo, a través de la unión de una porción heteróloga (por ejemplo, PEG). En un aspecto específico, FGF-21 modificado es PEG-FGF-21 (SEQ ID NO: 2).

TABLA 1: Secuencias de polipéptidos FGF-21

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
1	FGF-21 modificado en Q109	MHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSP ESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELL LEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP PGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS pAF = para-acetil-L-fenilalanina
2	FGF-21 modificado en Q109 PEGilado PEG-FGF-21	MHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSP ESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELL LEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP PGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS en donde pAF está ligado a un PEG de 30 kDa
3	FGF-21 nativo	MHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSP ESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELL LEDGYNVY _Q SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP PGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS La glutamina (Q) modificada en SEQ ID NO:1 y 2 aparece subrayada.

[0275] La expresión “polipéptido FGF-21 modificado” también abarca polimorfismos (por ejemplo, variantes naturales de la secuencia de FGF-21), por ejemplo, la forma P o la forma L de FGF-21.

[0276] Se describieron sustituciones en una amplia variedad de posiciones de aminoácidos en FGF-21 naturales. Las sustituciones que incluyen, entre otras, las que modulan la solubilidad o estabilidad, aumentan la actividad agonista, aumentan la semivida *in vivo* o *in vitro*, aumentan la resistencia a la proteasa, convierten el polipéptido en un antagonista, reducen la inmunogenicidad o la toxicidad, facilitan la purificación o la facilidad de elaboración, o cualquier combinación de estos, y también se incluyen mediante la expresión polipéptido FGF-21 modificado.

[0277] En algunos casos, las sustituciones de aminoácidos codificados de manera no natural se pueden combinar con otras adiciones, sustituciones o eliminaciones dentro

del polipéptido FGF-21 modificado para afectar otros rasgos biológicos del polipéptido FGF-21 modificado con respecto a otro polipéptido FGF-21 (por ejemplo, el polipéptido FGF-21 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 3, el polipéptido FGF-21 modificado de SEQ ID NO: 1, el polipéptido PEG-FGF-21 de SEQ ID NO: 2, el mismo polipéptido FGF-21 sin la adición, sustitución o eliminación, u otro polipéptido modificado o no modificado FGF-21 modificado o no modificado).

[0278] En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden aumentar la estabilidad (que incluye, entre otros, la resistencia a la degradación proteolítica) del polipéptido FGF-21 modificado o aumentar la afinidad del polipéptido FGF-21 modificado hacia su receptor. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden aumentar la estabilidad farmacéutica del polipéptido FGF-21 modificado. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden aumentar la solubilidad del polipéptido FGF-21 modificado.

[0279] En algunos aspectos, se seleccionan sitios para sustitución con un aminoácido no natural o codificado de manera natural, además de otro sitio para la incorporación de un aminoácido no natural que da como resultado una mayor solubilidad de polipéptido después de la expresión en una célula huésped recombinante.

[0280] En algunos aspectos, los polipéptidos FGF-21 modificados comprenden otra adición, sustitución o eliminación que modula la afinidad al receptor del polipéptido FGF-21, a las proteínas de unión o al ligando asociado, modula la transducción de la señal después de unirse al receptor de FGF-21, modula la semivida circulante, modula la liberación o biodisponibilidad, facilita la purificación, o mejora o altera una vía de administración particular.

[0281] En algunos aspectos, los polipéptidos FGF-21 modificados comprenden una adición, sustitución o eliminación que aumenta la afinidad del FGF-21 modificado a su receptor. De manera similar, los polipéptidos FGF-21 modificados pueden comprender secuencias de escisión química o enzimática, secuencias de escisión de proteasa, grupos reactivos, dominios de unión al anticuerpo (que incluyen, entre otros, FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en afinidad (que incluyen, entre otras, FLAG, poli-His, GST, etc.) o moléculas ligadas (que incluyen, entre otras, biotina) que mejoran la detección (que incluye, entre otras, GFP), purificación, transporte a través de tejidos o membranas celulares, liberación o activación del profármaco, reducción del tamaño de FGF-21 modificado, u otros rasgos del polipéptido.

[0282] Se identificaron múltiples polimorfismos de FGF-21. La leucina o la prolina se describieron en la misma posición en la publicación de patente estadounidense N.º

20010012628 y en la patente estadounidense N.º 6.716.626. Las secuencias de líder o señal del extremo N que difieren en 1 aminoácido (leucina) se muestran en la patente estadounidense N.º 6.716.626 y en la publicación de patente estadounidense N.º 20040259780. Las variantes del polipéptido FGF-21 o los mutantes incluyen, entre otros, los divulgados en la patente estadounidense N.º 6.716.626; las publicaciones de patentes estadounidenses N.º 2005/0176631, 2005/0037457, 2004/0185494, 2004/0259780, 2002/0164713 y 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; WO01/018172; WO09/149171; WO10/042747; WO12/066075; WO11/154349; WO13/052311; WO13/188181, que se incorporan por referencia en su totalidad en la presente.

[0283] La expresión polipéptido FGF-21 modificado también incluye fragmentos biológicamente activos, variantes biológicamente activas y estereoisómeros del FGF-21 natural, además de variantes agonistas, miméticas y antagonistas del FGF-21 natural y las fusiones de polipéptidos de estos. Las fusiones que comprenden aminoácidos adicionales en el extremo amino, extremo carboxilo o ambos están comprendidas en la expresión polipéptido FGF-21 modificado.

[0284] Los ejemplos de fusiones incluyen, por ejemplo, FGF-21 de metionilo, en donde una metionina está ligada al extremo N de FGF-21, que deriva de la expresión recombinante de la forma madura de FGF-21 que carece del péptido líder o péptido de señal o una porción de estos (una metionina está ligada al extremo N de FGF-21, que deriva de la expresión recombinante, por ejemplo, en *E. coli*), fusiones con fines de purificación (que incluyen, entre otros, a polihistidina o a epítomos de afinidad), fusiones con péptidos de unión a albúmina de suero, tales como adnectina PKE y fusiones con proteínas séricas, tales como albúmina de suero, y proteínas de fusión que comprenden FGF-21 y una o más moléculas diferentes (porciones heterólogas), que incluyen, entre otros, albúmina de suero, dominio Fc, región constante de inmunoglobulina, polipéptidos no estructurados, tales como XTEN, etc. Cualquiera de dichos fragmentos se puede preparar de las proteínas mediante métodos bioquímicos estándar, o mediante la expresión de un polinucleótido que codifica el fragmento.

[0285] La expresión polipéptido FGF-21 modificado incluye polipéptidos conjugados con un polímero, tal como PEG, y puede comprender opcionalmente una o más derivatizaciones adicionales de cisteína, lisina u otros residuos. Asimismo, el polipéptido FGF-21 modificado puede comprender un ligador o polímero, en donde el aminoácido

con el que se conjugan el ligador o el polímero puede ser un aminoácido no natural de acuerdo con la presente descripción, o se puede conjuguar con un aminoácido codificado de manera natural utilizando técnicas conocidas en el estado de la técnica, tales como acoplamiento a lisina o cisteína.

[0286] La expresión polipéptido FGF-21 modificado también incluye FGF-21 modificado glucosilado, tal como polipéptidos glucosilados en cualquier posición de aminoácido, formas glucosiladas ligadas a N o ligadas a O del polipéptido. Las variantes que contienen un cambio de un solo nucleótido también se consideran variantes biológicamente activas del polipéptido FGF-21. Asimismo, se incluyen las variantes de empalme.

[0287] La expresión polipéptido FGF-21 modificado también incluye heterodímeros del polipéptido FGF-21, homodímeros, heteromultímeros u homomultímeros de uno o más polipéptidos FGF-21 modificados o no modificados o cualquier otro polipéptido, proteína, carbohidrato, polímero, molécula pequeña, ligador, ligando u otra molécula biológicamente activa de cualquier tipo, ligada por medios químicos o expresada como una proteína de fusión, además de análogos de polipéptido que contienen, por ejemplo, eliminaciones específicas u otras modificaciones pero que aun así mantienen la actividad biológica.

[0288] La expresión polipéptido FGF-21 modificado también abarca polipéptidos FGF-21 que comprenden una o más sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos. Por ejemplo, los polipéptidos FGF-21 modificados de la presente descripción pueden estar compuestos por modificaciones con uno o más aminoácidos naturales, opcionalmente junto con una o más modificaciones de aminoácidos no naturales. Las sustituciones, inserciones o eliminaciones de ejemplo en una amplia variedad de posiciones de aminoácidos en polipéptidos FGF-21, lo que incluye sustituciones que modulan la estabilidad farmacéutica, que modulan una o más de las actividades biológicas del polipéptido FGF-21, por ejemplo, aumentan la actividad agonista, aumentan la solubilidad del polipéptido, reducen la susceptibilidad de la proteasa, disminuyen la desamidación, convierten el polipéptido en un antagonista, reducen la inmunogenicidad o la toxicidad, o facilitan la purificación o facilidad de fabricación, etc., están comprendidas en la expresión polipéptido FGF-21 modificado.

