

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 728**

51 Int. Cl.:

C07K 14/50	(2006.01)
A61K 38/18	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)
A61P 27/02	(2006.01)
A61P 17/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2014** **E 19209445 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2024** **EP 3666791**

54 Título: **Factores de crecimiento de fibroblastos modificados 1 para el tratamiento de trastornos oculares**

30 Prioridad:

25.09.2013 US 201361882561 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2024

73 Titular/es:

TREFOIL THERAPEUTICS, LLC (100.0%)
4868 Almondwood Way
San Diego, CA 92130, US

72 Inventor/es:

EVELETH, DAVID y
THOMAS, KENNETH, A.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 986 728 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Factores de crecimiento de fibroblastos modificados 1 para el tratamiento de trastornos oculares

Campo de la invención

5 En la presente descripción se describen factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) modificados, composiciones farmacéuticas y medicamentos que incluyen tales FGF modificados, y los mismos para uso en tratamientos de enfermedades, trastornos o afecciones oculares.

Antecedentes de la invención

10 Las enfermedades y lesiones en los ojos pueden ser gravemente debilitantes y ocurren en una amplia variedad de formas. Una clase de enfermedad ocular, las distrofias endoteliales corneales, se caracteriza por una degeneración progresiva no inflamatoria del endotelio. Ejemplos de distrofias endoteliales corneales son la distrofia de Fuch (FD), la distrofia endotelial hereditaria congénita 1 o 2 y la distrofia corneal polimorfa posterior. La FD es la más común y se estima que afecta aproximadamente al 4 % de la población de Estados Unidos mayor de 40 años (Schmedt y otros Experimental eye research. 2012; 95(1):24-34). La FD tiene una aparición relativamente tardía y progresa lentamente; en última instancia, muchos pacientes necesitarán queratoplastia penetrante. Se estima que los casos de FD representan 10-25 % de los 32 000 trasplantes de córnea en los Estados Unidos (Klintworth, Orphanet journal of rare diseases. 2009; 4:7), una mayor proporción en el Reino Unido (Keenan y otros Archives of ophthalmology. 2012; 130(5):621-8) y la mayoría de los procedimientos de queratoplastia endotelial. En 2008, se realizaron 17 468 procedimientos de queratoplastia endotelial en los Estados Unidos (Li JY y otros International ophthalmology clinics. 2010; 50(3):101-12).

20 Resumen de la invención

La invención se define en las reivindicaciones. Aspectos adicionales y realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes. Cualquiera de los aspectos, realizaciones y ejemplos de la presente divulgación que no se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forman parte de la invención y se proporcionan únicamente con fines ilustrativos.

25 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende: Un factor de crecimiento de fibroblastos I modificado (FGF-1) que comprende mutaciones de FGF-1 humano en las posiciones 16, 66 y 117, con respecto a la secuencia de FGF-1 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1).

30 En un segundo aspecto, la invención proporciona además un FGF-1 modificado según cualquier reivindicación anterior para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o afección ocular de la córnea o la superficie ocular.

En un tercer aspecto, la invención también proporciona un FGF-1 modificado, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2, para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o afección ocular de la córnea o la superficie ocular.

35 En ciertas realizaciones, el FGF-1 modificado de la invención comprende las mutaciones: Cys16Ser, Ala66Cys y Cys117Val.

En ciertas realizaciones, el FGF-1 modificado de la invención comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3.

En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección ocular es una enfermedad, trastorno o afección del endotelio corneal.

40 En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección ocular del endotelio corneal es distrofia de Fuch, queratopatía ampollar, distrofia endotelial hereditaria congénita 1, distrofia endotelial hereditaria congénita 2, o distrofia corneal polimorfa posterior.

En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección ocular es distrofia de Fuchs.

En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección ocular es una enfermedad, trastorno o afección del epitelio corneal.

45 En ciertas realizaciones, la afección del epitelio corneal es un síndrome del ojo seco o daño epitelial corneal por cirugía o trasplante corneal.

En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección ocular es edema corneal.

En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección ocular es daño a la córnea por cirugía corneal.

50 En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección ocular es daño al endotelio corneal por cirugía corneal.

En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección ocular es una enfermedad, trastorno o afección del estroma corneal. En una realización, la enfermedad, trastorno o afección del estroma corneal es queratocono, distrofia corneal reticular, distrofia corneal granular, distrofia corneal macular, distrofia corneal cristalina de Schnyder, distrofia corneal estromal congénita o distrofia corneal moteada.

- 5 En ciertas realizaciones, el FGF-1 modificado se administra por vía tópica, por microagujas en la córnea, mediante colirio, o por vía intracameraral.

En ciertas realizaciones, el FGF-1 modificado es una composición farmacéutica, en donde la composición farmacéutica comprende además un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, y en donde la composición farmacéutica es opcionalmente una formulación oftálmica líquida.

- 10 En ciertas realizaciones, el FGF-1 modificado exhibe al menos una concentración semiefectiva (EC50) 10 veces menor en un ensayo que mide la proliferación de células endoteliales corneales humanas, en comparación con la secuencia de FGF-1 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1).

Breve descripción de las figuras

- 15 La Figura 1A representa, una curva de desnaturalización isotérmica de una proteína FGF-1 modificada con la secuencia de SEQ ID NO: 3.

La Figura 1B representa, una curva de desnaturalización isotérmica de una proteína FGF-1 modificada con la secuencia de SEQ ID NO: 4.

La Figura 2 representa, los resultados de un ensayo de proliferación celular de BaF3.

La Figura 3 representa, los resultados de un ensayo de proliferación celular de BaF3.

- 20 La Figura 4 representa, una imagen microscópica de células HCEC.

La Figura 5 representa, los resultados de un ensayo de proliferación de HCEC humanas.

La Figura 6 representa, los resultados de un ensayo de proliferación de HCEC humanas.

La Figura 7 representa, los resultados de un ensayo de proliferación de HCEC humanas.

La Figura 8 representa, los resultados de un ensayo de proliferación de CEC de conejo.

- 25 La Figura 9 representa, los resultados de un ensayo de proliferación de HCEC humanas.

Descripción detallada

- 30 En la presente descripción se proporcionan factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) modificados, composiciones farmacéuticas y medicamentos que incluyen tales péptidos modificados, y los mismos para uso en el tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones oculares. En algunas realizaciones, los FGF modificados descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar enfermedades, trastornos y afecciones corneales, por ejemplo, distrofias endoteliales corneales tales como la distrofia de Fuch (FD).

- 35 Los factores de crecimiento son reguladores clave de la proliferación y migración de las células de la córnea y estructuras asociadas. Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) comprenden una gran familia de polipéptidos conservados evolutivamente involucrados en una variedad de procesos biológicos que incluyen la morfogénesis, la angiogénesis y la remodelación de tejidos, así como en la patogénesis de numerosas enfermedades. Los diversos miembros de esta familia estimulan la proliferación de un amplio espectro de células, que incluyen las derivadas de origen mesenquimatoso, endotelial, epitelial y neuroectodérmico. Las células epiteliales y endoteliales corneales son sensibles a los factores de crecimiento que incluyen la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF). La respuesta biológica de las células al FGF se encuentra
40 mediada por receptores específicos de la superficie celular (FGFR). El FGF es quimiotáctico para las células corneales (Grant y otros (1992) Invest Ophthalmol Vis Sci 33(12): 3292-3301) y promueve la cicatrización de heridas corneales en animales (Fredj-Reygrobelle y otros (1987) Curr Eye Res 6(10): 1205-1209) así como la reducción de la gravedad de la lesión en la queratitis herpética (Kim y otros (2006). Curr Eye Res 31(12): 1021-1028). Además, la aplicación de FGF-2 (FGF básico) puede acelerar la cicatrización de las heridas epiteliales corneales después de la queratotomía fotorrefractiva (PRK) (Meduri y otros (2012). J Refract Surg 28(3): 220-223). También se ha demostrado que el FGF estimula los fibroblastos corneales (Woost y otros (1985). Exp
45 Eye Res 40(1): 47-60).

- 50 Se desconoce la causa de la FD y otras distrofias corneales. A nivel celular, estas afecciones se caracterizan por una pérdida progresiva de células endoteliales corneales (CEC). Las CEC forman una barrera entre el humor acuoso y el estroma corneal y bombean iones activamente. Esto mantiene el equilibrio de líquidos en la córnea, lo que contrarresta la tendencia del estroma rico en glicosaminoglicanos (GAG) a absorber líquidos y

mantiene la arquitectura adecuada para la función óptica. El envejecimiento da como resultado una disminución en el número de CEC y, en la distrofia FD, el número de células disminuye hasta el punto en que la función de barrera se ve comprometida. El fallo de la barrera de CEC y la actividad de bombeo de iones conducen a edema corneal, degradación de las cualidades ópticas de la córnea y mala visión.

5 El tratamiento de la disfunción endotelial actualmente utiliza el trasplante de CEC, ya sea como un trasplante corneal completo o el trasplante de la capa endotelial mediante queratoplastia endotelial con pelado de Descemet (DSEK) (Anshu y otros Survey of ophthalmology. 2012; 57(3):236-52), queratoplastia endotelial de membrana de Descemet (DMEK) (Price y otros Current opinion in ophthalmology. 2013; 24(4):329-35) o procedimientos relacionados. Incluso después del trasplante, el número de CEC en el trasplante continúa
10 disminuyendo (Patel Experimental eye research. 2012; 95(1):40-7) y a veces es necesario repetir el trasplante. El trasplante es una opción de último recurso ya que el tejido donante es escaso, la cirugía requiere un alto nivel de habilidad por parte del cirujano y existe una tasa significativa de complicaciones.

Si bien las CEC no se repueblan ni se renuevan en pacientes normales o con FD, existen pruebas de que 1) las células del endotelio corneal periférico pueden migrar centralmente (He y otros Stem cells. 2012; 30(11):2523-34) y 2) las células del endotelio corneal periférico (Mimura y otros Investigative ophthalmology & visual science. 2005; 46(10):3645-8; Yamagami y otros Ophthalmology. 2007; 114(3):433-9; Yu y otros Journal of biomedicine & biotechnology. 2011; 2011:412743) o la TM (Whikehart y otros Molecular vision 2005; 11:816-24; McGowan y otros Molecular vision 2007; 13:1984-2000) pueden contener una población progenitora (Yu y otros Journal of biomedicine & biotechnology. 2011; 2011:412743). Por lo tanto, los tratamientos que aumentan
15 la migración y proliferación de células endoteliales pueden mejorar la función de barrera en la córnea central al proporcionar células adicionales desde la periferia. Un tratamiento farmacéutico que estimula la migración y/o proliferación de CEC puede reducir el edema corneal en estos pacientes y retrasar o eliminar la necesidad de un trasplante corneal.

Las CEC son sensibles a una serie de factores de crecimiento que incluyen varios de la familia FGF. Los FGF estimulan a una familia de siete isoformas del receptor de FGF y cada FGF estimula un patrón diferente de receptores para lograr su efecto específico (Ornitz y otros The Journal of biological chemistry. 1996; 271(25): 15292-7; Zhang y otros The Journal of biological chemistry. 2006; 281(23):15694-700). El FGF-1 (también denominado FGF ácido) es único entre los FGF ya que se une y estimula a las siete isoformas del receptor de FGF (Ornitz y otros The Journal of biological chemistry. 1996; 271(25):15292-7). El FGF-1 se expresa en la
20 córnea durante el desarrollo (Lovicu y otros Current eye research. 1997; 16(3):222-30), en el adulto (Caruelle y otros Journal of cellular biochemistry. 1989; 39(2):117-28), y se encuentra en el humor acuoso (Schulz y otros Development. 1993; 118(1):117-26). Se conoce que FGF-1 estimula la migración (Lee y otros Investigative ophthalmology & visual science. 2006; 47(4):1376-86) y la proliferación en CEC bovinas (Thalman-Goetsch y otros Acta ophthalmologica Scandinavica. 1997; 75(5):490-5) y humanas (Dannowski y otros Experimental eye research. 2005; 80(1):93-101). Por lo tanto, sin limitarse a la teoría, se cree que el FGF-1 suministrado de manera exógena puede promover la migración y proliferación de las CEC *in vivo* y puede ser útil como agente terapéutico para las distrofias endoteliales.

Sin embargo, existen varios problemas que complican la realización eficaz de FGF-1 como agente terapéutico. Primero, tiene una estabilidad térmica relativamente mala en ausencia de heparina, lo que afecta negativamente su potencia y vida útil de almacenamiento, así como su semivida potencial *in vivo*. Aunque la
35 inclusión de heparina en la formulación puede aumentar la estabilidad, esta afecta negativamente la unión de FGF-1 a los heparanos tisulares. Estos son problemas críticos que afectan la eficacia y la frecuencia de administración. Además, la producción de heparina es más costosa que la de FGF-1, se deriva de cerdos (con potencial para agentes infecciosos), es naturalmente heterogénea en estructura y función y tiene actividad anticoagulante, lo que puede prevenir que se alcancen los niveles de dosis óptimos de manera segura. Además, algunos individuos son inmunológicamente sensibles a la heparina, lo que en una exposición posterior puede conducir a trombosis inducida por heparina (Prechel y otros Seminars in Thrombostasis and Hemostasis. 2012; 38:483-96).

En la presente descripción se proporcionan FGF modificados, composiciones farmacéuticas y formulaciones oftálmicas de los mismos, adecuadas para los métodos descritos en la presente descripción. En algunas realizaciones, los FGF modificados, las composiciones farmacéuticas y las formulaciones oftálmicas de los mismos son útiles para el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones oculares, tales como los del endotelio corneal, el epitelio y el estroma.

Los FGF modificados descritos en la presente descripción son particularmente ventajosos para los métodos y aplicaciones descritas en la presente descripción. Por ejemplo, los FGF modificados descritos en la presente descripción pueden administrarse sin heparina en su composición o formulación farmacéutica (*por ejemplo*, una formulación oftálmica), lo que evita problemas potenciales de seguridad relacionados con su origen biológico. Además, evitar la heparina permite el uso de dosis más altas de los FGF modificados sin complicaciones como resultado de eventos adversos locales inducidos por heparina o anticuerpos antiheparina preexistentes. Además, en ausencia de heparina, la unión inmediata del FGF modificado al tejido se maximiza y la distribución sistémica se reduce de manera significativa. Los FGF modificados descritos en la presente

descripción también tienen la ventaja de tener un secuestro local potenciado y una cinética de redistribución reducida, lo que aumenta por lo tanto la semivida de eliminación y el tiempo promedio de permanencia (MRT) en el sitio de suministro y permite reducir la frecuencia de dosificación. Esto puede ser el resultado de FGF modificados descritos en la presente descripción que tienen una mayor estabilidad (*por ejemplo* 5 termostabilidad), número reducido de tioles libres enterrados y/o aumento de la afinidad eficaz por el proteoglicano heparán sulfato (HSPG).

Cierta terminología

A menos que se defina de cualquier otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que se entiende comúnmente a la que pertenece la materia 10 reivindicada. En el caso de que exista una pluralidad de definiciones para los términos en la presente, aquellos que se encuentran en esta sección prevalecen.

Debe entenderse que la descripción general anterior y la siguiente descripción detallada son solamente ilustrativas y explicativas. En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente de cualquier otra forma. Debe señalarse que, tal como se usa en esta descripción y las 15 reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un," "uno, una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto claramente lo indique de otra manera. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique de cualquier otra forma. Además, el uso del término "que incluye" así como otras formas, tales como "incluyen", "incluye" e "incluido", no es limitante.

Los encabezamientos de sección usados en la presente descripción son sólo para propósitos de organización 20 y no se deben interpretar como limitativos de la materia descrita.

La definición de términos de química estándar puede encontrarse en trabajos de referencia, que incluyen pero sin limitarse a, Carey y Sundberg "ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY 4TH ED". Vol. A (2000) y B (2001), Plenum Press, Nueva York. A menos que se indique de otra forma, los métodos convencionales de 25 espectroscopía de masas, NMR, HPLC, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología.