[0289] En algunos aspectos, los polipéptidos FGF-21 modificados también comprenden una inserción, sustitución o eliminación adicional que modula la actividad biológica del polipéptido FGF-21 modificado. Por ejemplo, las adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden modular una o más propiedades o actividades de FGF-21

modificado. Por ejemplo, las adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden modular la afinidad al receptor del polipéptido FGF-21, modular la semivida en circulación, modular la semivida terapéutica, modular la estabilidad del polipéptido, modular la escisión mediante proteasas, modular la dosis, modular la liberación o biodisponibilidad, facilitar la purificación, disminuir la desamidación, mejorar la vida útil o mejorar o alterar una vía de administración particular. De manera similar, los polipéptidos FGF-21 modificados pueden comprender secuencias de escisión de proteasa, grupos reactivos, dominios de unión al anticuerpo (que incluyen, entre otros, FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en afinidad (que incluyen, entre otras, FLAG, poli-His, GST, etc.) o moléculas ligadas (que incluyen, entre otras, biotina) que mejoran la detección (que incluyen, entre otras, GFP), la purificación u otros rasgos del polipéptido.

[0290] La expresión polipéptido FGF-21 modificado también abarca homodímeros, heterodímeros, homomultímeros y heteromultímeros que se forman mediante componentes de fusión, tales como dominios Fc, o que están ligados, entre otros, a aquellos ligados directamente a través de cadenas laterales del aminoácido codificado de manera no natural, ya sea a las mismas cadenas laterales del aminoácido codificado de manera no natural o a cadenas laterales diferentes de este, a cadenas laterales del aminoácido codificado de manera natural, o indirectamente a través de un ligador. Los ejemplos de ligadores incluyen, entre otros, compuestos orgánicos pequeños, polímeros hidrosolubles de varias longitudes, tales como poli(etilenglicol) o polidextrano, o polipéptidos de diferentes longitudes.

[0291] En algunos aspectos, un aminoácido codificado de manera no natural descrito en la presente puede comprender un grupo carbonilo, un grupo aminooxi, un grupo hidrazida, un grupo hidrazina, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino. En algunos aspectos, el aminoácido codificado de manera no natural comprende una porción carbonilo y está ligada a un ligador, polímero, molécula biológicamente activa o porción de extensión de semivida que comprende un aminooxi, una hidrazina, una hidrazida o una porción semicarbazida. En algunos aspectos, el aminoácido codificado de manera no natural comprende una porción aminooxi, hidrazina, hidrazida o semicarbazida que está ligada a un ligador, polímero, molécula biológicamente activa o porción de extensión de semivida a través de un enlace amida.

[0292] En algunos aspectos, el aminoácido codificado de manera no natural comprende una porción alquino que está ligada a un ligador, polímero, molécula biológicamente activa o porción de extensión de semivida a través de una porción azida. En algunos aspectos, el aminoácido codificado de manera no natural comprende una porción azida

que está ligada a un ligador, polímero, molécula biológicamente activa o porción de extensión de semivida que comprende una porción alquino; En algunos aspectos, el aminoácido codificado de manera no natural comprende una porción azida o alquino que está ligada a un ligador, polímero, molécula biológicamente activa o porción de extensión de semivida a través de un enlace amida.

[0293] En algunos aspectos, el aminoácido codificado de manera no natural está ligado a un ligador, polímero, molécula biológicamente activa o porción de extensión de semivida a través de un enlace oxima. En algunos aspectos, el aminoácido codificado de manera no natural está ligado a un ligador, polímero, molécula biológicamente activa o porción de extensión de semivida a través de un enlace oxima, en donde dicho enlace oxima tiene una estructura que deriva de la reacción de un grupo carbonilo y un grupo aminooxi. En algunos aspectos, el aminoácido codificado de manera no natural está ligado a un ligador, polímero, molécula biológicamente activa o porción de extensión de semivida a través de un enlace oxima, en donde dicho enlace oxima tiene una estructura que deriva de la reacción de un grupo carbonilo contenido en dicho aminoácido codificado de manera no natural y un grupo aminooxi contenido en dicho ligador, polímero, molécula biológicamente activa o porción de extensión de semivida.

[0294] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 modificado descrito en la presente tiene al menos una actividad biológica del polipéptido FGF-21 humano de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

[0295] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 modificado comprende al menos un aminoácido codificado de manera no natural ligado a un polímero hidrosoluble que comprende una porción poli(etilenglicol). En algunos aspectos, uno o más aminoácidos codificados de manera no natural se incorporan en una o más de las siguientes posiciones en FGF-21 modificado: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N), 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 (es decir, en el extremo carboxilo de la proteína) (posiciones de aminoácidos

correspondientes a SEQ ID NO: 3).

[0296] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 en una formulación farmacéutica divulgada en la presente es un polipéptido FGF-21 modificado descrito, por ejemplo, en las patentes estadounidenses N.^{os} 9.273.106; 9.458.214; 9.744.213; 8.541.369; 8.188.040; 9.120.871; 9.895.417; 9.266.935; 6.716.626; 4.904.584; o 8.722.622; la publicación de solicitud estadounidense N.^o 2013/0231277; 2009/0305986; 2011/0195895; 2010/0216715; 2001/0012628; 2004/0259780; 2005/0176631; 20070293430; o 2012/0035099; o las publicaciones PCT N.^{os} WO2016048999; WO2010065439; WO2017093465; WO2003011213; WO2003059270; WO2005091944; WO2008121563; WO199967291, WO199903887, WO200026354; o WO2017220706; que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

V. Porciones de extensión de semivida

[0297] Los polipéptidos FGF-21 de la presente divulgación pueden comprender una porción heteróloga, que en algún aspecto es una porción de extensión de semivida. En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida es una porción polipéptido, mientras que en otros aspectos, la porción de extensión de semivida es una porción no polipéptido. En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 comprende una sola porción de extensión de semivida. Sin embargo, en otros aspectos, un polipéptido FGF-21 divulgado en la presente puede comprender más de una porción de extensión de semivida.

[0298] Las porciones de extensión de semivida incluyen porciones de extensión de semivida proteináceas y no proteináceas. Las porciones de extensión de semivida no proteináceas incluyen, por ejemplo, polímeros hidrosolubles tales como polietilenglicol (PEG), almidón de hidroxietilo (HES), lípidos, grupos acilo ramificados o no ramificados, grupos C₈-C₃₀ acilo ramificados o no ramificados, grupos alquilo ramificados o no ramificados y grupos C₈-C₃₀ alquilo ramificados o no ramificados. Las porciones de extensión de semivida proteináceas incluyen, por ejemplo, albúmina de suero, transferrina, adnectinas (por ejemplo, adnectinas de unión a albúmina o de prolongación de farmacocinética (PKE)), dominios Fc, y polipéptidos no estructurados, tales como XTEN y PAS (por ejemplo, secuencias de polipéptidos de conformación desordenada compuestas por los aminoácidos Pro, Ala y/o Ser), así como un fragmento de cualquiera de las anteriores.

[0299] Un examen de la estructura cristalina de FGF-21 o de un miembro de la familia FGF y su interacción con el receptor de FGF puede indicar qué residuos de aminoácidos determinados tienen cadenas laterales total o parcialmente accesibles al solvente. La

cadena lateral de un aminoácido codificado de manera no natural en estas posiciones puede apuntar hacia afuera de la superficie de la proteína y hacia el solvente en el exterior y, por lo tanto, puede estar ligada, por ejemplo, a un polímero hidrosoluble.

(a) Región constante de inmunoglobulina o porción de esta

[0300] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 está ligado, por ejemplo, fusionado o conjugado, a una región constante de inmunoglobulina o una porción de esta. Una región constante de inmunoglobulina está compuesta de dominios indicados como dominios de CH (pesada constante) (CH1, CH2, etc.). De acuerdo con el isotipo (es decir, IgG, IgM, IgA IgD o IgE), la región constante puede estar compuesta por tres o cuatro dominios de CH. Algunas regiones constantes de isotipos (por ejemplo, IgG) también contienen una región bisagra. Ver Janeway *et al.* 2001, *Immunobiology*, Garland Publishing, N.Y., N.Y.

[0301] Una región constante de inmunoglobulina o una porción de esta para producir la proteína de fusión de la presente divulgación se puede obtener de diferentes fuentes. En algunos aspectos, una región constante de inmunoglobulina o una porción de esta deriva de una inmunoglobulina humana. Sin embargo, cabe destacar que la región constante de inmunoglobulina o una porción de esta puede derivar de una inmunoglobulina de otras especies de mamíferos, que incluyen, por ejemplo, un roedor (por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, un conejillo de Indias) o especies de primates no humanos (por ejemplo, chimpancés, *Macaca fascicularis*). Además, la región constante de inmunoglobulina o una porción de esta puede derivar de cualquier tipo de inmunoglobulina, que incluye IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo de inmunoglobulina, que incluye IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En un aspecto, se utiliza el isotipo IgG1 humana.

[0302] Una variedad de las secuencias génicas de la región constante de inmunoglobulina (por ejemplo, las secuencias génicas de la región constante humana) se encuentran disponibles en la forma de depósitos de acceso público. Se pueden seleccionar secuencias de dominios de región constante con una función efectora particular (o sin una función efectora particular) o con una modificación particular para reducir la inmunogenicidad. Se publicaron muchas secuencias de anticuerpos y genes que codifican anticuerpos, y secuencias de región constante de Ig adecuadas (por ejemplo, secuencias bisagra, CH2 y/o CH3, o porciones de estas) pueden derivar de estas secuencias con el uso de técnicas reconocidas en el estado de la técnica. El material genético obtenido con el uso de cualquiera de los métodos anteriores se puede alterar o sintetizar luego para obtener polipéptidos de la presente divulgación. Cabe

destacar también que el alcance de esta divulgación abarca alelos, variantes y mutaciones de secuencias de ADN de región constante.