A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura empleada en relación con, y los procedimientos de laboratorio y las técnicas de química analítica, química de síntesis orgánica y química de medicamentos y farmacéutica descritos en la presente descripción son los reconocidos en el campo. Pueden 30 usarse técnicas estándar de síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y suministro, y tratamiento de los pacientes. Pueden usarse técnicas estándar de ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones y técnicas de purificación pueden realizarse por ejemplo usando kits de especificaciones del fabricante o como comúnmente se realizan en la técnica o como se describen en la presente descripción. Las técnicas y procedimientos anteriores generalmente pueden realizarse de acuerdo con los métodos convencionales y como 35 se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente descripción.

Debe entenderse que los métodos y composiciones descritos en la presente descripción no se limitan a la metodología, protocolos, líneas celulares, constructos y reactivos particulares descritos en la presente descripción y como tal pueden variar. Debe entenderse además que la terminología usada en la presente 40 descripción solo tiene el propósito de describir realizaciones particulares.

Los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento" incluyen aliviar, disminuir o mejorar los síntomas de una enfermedad, trastorno o afección, prevenir síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas metabólicas subyacentes de los síntomas, inhibir la enfermedad, trastorno o afección, por ejemplo, detener el desarrollo de 45 la enfermedad, trastorno o afección, aliviar la enfermedad, trastorno o afección, causar la regresión de la enfermedad, trastorno o afección, aliviar un estado causado por la enfermedad, trastorno o afección o detener los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. Los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento" incluyen tratamientos profilácticos y/o terapéuticos.

El término "aceptable" o "farmacéuticamente aceptable", con respecto a una formulación, composición o ingrediente, se refiere a que no tiene un efecto perjudicial persistente sobre la salud general del sujeto que se 50 trata o no neutraliza la actividad biológica o las propiedades del FGF modificado descrito en la presente descripción y es relativamente no tóxico.

El término "mejora" de los síntomas de una enfermedad, trastorno o afección particular mediante la administración de un FGF modificado o composición farmacéutica particular se refiere a cualquier disminución de la gravedad, retraso en la aparición, disminución de la progresión o acortamiento de la duración, ya sea 55 permanente o temporal, duradero o transitorio que puede atribuirse o asociarse con la administración del FGF modificado o la composición farmacéutica.

El término "combinación" o "combinación farmacéutica", como se usa en la presente descripción, significa un producto que resulta de la mezcla o combinación de más de un ingrediente activo e incluye combinaciones tanto fijas como no fijas de los ingredientes activos. El término "combinación fija" significa que un ingrediente activo (por ejemplo, un FGF modificado) y un coagente se administran de manera simultánea a un paciente en forma de una entidad o dosis única. El término "combinación no fija" significa que un ingrediente activo (por ejemplo, un FGF modificado) y un coagente se administran a un paciente como entidades separadas de manera simultánea, concurrente o secuencial sin límites de tiempo intermedio específicos, en donde dicha administración proporciona niveles eficaces de los dos agentes en el cuerpo del paciente. Esto último también se aplica a las terapias de cóctel, por ejemplo, la administración de tres o más ingredientes activos.

El término "composición farmacéutica", como se usa en la presente descripción, se refiere a uno o más FGF modificados con uno o más componentes químicos adicionales, tales como portadores, estabilizantes, diluyentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o excipientes. La composición farmacéutica facilita la administración del FGF modificado a un organismo. En la técnica existen múltiples técnicas para administrar un FGF modificado que incluyen, pero sin limitarse a: tópica, oftálmica, intraocular, periocular, intravenosa, oral, aerosol, parenteral y administración.

El término "portador", como se usa en la presente descripción, se refiere a compuestos o agentes químicos relativamente no tóxicos que facilitan la incorporación de un agente de interés (por ejemplo, un FGF modificado) a células o tejidos.

El término "diluyente" se refiere a compuestos químicos que se usan para diluir el agente de interés (por ejemplo, un FGF modificado) antes del suministro. Los diluyentes también pueden usarse para estabilizar los agentes porque pueden proporcionar un entorno más estable. Las sales disueltas en soluciones tamponadas (que también pueden proporcionar control o mantenimiento del pH) se utilizan como diluyentes en la técnica, que incluyen, pero sin limitarse a, una solución salina tamponada con fosfato.

Los términos "coadministración" o similares, abarcan la administración de los agentes seleccionados (por ejemplo, un FGF modificado o composición del mismo y un coagente) a un solo paciente, y están destinados a incluir regímenes de tratamiento en los que los agentes se administran por la misma vía de administración o vías diferentes o al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

Los términos "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz", se refieren a una cantidad suficiente de un FGF modificado, un agente, una combinación o composición farmacéutica administrada descrita en la presente descripción que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección que se trata. El resultado puede ser la reducción y/o alivio de los signos, síntomas, o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Por ejemplo, una "cantidad eficaz" para usos terapéuticos es la cantidad del FGF modificado, el agente, la combinación o composición farmacéutica requerida para proporcionar un efecto farmacológico deseado, una mejora terapéutica o una disminución clínicamente significativa de los síntomas de la enfermedad sin demasiados efectos secundarios adversos. Una "cantidad eficaz" adecuada en cualquier caso individual puede determinarse usando técnicas, tales como un estudio de aumento escalonado de la dosis. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye, por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz. Se entiende que "una cantidad eficaz" puede variar de un sujeto a otro debido a la variación en el metabolismo del FGF modificado, la combinación o composición farmacéutica, la edad, el peso, el estado general del sujeto, la afección que se trata, la gravedad de la afección que se trata y el criterio del médico que prescribe. A modo de ejemplo solamente, las cantidades terapéuticamente eficaces pueden determinarse mediante experimentación habitual, que incluye, pero sin limitarse a, un ensayo clínico de aumento escalonado de la dosis.

El término "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un FGF modificado, un compuesto, un agente, una combinación o composición farmacéutica descrita en la presente descripción aplicada a un paciente que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de una enfermedad, afección o trastorno que se trata. En tales aplicaciones profilácticas, tales cantidades pueden depender del estado de salud, el peso del paciente y similares. Se considera bien dentro de la habilidad de la técnica que uno determine tales cantidades profilácticamente eficaces mediante experimentación habitual, que incluye, pero sin limitarse a, un ensayo clínico de aumento escalonado de la dosis.

El término "sujeto" o "paciente", como se usa en la presente descripción, se refiere a un animal, que es objeto de tratamiento, observación o experimentación. A modo de ejemplo solamente, un sujeto puede ser, pero no se limita a, un mamífero que incluye, pero sin limitarse a, un ser humano.

Los términos "potenciar" o "que potencia" significan aumentar o prolongar en potencia o duración un efecto deseado. A modo de ejemplo, "potenciar" el efecto de los agentes terapéuticos solos o en combinación se refiere a la capacidad de aumentar o prolongar, ya sea en potencia, duración y/o magnitud, el efecto de los agentes en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección. Cuando se usan en un paciente, las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad y curso de la enfermedad, trastorno o afección,

la terapia previa, el estado de salud del paciente y su respuesta a los fármacos, y el criterio del médico que lo trata.

El término "modular" significa interactuar con un objetivo (por ejemplo, un receptor de FGF) directa o indirectamente para alterar la actividad del objetivo, que incluye, a modo de ejemplo solamente, potenciar la actividad del objetivo, inhibir o antagonizar la actividad del objetivo, limitar la actividad del objetivo o extender la actividad del objetivo. En algunas realizaciones, los FGF modificados y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción pueden modular la actividad de uno o más objetivos respectivos (por ejemplo, uno o más receptores de FGF). En algunas realizaciones, los FGF modificados descritos en la presente descripción modulan (por ejemplo, aumentan) la actividad de uno o más receptores de FGF en una célula (por ejemplo, una célula endotelial corneal), lo que da como resultado, por ejemplo, la migración celular y/o la proliferación celular.

Como se usa en la presente descripción, el término "objetivo" se refiere a una molécula biológica (por ejemplo, una proteína o complejo proteico objetivo), tal como un receptor de FGF o una porción de una molécula biológica capaz de unirse a un agente de unión selectivo (por ejemplo, un FGF modificado) o composición farmacéutica descrita en la presente descripción. Como se usa en la presente descripción, el término "no objetivo" se refiere a una molécula biológica o una porción de una molécula biológica que no se une selectivamente a un agente de unión selectivo o composición farmacéutica descrita en la presente descripción.

El término "actividad objetivo" o "respuesta celular" se refiere a una actividad biológica capaz de modularse con un FGF modificado o cualquier respuesta celular que resulte de la unión de un FGF modificado a un receptor de FGF. Ciertas actividades objetivo y respuestas celulares ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, afinidad de unión, transducción de señales, expresión génica, migración celular, proliferación celular, diferenciación celular y mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o afección ocular.

El término "aminoácido" se refiere a las moléculas compuestas de grupos funcionales terminales de amina y ácido carboxílico con un átomo de carbono entre los grupos funcionales terminales de amina y ácido carboxílico que a veces contienen un grupo funcional de cadena lateral unido al átomo de carbono (por ejemplo, un grupo funcional metoxi, que forma el aminoácido serina). Típicamente, los aminoácidos se clasifican como naturales y no naturales. Los ejemplos de aminoácidos naturales incluyen glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, serina, treonina, cisteína, metionina, asparagina, glutamina, lisina, arginina, histidina, aspartato y glutamato, entre otros. Los ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen L-3,4-dihidroxifenilalanina, ácido 2-aminobutírico, deshidroalanina, ácido γ -carboxiglutamato, carnitina, ácido gamma aminobutírico, hidroxiprolina y selenometionina, entre otros. En el contexto de esta descripción, deberá apreciarse que los aminoácidos pueden ser el isómero óptico L o el isómero óptico D.

Factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) modificados

Las realizaciones descritas en la presente descripción se refieren a un FGF modificado o una composición farmacéutica (por ejemplo, una formulación oftálmica) que comprende un FGF modificado. Un FGF modificado, como se usa en la presente descripción, se refiere a un FGF de tipo silvestre o nativo que incluye una sustitución o mutación de residuos de aminoácidos como se reivindica. El FGF de tipo silvestre o nativo que incluye la(s) modificación(ones) puede ser FGF-1 (SEQ ID NO: 1). Los FGF estimulan a una familia de siete isoformas del receptor de FGF y cada FGF estimula un patrón diferente de receptores para lograr su efecto específico (Ornitz y otros *The Journal of biological chemistry*. 1996; 271(25):15292-7; Zhang y otros *The Journal of biological chemistry*. 2006; 281(23):15694-700).

En algunas realizaciones, el FGF modificado es un FGF-1 modificado. En algunas realizaciones, se prefiere el FGF-1 modificado ya que se une y estimula a las siete isoformas del receptor de FGF (Ornitz y otros *The Journal of biological chemistry*. 1996; 271(25):15292-7).

En algunas realizaciones, el FGF modificado es termoestable. Como se usa en la presente descripción, un FGF termoestable (por ejemplo, un FGF-1 termoestable) se refiere a un FGF que tiene una secuencia de aminoácidos modificada en relación con la secuencia de FGF de tipo silvestre que además es más estable que el FGF de tipo silvestre en las mismas condiciones. Los ejemplos de mutaciones capaces de conferir termoestabilidad a FGF (por ejemplo, FGF-1) y métodos para evaluar la termoestabilidad se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos núm. 7,790,682; 7,595,296; 7,696,171; 7,776,825; 7,659,379; 8,119,776; 8,153,770; 8,153,771; y 8,461,111; las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2011/0224404, 2013/0130983; y en Xia y otros *PloS one*. 2012; 7(11):e48210. En algunas realizaciones, la 12 y/o 134 se mutan en FGF-1 para generar un FGF-1 modificado que es termoestable.

En algunas realizaciones, el FGF modificado incluye una o más modificaciones que reducen el número de tioles reactivos (por ejemplo, cisteínas libres). Los ejemplos de tales modificaciones en FGF (por ejemplo, FGF-1) se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos núm. 5,223,483; 5,312,911; 5,409,897; 7,790,682; 7,595,296; 7,696,171; 7,776,825; 7,659,379; 8,119,776; 8,153,770; 8,153,771; y 8,461,111; las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2011/0224404 y 2013/0130983; y en Xia y otros *PloS one*.

2012; 7(11):e48210. En algunas realizaciones, la posición 83 está mutada en FGF-1 para generar un FGF-1 modificado que tiene un número reducido de tioles reactivos.

5 Los FGF modificados descritos en la presente descripción son especialmente adecuados para la aplicación en el ojo. Debido a que los FGF modificados descritos en la presente descripción pueden administrarse sin heparina exógena en la formulación para la estabilidad, estos pueden formularse y aplicarse sin heparina y, por lo tanto, son más capaces de unirse a los heparanos tisulares. Tales FGF modificados tienen una alta afinidad por los heparanos tisulares que se exponen en afecciones quirúrgicas, traumáticas o distróficas y estados patológicos y, por lo tanto, se unen al tejido enfermo en la aplicación. Además, los FGF modificados que son térmicamente más estables son adecuados para la formulación y el almacenamiento a temperatura ambiente. La estabilidad de los FGF modificados también los hace adecuados para la administración tanto en solución (por ejemplo, liberación inmediata) como en formulaciones de liberación sostenida.

10 Los FGF modificados descritos en la presente descripción también son especialmente adecuados para la aplicación a la regeneración de tejidos sin la conversión de las células proliferantes en fibroblastos o la inducción de un fenotipo fibroblástico o miofibroblástico (transición de epitelio o endotelio a mesénquima o EMT) o formación de cicatrices. Se conoce que FGF-1 inhibe la EMT (ver, por ejemplo, Ramos y otros, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 299:L222-L231). Debido a que los FGF modificados se estabilizan y tienen semividas más largas, estos pueden proporcionar una supresión potente y consistente de la EMT. Además, ciertos eFGF son particularmente potentes para suprimir la transición fibroblástica.

15 Los FGF modificados para el uso en las composiciones y métodos descritos en la presente descripción pueden ser cualquier FGF modificado conocido en la técnica o descrito en la presente descripción que sea termoestable, comprenda un número reducido de tioles reactivos y/o permanezca biológicamente activo cuando se administra sin heparina según lo medido por cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica o descrito en la presente descripción.