[0303] Las secuencias de la región constante de inmunoglobulina o una porción de estas se pueden clonar usando, por ejemplo, la reacción en cadena de polimerasa y cebadores que se seleccionan para amplificar el dominio de interés. Para clonar una secuencia de la región constante de inmunoglobulina o una porción de esta de un anticuerpo, mRNA se puede aislar de hibridoma, células esplénicas o células linfáticas, se puede transcribir de manera inversa en ADN, y los genes del anticuerpo se pueden amplificar mediante PCR. Los métodos de amplificación de la PCR se describen en detalle en la patente estadounidense N.^{os} 4.683.195; 4.683.202; 4.800.159; 4.965.188; y en, por ejemplo, "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" Innis et al. eds., Academic Press, San Diego, CA (1990); Ho et al. 1989. *Gene* 77:51; Horton et al. 1993. *Methods Enzymol.* 217:270). La PCR se puede iniciar mediante cebadores de la región constante de consenso o mediante cebadores más específicos en función del ADN de cadena pesada y liviana y las secuencias de aminoácidos publicados. Como se analizó anteriormente, la PCR también se puede usar para aislar los clones de ADN que codifican las cadenas liviana y pesada del anticuerpo. En este caso se pueden cribar las colecciones mediante cebadores de consenso o sondas homólogas más amplias, tales como sondas de región constante para ratón. Los conjuntos de cebadores numerosos adecuados para la amplificación de genes del anticuerpo son conocidos en el estado de la técnica (por ejemplo, cebadores 5' en función de la secuencia del extremo N de anticuerpos purificados (Benhar y Pastan. 1994. *Protein Engineering* 7:1509); amplificación rápida de extremos de cADN (Ruberti, F. et al. 1994. *J. Immunol. Methods* 173:33); secuencias líder de anticuerpo (Larrick et al. 1989 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160:1250). La clonación de secuencias de anticuerpo se describe también en Newman et al., patente estadounidense N.º 5.658.570, presentada el 25 de enero de 1995.

[0304] Una región constante de inmunoglobulina usada en la presente puede incluir todos los dominios y la región bisagra o porciones de esta. En un aspecto, la región constante de inmunoglobulina o una porción de esta comprende el dominio CH2, el dominio CH3 y una región bisagra, es decir, una región Fc o un componente de unión a FcRn.

[0305] Como se usa en la presente, la expresión región Fc se define como la porción de un polipéptido que corresponde a la región Fc de inmunoglobulina nativa, es decir, formada por la asociación dimérica de los dominios Fc respectivos de sus dos cadenas

pesadas. Una región Fc nativa forma un homodímero con otra región Fc.

[0306] En un aspecto, la región Fc se refiere a la porción de una cadena pesada de inmunoglobulina única que comienza en la región bisagra justo corriente arriba del sitio de escisión de papaína (es decir, residuo 216 en IgG, tomando el primer residuo de la región constante de cadena pesada como 114) y que termina en el extremo C del anticuerpo. En consecuencia, un dominio Fc completo comprende al menos un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.

[0307] La región Fc de una región constante de inmunoglobulina, en función del isotipo de inmunoglobulina puede incluir los dominios CH2, CH3 y CH4, así como la región bisagra. Las proteínas de fusión que comprenden una región Fc de una inmunoglobulina otorgan varias propiedades convenientes en una proteína de fusión, que incluyen mayor estabilidad, mayor semivida en suero (ver Capon *et al.*, 1989, Nature 337:525) y unión a receptores Fc, tales como el receptor Fc neonatal (FcRn) (patentes estadounidenses N.ºs 6.086.875, 6.485.726, 6.030.613; WO 03/077834; US2003-0235536A1).

[0308] En algunos aspectos, la “región Fc” incluye una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc o derivada de un dominio Fc. En algunos aspectos, una región Fc comprende al menos uno de: un dominio bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media y/o inferior) (alrededor de aminoácidos 216-230 de una región Fc de anticuerpo, de acuerdo con la numeración de EU), un dominio CH2 (alrededor de aminoácidos 231-340 de una región Fc de anticuerpo de acuerdo con la numeración de EU), un dominio CH3 (alrededor de aminoácidos 341-438 de una región Fc de anticuerpo de acuerdo con la numeración de EU), un dominio CH4, o una variante, una porción o un fragmento de esta. En otros aspectos, una región Fc comprende un dominio Fc completo (es decir, un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3). En algunos aspectos, una región Fc comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio bisagra (o una porción de este) fusionado a un dominio CH3 (o una porción de este), un dominio bisagra (o una porción de este) fusionado a un dominio CH2 (o una porción de este), un dominio CH2 (o una porción de este) fusionado a un dominio CH3 (o una porción de este), un dominio CH2 (o una porción de este) fusionado a un dominio bisagra (o una porción de este) y un dominio CH3 (o una porción de este). Aun en otros aspectos, una región Fc no tiene al menos una porción de un dominio CH2 (por ejemplo, la totalidad o parte de un dominio CH2). En un aspecto particular, una región Fc comprende o consiste en aminoácidos correspondientes a los números de EU 221 a 447.

[0309] Los dominios Fc indicados en la presente como F, F1 o F2 se pueden obtener de diferentes fuentes. En un aspecto, una región Fc del polipéptido deriva de una

inmunoglobulina humana. Sin embargo, cabe destacar que una región Fc puede derivar de una inmunoglobulina de otras especies de mamíferos, que incluyen, por ejemplo, un roedor (por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, un conejillo de Indias) o especies de primates no humanos (por ejemplo, chimpancés, *Macaca fascicularis*). Además, el polipéptido de los dominios Fc o porciones de este puede derivar de cualquier tipo de inmunoglobulina, que incluye IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo de inmunoglobulina, que incluye IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En otro aspecto, se utiliza el isotipo IgG1 humana.

[0310] En algunos aspectos, la variante Fc confiere un cambio en al menos una función efectora impartida por una región Fc que comprende dicho dominio Fc de tipo silvestre (por ejemplo, una mejora o reducción en la capacidad de la región Fc de unirse a receptores Fc (por ejemplo, FcγRI, FcγRII o FcγRIII) o proteínas de complemento (por ejemplo, C1q), o de desencadenar citotoxicidad dependiente del anticuerpo (ADCC), fagocitosis o citotoxicidad dependiente del complemento (CDCC)). En otros aspectos, la variante Fc proporciona un residuo de cisteína modificado por ingeniería genética.

[0311] Las regiones Fc de la divulgación pueden utilizar variantes Fc reconocidas en el estado de la técnica conocidas por impartir un cambio (por ejemplo, una mejora o reducción) en la función efectora y/o la unión a FcR. Específicamente, una molécula de unión de la divulgación puede incluir, por ejemplo, un cambio (por ejemplo, una sustitución) en una o más de las posiciones de aminoácido divulgadas en las publicaciones internacionales PCT WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO04/044859, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2 y WO06/085967A2; las publicaciones de patentes estadounidenses N.^{os} US2007/0231329, US2007/0231329, US2007/0237765, US2007/0237766, US2007/0237767, US2007/0243188, US20070248603, US20070286859, US20080057056 ; o las patentes estadounidenses 5.648.260; 5.739.277; 5.834.250; 5.869.046; 6.096.871; 6.121.022; 6.194.551; 6.242.195; 6.277.375; 6.528.624; 6.538.124; 6.737.056; 6.821.505; 6.998.253; 7.083.784; 7.404.956 y 7.317.091. En un aspecto, el cambio específico (por ejemplo, la sustitución específica de uno o más aminoácidos divulgados en el estado de la técnica) se puede llevar a cabo en una o más de las posiciones de aminoácidos divulgadas. En otro

aspecto, se puede llevar a cabo un cambio diferente en una o más de las posiciones de aminoácidos divulgadas (por ejemplo, la diferente sustitución de una o más posiciones de aminoácidos divulgadas en el estado de la técnica).

[0312] La región Fc de IgG se puede modificar según procedimientos reconocidos, tales como mutagénesis dirigida y similares, para obtener fragmentos de IgG o Fc o porciones de estos que se unirán mediante receptores Fc. Tales modificaciones incluyen modificaciones remotas de los sitios de contacto del receptor Fc así como modificaciones en los sitios de contacto que preservan o incluso mejoran la unión a los receptores Fc. Por ejemplo, los siguientes residuos de aminoácido único en Fc de IgG1 humana (Fcγ1) se pueden sustituir sin pérdida significativa de la afinidad de unión a Fc para los receptores Fc: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, P331A, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A y K447A, en donde, por ejemplo, P238A representa prolina de tipo silvestre sustituida con alanina en la posición número 238. En un ejemplo, un aspecto específico incorpora la mutación de N297A, lo que elimina un sitio de N-glucosilación altamente conservado. Además de alanina, otros aminoácidos pueden sustituir los aminoácidos de tipo silvestre en las posiciones especificadas anteriormente. Las mutaciones se pueden introducir en Fc para dar lugar a más de cien regiones Fc distintas de Fc nativo. Además, las combinaciones de dos, tres o más de estas mutaciones individuales se pueden introducir en conjunto, para dar lugar a cientos de regiones Fc más. Además, una de las regiones Fc de un constructo de la divulgación puede ser mutada y la otra región Fc del constructo puede no ser mutada, o ambas pueden ser mutadas pero con diferentes mutaciones.