20 En algunas realizaciones, el FGF modificado es cualquiera de las proteínas FGF-1 modificadas descritas en las patentes de Estados Unidos núm. 7,790,682; 7,595,296; 7,696,171; 7,776,825; 7,659,379; 8,119,776; 8,153,770; 8,153,771; y 8,461,111; las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2011/0224404 y 2013/0130983; y en Xia y otros *PloS one*. 2012; 7(11):e48210. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado es un FGF-1 de tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) que se ha modificado en las posiciones 12, 117 y/o 134, por ejemplo, con Val, Thr, Cys, Ala. En ejemplos no reivindicados, las posiciones de aminoácidos se sustituyen, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido para conferir mayor termoestabilidad, reducir el número de tioles reactivos, crear enlaces disulfuro entre aminoácidos modificados y aminoácidos de tipo silvestre o crear enlaces disulfuro entre dos aminoácidos modificados. En algunas realizaciones, el FGF modificado comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el FGF modificado es un FGF-1 de tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) que se ha modificado en las posiciones 16, 66 y 117, por ejemplo, con Val, Thr, Cys, Ala. En algunas realizaciones, las posiciones de aminoácidos se sustituyen, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido para conferir mayor termoestabilidad, reducir el número de tioles reactivos, crear enlaces disulfuro entre aminoácidos modificados y aminoácidos de tipo silvestre o crear enlaces disulfuro entre dos aminoácidos modificados. En algunas realizaciones, el FGF modificado comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el FGF modificado es un FGF-1 de tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) que se ha modificado en las posiciones 16, 66 y 117 y 12 y/o 134, por ejemplo, con Val, Thr, Cys, Ala. En algunas realizaciones, las posiciones de aminoácidos se sustituyen, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido para conferir mayor termoestabilidad, reducir el número de tioles reactivos, crear enlaces disulfuro entre aminoácidos modificados y aminoácidos de tipo silvestre o crear enlaces disulfuro entre dos aminoácidos modificados. En algunas realizaciones, el FGF modificado comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

25 En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado es una proteína FGF de tipo silvestre humana modificada en la posición 12, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En algunas realizaciones, el FGF modificado es una proteína FGF de tipo silvestre humana que incluye la mutación Lys12Val. En algunas realizaciones, el FGF modificado es una proteína FGF de tipo silvestre humana modificada en la posición 16, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En algunas realizaciones, el FGF modificado es una proteína FGF de tipo silvestre humana que incluye la mutación Pro134Val. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado es una proteína FGF de tipo silvestre humana modificada en la posición 66, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En algunas realizaciones, el FGF modificado es la proteína FGF de tipo silvestre humana que incluye la mutación Ala66Cys. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado es una proteína FGF de tipo silvestre humana modificada en la posición 117, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En algunas realizaciones, el FGF modificado es una proteína FGF de tipo silvestre humana que incluye la mutación Cys117Val. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado es una proteína FGF de tipo silvestre humana modificada en la posición 134, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En algunas realizaciones, el FGF modificado es una proteína FGF de tipo silvestre humana que incluye la mutación Pro134Val. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado es una proteína FGF de tipo silvestre humana modificada en una o más posiciones 12, 117 y 134. En algunas realizaciones, el FGF

modificado es una proteína FGF de tipo silvestre humana que incluye las mutaciones Lys12Val, Cys117Val y Pro134Val. En algunas realizaciones, el FGF modificado es una proteína FGF de tipo silvestre humana modificada en una o más posiciones 16, 66 y 117. En algunas realizaciones, el FGF modificado es una proteína FGF de tipo silvestre humana con las mutaciones Pro134Val, Ala66Cys y Cys117Val. En algunas realizaciones, el FGF modificado es una proteína FGF de tipo silvestre humana modificada en las posiciones 16, 66, 117 y 12 y/o 134. En algunas realizaciones, el FGF modificado es una proteína FGF de tipo silvestre humana con las mutaciones Lys12Val, Pro134Val, Ala66Cys, Cys117Val y Pro134Val. En algunas realizaciones, el FGF modificado es un FGF-1 de tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) que se ha modificado en las posiciones 12, 16, 66, 117 y/o 134. Las posiciones de aminoácidos pueden sustituirse, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido para conferir mayor termoestabilidad, reducir el número de tioles reactivos, crear enlaces disulfuro entre aminoácidos modificados y aminoácidos de tipo silvestre o crear enlaces disulfuro entre dos aminoácidos modificados. En algunas realizaciones, el FGF modificado comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado es un FGF-1 de tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) que se ha modificado en la posición 12, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 12 se modifica adicionalmente en la posición 16, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 12 se modifica adicionalmente en la posición 66, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 12 se modifica adicionalmente en la posición 117, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 12 se modifica adicionalmente en la posición 134, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 12 y la posición 16 se modifica adicionalmente en la posición 66, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 12 y la posición 16 se modifica adicionalmente en la posición 117, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 12 y la posición 16 se modifica adicionalmente en la posición 134, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En algunas realizaciones, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 12, 16 y 66 se modifica adicionalmente en la posición 117, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 12, 16 y 66 se modifica adicionalmente en la posición 134, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En algunas realizaciones, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 12, 16, 66 y 117 se modifica adicionalmente en la posición 134, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 12 y la posición 66 se modifica adicionalmente en la posición 117, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 12 y la posición 66 se modifica adicionalmente en la posición 134, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 12 y la posición 117 se modifica adicionalmente en la posición 134, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido.

En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado es un FGF-1 de tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) que se ha modificado en la posición 16, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 16 se modifica adicionalmente en la posición 66, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 16 se modifica adicionalmente en la posición 117, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 16 se modifica adicionalmente en la posición 134, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En algunas realizaciones, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 16 y la posición 66 se modifica adicionalmente en la posición 117, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 16 y la posición 66 se modifica adicionalmente en la posición 134, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En algunas realizaciones, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 16, 66 y 117 se modifica adicionalmente en la posición 134, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 16 y la posición 117 se modifica adicionalmente en la posición 134, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido.

En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado es un FGF-1 de tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) que se ha modificado en la posición 66, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 66 se modifica adicionalmente en la posición 117, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 66 se modifica adicionalmente en la posición 134, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 66 y la posición 117 se modifica adicionalmente en la posición 134, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido.

En algunas realizaciones, la numeración de los residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO: 4 se basa en la nomenclatura de numeración de 140 aminoácidos para FGF-1.

5 En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado es un FGF-1 de tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) que se ha modificado en la posición 117, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado que se ha modificado en la posición 117 se modifica adicionalmente en la posición 134, por ejemplo, con Val, Ser, Thr, Cys, Ala u otro aminoácido.

10 En algunas realizaciones, la secuencia del FGF modificado comprende 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el FGF-1 humano de tipo silvestre. En algunas realizaciones, el FGF modificado comprende la secuencia de FGF-1 humano de tipo silvestre con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo N-terminal. En algunas realizaciones, el FGF modificado comprende la secuencia de FGF-1 humano de tipo silvestre con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo C-terminal. En algunas realizaciones, la secuencia del FGF modificado comprende 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el FGF modificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo N-terminal. En algunas realizaciones, el FGF modificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo C-terminal.

30 En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado comprende 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el FGF-1 humano de tipo silvestre mutado en la posición 12, por ejemplo, con la mutación Lys12Val. En ejemplos no reivindicados, la secuencia del FGF modificado comprende 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 mutada en la posición 12, por ejemplo, con la mutación Lys12Val. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado comprende la secuencia de FGF-1 humano de tipo silvestre con una mutación en la posición 12, por ejemplo, la mutación Lys12Val, y con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo N-terminal. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 con una mutación en la posición 12, por ejemplo, la mutación Lys12Val, y con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo C-terminal.

45 En ejemplos no reivindicados, la secuencia del FGF modificado comprende 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el FGF-1 humano de tipo silvestre mutado en la posición 16, por ejemplo, con la mutación Cys16Ser. En ejemplos no reivindicados, la secuencia del FGF modificado comprende 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 mutada en la posición 16, por ejemplo, con la mutación Cys16Ser. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado comprende la secuencia de FGF-1 humano de tipo silvestre con una mutación en la posición 12, por ejemplo, la mutación Cys16Ser, y con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo N-terminal. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 con una mutación en la posición 12, por ejemplo, la mutación Cys16Ser, y con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo C-terminal.

60 En ejemplos no reivindicados, la secuencia del FGF modificado comprende 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el FGF-1 humano de tipo silvestre mutado en la posición 66, por ejemplo, con la mutación Ala66Cys. En ejemplos no reivindicados, la secuencia del FGF modificado comprende 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 mutada en la posición 66, por ejemplo, con la mutación Ala66Cys. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado comprende la secuencia

de FGF-1 humano de tipo silvestre con una mutación en la posición 12, por ejemplo, la mutación Ala66Cys, y con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo N-terminal. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado comprende la

5 secuencia de SEQ ID NO: 1 con una mutación en la posición 12, por ejemplo, la mutación Ala66Cys, y con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo C-terminal.

En ejemplos no reivindicados, la secuencia del FGF modificado comprende 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el FGF-1 humano de tipo silvestre mutado en la posición 117, por ejemplo, con la mutación Cys117Val. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado comprende 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 mutada en la

10 posición 117, por ejemplo, con la mutación Cys117Val. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado comprende la secuencia de FGF-1 humano de tipo silvestre con una mutación en la posición 12, por ejemplo, la mutación Cys117Val, y con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo N-terminal. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 con una mutación en la posición

15 12, por ejemplo, la mutación Cys117Val y con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo C-terminal.

En ejemplos no reivindicados, la secuencia del FGF modificado comprende 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el FGF-1 humano de tipo silvestre mutado en la posición 134, por ejemplo, con la mutación Pro134Val. En ejemplos no reivindicados, la secuencia del FGF modificado comprende 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 mutada en la posición 134,

25 por ejemplo, con la mutación Pro134Val. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado comprende la secuencia de FGF-1 humano de tipo silvestre con una mutación en la posición 12, por ejemplo, la mutación Pro134Val, y con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo N-terminal. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 con una mutación en la posición 12, por ejemplo, la mutación Pro134Val, y con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo C-terminal.

30

En ejemplos no reivindicados, la secuencia del FGF modificado comprende 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el FGF-1 humano de tipo silvestre mutado en una o más posiciones 12, 117 y 134, por ejemplo, con las mutaciones Lys12Val, Cys117Val y Pro134Val. En ejemplos no reivindicados, la secuencia del FGF modificado comprende 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 mutada en una o más posiciones 12, 117 y 134, por ejemplo, con las mutaciones Lys12Val, Cys117Val y Pro134Val. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado comprende la secuencia de FGF-1 humano de tipo silvestre con una mutación en las posiciones 12, 117 y 134, por ejemplo, las mutaciones Lys12Val, Cys117Val y Pro134Val, y con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo N-terminal. En ejemplos no reivindicados, el FGF modificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 con mutaciones en las posiciones 12, 117 y 134, por ejemplo, las mutaciones Lys12Val, Cys117Val y Pro134Val, y con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del

40 extremo C-terminal.

45

50

En algunas realizaciones, la secuencia del FGF modificado comprende 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con las posiciones mutadas 16, 66 y 117 del FGF-1 humano de tipo silvestre con, por ejemplo, con las mutaciones Cys16Ser, Ala66Cys y Cys117Val. En algunas realizaciones, la secuencia del FGF modificado comprende 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 mutada en una o más posiciones 16, 66 y 117, por ejemplo, con las mutaciones Cys16Ser, Ala66Cys y Cys117Val. En algunas realizaciones, el FGF modificado comprende la secuencia de FGF-1 humano de tipo silvestre con una

60

mutación en las posiciones 16, 66 y 117, por ejemplo las mutaciones Cys16Ser, Ala66Cys y Cys117Val, y con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo N-terminal. En algunas realizaciones, el FGF modificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 con mutaciones en las posiciones 16, 66 y 117, por ejemplo, las mutaciones Cys16Ser, Ala66Cys y Cys117Val, y con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo C-terminal.

En algunas realizaciones, la secuencia del FGF modificado comprende 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el FGF-1 humano de tipo silvestre mutado en una o más posiciones 12, 16, 66, 117 y 134, por ejemplo, con las mutaciones Lys12Val, Cys16Ser, Ala66Cys, Cys117Val, Pro134Val. En algunas realizaciones, la secuencia del FGF modificado comprende 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 en una o más posiciones 12, 16, 66, 117 y 134, por ejemplo, con las mutaciones Lys12Val, Cys16Ser, Ala66Cys, Cys117Val, Pro134Val. En algunas realizaciones, el FGF modificado comprende la secuencia de FGF-1 humano de tipo silvestre con una mutación en las posiciones 12, 16, 66, 117 y 134, por ejemplo, las mutaciones Lys12Val, Cys16Ser, Ala66Cys, Cys117Val, Pro134Val y con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo N-terminal. En algunas realizaciones, el FGF modificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 con mutaciones en las posiciones 12, 16, 66, 117 y 134, por ejemplo, las mutaciones Lys12Val, Cys16Ser, Ala66Cys, Cys117Val, Pro134Val y con aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 residuos eliminados del extremo C-terminal.

En algunas realizaciones, el péptido señal se elimina del FGF modificado. En algunas realizaciones, el péptido señal no se elimina del FGF modificado.

En algunas realizaciones, los FGF modificados o las composiciones descritas en la presente descripción pueden prepararse como profármacos. Un "profármaco" se refiere a un agente que se convierte en el fármaco original *in vivo*. Los profármacos son a menudo útiles porque, en algunas situaciones, son más fáciles de administrar que el fármaco original. Éstos pueden, por ejemplo, ser biodisponibles por administración oral mientras que el fármaco original no. El profármaco puede tener, además, solubilidad mejorada en composiciones farmacéuticas sobre el fármaco madre.

Los FGF modificados descritos en la presente descripción pueden etiquetarse isotópicamente (por ejemplo, con un radioisótopo) o por otros medios, que incluyen, pero sin limitarse a, el uso de cromóforos o restos fluorescentes, etiquetas bioluminiscentes, etiquetas fotoactivables o quimioluminiscentes.

En ejemplos no reivindicados, la síntesis de los FGFF modificados descritos en la presente descripción se realiza usando los medios descritos en la técnica, usando los métodos descritos en la presente descripción o mediante una combinación de los mismos.

Secuencias

La SEQ ID NO: 1 es la siguiente:

**FNLPPGNYKKPKLLYCSNNGGHFLRILPDGTVDGTRDRSDQHIQLQLSAESVGEVYIKSTE
TGQYLAMDTDGLLYGSQTPNEECLFLERLEENHYNTYISKKHAEKNWFVGLKKNNGSC
KRGPRTHYGQKAILFLPLPVSSD**

La SEQ ID NO: 2 es la siguiente:

**FNLPPGNYKKPVLLYCSNNGGHFLRILPDGTVDGTRDRSDQHIQLQLSAESVGEVYIKSTE
TGQYLAMDTDGLLYGSQTPNEECLFLERLEENHYNTYISKKHAEKNWFVGLKKNNGSV
KRGPRTHYGQKAILFLVLPVSSD**

La SEQ ID NO: 3 es la siguiente:

FNLPPGNYKKPKLLYSSNNGGHFLRILPDGTVDGTRDRSDQHIQLQLSAESVGEVYIKSTE

TGQYLCMDTDGLLYGSQTPNEECLFLERLEENHYNTYISKKHAEKNWVGLKKNQSV
KRGPRTHYGQKAILFLPLPVSSD

La SEQ ID NO: 4 es la siguiente:

FNLPPGNYKKPVLLYSSNGGHFLRILPDGTVDGTRDRSDQHIQLLSAESVGEVYIKSTE
TGQYLCMDTDGLLYGSQTPNEECLFLERLEENHYNTYISKKHAEKNWVGLKKNQSV
KRGPRTHYGQKAILFLVLPVSSD

Métodos de uso

- 5 Se proporciona en este documento FGF-1 modificado según se reivindica para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o afección ocular de la córnea o la superficie ocular.
- En algunas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección ocular a tratar es una enfermedad, trastorno o afección de la capa endotelial corneal. Las enfermedades, trastornos o afecciones de la capa endotelial corneal incluyen, pero no se limitan a, distrofia de Fuch, queratopatía ampollar, distrofia endotelial hereditaria congénita 1, distrofia endotelial hereditaria congénita 2, distrofia corneal polimorfa posterior y síndrome del ojo seco.
- 10 Sin limitarse a la teoría, se cree que una solución de un FGF modificado inyectada por vía intracamerar en el humor acuoso del ojo se une a la superficie endotelial y especialmente a cualquier área de la córnea que no esté cubierta por una capa endotelial sana. El FGF modificado estimula el crecimiento y la migración de las células endoteliales. Esto reduce el edema corneal asociado con la distrofia endotelial y reduce la probabilidad de que se necesite un trasplante corneal o endotelial. La acción del FGF modificado puede ocurrir en un sitio distinto al sitio de mayor distrofia (típicamente en el centro de la córnea) y también da como resultado la estimulación de las células endoteliales en la periferia corneal y los grupos de progenitores endoteliales en la malla trabecular (TM).
- 15 En algunas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección ocular a tratar es una enfermedad, trastorno o afección del epitelio corneal. Las enfermedades, trastornos o afecciones del epitelio corneal incluyen, pero no se limitan a, síndrome del ojo seco, afecciones inflamatorias tales como el síndrome de Stevens-Johnson y defectos epiteliales corneales.
- 20 En realizaciones adicionales, los FGF modificados descritos en la presente descripción pueden ser para uso en tratar la distrofia de la membrana basal epitelial, la distrofia corneal epitelial juvenil de Meesmann, la distrofia corneal en forma de gota gelatinosa, la distrofia corneal epitelial de Lisch, la distrofia corneal mucinosa subepitelial, la distrofia corneal de Reis-Bucklers o la distrofia de Thiel-Behnke y erosiones corneales recurrentes.
- 25 En algunas realizaciones, la afección ocular incluye daño a la córnea (por ejemplo, la superficie corneal o la capa endotelial en la interfaz de la córnea y el humor acuoso) o ruptura quirúrgica causada por cirugías corneales, que incluyen PRK, LASIK y cualquier cirugía corneal o queratoplastia penetrante.
- 30 En algunas realizaciones, la afección ocular incluye trauma accidental o lesión química o térmica en la córnea. En algunas realizaciones, la afección ocular comprende queratopatía por gas mostaza.
- En algunas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección ocular a tratar es una enfermedad, trastorno o afección del estroma corneal. Las enfermedades, trastornos o afecciones del estroma corneal incluyen, pero no se limitan a, queratocono, distrofia corneal reticular, distrofia corneal granular, distrofia corneal macular, distrofia corneal cristalina de Schnyder, distrofia corneal estromal congénita, distrofia corneal moteada, trauma o lesión química o térmica, o lesión secundaria a infecciones tales como tracoma.
- 35 Los FGF modificados descritos en la presente descripción pueden aplicarse antes, durante o después de los procedimientos de trasplante corneal (por ejemplo, trasplante corneal o procedimientos que involucran la membrana de Descemet) que involucran la ruptura de la córnea (por ejemplo, estructura endotelial corneal) donde la aceleración de la cicatrización de las células de la superficie corneal u ocular y/o de la mejora de la respuesta celular (por ejemplo, mediante el aumento de la viabilidad y/o la longevidad de las células trasplantadas) al insulto daría como resultado un beneficio terapéutico.
- 40 Los FGF modificados descritos en la presente descripción pueden usarse para aumentar la viabilidad y la salud de las células corneales o los progenitores corneales que se preparan para el trasplante. Los FGF modificados añadidos al medio de cultivo de órganos para las córneas donadas u otro tejido corneal donado estimulan las células corneales y aumentan el período de tiempo que las córneas pueden almacenarse antes del trasplante, así como aumentan la probabilidad de que una córnea tenga suficientes células sanas para que sea útil para el trasplante. Además, los FGF modificados pueden usarse en medios de cultivo cuando se cultivan células progenitoras corneales para estimular el crecimiento de esas células.
- 45
- 50

Ejemplos no reivindicados adicionales se refieren a métodos para modular la actividad de uno o más receptores de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) en una célula endotelial corneal que comprenden poner en contacto dicha célula endotelial corneal con un FGF modificado (por ejemplo, un FGF-1 modificado, tal como uno que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o una combinación de las mismas). Tales métodos pueden usarse para aumentar o estimular la actividad de uno o más FGFR, lo que puede dar como resultado un aumento de la migración celular y/o la proliferación celular.