[0313] Algunas de las mutaciones anteriores pueden conferir nueva funcionalidad ante la región Fc. Por ejemplo, un aspecto incorpora N297A, lo que elimina un sitio de N-glucosilación altamente conservado. El efecto de esta mutación es reducir la inmunogenicidad, y en consecuencia, mejorar la semivida circulante de la región Fc, y hacer que la región Fc no sea capaz de ligarse a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIIA,

sin perjudicar la afinidad (Routledge *et al.* 1995, Transplantation 60:847; Friend *et al.* 1999, Transplantation 68:1632; Shields *et al.* 1995, J. Biol. Chem. 276:6591). Como otro ejemplo de nueva funcionalidad que surge de mutaciones, en algunos casos, la afinidad descrita anteriormente de receptores Fc puede aumentar más allá de la de tipo silvestre. Esta mayor afinidad puede reflejar una constante de asociación aumentada, una constante de disociación disminuida o tanto una constante de asociación aumentada como una constante de disociación disminuida. Los ejemplos de mutaciones que se considera que imparten una mayor afinidad a receptores Fc incluyen, entre otros, T256A, T307A, E380A y N434A (Shields *et al.* 2001, J. Biol. Chem. 276:6591).

[0314] Además, al menos tres receptores gamma Fc parecen reconocer un sitio de unión en IgG en la región bisagra inferior, por lo general, los aminoácidos 234-237. Por lo tanto, puede surgir otro ejemplo de nueva funcionalidad y posible inmunogenicidad disminuida de mutaciones de esta región, por ejemplo, reemplazando los aminoácidos 233-236 de "ELLG" de IgG1 humana con la secuencia correspondiente de "PVA" de IgG2 (con una eliminación de aminoácido). Se ha demostrado que FcγRII, FcγRII y FcγRIII, que median varias funciones efectoras, no se unirán a IgG1 cuando se hayan introducido tales mutaciones. Ward y Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77 y Armour *et al.* 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613.

[0315] En algunos aspectos, la región constante de inmunoglobulina o una porción de esta es hemi-glucosilada. Por ejemplo, la proteína de fusión comprende dos regiones Fc o los componentes de unión a FcRn pueden contener una primera región Fc glucosilada (por ejemplo, una región CH2 glucosilada) y una segunda región Fc aglucosilada (por ejemplo, una región CH2 aglucosilada). En un aspecto, un ligador se puede interponer entre las regiones Fc glucosiladas y aglucosiladas. En otro aspecto, la región Fc o el componente de unión a FcRn están totalmente glucosilados, es decir, todas las regiones Fv están glucosiladas. En otros aspectos, la región Fc puede estar aglucosilada, es decir, ninguna de las porciones Fc está glucosilada.

[0316] En algunos aspectos, una proteína de fusión de la divulgación comprende una sustitución de aminoácidos en una región constante de inmunoglobulina o una porción de esta (por ejemplo, variantes Fc), que altera las funciones efectoras independientes de antígeno de la región constante de Ig, en particular, la semivida circulante de la proteína.

[0317] Tales proteínas exhiben mayor o menor unión a un receptor Fc cuando se comparan con las proteínas que no tienen estas sustituciones y, por lo tanto, tienen una semivida en suero mayor o menor, respectivamente. Se prevé que las variantes Fc con

afinidad mejorada a un receptor Fc tengan semividas en suero más extensas, y tales moléculas tienen aplicaciones útiles en métodos para tratar mamíferos en donde se desea la semivida extensa del polipéptido administrado, por ejemplo, para tratar una enfermedad o un trastorno crónicos (ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.^{os} 7.348.004, 7.404.956 y 7.862.820). En contraste, se espera que las variantes Fc con afinidad de unión disminuida al receptor Fc tengan semividas más cortas, y tales moléculas también son útiles, por ejemplo, para la administración a un mamífero en donde un tiempo de circulación más corto puede ser ventajoso, por ejemplo, para el diagnóstico por imágenes *in vivo* o en situaciones en donde el polipéptido de inicio tiene efectos colaterales tóxicos cuando está presente en la circulación durante períodos prolongados. Las variantes Fc con afinidad de unión disminuida al receptor Fc también tienen menos probabilidad de cruzar la placenta y, de este modo, son también útiles para el tratamiento de enfermedades o trastornos en mujeres embarazadas.

[0318] Además, otras aplicaciones en las que puede ser conveniente la afinidad de unión reducida al receptor Fc incluyen aquellas aplicaciones en las que es conveniente la localización en el cerebro, riñón y/o hígado. En un aspecto de ejemplo, la proteína de fusión de la divulgación exhibe transporte reducido sobre el epitelio de glomérulos renales de la vasculatura. En otro aspecto, la proteína de fusión de la divulgación exhibe transporte reducido sobre la barrera hematoencefálica (BBB) del cerebro, en el espacio vascular. En un aspecto, una proteína con una unión alterada al receptor Fc comprende al menos una región Fc (por ejemplo, una o dos regiones Fc) que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en el “bucle de unión al receptor Fc” de una región constante de Ig. El bucle de unión al receptor Fc está compuesto por residuos de aminoácidos 280-299 (de acuerdo con la numeración de EU) de una región Fc de longitud completa, de tipo silvestre.

[0319] En otros aspectos, una región constante de Ig o una porción de esta de la divulgación con una afinidad de unión alterada al receptor Fc comprende al menos una región Fc que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en una posición de aminoácido que corresponde a cualquiera de las siguientes posiciones de EU: 256, 277-281, 283-288, 303-309, 313, 338, 342, 376, 381, 384, 385, 387, 434 (por ejemplo, N434A o N434K) y 438. Las sustituciones de aminoácidos de ejemplo que alteraron la actividad de unión al receptor Fc se divulgan en la publicación internacional PCT N.º WO05/047327.

(b) Albúmina o fragmento, o variante de esta

[0320] En algunos aspectos, el polipéptido FGF-21 está ligado, por ejemplo, fusionado

o conjugado, a albúmina o un fragmento funcional de esta.

[0321] La albúmina de suero humano (HSA o HA), una proteína de 609 aminoácidos en su forma de longitud completa, es responsable de una proporción significativa de presión osmótica de suero y también funciona como un portador de ligandos endógenos y exógenos. Como se usa en la presente, el término albúmina incluye albúmina de longitud completa o un fragmento funcional, variante, derivado o análogo de esta.

[0322] En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida ligada al polipéptido FGF-21 es albúmina o un fragmento o variante de esta, que extiende (o es capaz de extender) la semivida del polipéptido FGF-21. Otros ejemplos de albúmina o los fragmentos o variantes de esta se divulgan en la publicación de las patentes estadounidense N.^{os} 2008/0194481 A1, 2008/0004206 A1, 2008/0161243 A1, 2008/0261877 A1 o 2008/0153751 A1, o las publicaciones de la solicitud estadounidense N.^{os} 2008/033413 A2, 2009/058322 A1 o 2007/021494 A2.

(c) Porción de unión a albúmina

[0323] En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida ligada, por ejemplo, fusionada o conjugada, al polipéptido FGF-21 es una porción de unión a albúmina, que comprende un péptido de unión a albúmina, un dominio de unión a albúmina bacteriana, un fragmento de anticuerpo de unión a albúmina, o cualquier combinación de estos. Por ejemplo, la proteína de unión a albúmina puede ser una proteína de unión a albúmina bacteriana, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que incluye anticuerpos de dominio (ver la patente estadounidense N.º 6.696.245). Por ejemplo, una proteína de unión a albúmina puede ser un dominio de unión a albúmina bacteriana, tal como el de la proteína G estreptocócica (Konig, T. y Skerra, A. (1998) J. Immunol. Methods 218, 73-83). Otros ejemplos de péptidos de unión a albúmina que se pueden usar como componente de conjugación son, por ejemplo, los que tienen una secuencia de consenso Cys-Xaa 1 -Xaa 2 -Xaa 3 -Xaa 4 -Cys, en donde Xaa 1 es Asp, Asn, Ser, Thr o Trp; Xaa 2 es Asn, Gln, His, Ile, Leu o Lys; Xaa 3 es Ala, Asp, Phe, Trp o Tyr; y Xaa 4 es Asp, Gly, Leu, Phe, Ser o Thr como se describe en la solicitud de patente estadounidense 2003/0069395 o en Dennis *et al.* (Dennis *et al.* (2002) J. Biol. Chem. 277, 35035-35043).