En algunas realizaciones, uno o más FGF modificados (por ejemplo, un FGF modificado que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2, un FGF modificado que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 o un FGF modificado que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4) se usan para inducir la regeneración o la cicatrización de tejidos sin EMT o cicatrices. En algunas realizaciones, los FGF modificados descritos en la presente descripción FGFs (por ejemplo, un FGF modificado que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2, un FGF modificado que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 o un FGF modificado que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4) se usan para disminuir la cantidad de cicatrices asociadas con el proceso de cicatrización. En algunas realizaciones, los FGF modificados (por ejemplo, un FGF modificado que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2, un FGF modificado que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 o un FGF modificado que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4) se aplican a incisiones quirúrgicas para reducir la cantidad de cicatrices formadas. Esto es particularmente útil cuando la respuesta cicatricial da como resultado una disminución de la función del tejido, por ejemplo, en procedimientos de trabeculectomía donde las cicatrices del tejido conducen al bloqueo del canal de drenaje creado por la trabeculectomía. Esto también es útil cuando la formación de tejido cicatricial es estéticamente no deseable, tal como en incisiones quirúrgicas en la piel.

Composiciones farmacéuticas, métodos de administración y dosificación

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un FGF modificado descrito en la presente descripción pueden formularse de una manera convencional usando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que incluyen excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación propia depende de la ruta de administración escogida. Detalles adicionales sobre excipientes adecuados para las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción pueden encontrarse, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Decimonovena Ed. (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H.A. y Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nueva York, N.Y., 1980; y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Séptima Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999).

Una composición farmacéutica, como se usa en la presente descripción, se refiere a una mezcla de un FGF modificado con otros componentes químicos, tales como portadores, estabilizantes, diluyentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o excipientes y, opcionalmente, otros ingredientes profilácticos y/o terapéuticos. La composición farmacéutica facilita la administración del FGF modificado a un organismo. Al llevar a la práctica los métodos de tratamiento o uso proporcionados en la presente descripción, cantidades terapéuticamente eficaces de los FGF modificados descritos en la presente descripción se administran en una composición farmacéutica a un mamífero que tiene una enfermedad, trastorno o afección ocular a tratar. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar ampliamente en dependencia de la gravedad de la enfermedad, la edad y la salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto usado y otros factores. Una composición farmacéuticamente aceptable o adecuada incluye una composición adecuada o aceptable para uso oftalmológico.

Una composición farmacéutica (*por ejemplo*, para el suministro por inyección o para la aplicación como un colirio) puede estar en forma de líquido o sólido. Una composición farmacéutica líquida puede incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con citrato, aceites fijos que pueden servir como solvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes; agentes antibacterianos; antioxidantes; agentes quelantes; tampones y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. Una preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico. La solución salina fisiológica se usa comúnmente como excipiente y una composición farmacéutica inyectable o una composición que se suministra por vía ocular es preferentemente estéril.

Un FGF modificado o una composición farmacéutica descrita en la presente descripción puede suministrarse a un sujeto por cualquier medio adecuado, que incluye, por ejemplo, administración tópica, intraocular, intracameral, oral, parenteral, intravenosa, intraperitoneal, intranasal (u otros métodos de suministro a las membranas mucosas, por ejemplo, de la nariz, la garganta y los bronquios) o local en el ojo, o mediante un dispositivo intraocular o periocular. Los modos de administración local pueden incluir, por ejemplo, aplicación tópica, colirios, inyección intraocular o inyección periocular. La inyección periocular típicamente involucra la inyección del compuesto debajo de la conjuntiva o en el espacio de Tenon (debajo del tejido fibroso que recubre el ojo). La inyección intraocular típicamente involucra la inyección del FGF modificado o la composición

farmacéutica en el humor vítreo o acuoso humano. En ciertas realizaciones, la administración es no invasiva, tal como por aplicación tópica o colirios.

5 Un FGF modificado o una composición farmacéutica descrita en la presente descripción puede formularse para la administración usando portadores o vehículos farmacéuticamente aceptables (adecuados) así como técnicas usadas habitualmente en la técnica. Un portador farmacéuticamente aceptable o adecuado incluye un portador adecuado o aceptable para uso oftalmológico. Un portador se selecciona de acuerdo con la solubilidad del FGF modificado particular. Las composiciones y formulaciones oftalmológicas adecuadas incluyen aquellas que pueden administrarse localmente en el ojo, tal como mediante colirios, inyección. En el caso de los colirios, la formulación también puede incluir opcionalmente, por ejemplo, agentes compatibles con el uso oftalmológico
10 tales como agentes de isotonicidad tales como cloruro de sodio, glicerina concentrada; agentes tamponantes tales como fosfato de sodio, acetato de sodio y similares; tensioactivos, tales como monooleato de polioxietileno sorbitán (también denominado polisorbato 80), estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado polioxietileno; agentes de estabilización tales como citrato de sodio, edentato de sodio y similares; conservantes tales como cloruro de benzalconio, parabenos; y otros ingredientes. Los conservantes se pueden emplear, por ejemplo, a un nivel de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 1.0 % peso/volumen. El pH de la formulación está, por lo general, dentro del intervalo aceptable para las formulaciones oftalmológicas, tal como dentro del intervalo de pH de aproximadamente 4 a 8.

20 Para inyección, el FGF modificado o la composición farmacéutica puede proporcionarse en una solución salina de grado inyectable, en forma de una solución de liposomas inyectable, un sistema de polímero de liberación lenta. Las inyecciones intraoculares y perioculares son conocidas por los expertos en la técnica y se describen en numerosas publicaciones que incluyen, por ejemplo, Spaeth, Ed., *Ophthalmic Surgery: Principles of Practice*, W. B. Sanders Co., Filadelfia, Pa., 85-87, 1990.

25 En algunas realizaciones, el FGF modificado o la composición farmacéutica (por ejemplo, una formulación oftálmica) se administra mediante microagujas en la córnea (Jiang y otros (2007). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(9): 4038-4043). Una matriz de microagujas se recubre con el FGF modificado o la composición farmacéutica y se presiona contra la córnea de modo que las microagujas penetren en el estroma corneal pero no penetren en toda la córnea. Después se retira y el FGF modificado o la composición farmacéutica se deja en el estroma corneal. Este FGF modificado o composición farmacéutica puede estimular la proliferación y migración de las células corneales y suprime la respuesta cicatricial que normalmente tienen las células estromales.

30 Para el suministro de una composición que comprende al menos uno de los FGF modificados descritos en la presente descripción mediante una vía mucosal, que incluye el suministro a las fosas nasales, la garganta y las vías respiratorias, la composición puede suministrarse en forma de un aerosol. El compuesto puede estar en forma líquida o en polvo para el suministro intramucosal. Por ejemplo, la composición puede suministrarse mediante un recipiente de aerosol presurizado con un propulsor adecuado, tal como un propulsor de hidrocaburo (*por ejemplo*, propano, butano, isobuteno). La composición puede suministrarse mediante un sistema de suministro no presurizado tal como un nebulizador o atomizador.

40 Las formas de dosificación oral adecuadas incluyen, por ejemplo, tabletas, píldoras, bolsitas o cápsulas de gelatina dura o blanda, metilcelulosa u otro material adecuado que se disuelve fácilmente en el tracto digestivo. Se pueden usar portadores sólidos no tóxicos que incluyen, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio. (*Ver, por ejemplo*, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (Gennaro, 21ra Ed. Mack Pub. Co., Easton, PA (2005)).

45 Los FGF modificados o las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción pueden formularse para la liberación sostenida o lenta. Generalmente tales composiciones pueden prepararse usando tecnología bien conocida y administrarse, por ejemplo, mediante implantación periocular, intraocular, rectal, oral o subcutánea, o mediante implantación en el sitio objetivo deseado o mediante aplicación tópica. Las formulaciones de liberación sostenida pueden contener un agente disperso en una matriz portadora y/o contenido dentro de un depósito rodeado por una membrana de control de la velocidad. Los excipientes para su uso dentro de tales formulaciones son biocompatibles y además pueden ser biodegradables; preferentemente la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación de componente activo. La cantidad de compuesto activo contenido dentro de una formulación de liberación sostenida depende del sitio de implantación, la velocidad y la duración esperada de la liberación y la naturaleza de la afección a tratar o prevenir.

55 Los expertos en la técnica conocen la absorción farmacológica sistémica de un fármaco o una composición administrada por vía ocular (*ver, por ejemplo*, Lee y otros, *Int. J. Pharm.* 233:1-18 (2002)). En una realización, un compuesto descrito en la presente descripción se suministra mediante un método de suministro ocular tópico (*ver, por ejemplo*, *Curr. Drug Metab.* 4:213-22 (2003)). La composición puede estar en forma de colirio, bálsamo o ungüento, tal como colirios acuosos, suspensiones oftálmicas acuosas, colirios no acuosos y suspensiones oftálmicas no acuosas, geles, ungüentos oftálmicos, etcétera. Para preparar un gel, por ejemplo, puede usarse

polímero de carboxivinilo, metilcelulosa, alginato de sodio, hidroxipropilcelulosa, polímero de anhídrido maleico de etileno y similares.

5 En otra realización, la solución o composición farmacéutica de FGF modificado (por ejemplo, una formulación oftálmica) contiene ácido hialurónico, carboximetilcelulosa u otros polisacáridos que proporcionan una mayor tolerabilidad ocular, viscosidad y osmolalidad para producir una solución ocular cómoda.

10 La dosis del FGF modificado o la composición farmacéutica que comprende al menos uno de los FGF modificados descritos en la presente descripción puede diferir, en dependencia del estado del paciente (*por ejemplo*, un ser humano), es decir, la etapa de la enfermedad, trastorno o afección ocular, el estado de salud general, la edad y otros factores que un experto en la técnica médica usará para determinar la dosis. Cuando la composición se usa como colirio, por ejemplo, puede aplicarse de una a varias gotas por dosis unitaria, preferentemente 1 o 2 gotas (aproximadamente 50 µl por 1 gota) aproximadamente 1 a aproximadamente 6 veces al día.

15 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de una manera adecuada a la enfermedad, trastorno o afección ocular a tratar (o prevenir) según lo determinen los expertos en las técnicas médicas. Una dosis adecuada y una duración y frecuencia de administración adecuadas se determinarán mediante factores tales como el estado del paciente, el tipo y la gravedad de la enfermedad, trastorno o afección del paciente, la forma particular del ingrediente activo y el método de administración. En general, un régimen de dosis y tratamiento adecuado proporciona la(s) composición(es) en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico y/o profiláctico (*por ejemplo*, un resultado clínico mejorado, tal como remisiones completas o
20 parciales más frecuentes o una ausencia más larga de la enfermedad o una disminución de la gravedad de los síntomas. Para el uso profiláctico, una dosis debe ser suficiente para prevenir, retrasar la aparición o disminuir la gravedad de una enfermedad, trastorno o afección ocular. Las dosis óptimas generalmente pueden determinarse usando modelos experimentales y/o ensayos clínicos. La dosis óptima puede depender de la masa corporal, el peso o el volumen de sangre del paciente.

25 Las dosis de los FGF modificados o las composiciones farmacéuticas pueden seleccionarse adecuadamente en dependencia del estado clínico, la afección y la edad del sujeto, la forma de dosificación y similares. En el caso de los colirios, un FGF modificado descrito en la presente descripción puede administrarse, por ejemplo, de aproximadamente 1 pg/ml a aproximadamente 100 mg/ml de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 100 mg/ml del FGF modificado de una a siete veces por semana. En el caso de la inyección intracameral, un FGF modificado descrito en la presente descripción puede administrarse aproximadamente una vez al mes, aproximadamente una vez cada dos meses, aproximadamente una vez cada tres meses, aproximadamente una vez cada cuatro meses, aproximadamente una vez cada cinco meses, aproximadamente una vez cada seis meses, aproximadamente una vez cada siete meses, aproximadamente una vez cada ocho meses, aproximadamente una vez cada nueve meses, aproximadamente una vez cada diez meses, aproximadamente una vez cada once meses o aproximadamente una vez cada doce meses. En el caso de la administración
30 tópica, un FGF modificado descrito en la presente descripción puede administrarse, aproximadamente una vez al día, aproximadamente dos veces al día, aproximadamente tres veces al día, aproximadamente una vez cada dos días, aproximadamente una vez cada tres días, aproximadamente una vez cada cuatro días, aproximadamente una vez cada cinco días, aproximadamente una vez cada seis días o aproximadamente una vez por semana.

35 También se proporcionan pero no se reivindican métodos para fabricar los FGF modificados y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción. Una composición que comprende un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable y al menos uno de los FGF modificados descritos en la presente descripción puede prepararse mediante la síntesis del FGF modificado de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción o practicados en la técnica y después la formulación del compuesto con un portador farmacéuticamente aceptable. La formulación de la composición será adecuada y dependerá de varios factores, que incluyen la vía de suministro, la dosis y la estabilidad del compuesto.

40 Al menos un FGF modificado descrito en la presente descripción puede administrarse a seres humanos u otros vertebrados no humanos. En ciertas realizaciones, el FGF modificado es sustancialmente puro, ya que contiene menos de aproximadamente 5 % o menos de aproximadamente 1 %, o menos de aproximadamente 0,1 %, de otras moléculas orgánicas, tales como productos intermedios contaminantes o subproductos que se crean, por ejemplo, en una o más de las etapas de un método de síntesis. En otras realizaciones, puede administrarse una combinación de uno o más FGF modificados descritos en la presente descripción.

45 Las composiciones descritas en la presente descripción pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que ya padece una enfermedad, trastorno o afección, en una cantidad suficiente para curar o detener al menos parcialmente los síntomas de la enfermedad o afección. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad y curso de la enfermedad o afección, la terapia previa, el estado de salud, el peso y la respuesta del paciente a los fármacos, y el criterio del médico que lo trata.