(d) Secuencia PAS

[0324] En otros aspectos, la porción de extensión de semivida ligada, por ejemplo, fusionada o conjugada, al polipéptido FGF-21 es una secuencia PAS. Como se usa en la presente, una "secuencia PAS" se refiere a una secuencia de aminoácidos que comprende principalmente residuos de alanina y serina o que comprende principalmente

residuos de alanina, serina y prolina, en donde la secuencia de aminoácidos forma una conformación de enrollamiento aleatorio en condiciones fisiológicas. En consecuencia, la secuencia PAS es un bloque de construcción, un polímero de aminoácido o un casete de secuencia que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en alanina, serina y prolina que se puede usar como una parte de la porción heteróloga en la proteína de fusión. Aun así, la persona del oficio de nivel medio sabe que un polímero de aminoácido puede formar también una conformación de enrollamiento aleatorio cuando se agregan residuos que no son de alanina, serina y prolina como un constituyente menor en la secuencia PAS. La expresión “constituyente menor”, como se usa en la presente, significa que los aminoácidos que no son de alanina, serina y prolina se pueden agregar a la secuencia PAS hasta un determinado punto, por ejemplo, hasta alrededor de 12 %, es decir, alrededor de 12 de 100 aminoácidos de la secuencia PAS, hasta alrededor de 10 %, es decir, alrededor de 10 de 100 aminoácidos de la secuencia PAS, hasta alrededor de 9 %, es decir, alrededor de 9 de 100 aminoácidos, hasta alrededor de 8 %, es decir, alrededor de 8 de 100 aminoácidos, alrededor de 6 %, es decir, alrededor de 6 de 100 aminoácidos, alrededor de 5 %, es decir, alrededor de 5 de 100 aminoácidos, alrededor de 4 %, es decir, alrededor de 4 de 100 aminoácidos, alrededor de 3 %, es decir, alrededor de 3 de 100 aminoácidos, alrededor de 2 %, es decir, alrededor de 2 de 100 aminoácidos, alrededor de 1 %, es decir, alrededor de 1 de 100 de los aminoácidos. Los aminoácidos que no son de alanina, serina y prolina se pueden seleccionar del grupo que consiste en Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr y Val.

[0325] En condiciones fisiológicas, el tramo de la secuencia PAS forma una conformación de enrollamiento aleatorio y puede mediar una mayor estabilidad *in vivo* y/o *in vitro* en el polipéptido FGF-21. Dado que el dominio de enrollamiento aleatorio no adopta una estructura estable ni funciona por sí mismo, la actividad biológica mediada por FGF-21 se conserva esencialmente. En otros aspectos, las secuencias PAS que forman dominio de enrollamiento aleatorio son biológicamente inertes, en especial en lo que se refiere a proteólisis en plasma en sangre, inmunogenicidad, punto isoeléctrico/comportamiento electroestático, unión a receptores de superficie celular o internalización, pero siguen siendo biodegradables, lo que proporciona ventajas evidentes con respecto a polímeros sintéticos, tales como PEG.

[0326] Las secuencias PAS de ejemplo se proporcionan, por ejemplo, en la publicación de la patente estadounidense N.º 2010/0292130 A1 y la solicitud de publicación de estadounidense N.º WO 2008/155134 A1, ambas incorporadas en la presente por

referencia en su totalidad).

(e) Secuencia HAP

[0327] En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida ligada, por ejemplo, fusionada o conjugada, al polipéptido FGF-21 es un polímero homo-amino-ácido (HAP) rico en glicina. La secuencia HAP puede comprender una secuencia repetitiva de glicina, que tiene al menos 50 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos, 120 aminoácidos, 140 aminoácidos, 160 aminoácidos, 180 aminoácidos, 200 aminoácidos, 250 aminoácidos, 300 aminoácidos, 350 aminoácidos, 400 aminoácidos, 450 aminoácidos o 500 aminoácidos de longitud.

[0328] En un aspecto, la secuencia HAP es capaz de extender la semivida de una porción fusionada o ligada a la secuencia HAP. Los ejemplos no limitativos de la secuencia HAP incluyen (Gly) n , (Gly4Ser) n o S(Gly4Ser) n , en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20. En un aspecto, n es 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40. En un aspecto, n es 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200.

(f) Transferrina o fragmento de esta

[0329] En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida ligada, por ejemplo, fusionada o conjugada, al polipéptido FGF-21 es transferrina o un fragmento de esta. Cualquier transferrina se puede usar para elaborar las proteínas de fusión de la divulgación. Como un ejemplo, la Tf humana de tipo silvestre (Tf) es una proteína de 679 aminoácidos, de alrededor de 75 KDa (sin contar la glucosilación), con dos dominios principales, N (alrededor de 330 aminoácidos) y C (alrededor de 340 aminoácidos), que parecen originarse de una duplicación génica. Ver los números de acceso GenBank NM001063, XM002793, M12530, XM039845, XM 039847 y S95936 (www.ncbi.nlm.nih.gov/). La transferrina comprende dos dominios, dominio N y dominio C. El dominio N comprende dos subdominios, dominio N1 y dominio N2, y el dominio C comprende dos subdominios, dominio C1 y dominio C2.

[0330] En un aspecto, la porción de transferrina de la proteína de fusión incluye una variante de empalme de transferrina. En un ejemplo, una variante de empalme de transferrina puede ser una variante de empalme de transferrina humana, por ejemplo, acceso Genbank AAA61140. En otro aspecto, la porción de transferrina de la proteína de fusión incluye uno o más dominios de la secuencia de transferrina, por ejemplo, dominio N, dominio C, dominio N1, dominio N2, dominio C1, dominio C2 o cualquier combinación de estos.

(g) Polímero, por ejemplo, polietilenglicol (PEG)

[0331] En otros aspectos, la porción de extensión de semivida ligada, por ejemplo, fusionada o conjugada, al polipéptido FGF-21 es un polímero soluble conocido en el estado de la técnica, que incluye, entre otros, polietilenglicol (PEG), etilenglicol/copolímeros de propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano o alcohol de polivinilo. Los derivados químicamente modificados de los polipéptido FGF-21 de la divulgación pueden proporcionar ventajas adicionales tales como solubilidad, estabilidad y tiempo de circulación del polipéptido aumentados, o inmunogenicidad disminuida (ver la patente estadounidense N.º 4.179.337). El polímero soluble se puede unir en cualquier posición al polipéptido FGF-21 o su extremo N o C. El polímero soluble se puede unir a posiciones aleatorias dentro de la secuencia del polipéptido FGF-21 o a posiciones predeterminadas dentro del polipéptido FGF-21 y puede incluir una, dos, tres o más porciones de polímero solubles unidas. En algunos aspectos, el polímero se une a una cadena lateral de un aminoácido natural. En otros aspectos, el polímero se une a una cadena lateral de un aminoácido codificado de manera no natural, por ejemplo, un derivado de fenilalanina tal como para-acetil-L-fenilalanina.

[0332] El polímero soluble puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. En un aspecto, en el caso de PEG, el peso molecular es de alrededor de 1 kDa a alrededor de 100 kDa para facilitar la manipulación y fabricación. En algunos aspectos, el peso molecular del polímero soluble, por ejemplo, PEG, es alrededor de 30 kDa. Se pueden usar otros tamaños, en función del perfil deseado (por ejemplo, la duración de la liberación sostenida deseada, los efectos, si los hubiera, en la actividad biológica, la facilidad de la manipulación, el grado o la falta de antigenicidad y otros efectos conocidos del polietilenglicol en una proteína o análogo). Por ejemplo, el PEG puede tener un peso molecular promedio de alrededor de 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10.000, 10.500, 11.000, 11.500, 12.000, 12.500, 13.000, 13.500, 14.000, 14.500, 15.000, 15.500, 16.000, 16.500, 17.000, 17.500, 18.000, 18.500, 19.000, 19.500, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000, 55.000, 60.000, 65.000, 70.000, 75.000, 80.000, 85.000, 90.000, 95.000 o 100.000 Da.

[0333] En algunos aspectos, el PEG puede tener una estructura ramificada. Los PEG ramificados se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 5.643.575; Morpurgo *et al.*, Appl. Biochem. Biotechnol. 56:59-72 (1996); Vorobjev *et al.*, Nucleosides Nucleotides 18:2745-2750 (1999); y Caliceti *et al.*, Bioconjug. Chem. 10:638-646 (1999).

[0334] La cantidad de porciones PEG unidas al polipéptido FGF-21 también puede

variar. Por ejemplo, las proteínas PEGiladas de la divulgación pueden estar ligadas, en promedio, a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20 o más moléculas de PEG. De manera similar, el grado de sustitución promedio puede estar dentro de rangos tales como 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19 o 18-20 porciones PEG por molécula de proteína. Los métodos para determinar el grado de sustitución se divulgan, por ejemplo, en Delgado *et al.*, Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys. 9:249-304 (1992).

[0335] En otros aspectos, el polipéptido FGF-21 usado en las formulaciones de la presente divulgación se conjuga con uno o más polímeros. El polímero puede ser hidrosoluble y puede estar unido de manera covalente o no covalente al polipéptido FGF-21 u otras porciones conjugadas con el polipéptido FGF-21. Los ejemplos no limitativos del polímero pueden ser poli(óxido de alquileo), poli(pirrolidona de vinilo), poli(alcohol de vinilo), polioxazolina o poli(acrilolmorfolina).