En las aplicaciones profilácticas, las composiciones descritas en la presente descripción se administran a un paciente susceptible a o de cualquier otra forma en riesgo de una enfermedad, trastorno o afección particular. Dicha cantidad se define como una "dosis o cantidad profilácticamente eficaz". En este uso, las cantidades precisas dependerán además del peso y estado de salud del paciente, y similares.

5 En el caso en donde el estado del paciente no mejora, a criterio del doctor la administración de las composiciones puede administrarse crónicamente, es decir, por un período de tiempo prolongado, que incluye a lo largo de la duración de la vida del paciente para mejorar o de cualquier otra forma controlar o limitar los síntomas de la enfermedad o afección del paciente.

10 En el caso en donde el estado del paciente no mejora, a criterio del doctor la administración de las composiciones puede administrarse de forma continua; alternativamente, la dosis del fármaco que se administra puede reducirse temporalmente o suspenderse temporalmente durante cierto período de tiempo (es decir, un "descanso del fármaco").

15 Una vez que ha ocurrido una mejora en el estado del paciente, se administra una dosis de mantenimiento, si es necesario. Posteriormente, la dosis o la frecuencia de administración, o ambas, pueden reducirse, en función de los síntomas, a un nivel en el que se mantiene la mejora de la enfermedad, trastorno o afección. Sin embargo, los pacientes pueden requerir tratamiento intermitente a largo plazo tras cualquier reaparición de los síntomas.

20 La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una dosis única o como dosis divididas administradas de manera simultánea (o durante un período de tiempo corto) o a intervalos adecuados, por ejemplo como dos, tres, cuatro o más subdosis al día.

25 La composición farmacéutica descrita en la presente descripción puede estar en formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración individual de dosificaciones precisas. En la forma de dosificación unitaria, la formulación se divide en dosis unitarias que contienen cantidades adecuadas de uno o más FGF modificados. La dosis unitaria puede estar en forma de un envase que contiene cantidades discretas de la formulación. Los ejemplos se empaquetan en tabletas o cápsulas, y polvos en viales o ampollas. Las composiciones en suspensión acuosa pueden envasarse en recipientes de dosis única que no pueden volver a cerrarse. Alternativamente, se usan recipientes de dosis múltiples que pueden volver a cerrarse, en cuyo caso es típico incluir un conservante en la composición. A modo de ejemplo solamente, las formulaciones para inyección parenteral pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, que incluye ampollas, o en recipientes de dosis múltiples, con la adición de un conservante.

35 La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales regímenes terapéuticos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, que incluyen, pero sin limitarse a, la determinación de la LD₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación entre LD₅₀ y ED₅₀. Se prefieren los compuestos que muestran índices terapéuticos altos. Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivos celulares y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para el uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos está, preferentemente, dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con toxicidad mínima. La dosificación puede variar dentro de ese intervalo en dependencia de la forma de dosificación que se emplea, y de la vía de administración que se utiliza.

Tratamientos de combinación

45 Los FGF modificados y las composiciones farmacéuticas también pueden usarse en combinación con otros agentes terapéuticos que se seleccionan por su valor terapéutico para la afección a tratar. Tales agentes no tienen que administrarse en la misma composición farmacéutica y, debido a las diferentes características físicas y químicas, pueden tener que administrarse por vías diferentes. La determinación del modo de administración y la conveniencia de administración, siempre que sea posible, en la misma composición farmacéutica, está dentro del conocimiento del clínico. La administración inicial puede realizarse de acuerdo con los protocolos establecidos conocidos en el campo y después, en base a los efectos observados, el clínico puede modificar la dosificación, los modos de administración y los tiempos de administración.

55 La elección particular de estos agentes adicionales opcionales dependerá del diagnóstico de los médicos tratantes y su criterio del estado del paciente y el protocolo de tratamiento adecuado. Los agentes pueden administrarse de manera concurrente (por ejemplo, de manera simultánea, esencialmente de manera simultánea o dentro del mismo protocolo de tratamiento) o de manera secuencial, en dependencia de la naturaleza de la enfermedad, trastorno o afección, el estado del paciente y la elección real de los agentes usados. La determinación del orden de administración y el número de repeticiones de la administración de cada agente terapéutico durante un protocolo de tratamiento, está dentro del conocimiento del médico después de la evaluación de la enfermedad que se trata y del estado del paciente.

Los agentes farmacéuticos que conforman la terapia de combinación descrita en la presente descripción pueden estar en una forma de dosificación combinada o en formas de dosificación separadas destinadas a una administración sustancialmente simultánea. Los agentes farmacéuticos que conforman la terapia de combinación también pueden administrarse de manera secuencial, administrando cualquiera de los compuestos terapéuticos mediante un régimen que requiere la administración en dos etapas. El régimen de administración en dos etapas puede requerir la administración secuencial de los agentes activos o la administración separada de los agentes activos separados. El período de tiempo entre las múltiples etapas de administración puede variar de unos pocos minutos a varias horas, en dependencia de las propiedades de cada agente farmacéutico, tales como potencia, solubilidad, biodisponibilidad, semivida plasmática y perfil cinético del agente farmacéutico. La variación circadiana de la concentración de la molécula objetivo también puede determinar el intervalo de dosis óptimo.

Las dosis terapéuticamente eficaces pueden variar cuando los fármacos se usan en combinaciones de tratamientos. Los métodos para determinar experimentalmente las dosis terapéuticamente eficaces de fármacos y otros agentes para el uso en regímenes de tratamiento de combinación se describen en la bibliografía. Por ejemplo, el uso de la dosificación metronómica, es decir, proporcionar dosis más frecuentes y más bajas para minimizar los efectos secundarios tóxicos, se ha descrito ampliamente en la bibliografía. El tratamiento combinado incluye, además, tratamientos periódicos que comienzan y terminan en diversos momentos para ayudar con el manejo clínico del paciente.

Por ejemplo, el FGF-1 modificado puede incorporarse en formulaciones que contienen otros ingredientes activos tales como esteroides, antibióticos, antiinflamatorios, citocinas tales como IL-1 o análogos de IL-1, o antagonistas de citocinas tales como inhibidores de IL-17.

Otras citocinas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, interleucinas (por ejemplo, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-1 α , IL-1 β e IL-1 RA), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), oncostatina M, eritropoyetina, factor inhibidor de leucemia (LIF), interferones, B7.1 (también conocido como CD80), B7.2 (también conocido como B70, CD86), miembros de la familia de TNF (TNF- α , TNF- β , LT- β , ligando de CD40, ligando de Fas, ligando de CD27, ligando de CD30, 4-1BBL, Trail) y factor inhibidor de la migración MIF.

En algunas realizaciones, las combinaciones o composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción se administran en terapia inmunosupresora para reducir, inhibir o prevenir la actividad del sistema inmunitario. La terapia inmunosupresora se usa clínicamente para: prevenir el rechazo de órganos y tejidos trasplantados; el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o enfermedades que probablemente sean de origen autoinmunitario; y el tratamiento de algunas otras enfermedades inflamatorias no autoinmunitarias.

En algunas realizaciones, los FGF modificados y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción se administran con uno o más agentes antiinflamatorios que incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y corticosteroides (glucocorticoides).

Los AINE incluyen: aspirina, ácido salicílico, ácido genticónico, salicilato de colina y magnesio, salicilato de colina, salicilato de colina y magnesio, salicilato de colina, salicilato de magnesio, salicilato de sodio, diflunisal, carprofeno, fenoprofeno, fenoprofeno cálcico, fluorobiprofeno, ibuprofeno, ketoprofeno, nabutona, ketoloraco, trometamina ketorolaco, naproxeno, oxaprozina, diclofenaco, etodolaco, indometacina, sulindac, tolmetina, meclofenamato, meclofenamato sódico, ácido mefenámico, piroxicam, meloxicam e inhibidores específicos de COX-2 (tales como celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib, etoricoxib, lumiracoxib, CS-502, JTE-522, L-745,337 y NS398).

Los corticosteroides incluyen: betametasona, prednisona, alclometasona, aldosterona, amcinonida, beclometasona, betametasona, budesonida, ciclesonida, clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, cortisona, cortivazol, deflazacort, desoxicorticosterona, desonida, desoximetasona, desoxicortona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, fluclorolona, fludrocortisona, fludroxicortida, flumetasona, flunisolida, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina, fluocortolona, fluorometolona, fluperolona, fluprednido, fluticasona, formocortal, halcinonida, halometasona, hidrocortisona/cortisol, aceponato de hidrocortisona, butepato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, loteprednol, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, aceponato de metilprednisolona, furoato de mometasona, parametasona, prednicartrato, prednisona/prednisolona, rimexolona, tixocortol, triamcinolona y ulobetasol.

Otros agentes usados como antiinflamatorios incluyen los descritos en la publicación de patente de Estados Unidos 2005/0227929.

Algunos antiinflamatorios disponibles en el mercado incluyen: Arthrotec® (diclofenaco y misoprostol), Asacol® (ácido 5-aminosalicílico), Salofalk® (ácido 5-aminosalicílico), Auralgan® (antipirina y benzocaína), Azulfidine® (sulfasalazina), Daypro® (oxaprozina), Lodine® (etodolaco), Ponstan® (ácido mefenámico), Solumedrol® (metilprednisolona), Bayer® (aspirina), Bufferin® (aspirina), Indocin® (indometacina), Vioxx®

(rofecoxib), Celebrex® (celecoxib), Bextra® (valdecoxib), Arcoxia® (etoricoxib), Prexige® (lumiracoxib), Advil®, Motrin® (ibuprofeno), Voltaren® (diclofenaco), Orudis® (ketoprofeno), Mobic® (meloxicam), Relafen® (nabumetona), Aleve®, Naprosyn® (naproxeno), Feldene® (piroxicam).

- 5 En una realización, las composiciones descritas en la presente descripción se administran con antagonistas del receptor de leucotrienos que incluyen BAY u9773 (ver el documento EP 00791576; publicado el 27 de agosto de 1997), DUO-LT (Tsuji y otros, Org. Biomol. Chem., 1, 3139-3141, 2003), zafirlukast (Accolate®), montelukast (Singulair®), pranlukast (Onon®) y derivados o análogos de los mismos.

- 10 En algunas realizaciones, los FGF modificados y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción se administran con uno o más inhibidores de Rho quinasa. En algunas realizaciones, los FGF modificados y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción se administran con uno o más factores de crecimiento adicionales, que incluyen factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento nervioso (NGF) (ver, *por ejemplo*, ver Joyce y otros Invest Ophthalmol. Vis Sci. 2009; 50:2116-2122), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante alfa y beta (TGF-alfa y TGF-beta), factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), eritropoyetina, factor estimulante de colonias (CSF), CSF de macrófagos (M-CSF), CSF de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) y óxido nítrico sintasa (NOS).

Kits/Artículos de Fabricación

- 20 Para el uso en las aplicaciones terapéuticas descritas en la presente descripción, en la presente descripción se proporcionan pero no se reivindican kits y artículos de fabricación. Tales kits pueden incluir un portador, envase o recipiente que está compartimentado para recibir uno o más recipientes tales como viales, tubos y similares, cada uno de los recipientes incluye uno de los elementos separados a usar en un método descrito en la presente descripción. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico.

- 25 Los artículos de fabricación proporcionados en la presente descripción pero no reivindicados contienen materiales de envasado. Los materiales de envasado para el uso en el envasado de productos farmacéuticos incluyen, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núm. 5,323,907, 5,052,558 y 5,033,252. Los ejemplos de materiales de envasado farmacéutico incluyen envases de burbuja, botellas, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringas, botellas y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y el modo de administración y el tratamiento previstos. Se contempla una amplia gama de formulaciones oftálmicas de los FGF modificados y las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción, así como una variedad de tratamientos para cualquier enfermedad, trastorno o afección ocular que se beneficiaría con la administración de un FGF modificado o una composición farmacéutica descrita en la presente descripción.

- 35 Por ejemplo, el(los) recipiente(s) pueden incluir un FGF modificado tal como un FGF-1 modificado que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4 o una combinación de las mismas. El(Los) recipiente(s) tiene(n) opcionalmente un puerto de acceso estéril. Tales kits comprenden opcionalmente compuestos con una descripción o etiqueta de identificación o instrucciones relacionadas con su uso en los métodos descritos en la presente descripción.

- 40 Un kit incluirá típicamente uno o más recipientes adicionales, cada uno con uno o más de diversos materiales (tales como reactivos, opcionalmente en forma concentrada y/o dispositivos) convenientes desde el punto de vista comercial y del usuario para el uso de un FGF modificado descrito en la presente descripción. Ejemplos de tales materiales incluyen tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas; etiquetas del portador, envase, recipiente, vial y/o tubo que enumeran el contenido y/o las instrucciones de uso y los prospectos con instrucciones de uso. Típicamente también se incluirá un conjunto de instrucciones.

- 45 Una etiqueta puede estar en o asociada con el recipiente. Una etiqueta puede estar en un recipiente cuando las letras, números u otros caracteres que forman la etiqueta están pegados, moldeados o grabados en el propio recipiente; una etiqueta puede estar asociada con un recipiente cuando está presente dentro de un receptáculo o portador que también contiene el recipiente, por ejemplo, como un prospecto. Una etiqueta puede usarse para indicar que los contenidos se usarán para una aplicación terapéutica específica. La etiqueta puede indicar además las instrucciones de uso de los contenidos, tal como en los métodos descritos en la presente descripción.

- 55 En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de FGF modificado puede presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen un compuesto proporcionado en la presente descripción. El envase puede contener, por ejemplo, una lámina de metal o plástico, tal como un envase de burbuja. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de las instrucciones para la administración. El envase o dispensador también puede ir acompañado de un aviso asociado con el recipiente en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso

o venta de los productos farmacéuticos, cuyo aviso es reflejo de la aprobación por la agencia de la forma del fármaco para la administración humana o veterinaria. Tal aviso, por ejemplo, puede ser el etiquetado aprobado por la Administración de alimentos y fármacos de Estados Unidos para los fármacos con receta o el prospecto de producto aprobado. Las composiciones que contienen un FGF modificado proporcionado en la presente descripción formulado en un portador farmacéutico compatible también pueden prepararse, colocarse en un recipiente adecuado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada.

Ejemplos

Estos ejemplos se proporcionan sólo con fines ilustrativos y cualquier ejemplo que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención. Los materiales de partida y los reactivos usados en los ejemplos descritos en la presente descripción pueden sintetizarse o pueden obtenerse de fuentes comerciales.

Ejemplo 1: Efectos del FGF-1 modificado sobre la proliferación de células endoteliales corneales humanas (HCEC)

El estudio se dirigió hacia proteínas FGF-1 modificadas que tienen la secuencia de SEQ ID NO: 2 (M1), SEQ ID NO: 3 (C3) y SEQ ID NO: 4 (C2V3). Las proteínas FGF-1 modificadas se generaron usando métodos similares a los descritos en el Ejemplo 4.

Métodos

Los cultivos primarios de HCEC se descongelaron y expandieron en un matraz T75 recubierto con FNC en medio de crecimiento (OptiMEM con suero fetal bovino (FBS) al 8 %, insulina/transferrina/selenio, ácido ascórbico 20 µg/ml, cloruro de calcio 200 µg/ml y antibiótico/antimicótico) complementado con FGF-1 10 ng/ml que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 (wtFGF-1).

Para el ensayo de proliferación, las células HCEC se pasaron usando Accutase, se cosecharon por centrifugación (200 g x 12 min), se resuspendieron en medio de crecimiento sin FGF y se sembraron en placas de 24 pocillos recubiertas con FNC (3 placas) con la siembra de 25 000 células por pocillo en 0,5 ml de medio de crecimiento.

A las 24 h después de la siembra en placa, los medios se retiraron y se reemplazaron con medio base (OptiMEM con suero fetal bovino (FBS) al 0,4 %, insulina/transferrina/selenio, ácido ascórbico 20 µg/ml, cloruro de calcio 200 mg/ml y antibiótico/antimicótico) con las adiciones indicadas. Para cada placa, las condiciones para el control negativo fueron medio sin FBS adicional y las condiciones para el control positivo fueron medio con una alta concentración de FBS. Cada proteína FGF-1 modificada se diluyó a 1ng/ul en medio base como una solución madre y después se usó para generar el medio celular a las concentraciones de proteína evaluadas de 0,3 ng/ml, 1,0 ng/ml, 3 ng/ml y 10 ng/ml. Todos los controles y proteínas mutantes se evaluaron por cuadruplicado.