(h) Almidón de hidroxietilo (HES)

[0336] En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida ligada, por ejemplo, fusionada o conjugada, al polipéptido FGF-21 es almidón de hidroxietilo (HES) o un derivado de este. HES es un derivado de amilopectina natural y se degrada en el cuerpo mediante alfa-amilasa. HES es un derivado sustituido de la amilopectina de polímero de carbohidrato, que está presente en el almidón de maíz en una concentración de hasta 95 % en peso. HES exhibe propiedades biológicas ventajosas y se usa como agente de reemplazo de volumen de sangre y en tratamiento de hemodilución en las clínicas (Sommermeier *et al.*, Krankenhauspharmazie, 8(8), 271-278 (1987); y Weidler *et al.*, Arzneim.-Forschung/Drug Res., 41, 494-498 (1991)).

[0337] La amilopectina contiene porciones de glucosa, en donde, en la cadena principal, están presentes los enlaces alfa-1,4-glucosídicos, y en los sitios de ramificación, se encuentran los enlaces alfa-1,6-glucosídicos. Las propiedades físico-químicas de esta molécula se determinan principalmente por el tipo de enlaces glucosídicos. Debido al enlace alfa-1,4-glucosídico cortado, se producen las estructuras helicoidales con alrededor de seis monómeros de glucosa por vez. Las propiedades físico-químicas así como las propiedades bioquímicas del polímero se pueden modificar por sustitución. La introducción de un grupo hidroxietilo se puede lograr mediante hidroxietilación alcalina. Mediante la adaptación de condiciones de reacción, es posible aprovechar la diferente reactividad del grupo hidroxilo respectivo en el monómero de glucosa no sustituido con respecto a una hidroxietilación. A causa de esto, la persona del oficio de nivel medio puede influir en el patrón de sustitución en una medida limitada.

[0338] HES se caracteriza principalmente por la distribución de peso molecular y el grado de sustitución. El grado de sustitución, indicado como DS y que se refiere a la sustitución molar, es conocido por la persona del oficio de nivel medio. Ver Sommermeyer *et al.*, *Krankenhauspharmazie*, 8(8), 271-278 (1987), como se mencionó anteriormente, en particular, la página 273.

[0339] En un aspecto, HES tiene una media de peso molecular (peso medio) de 1 a 300 kD, de 2 a 200kD, de 3 a 100 kD, o de 4 a 70kD. El almidón de hidroxietilo puede además exhibir un grado molar de sustitución de 0,1 a 3, preferentemente, 0,1 a 2, con mayor preferencia, 0,1 a 0,9, preferentemente, 0,1 a 0,8, y una relación de sustitución C2:C6 en el rango de 2 a 20 con respecto a los grupos hidroxietilo. Un ejemplo no limitativo de HES que tiene un peso molecular de alrededor de 130 kD es un HES con un grado de sustitución de 0,2 a 0,8, tal como 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8, preferentemente, de 0,4 a 0,7, tal como 0,4, 0,5, 0,6 o 0,7. En un aspecto específico, HES con una media de peso molecular de alrededor de 130 kD es Voluven® de Fresenius. Voluven® es un coloide artificial, usado, por ejemplo, para el reemplazo del volumen usado en indicaciones terapéuticas para el tratamiento y la profilaxis de hipovolemia. Las características de Voluven® son una media de peso molecular de 130.000+/-20.000 D, una sustitución molar de 0,4 y una relación C2:C6 de alrededor de 9:1. En otros aspectos, los rangos de la media de peso molecular del almidón de hidroxietilo son, por ejemplo, 4 a 70 kD o 10 a 70 kD o 12 a 70 kD o 18 a 70 kD o 50 a 70 kD o 4 a 50 kD o 10 a 50 kD o 12 a 50 kD o 18 a 50 kD o 4 a 18 kD o 10 a 18 kD o 12 a 18 kD o 4 a 12 kD o 10 a 12 kD o 4 a 10 kD. Aun en otros aspectos, la media de peso molecular del almidón de hidroxietilo usado está en el rango de más de 4 kD y menos de 70 kD, tal como alrededor de 10 kD, o en el rango de 9 a 10 kD o de 10 a 11 kD o de 9 a 11 kD, o alrededor de 12 kD, o en el rango de 11 a 12 kD) o de 12 a 13 kD o de 11 a 13 kD, o alrededor de 18 kD, o en el rango de 17 a 18 kD o de 18 a 19 kD o de 17 a 19 kD, o alrededor de 30 kD, o en el rango de 29 a 30, o de 30 a 31 kD, o alrededor de 50 kD, o en el rango de 49 a 50 kD o de 50 a 51 kD o de 49 a 51 kD.

[0340] En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida puede consistir en una mezcla de HES que tiene diferentes medias de peso molecular y/o diferentes grados de sustitución y/o diferentes relaciones de sustitución C2: C6. Por lo tanto, las mezclas de HES se pueden usar con diferentes medias de peso molecular y diferentes grados de sustitución y diferentes relaciones de sustitución C2: C6, o con diferentes medias de peso molecular y diferentes grados de sustitución y la misma o casi la misma relación de sustitución C2:C6, o con diferentes medias de peso molecular y el mismo o casi el

mismo grado de sustitución y diferentes relaciones de sustitución C2:C6, o que tiene la misma o casi la misma media de peso molecular y diferentes grados de sustitución y diferentes relaciones de sustitución C2:C6, o que tiene diferentes medias de peso molecular y el mismo o casi el mismo grado de sustitución y la misma o casi la misma relación de sustitución C2:C6, o que tiene las mismas o casi las mismas medias de peso molecular y diferentes grados de sustitución y la misma o casi la misma relación de sustitución C2:C6, o que tiene la misma o casi la misma media de peso molecular y el mismo o casi el mismo grado de sustitución y diferentes relaciones de sustitución C2:C6, o que tiene casi la misma media de peso molecular y casi el mismo grado de sustitución y casi la misma relación de sustitución C2:C6.

(i) Ácidos polisiálicos (PSA)

[0341] En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida ligada, por ejemplo, fusionada o conjugada, al polipéptido FGF-21 es un ácido polisiálico (PSA) o un derivado de este. PSA son polímeros no ramificados naturales de ácido siálico producidos por determinadas cepas bacterianas y en mamíferos en determinadas células Roth J., *et al.* (1993) en *Polysialic Acid: From Microbes to Man*, eds Roth J., Rutishauser U., Troy F. A. (Birkhäuser Verlag, Basel, Suiza), pp 335–348. Se pueden producir en diversos grados de polimerización de n =alrededor de 80 o más de residuos de ácido siálico hasta $n=2$ mediante hidrólisis de ácido limitada o mediante digestión con neuraminidasas, o mediante fraccionamiento de las formas naturales, derivadas de bacterias del polímero.

[0342] La composición de diferentes ácidos polisiálicos también varía de modo que se presenten formas homopoliméricas, es decir, el ácido polisiálico ligado a alfa-2,8 que comprende el polisacárido capsular de la cepa K1 de *E. coli* y el grupo meningococo B, que también se encuentra en la forma embrionaria de la molécula de adhesión a células neuronales (N-CAM). También existen formas heteropoliméricas, tales como el ácido polisiálico alfa-2,8 alfa-2,9 alternante de la cepa K92 de *E. coli* y los polisacáridos del grupo C de *N. meningitidis*. El ácido siálico también se puede encontrar en copolímeros alternantes con monómeros que no son ácido siálico, tales como el grupo W135 o el grupo Y de *N. meningitidis*. Los ácidos polisiálicos tienen funciones biológicas importantes que incluyen la evasión de los sistemas inmunitarios y de complemento mediante bacterias patógenas y la regulación de adherencia glial de neuronas inmaduras durante el desarrollo fetal (en donde el polímero tiene una función antiadherente) Cho y Troy, P.N.A.S., Estados Unidos, 91 (1994) 11427-11431, aunque no se encuentran receptores conocidos para los ácidos polisiálicos en mamíferos. El ácido polisiálico ligado a alfa-2,8 de la cepa K1 de *E. coli* es también conocido como

“ácido colomínico” y se usa (en varias longitudes) para ejemplificar la presente divulgación.

[0343] Se describieron varios métodos para unir o conjugar ácidos polisiálicos con un polipéptido (ver, por ejemplo la patente estadounidense N.º 5.846.951; WO-A-0187922 y US 2007/0191597 A1.

(j) Secuencias XTEN

[0344] En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida ligada, por ejemplo, fusionada o conjugada, al polipéptido FGF-21 es una secuencia de XTEN. Como se usa en la presente, la "secuencia de XTEN" se refiere a polipéptidos de longitud extendida con secuencias sustancialmente no repetitivas, no naturales compuestas principalmente de aminoácidos hidrófilos pequeños, en donde la secuencia tiene un bajo grado o no tiene estructura secundaria o terciaria en condiciones fisiológicas. Como un componente de proteína de fusión, el XTEN puede servir como un portador, que confiere determinadas propiedades farmacocinéticas, fisicoquímicas y farmacéuticas convenientes cuando se liga al polipéptido FGF-21 para crear una proteína de fusión. Tales propiedades convenientes incluyen, entre otros, parámetros farmacocinéticos mejorados y características de solubilidad.

[0345] En algunos aspectos, la secuencia de XTEN de la divulgación es un péptido o un polipéptido que tiene más de alrededor de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 o 2000 residuos de aminoácidos. En algunos aspectos, XTEN es un péptido o un polipéptido que tiene más de alrededor de 20 a alrededor de 3000 residuos de aminoácidos, más de 30 a alrededor de 2500 residuos, más de 40 a alrededor de 2000 residuos, más de 50 a alrededor de 1500 residuos, más de 60 a alrededor de 1000 residuos, más de 70 a alrededor de 900 residuos, más de 80 a alrededor de 800 residuos, más de 90 a alrededor de 700 residuos, más de 100 a alrededor de 600 residuos, más de 110 a alrededor de 500 residuos, o más de 120 a alrededor de 400 residuos.

[0346] La secuencia de XTEN de la divulgación puede comprender uno o más motivos de secuencia de 9 a 14 residuos de aminoácidos o una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica al motivo de secuencia, en donde el motivo comprende, consiste esencialmente en o consiste en 4 a 6 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P). Ver US 2010-0239554 A1.

[0347] En algunos aspectos, una secuencia de XTEN comprende unidades múltiples de motivos de secuencia no superpuestos de la familia de motivos AD, o de la familia de motivos AE, o de la familia de motivos AF, o de la familia de motivos AG, o de la familia de motivos AM, o de la familia de motivos AQ, o de la familia de motivos BC, o de la familia de motivos BD, en donde el XTEN resultante exhibe el rango de homología. En otros aspectos, el XTEN comprende unidades múltiples de secuencias de motivos de dos o más de las familias de motivos. Estas secuencias se pueden seleccionar para alcanzar las características físicas/químicas deseadas, que incluyen propiedades tales como carga neta, hidrofilia, falta de estructura secundaria, o falta de repetición que se confieren por la composición de aminoácido de los motivos, descritos más en detalle más adelante. En otros aspectos, los motivos incorporados en el XTEN se pueden seleccionar y ensamblar con el uso de métodos descritos en la presente para alcanzar un XTEN de alrededor de 36 a alrededor de 3000 residuos de aminoácidos.

[0348] En otros aspectos, la secuencia de XTEN usada en la divulgación afecta la propiedad física o química, por ejemplo, la farmacocinética, de la proteína de fusión de la presente divulgación. La secuencia de XTEN usada en la presente divulgación puede exhibir una o más de las siguientes propiedades ventajosas: flexibilidad conformacional, solubilidad acuosa mejorada, alto grado de resistencia a la proteasa, baja inmunogenicidad, baja unión a receptores de mamíferos, o mayores radios hidrodinámicos (o Stokes).

[0349] En algunos aspectos, una secuencia de XTEN ligada a un polipéptido FGF-21 puede aumentar propiedades farmacocinéticas tales como semivida terminal más larga o mayor área debajo de la curva (AUC), de modo que el polipéptido FGF-21 se mantenga *in vivo* durante un período más extenso en comparación con un polipéptido FGF-21 correspondiente sin XTEN. En otros aspectos, una secuencia de XTEN ligada a un polipéptido FGF-21 divulgado en la presente puede aumentar las propiedades farmacocinéticas tales como una semivida terminal más larga o mayor área debajo de la curva (AUC), de modo que el polipéptido FGF-21 se mantenga *in vivo* durante un período más extenso en comparación con un polipéptido FGF-21 correspondiente sin XTEN.

[0350] Se puede usar una variedad de métodos y ensayos para determinar las propiedades físicas/químicas de proteínas que comprenden la secuencia de XTEN. Dichos métodos incluyen, entre otros, centrifugación analítica, EPR, HPLC de intercambio de iones, HPLC de exclusión de tamaño, HPLC de fase inversa, dispersión de luz, electroforesis capilar, dicroísmo circular, calorimetría de barrido diferencial,

fluorescencia, HPLC de intercambio de iones, HPLC de exclusión de tamaño, IR, RMN, espectroscopía de Raman, refractometría y espectroscopía UV/visible. Se divulgan métodos adicionales en Amau *et al.*, Prot Expr and Purif 48, 1-13 (2006).

[0351] Otros ejemplos de secuencias de XTEN se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación y se divulgan en las publicaciones de patentes estadounidenses N.^{os} 2010/0239554 A1, 2010/0323956 A1, 2011/0046060 A1, 2011/0046061 A1, 2011/0077199 A1 o 2011/0172146 A1, o las publicaciones de patentes internacionales N.^{os} WO 2010091122 A1, WO 2010144502 A2, WO 2010144508 A1, WO 2011028228 A1, WO 2011028229 A1 o WO 2011028344 A2, que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

(k) Péptido de unión a inmunoglobulina (o polipéptido)

[0352] En algunos aspectos, la porción de extensión de semivida ligada, por ejemplo, fusionada o conjugada, al polipéptido FGF-21 es un péptido de unión a inmunoglobulina. Los péptidos de unión a inmunoglobulina se pueden unir a una región Fc y pueden mejorar la semivida de la proteína de fusión descrita en la presente.

[0353] En algunos aspectos, el péptido de unión a inmunoglobulina útil para la divulgación es un péptido o un polipéptido que tiene más de alrededor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 residuos de aminoácidos.

[0354] En algunos aspectos, el péptido de unión a inmunoglobulina útil para la divulgación comprende un péptido de unión al dominio Fc de IgG (IgGBP) 13-mero. DeLano WL, *et al.* (2000) Science 287:1279–1283. En otros aspectos, el péptido de unión a inmunoglobulina útil para la divulgación comprende los péptidos divulgados en la publicación de patente estadounidense N.º 20170334954, la publicación de patente estadounidense N.º 20170210777 o la publicación PCT N.º WO/2017/069158.

VI. Artículos de fabricación y kits

[0355] La presente divulgación también proporciona un artículo o fabricación o kit que comprende (i) una formulación farmacéutica de FGF-21 que comprende un polipéptido FGF-21 (por ejemplo, un FGF-21 modificado tal como PEG-FGF-21) divulgado en la presente, y (ii) instrucciones para su uso. El artículo de fabricación puede comprender un recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. El recipiente pueden formarse de una variedad de materiales, tales como vidrio, plástico o metales. El recipiente contiene la formulación farmacéutica de FGF-21, por ejemplo, una formulación líquida.

[0356] La etiqueta en, o asociada al, recipiente puede indicar direcciones para la

reconstitución y/o el uso. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que la formulación farmacéutica de FGF-21 debe diluirse en concentraciones de proteínas, como se describe anteriormente. La etiqueta puede también indicar que la formulación subcutánea es útil o está prevista para la administración subcutánea.

[0357] El recipiente que contiene la formulación puede ser un vial multiuso, que permite repetir las administraciones (por ejemplo, de 2 a 6 administraciones, o más) por ejemplo, de la formulación subcutánea. De manera alternativa, el recipiente puede ser una jeringa precargada que contiene, por ejemplo, la formulación subcutánea.

[0358] El artículo de fabricación o kit puede también comprender un segundo recipiente que comprende, por ejemplo, un solvente. El artículo de fabricación puede incluir también otros materiales convenientes desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

[0359] Cabe destacar que la sección Descripción detallada, a diferencia de las secciones Síntesis y Resumen, se pretende utilizar para interpretar las reivindicaciones. Las secciones de Síntesis y Resumen pueden establecer una o más pero no todos los aspectos de ejemplo de la presente divulgación como las contempla el/los inventor/es, y por ende, no pretenden limitar la presente divulgación ni las reivindicaciones adjuntas de ninguna manera.

[0360] La presente divulgación se describió anteriormente con la ayuda de bloques de construcción funcionales que ilustran la implementación de funciones específicas y las relaciones de estas. Los límites de estos bloques de construcción funcionales se definieron arbitrariamente en la presente para la conveniencia de la descripción. Los límites alternativos se pueden definir siempre que las funciones específicas y las relaciones de estas se lleven a cabo de manera apropiada.

[0361] La descripción que antecede de los aspectos específicos revelará completamente la naturaleza general de la divulgación que otros pueden, mediante la aplicación del conocimiento del oficio, modificar y/o adaptar fácilmente para distintas aplicaciones de tales aspectos específicos, sin experimentación indebida, y sin apartarse del concepto general de la presente invención. Por lo tanto, se pretende que tales adaptaciones y modificaciones estén dentro del significado y rango de equivalentes de los aspectos divulgados, sobre la base de la enseñanza y orientación proporcionadas en la presente. Cabe destacar que la fraseología o terminología en la presente es con fines descriptivos y no limitativos, de manera que la terminología o fraseología de la

presente memoria descriptiva debe ser interpretada por una persona del oficio de nivel medio a la luz de las enseñanzas y orientación.

[0362] La amplitud y el alcance de la presente divulgación no deberían estar limitados por ninguno de los aspectos de ejemplo descritos anteriormente, pero deberían estar definidos solo de acuerdo con las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Desarrollo de la formulación de PEG-FGF-21

[0363] Para los estudios iniciales, PEG-FGF-21 se formuló a 7,5 mg/ml en 20 mM de Tris, 250 mM de sacarosa, pH 8,3. Las velocidades de desamidación alta observadas en esta formulación hicieron que sea necesario almacenar el producto farmacológico congelado a -20 °C. Por lo tanto, se realizó un trabajo adicional para desarrollar una formulación lista para usar (RTU) que permite el almacenamiento a 2-8 °C del producto farmacológico.