Los números de células se contaron manualmente como el número de células en un campo 20x. Se contó la misma área de la placa cada vez, con la ubicación marcada en el día 1 usando un punto de tinta en la superficie inferior de la placa.

En este ejemplo, tanto C3 como C2V3 comprendían una etiqueta N-terminal de histidina, que se usó para purificar cada proteína.

Resultados

La adhesión y distribución regular de las células se comprobó a las 24 horas después de la siembra en placa. Los recuentos de células por campo 20x para las placas fueron 49 ± 11 , 53 ± 14 y 41 ± 8 . Como un ejemplo no limitante, en la Figura 4, se representa una imagen microscópica de las células que indica que las células eran fibroblásticas.

Los resultados de los recuentos de células en el día 3 se muestran, como un ejemplo no limitante, en la Figura 5. El número de células en el control negativo en cada placa se duplicó aproximadamente durante los tres días de cultivo. El control positivo en la placa #3, que evaluó C2V3, no fue estadísticamente diferente del control negativo en el punto de tiempo de 3 días.

Estos experimentos muestran que M1 estimula el crecimiento de HCEC con una respuesta a la dosis similar a la del experimento previo y es consistente con una EC50 de aproximadamente 3 ng/ml. C3 parece estimular al máximo a la dosis más baja con una curva inversa de respuesta a la dosis. El examen de la placa que contiene C3 sugiere que C3 tiene un efecto morfológico sobre las células; las células tratadas con C3 parecen más planas y menos fibroblásticas, como puede observarse en un ejemplo no limitante representado en la Figura 6. En general, los datos muestran que M1 y C3 tienen cada uno un efecto mitogénico que dio como resultado la proliferación celular.

Las células se alimentaron con medio en el día 3 y el día 5 después de lo cual la placa 3 y las células tratadas con C2V3 se volvieron a contar. Como se muestra en un ejemplo no limitante en la Figura 7 en el día 5, el control positivo fue estadísticamente diferente del control negativo, lo que hace válida la evaluación de la placa. Además, el grupo de 3 ng/ml fue estadísticamente diferente del control de manera significativa lo que indica que C2V3 tuvo un efecto mitogénico que dio como resultado la proliferación celular.

Discusión

Los resultados previos usando M1 se replicaron y son consistentes con una EC_{50} de 3 ng/ml para la estimulación de la proliferación celular en estas células.

C3 parecía estimular potentemente las HCEC. La curva inversa de respuesta a la dosis sugirió que el pico del efecto puede estar a concentraciones más bajas. En particular, estos datos sugieren que la EC_{50} de este mutante fue al menos 10 veces más baja que la del FGF de tipo silvestre u otras proteínas FGF-1 modificadas evaluadas. El efecto morfológico sugirió que C3 puede invertir la transición de epitelio a mesénquima (EMT) de estas células. Este ejemplo también mostró que C2V3 estimula la proliferación de las HCEC. Estos experimentos sugirieron que C2V3 no era más potente que wtFGF o M1.

15 **Ejemplo 2: Efectos de FGF-1 modificado sobre la proliferación de células endoteliales corneales de conejo**

El estudio se dirigió hacia la proteína FGF-1 modificada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2 (M1).

Se sembraron cultivos primarios (pase 1) de células endoteliales corneales de conejo en placas de 12 pocillos en presencia de M1 (10 ng/ml), suero fetal bovino (FBS al 8 %) como control positivo o sin adición de suero fetal bovino como control negativo (control -). Los números de células se contaron con contraste de fases para cada uno de los 3 pocillos por tratamiento. Los datos que se muestran son la media +/- sd. Una comparación por pares de los grupos de 10 ng/ml y FBS con el control (sin suero) en el día 6 mostró un valor de $p < 0,05$. Este experimento se realizó en ausencia de heparina. Como se muestra en un ejemplo no limitante en la Figura 8, M1 estimuló la proliferación de células endoteliales corneales de conejo.

25 **Ejemplo 3: Efectos de FGF-1 modificado sobre la proliferación de células endoteliales corneales humanas**

El estudio se dirigió hacia la proteína FGF-1 modificada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2. (M1)

Se sembraron cultivos primarios (pase 1) de células endoteliales corneales humanas de un donante sano en placas de 24 pocillos en presencia de suero fetal bovino (FBS, 8 %) y 24 horas después se trataron con las concentraciones indicadas de M1 en medio con bajo (0,8 %) FBS. Los números de células se contaron con contraste de fases para cada uno de los 4 pocillos por tratamiento. Los datos son la media +/-sd; la comparación por pares de los grupos de 10 ng/ml y 3 ng/ml con el control (suero bajo sin FGF) en el día 2 $p < 0,05$. El grupo de FBS al 8 % sirve como control positivo. Este experimento se realizó en ausencia de heparina. Como puede observarse como un ejemplo no limitante en la Figura 9, M1 estimuló la proliferación de células epiteliales corneales humanas y fue sensible a la dosis.

Los ejemplos y realizaciones descritos en este documento son sólo para fines ilustrativos y en algunas realizaciones, se incluirán diversas modificaciones o cambios dentro del alcance de la divulgación y las reivindicaciones adjuntas.

40 **Ejemplo 4: Producción, caracterización y actividad biológica de los péptidos FGF-1 modificados**

El estudio se dirigió hacia proteínas FGF-1 modificadas que tienen la secuencia de SEQ ID NO: 2 (M1), SEQ ID NO: 3 (C3) y SEQ ID NO: 4 (C2V3).

Purificación y oxidación de proteínas.

Se usó E. coli Shuffle T7 competente (H3026) de New England Biolabs para producir C3 y C2V3. Esta cepa K12 de E. coli modificada genéticamente proporciona un entorno intracelular oxidativo para la formación de disulfuro. C3 y C2V3 se expresaron a partir de E. coli pET21a(+)/BL21(DE3). Después de la inducción con isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) 1 mM, la temperatura de incubación se disminuyó de 37 °C a 16 °C para la expresión durante la noche. La proteína expresada se purificó utilizando cromatografía en columna secuencial en resina de afinidad de Ni-NTA (Qiagen, Valencia CA) y resina de heparina Sepharose (GE Life Sciences, Pittsburgh PA). El ensayo de DTNB se realizó en C3 y C2V3 después de la purificación. Los resultados mostraron que C3 estaba cerca del 100 % de oxidación y C2V3 estaba cerca del 40 % de oxidación. C2V3 se oxidó por aire en tampón cristal (sin DTT, sin EDTA) durante 16 días a temperatura ambiente y el ensayo de DTNB mostró que más de 85 % de la proteína estaba oxidada. Para C3, un gel de SDS-PAGE no reductor mostró una sola banda que correspondía a la forma oxidada y un gel de SDS-PAGE reductor mostró una doble

banda que correspondía a una mezcla de forma oxidada y reducida. Para C2V3, un gel de SDS-PAGE no reductor y un gel reductor mostraron una doble banda que indicaba una mezcla de forma oxidada y reducida.

Estudio de desnaturalización isotérmica con fluorescencia.

5 Cada uno de C3 y C2V3 comprendía una etiqueta N-terminal de histidina y se equilibró durante la noche en fosfato de Na 50 mM, NaCl 100 mM, con y sin DTT 10 mM, pH 7,5 a 298K en incrementos de 0,2 M de GuHCl con una concentración final de proteína de 5 μ M. Antes de la equilibración C3 no se sometió a oxidación por aire pero C2V3 se sometió a oxidación por aire. Los análisis de fluorescencia se integraron para cuantificar la fluorescencia total en función de la concentración de desnaturalizante. Los datos se analizaron usando un modelo de dos estados y seis parámetros. Como un ejemplo no limitante, la curva de desnaturalización isotérmica para C3, con y sin DTT 10 mM, se representa en la Figura 1A. La C_m para la muestra de proteína no reducida fue mayor que la de la muestra de proteína reducida. Sin embargo, tanto la proteína reducida como la no reducida se desestabilizaron al comparar los valores de ΔG . Como un ejemplo no limitante, la curva de desnaturalización isotérmica de C2V3, con y sin DTT 10 mM, se representa en la Figura 1B. La C_m para la muestra de proteína no reducida fue aproximadamente 0,5 M de GuHCl mayor que la de la muestra de proteína reducida. Sin embargo, la forma reducida tenía un desplegamiento más cooperativo y tenía un mayor valor de ΔG a 0 molar de GuHCl. Los parámetros termodinámicos derivados del estudio se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.

Proteína	ΔG (kJ/mol)	valor m (kJ/mol/M)	C_m (M)
C3 sin DTT	14.4	13.0	1.10
C3 con DTT	17.1	22.0	0.78
C2V3 sin DTT	35.0	14.6	2.39
C2V3 con TDT	43.0	23.2	1.85

20 Los residuos de Cys libres limitan eficazmente la semivida funcional debido a la química de tioles reactivos (por ejemplo, la formación de aductos de tiol) que contribuye a un desplegamiento irreversible. Se pueden lograr aumentos en la semivida funcional mediante la mutación para eliminar los residuos de Cys libres enterrados, incluso si tales mutaciones disminuyen la termoestabilidad. Sin embargo, desde un punto de vista funcional también es conveniente aumentar (o al menos generalmente mantener) la termoestabilidad ya que una mayor estabilidad puede reducir la degradación proteolítica, reducir la agregación, etcétera.

25 En el FGF-1 de tipo silvestre humano existen 3 posiciones de Cys libres (17, 83, 117). Con la excepción de la posición 117, la mutación de estos residuos es desestabilizante (y en el caso de la posición 117 esto es cierto excepto por la mutación a Ala, que es esencialmente neutra). En algunos casos la mutación de estos residuos da como resultado una proteína que se pliega por fracciones.

30 En lugar de la mutación, una solución para eliminar los tioles libres es añadir otro tiol y de este modo crear un enlace disulfuro con un residuo de Cys libre en la proteína. La mutación de Ala66 a Cys produce un disulfuro con la posición Cys83. La mutación combinada de C16S/A66C/C117V en condiciones de oxidación, donde se forma un disulfuro, tiene un punto medio de desnaturalización (1,10 M de GuHCl) que es ligeramente desestabilizante en comparación con el FGF-1 de tipo silvestre (1,23 M de GuHCl - datos no mostrados); por lo tanto, esta mutación es desestabilizante. Sin embargo, probablemente la eliminación de todos los residuos de Cys libres crea estabilidad farmacológica debido a que la proteína es menos susceptible a la degradación. El mutante C2V3 demuestra que se crea una proteína FGF-1 modificada que carece de tioles reactivos y tiene una termoestabilidad mejorada.

Análisis de espectrometría de masas.

40 C2 y C2V3 se analizaron por espectrometría de masas. Las muestras de proteína oxidada se digirieron con tripsina durante la noche. Las muestras digeridas se dividieron a la mitad y una mitad de la muestra se redujo con DTT 10 mM. Las muestras digeridas de proteína reducida y no reducida se analizaron en un espectrómetro de masas en tándem AB Sciex 5800 MALDI-TOF/TOF. Los datos para C2 y C2V3 mostraron una adición de aproximadamente 2 Da en las muestras con DTT consistente con la adición de un átomo de hidrógeno a cada átomo de azufre de cisteína en la reducción del enlace disulfuro

45 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

C3 y C2V3 se analizaron en un instrumento nanoDSC en fosfato de Na 50 mM, NaCl 100 mM con y sin TCEP 2 mM. La concentración de cada proteína fue de aproximadamente 0,5 mg/ml. Las proteínas FGF-1 modificadas tienden a desplegarse irreversiblemente con calor y forman agregados de proteínas. Para analizar C3 y C2V3 en nanoDSC, se incubaron diferentes concentraciones (0,4-1,2 M) de GuHCl con cada proteína a

92 °C durante 1 hora para determinar la concentración de GuHCl proteína a la que se evitó la agregación de cada proteína. Para C3, se usó GuHCl 0,7 M al recolectar los datos de calorimetría. Para C2V3, se usó GuHCl 1,2 M al recolectar los datos de calorimetría.

5 Se recopilaron los análisis de nanoDSC de C3 en fosfato de Na 50 mM, NaCl 100 mM, GuHCl 0,7 M pH 7,5. Los análisis mostraron que esta proteína era demasiado inestable para analizarla usando DSC. Los análisis de nanoDSC de C2V3 en fosfato de Na 50 mM, NaCl 100 mM, GuHCl 1,2 M, pH 7,5 se recopilaron y analizaron con el software DSCfit. Los análisis de nanoDSC de C2V3 en fosfato de Na 50 mM, NaCl 100 mM, GuHCl 1,2 M, pH 7,5 se recopilaron y analizaron con el software NanoAnalyze. Los resultados del software NanoAnalyze coincidieron bien con los del software DSCfit.

10 Ensayo de proliferación celular de BaF3

C3, C2V3 y M1 se evaluaron para determinar la actividad biológica usando un ensayo de proliferación celular de BaF3. Se sembró una baja concentración de células BaF3 que expresan solamente la isoforma FGFR1c en una placa de 96 pocillos que incluía heparina 1 µg/ml. Para cada uno de C3, C2V3 y M1, una muestra sin heparina se diluyó 4 veces (intervalo de concentraciones 0-5 nM) con medio de cultivo con heparina 1 µg/ml y se suministró a pocillos individuales. La actividad mitogénica se determinó mediante la adición de 1 µCi de 3H-timidina a cada pocillo. Las células se cosecharon después de 4 horas de incubación y la 3H-timidina incorporada se contó en un contador de centelleo. Como un ejemplo no limitante, los resultados de un primer ensayo de proliferación celular de BaF3 se representan en la Figura 2. Esta figura ilustra que M1 (K12V/C117V/P134V), C3 (C16S/A66C/C117V) y C2V3 (K12V/C16S/A66C/C117V/P134V) dieron lugar a un aumento significativo sensible a la dosis en la incorporación de 3H-timidina lo que indica una potenciación de la proliferación celular. Por lo tanto, M1, C3 y C2V3 estimularon la proliferación celular. Como un ejemplo no limitante, los resultados de un segundo ensayo de proliferación celular de BaF3 se representan en la Figura 3. Esta figura ilustra que M1 (K12V/C117V/P134V) y C3 (C16S/A66C/C117V) dieron lugar a un aumento significativo sensible a la dosis en la incorporación de 3H-timidina lo que indica una potenciación de la proliferación celular.

Ejemplo 5: Determinación de la estimulación de la respuesta a la dosis de CEC

El FGF-1 se usa como la molécula de base para la generación de FGF modificados porque es único entre los FGF en la estimulación de las siete isoformas del receptor de FGF. La proteína FGF-1 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1, eFGF-1, ha demostrado mantener la actividad en un ensayo de proliferación celular de 3T3 (Dubey y otros Journal of molecular biology. 2007; 371(1):256-68.) y las sustituciones de aminoácidos y la estabilización de la estructura dan como resultado ningún cambio en la estimulación del receptor de FGF ya que hay cambios mínimos en los residuos expuestos a la superficie.

Las curvas de respuesta a la dosis se determinan tanto para la migración (mediante el ensayo de rasguño *in vitro*) como para la estimulación mitogénica de las CEC. Los cultivos primarios de CEC de conejo se establecen usando procedimientos establecidos, *por ejemplo*, el procedimiento descrito por Kay y otros (Kay y otros Investigative ophthalmology & visual science. 1993; 34(3):663-72; Lee y otros, Investigative ophthalmology & visual science. 2009; 50(5):2067-76). Brevemente, el complejo de membrana de Descemet de ojos de conejo se trata con colagenasa al 0,2 % y hialuronidasa al 0,05 % durante 90 min a 37 °C. Las células disociadas se cultivan en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 15 % y gentamicina 50 µg/ml. Las células se dejan crecer hasta la confluencia y se subcultivan usando tripsina/EDTA. Para todos los experimentos se usan células del primer pase. El ensayo de rasguño se realiza dejando que las células del primer pase crezcan hasta la confluencia en placas de 6 pocillos y usando un policia de goma para crear un rasguño en la monocapa. Los ensayos de proliferación se realizan en placas de 12 pocillos usando, *por ejemplo*, un kit de ensayo Click-IT (Life Technologies). Se generan las curvas de respuesta a la dosis para eFGF-1 en presencia y ausencia de heparina. FGF-1 en presencia de heparina y FGF-2 se usan como controles positivos.