[0364] PEG-FGF-21 (SEQ ID NO: 2) se elaboró mediante la unión de una porción PEG de 30-kDa lineal para los FGF-21 modificados (SEQ ID NO: 1) de manera específica de sitio. Para alcanzar la PEGilación específica de sitio, el PEG activado se hizo reaccionar mediante métodos conocidos en el estado de la técnica con el aminoácido no natural, para-acetil fenilalanina (pAF), en la posición 109 de la molécula FGF-21 para formar un conjugado PEG-proteína ligado a oxima químicamente estable.

[0365] El pH de formulación más bajo demostró aumentar las velocidades de agregación de la molécula, mientras que el pH de formulación más alto demostró aumentar las velocidades de desamidación. En la concentración de proteínas diana de 10 mg/ml, el pH 7,0 demostró tener el mejor equilibrio entre velocidades de desamidación y agregación. La concentración creciente de sacarosa demostró estabilizar adicionalmente la molécula contra la agregación.

[0366] La formulación seleccionada para estudios adicionales fue de 10 mg/ml de PEG-FGF-21 en 20 mM de L-histidina, 600 mM de sacarosa, pH 7,0. Luego de una dosis semanal contemplada de 20 mg, se desarrolló una mayor concentración fármaco producto en una jeringa precargada. Para permitir la mayor concentración fármaco producto, fue necesaria la optimización adicional de la formulación.

[0367] El desarrollo inicial de una mayor formulación de la concentración se llevó a cabo en viales de vidrio de tipo I de 3 ml. Tras la agitación de 15 mg/ml y 22 mg/ml de PEG-FGF-21 en 20 mM de L-histidina, 600 mM de sacarosa, pH 7,0, se observó captura de

burbujas de aire y las soluciones se volvieron cada vez más turbias (Figura 5, imágenes de la izquierda). Con el fin de intentar mitigar el problema, se usó polisorbato 80. El polisorbato 80 pudo prevenir la captura de burbujas de aire (Figura 5, imágenes de la derecha). Por lo tanto, se agregó polisorbato 80 en una concentración de 0,05 % (p/v) a la formulación de alta concentración de PEG-FGF-21.

[0368] La oxidación es un atributo de calidad crítica de PEG-FGF-21 y la oxidación de metionina-169 cerca del extremo C suprime la unión al receptor y de este modo la actividad de la molécula. La oxidación catalizada por metal es uno de los mecanismos mediante los cuales se puede oxidar la proteína. Las concentraciones de rastros de metales pueden estar presentes en la formulación de proteínas debido a la transferencia del cultivo celular, el contacto con recipientes de acero inoxidable, las impurezas en excipientes, el proceso de formación de las jeringas precargadas, etc.

[0369] Para comprobar si PEG-FGF-21 era sensible a la oxidación catalizada por metal, se incubaron muestras con o sin la adición de un cóctel de metales (250 ppm de Fe, 10 ppm de Cu, 15 ppm de Cr, 15 ppm de Ni, 10 ppm de Mo) en presencia o ausencia de 0,05 mM de ácido pentético (ácido dietilentriaminopentaacético, DTPA) durante un mes a 25 °C y durante dos semanas a 40 °C, respectivamente, y los niveles de oxidación de metionina 1 y metionina 169 se determinaron mediante el mapeo de péptidos triptico (Figuras 2A y 2B).

[0370] En ausencia del ácido pentético (DTPA), se observó una oxidación significativa de ambos residuos de metionina incluso en muestras sin metal agregado mientras que en muestras enriquecidas con un cóctel de metales los niveles de oxidación fueron aún mayores. En muestras con 50 µM de ácido pentético, no se observó un aumento en los niveles de oxidación para metionina. Esto indica que PEG-FGF-21 es sensible a la oxidación catalizada por metal y que ya existen niveles de rastros de metales presentes en la formulación. El ácido pentético queló de manera eficaz los metales presentes en la formulación así como metales adicionales enriquecieron la formulación y evitaron la oxidación catalizada por metal de metioninas 1 y 169. Por lo tanto, se agregaron 50 µM de ácido pentético a la formulación de alta concentración de PEG-FGF-21.

[0371] Para optimizar el pH para la formulación de mayor concentración, se analizaron los datos de agregación de PEG-FGF-21 recolectados entre pH 6,3 y 8,5, lo que muestra que las velocidades de agregación aumentaron rápidamente por debajo de pH 6,8 (Figuras 3A y 3B). Por lo tanto, se aumentó el pH diana para la formulación de alta concentración de pH 7,0 a pH 7,1.

[0372] Con el fin de comparar la nueva formulación de alta concentración con la

formulación anterior, se colocaron PEG-FGF-21 a 20 mg/ml en 20 mM de L-histidina, 600 mM de sacarosa, 0,05 mM de ácido pentético, 0,05 % (p/v) de polisorbato 80, pH 7,0 (antes de la optimización de pH) en estabilidad y se compararon con PEG-FGF-21 a 22,5 mg/ml en 20 mM de L-histidina, 600 mM de sacarosa, pH 7,0.

[0373] Como se muestra en las Figuras 4A y 4B, en las Figuras 1A y 1B, la adición de polisorbato 80 y ácido pentético a la formulación de PEG-FGF-21 dio como resultado menor velocidad de agregación en todas las temperaturas y menos desamidación a 40 °C.

Métodos de prueba

[0374] *Agregación:* La agregación se evaluó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución y exclusión por tamaño en un sistema disponible en el comercio (por ejemplo, sistema de HPLC Agilent Technologies serie 1100 con detector de PDA o HPLC Waters Alliance serie e2695 con detector de PDA) ajustado con una columna analítica disponible en el comercio (gel Tosoh TSK G3000SWXL, 7,8 x 300 mm, P/N: 08541). Una fase móvil de 95 % de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y 5 % de etanol a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min se usó para separar especies de alto peso molecular del monómero de proteína. Las muestras se diluyeron en una concentración de proteínas de 0,5 mg/ml con PBS y se inyectaron 0,01 mg (0,02 ml) para cada experimento. La cantidad de agregado se determinó al dividir el área de picos de alto peso molecular por el área total de todos los picos observados con el uso de un *software* de instrumento.

[0375] *Desamidación:* La desamidación se evaluó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución e intercambio de aniones en un sistema disponible en el comercio (por ejemplo, sistema de HPLC Agilent Technologies serie 1100 con detector de PDA o HPLC Waters Alliance serie e2695 con detector de PDA) ajustado con una columna analítica disponible en el comercio (columna de 5 µm no porosa Agilent Bio WAX, 4,6 x 250 mm, P/N: 5190-2487). La fase móvil A consistió en 20 mM de Tris, pH 8,2 y la fase móvil B consistió en 20 mM de Tris, 500 mM de cloruro de sodio, pH 8,2. Un gradiente lineal de 2 % de B a 67 % de B durante 20 minutos a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min se usó para separar variantes de proteína cargadas. Las muestras se diluyeron en una concentración de proteínas de 1 mg/ml con fase móvil A y se inyectaron 0,075 mg (0,075 ml) para cada experimento. La cantidad de desamidación se determinó al dividir el área de picos de variante ácida por el área total de todos los picos observados con el uso de un *software* de instrumento.

[0376] *Oxidación:* La oxidación se evaluó mediante mapeo de péptidos triptico.

Después de que las muestras de proteína se hayan digerido con tripsina, los péptidos resultantes se separaron mediante cromatografía de líquidos de ultraalta resolución de fase inversa en un sistema disponible en el comercio (por ejemplo, Waters Acquity UPLC) ajustado con una columna analítica disponible en el comercio (columna de RP UPLC de péptidos Waters Acquity C18 BEH, 2,1 × 150 mm, 1,7- μ m de tamaño de partícula, 130-Å de tamaño de poro P/N: 186003556). La fase móvil A consistió en 0,2 % de ácido trifluoroacético (TFA) en agua y la fase móvil B consistió en 0,2 % de TFA en acetonitrilo. Un complejo de gradiente de 10 % de B a 40 % de B durante 27 minutos a una temperatura de 60 °C y una velocidad de flujo de 0,3 ml/min se usó para separar péptidos tripticos. La cantidad de oxidación se determinó al dividir el área de picos de péptido oxidado por el área total de picos oxidados y no oxidados correspondientes con el uso de un *software* de instrumento.

[0377] Formación de partículas y formación de burbujas de aire: Observación visual.

[0378] *Concentración de PEG-FGF-21*: La concentración de PEG-FGF-21 en la formulación farmacéutica divulgada en la presente se midió mediante espectroscopía de pendiente a 280 nm usando un coeficiente de extinción de 0,87 (ml/(mg*cm)).

[0379] *Determinación de pH*: el pH se determinó de acuerdo con métodos estándar (USP<791>).

[0380] *Concentración de excipientes*: La concentración de excipientes individuales en la formulación farmacéutica divulgada en la presente (por ejemplo, DTPA, PS80, histidina, sacarosa) se determinó/calculó para que sea la cantidad (peso, moles, etc.) del excipiente individual agregado a la formulación farmacéutica en el curso de su elaboración por unidad de volumen final de la formulación farmacéutica terminada. De manera alternativa, la concentración de excipientes se puede basar en la cantidad real del excipiente individual en la formulación farmacéutica.