Las dosis propuestas en los experimentos *in vivo* se basan en la suposición de que la ED₅₀ para eFGF-1 es similar a la ED₅₀ para el FGF-1 de tipo silvestre. Las ED₅₀ determinadas se usan para ajustar la dosis para los experimentos *in vivo*. Los resultados indican que eFGF-1 estimula la migración y/o proliferación de las CEC de conejo.

50 **Ejemplo 6: Demostración de que eFGF-1 se localiza en áreas de lesión corneal o progenitores de CEC en córnea completa (cultivo de órganos) e *in vivo* mediante inyección en la cámara anterior (intracameral)**

La terapia eficaz requiere que el fármaco llegue al tejido objetivo y esté presente durante el tiempo suficiente para actuar. El FGF-1 de tipo silvestre (wtFGF-1) requiere un exceso de masa de 3x de heparina para la estabilidad y la heparina en la formulación puede interferir con la orientación del FGF al sitio de la herida en aplicaciones oftálmicas tópicas. Los estudios farmacocinéticos que comparan wtFGF-1 con y sin heparina con eFGF-1 confirman que el eFGF-1 se reparte en el compartimento tisular de manera más eficaz que wtFGF-1 y se libera lentamente de ese compartimento (Xia y otros PLoS one. 2012; 7(11):e48210). La lesión corneal activa

la producción de heparinas por los queratocitos estromales (Brown y otros, Journal of cellular biochemistry. 1995; 59(1):57-68).

5 La combinación de la capacidad de administrar eFGF-1 sin heparina y la baja concentración de proteínas del humor acuoso da como resultado la localización de eFGF-1 en la superficie endotelial y en el estroma expuesto en áreas de lesión.

El eFGF-1 etiquetado se usa para demostrar que eFGF-1 se une al compartimento tisular y se libera lentamente, primero en córneas cultivadas de órganos completos y después *in vivo* tras la administración intracameral.

10 El eFGF-1 se etiqueta con colorante como se describe en la técnica (Xu, y otros, The Journal of biological chemistry. 2012; 287(47):40061-73). Brevemente, en este procedimiento, el eFGF-1 forma un complejo con la heparina antes de la derivatización con colorante de manera que el colorante no se una al sitio de unión a la heparina y, por lo tanto, la derivatización no afecte la unión a la heparina. Todavía es posible que el colorante se una a las áreas de unión al receptor de la proteína, pero las interacciones iniciales con el tejido son predominantemente mediante proteoglicanos en lugar de los receptores de FGF y la cantidad de eFGF-1 unido a los receptores no es detectable en este ensayo.

15 Para modelar la inyección intracameral de eFGF-1 usando cultivo de órganos corneales, las córneas explantadas que incluyen la córnea periférica se incuban en eFGF etiquetado durante 30 minutos seguido de enjuague durante períodos de tiempo variables en medio sin FGF etiquetado. Las córneas se rasguñan para crear una lesión endotelial a través de la córnea central. Las córneas se usan inmediatamente o se incuban en medio de cultivo durante 24 horas después de hacer el rasguño para permitir que las células del estroma expresen heparanos antes del ensayo de unión de eFGF-1. Para evaluar la dependencia de la unión de las heparinas, las córneas se exponen a eFGF-1 etiquetado en ausencia o presencia de heparina (10 ug/ml).

Ejemplo 7: Aceleración de la cicatrización corneal en un modelo animal *in vivo*

25 Este estudio está dirigido a mediciones PK semicuantitativas *in vivo*. Para los experimentos *in vivo*, el eFGF-1 etiquetado se administra mediante inyección intracameral a través de la córnea periférica en ausencia de heparina, y la proteína etiquetada con fluorescencia seguido de inspección periódica mediante microscopía de fluorescencia confocal con tomografía retiniana de Heidelberg (HRT) + módulo de córnea de Rostock. Los ojos inyectados se evalúan a los 30 min, 2 horas, 8 horas, 24 horas y 48 horas después de la inyección. Si la etiqueta todavía está presente a las 48 horas, se da seguimiento a los animales hasta por 2 semanas.

30 El paradigma de la administración en el experimento *in vivo* supone que la unión del eFGF-1 a la córnea puede medirse y que el curso temporal de desaparición del eFGF-1 unido es al menos tan largo como el esperado por la dilución del acuoso ($t_{1/2}$ de aproximadamente 90 minutos). En el caso de que la desaparición del eFGF-1 siga un curso más rápido, el eFGF-1 se administra con mayor frecuencia en el modelo animal.

35 Una vez que se confirma que eFGF-1 estimula las CEC y se establece una EC_{50} , se mide el efecto de eFGF-1 *in vivo* usando el modelo de daño por congelación transcorneal en conejo del daño endotelial corneal (Okumura y otros The British journal of ophthalmology. 2011; 95(7):1006-9). Brevemente, una sonda de acero de 7 mm se congela en nitrógeno líquido y después se sujeta a la córnea del conejo durante 15 s. Esto congela la córnea a través de la capa de células endoteliales y genera una región reproducible de pérdida de CEC, con edema corneal y un área libre de células de la superficie interna de la córnea 24 horas después.

40 Los conejos se someten a congelación transcorneal bajo anestesia general. El ojo contralateral sirve como control. Una vez que la bola de hielo en la cámara anterior se ha derretido, las lesiones se observan por microscopía y se fotografían para comprobar la generación y el tamaño adecuados de la lesión. El eFGF-1 se administra por vía intracameral mediante una aguja de 30 ga en el acuoso a través de la córnea periférica. La inyección ocurre en un área de la córnea distante de la lesión. Las córneas se examinan por microscopía y se fotografían a las 24 y 48 h, incluidas las imágenes de OCT del grosor corneal para evaluar el daño al estroma, así como microscopía confocal con la HRT y el recuento de CEC. A las 48 horas, los animales se sacrifican y las córneas se cosechan y se tifican con rojo de alizarina. El área de las lesiones endoteliales se cuantifica usando análisis de imágenes.

45 El eFGF se administra por vía intracameral a partir de una dosis de 100 ng (10 ul de una solución a 10 ug/ml) en solución salina aproximadamente 60 min después de producir la lesión. Una dosis de 100 ng en el acuoso de un conejo proporciona una concentración inicial de aproximadamente 400 ng/ml y dado el recambio de humor acuoso de 2-3 ul/min, la concentración de eFGF-1 en el acuoso cae por debajo de 2 ng/ml (la ED_{50} en el ensayo de células 3T3 (Dubey y otros Journal of molecular biology. 2007; 371(1):256-68)) a las 11 horas después de la dosis. Sobre esta base, solo se administra una dosis única del eFGF-1 para estos experimentos
50 y la frecuencia de dosificación se ajusta si no se observa ningún efecto a esta dosis. Los agonistas tales como el FGF-1 a menudo muestran una curva de respuesta a la dosis en forma de campana; por lo tanto, otros grupos de animales se tratan con dosis más bajas o más altas para establecer una curva de respuesta a la dosis.

En el modelo de conejo, la administración del inhibidor de Rho quinasa (ROCK) Y-27632 reduce el área de la lesión al 20 % del control a las 48 horas después de la lesión. En modelos *in vitro*, el FGF-2 solo produce un efecto sobre la migración de células endoteliales mayor que el de Y-27632 y los dos son sinérgicos (Lee y otros Investigative ophthalmology & visual science. 2006; 47(4):1376-86). Si eFGF-1 produce un efecto al menos similar en tamaño al inhibidor de ROCK, seis animales por grupo de dosis proporcionan un resultado estadísticamente significativo.

Estos experimentos demuestran que eFGF-1 es un tratamiento potencial para FD y otras distrofias endoteliales y sienta las bases para la fase II, en la que estos experimentos se repiten con células endoteliales corneales humanas *in vitro* y primates *in vivo*. Estos datos de eficacia son suficientes para respaldar una presentación de IND para el uso de eFGF-1 en pacientes que tienen distrofia suficiente para ser considerados para trasplantes corneales.

Ejemplo 8: Uso de un FGF modificado en pacientes que se someten a queratotomía fotorrefractiva (PRK)

Los pacientes que se han sometido a PRK se tratan con una formulación oftálmica adecuada (*por ejemplo*, una solución tópica de eFGF-1 a 1 mg/ml (0,1 %) en forma de colirio formulada en solución salina tamponada con fosfato). El colirio se administra diariamente, *por ejemplo*, tres o cuatro veces al día durante 7 días. Estos pacientes tratados experimentan reepitelización de la córnea más rápidamente que los pacientes no tratados. La reepitelización de la córnea se observa por tinción con fluoresceína o verde de lisamina así como por biomicroscopía.

Ejemplo 9: Uso de un FGF modificado en pacientes con distrofia endotelial corneal

Los pacientes con distrofia endotelial corneal (*por ejemplo*, distrofia de Fuch) se tratan con una formulación oftálmica adecuada (*por ejemplo*, una solución de eFGF-1 a 1 mg/ml (0,1 %) formulada en solución salina tamponada con fosfato). La solución de FGF se administra mediante inyección intracameral cada 1-3 meses. Estos pacientes tratados experimentan un aumento en la densidad de las células endoteliales en la córnea central más rápidamente que los pacientes no tratados. El aumento en la densidad de las células endoteliales corneales se observa usando microscopía especular.

Ejemplo 10. Uso de FGF modificado en pacientes que se someten a trabeculectomía

Los pacientes que se someten a trabeculectomía se tratan con un FGF modificado (*por ejemplo*, un FGF-1 modificado que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2, un FGF-1 modificado que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 o un FGF-1 modificado que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4) en una formulación oftálmica adecuada (*por ejemplo*, una solución de 1 mg/ml (0,1 %) de un FGF-1 modificado (*por ejemplo*, un FGF-1 modificado que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2, un FGF-1 modificado que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 o un FGF-1 modificado que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4) formulada en solución salina tamponada con fosfato o como una formulación de liberación sostenida aplicada al sitio de trabeculectomía). Estos pacientes experimentan una cicatrización más rápida del sitio de trabeculectomía con fibrosis reducida y obstrucción fibrótica reducida del canal de trabeculectomía.

REIVINDICACIONES

1. Un factor de crecimiento de fibroblastos I (FGF-1) modificado que comprende mutaciones del FGF-1 humano en las posiciones 16, 66 y 117, con respecto a la secuencia del FGF-1 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1).
- 5 2. El FGF-1 modificado de la reivindicación 1, en el que dicho FGF-1 modificado comprende las mutaciones: Cys16Ser, Ala66Cys y Cys117Val.
3. El FGF-1 modificado de la reivindicación 1, en el que dicho FGF-1 modificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3.
4. Un FGF-1 modificado de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o afección ocular de la córnea o la superficie ocular.
- 10 5. El FGF-1 modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad, trastorno o afección ocular es una enfermedad, trastorno o afección del endotelio corneal.
6. El FGF-1 modificado para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la enfermedad, trastorno o afección ocular del endotelio corneal es distrofia de Fuchs, queratopatía ampollar, distrofia endotelial hereditaria congénita I, distrofia endotelial hereditaria congénita 2 o distrofia corneal polimorfa posterior.
- 15 7. El FGF-1 modificado para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la enfermedad, trastorno o afección ocular es distrofia de Fuchs.
8. El FGF-1 modificado para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad, trastorno o afección ocular es una enfermedad, trastorno o afección del epitelio corneal.
- 20 9. El FGF-1 modificado para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la afección del epitelio corneal es un síndrome del ojo seco o un daño del epitelio corneal por cirugía o trasplante corneal.
10. El FGF-1 modificado para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad, trastorno o afección ocular es edema corneal.
11. El FGF-1 modificado para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad, trastorno o afección ocular es daño a la córnea por cirugía corneal.
- 25 12. El FGF-1 modificado para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad, trastorno o afección ocular es daño al endotelio corneal por cirugía corneal.
13. El FGF-1 modificado para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad, trastorno o afección ocular es una enfermedad, trastorno o afección del estroma corneal.
- 30 14. El FGF-1 modificado para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la enfermedad, trastorno o afección del estroma corneal es queratocono, distrofia corneal reticular, distrofia corneal granular, distrofia corneal macular, distrofia corneal cristalina de Schnyder, distrofia corneal estromal congénita o distrofia corneal moteada.
15. El FGF-1 modificado para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el FGF-1 modificado se administra por vía tópica, mediante microagujas en la córnea, mediante un colirio o por vía intracameral.
- 35 16. El FGF-1 modificado para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-15, en el que el FGF-1 modificado es una composición farmacéutica, en el que la composición farmacéutica comprende además un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, y en el que la composición farmacéutica es opcionalmente una formulación oftálmica líquida.
- 40 17. El FGF-1 modificado de la reivindicación 1, en el que el FGF-1 modificado exhibe al menos una concentración semiefectiva (EC50) 10 veces menor en un ensayo que mide la proliferación de células endoteliales corneales humanas, en comparación con la secuencia de FGF-1 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1).
18. El FGF-1 modificado, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2, para uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o afección ocular de la córnea o la superficie ocular.

FGF-1 modificado con SEQ ID NO: 3

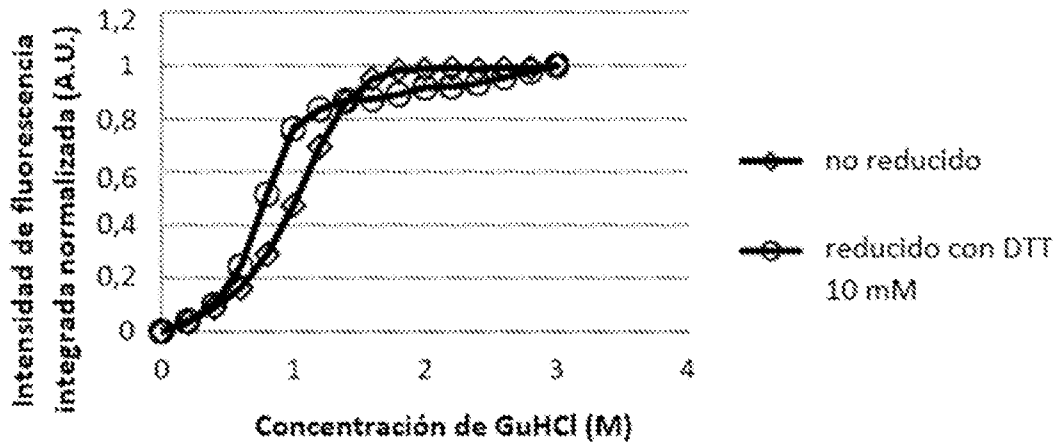


Figura 1A

FGF-1 modificado con SEQ ID NO: 4

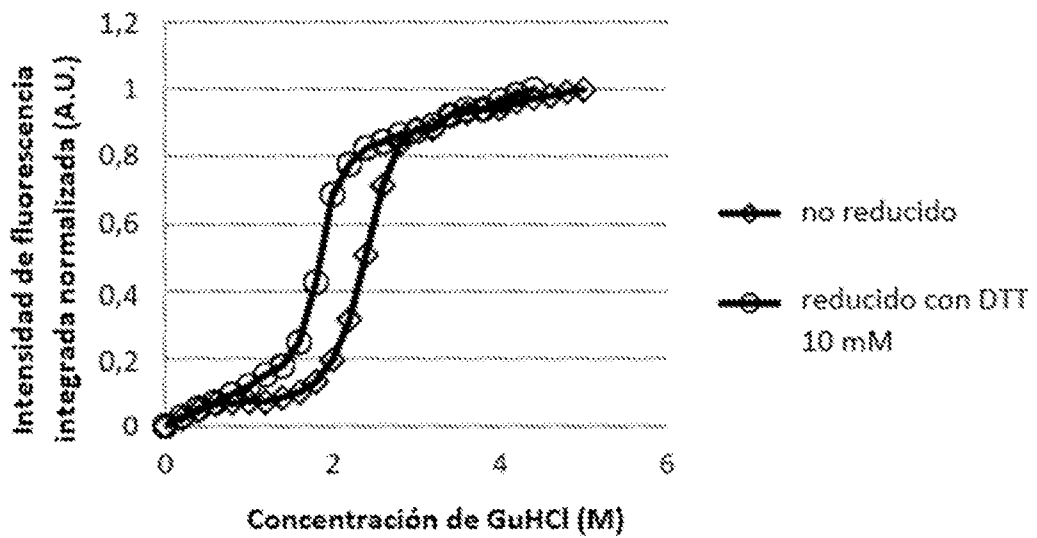


Figura 1B

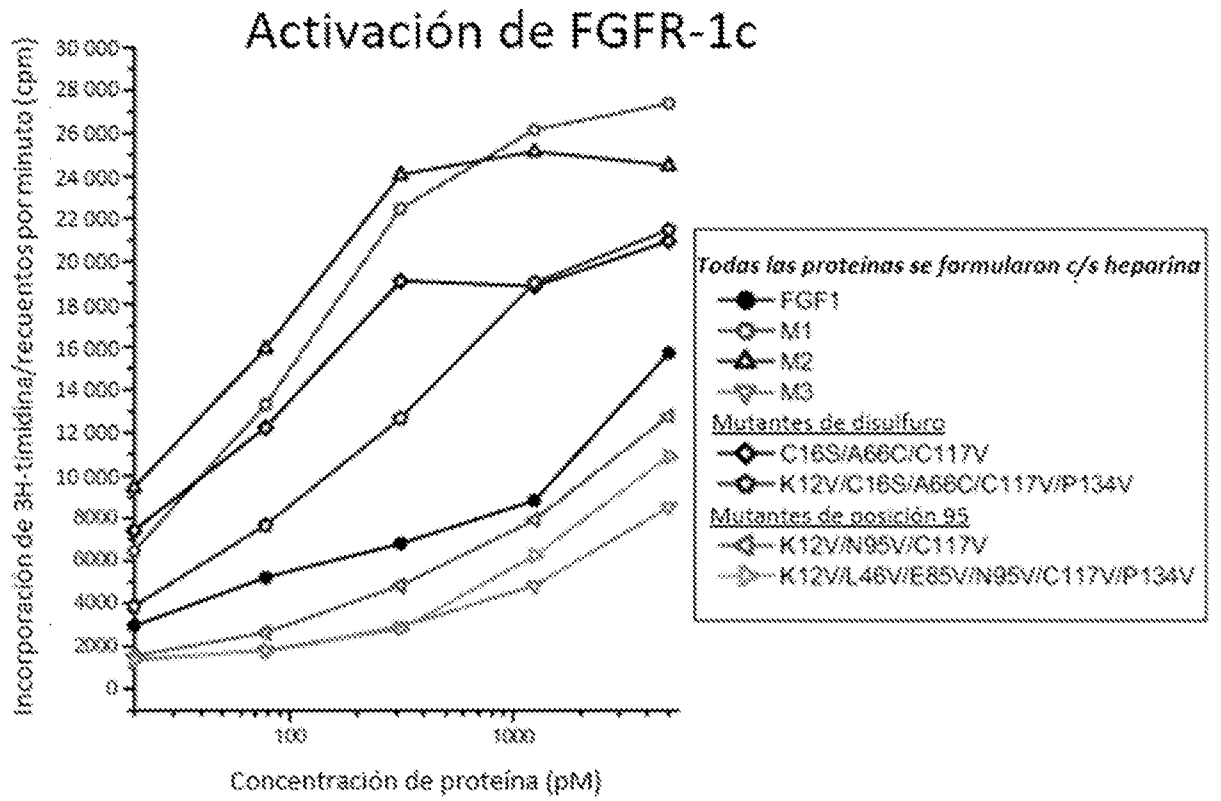


Figura 2

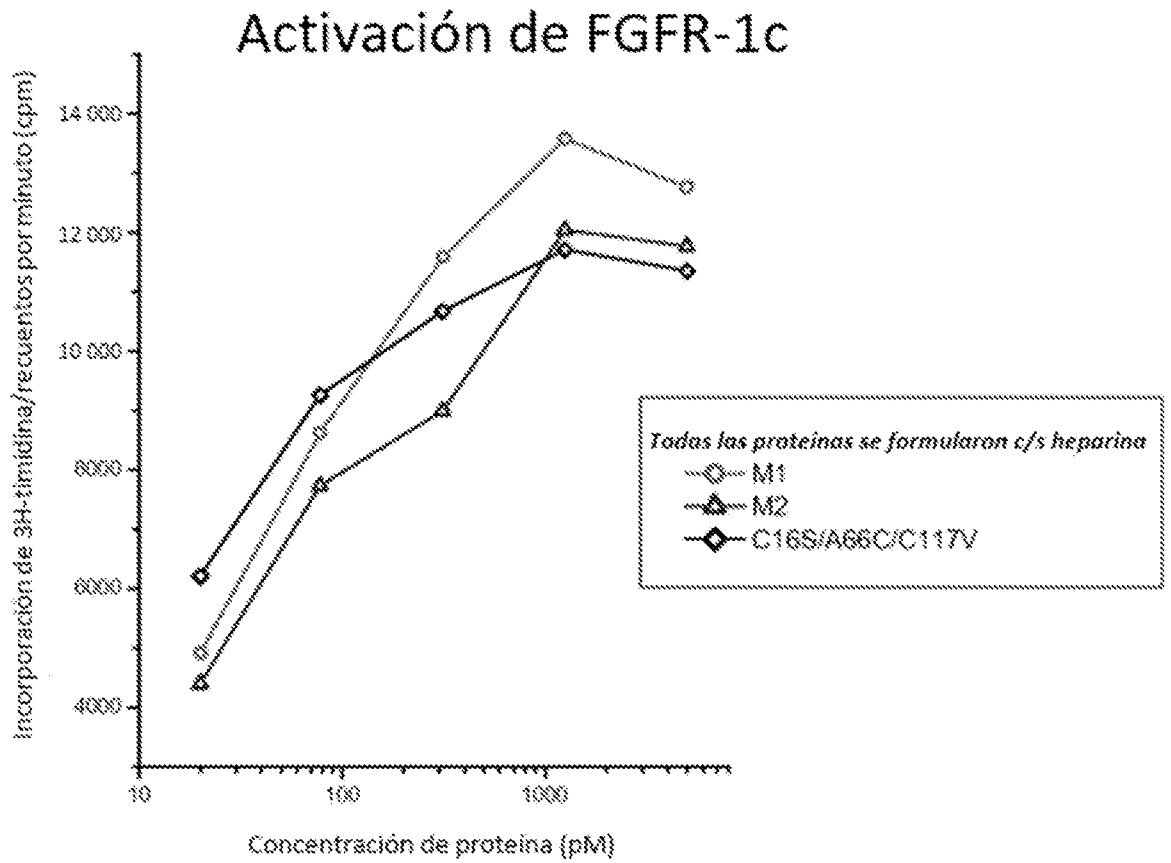


Figura 3

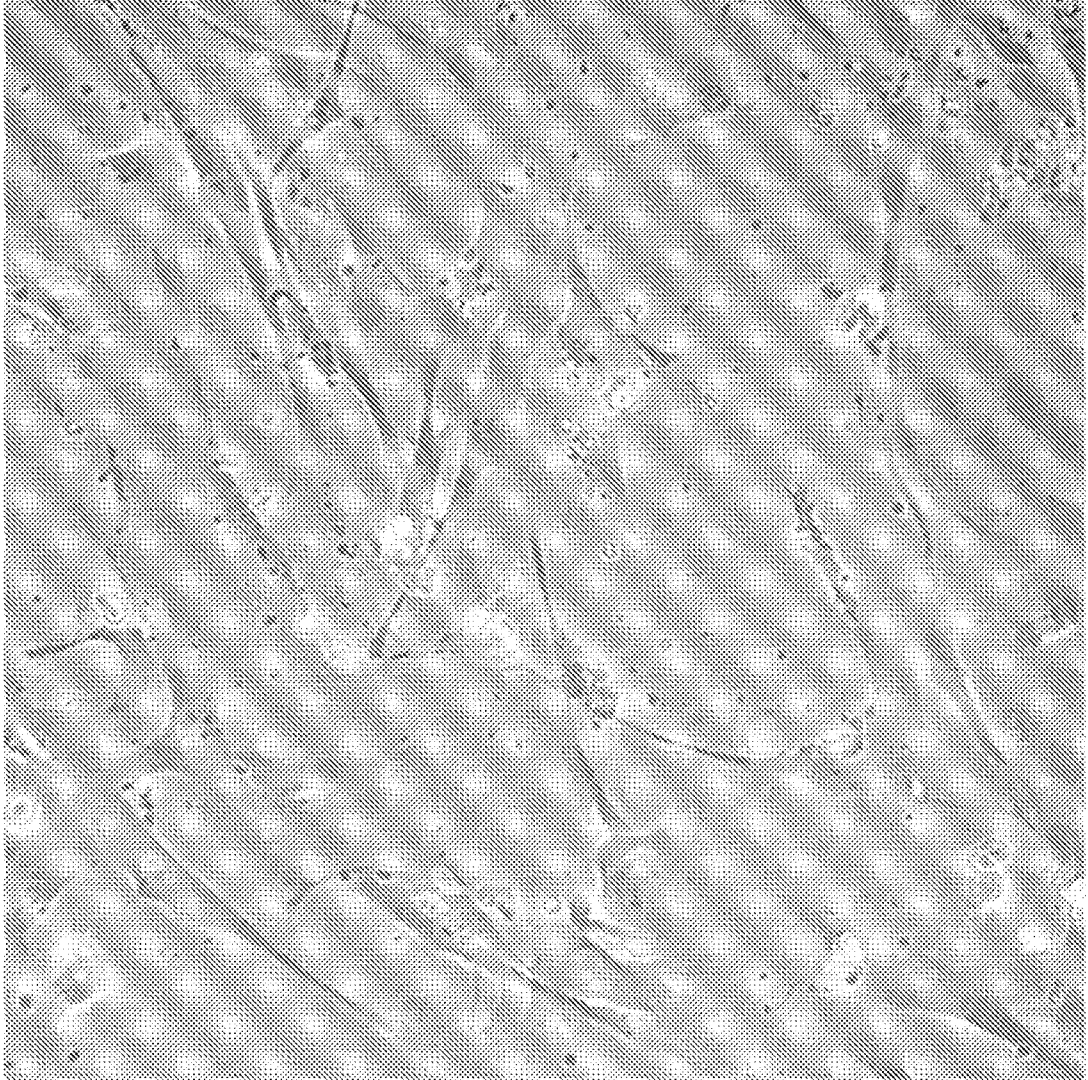


Figura 4

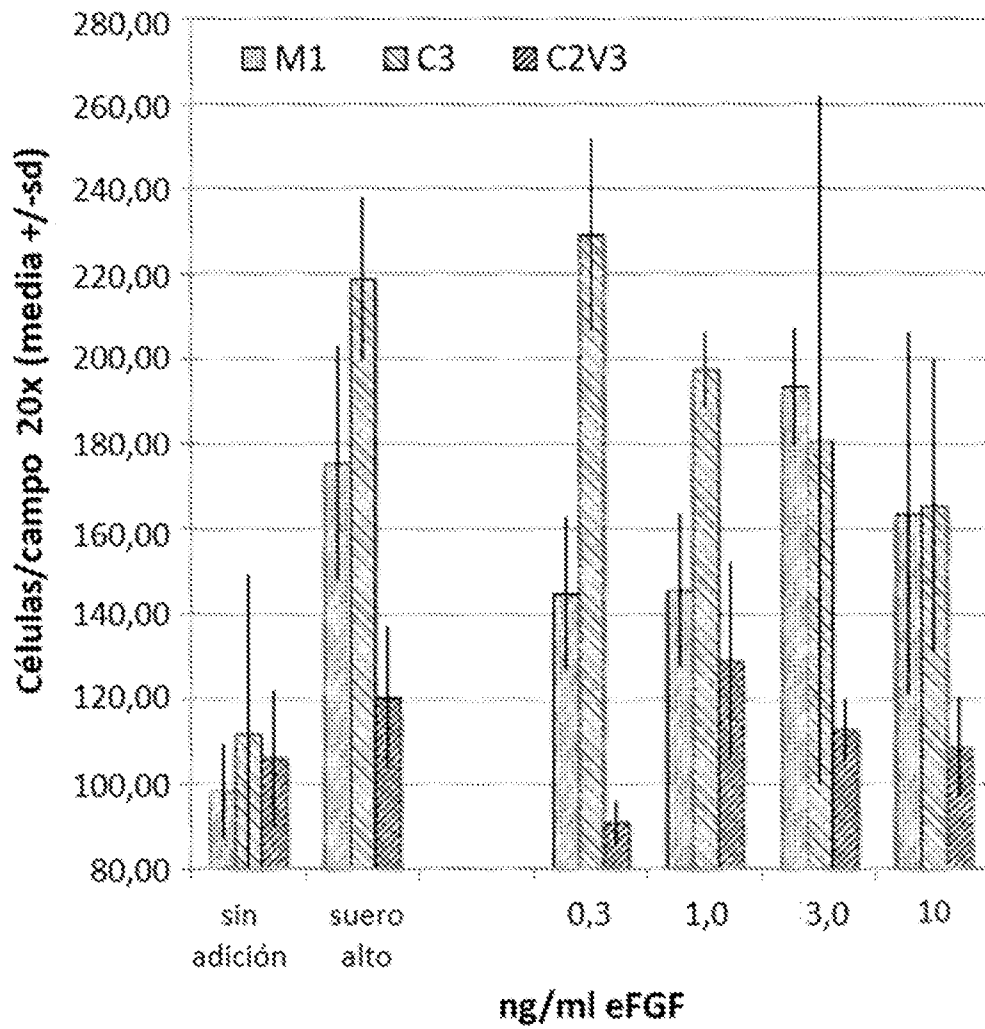


Figura 5

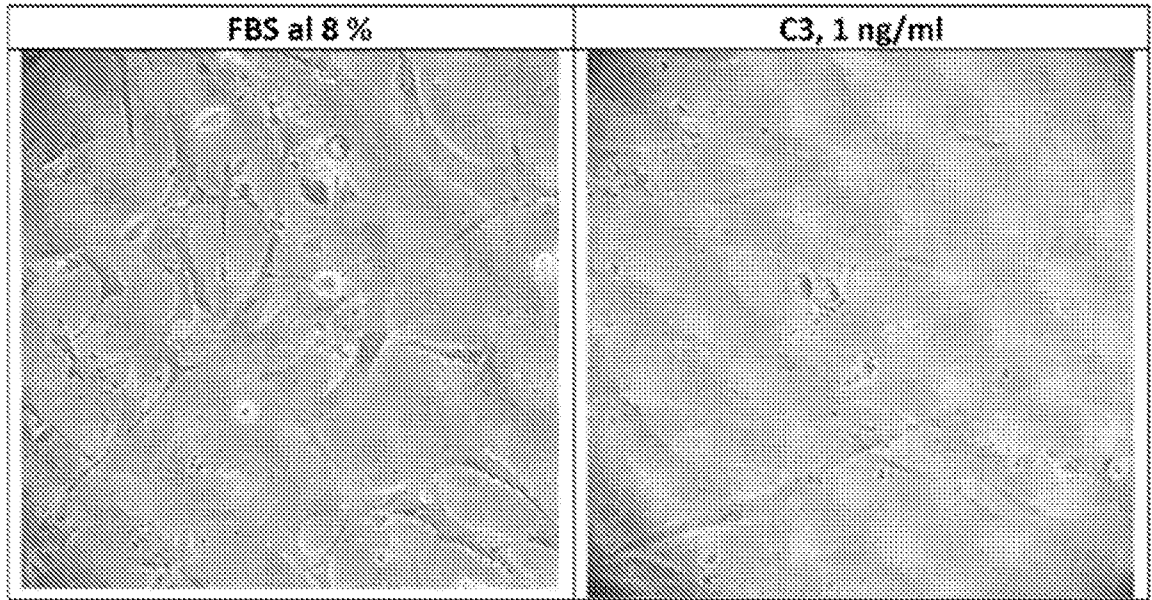


Figura 6

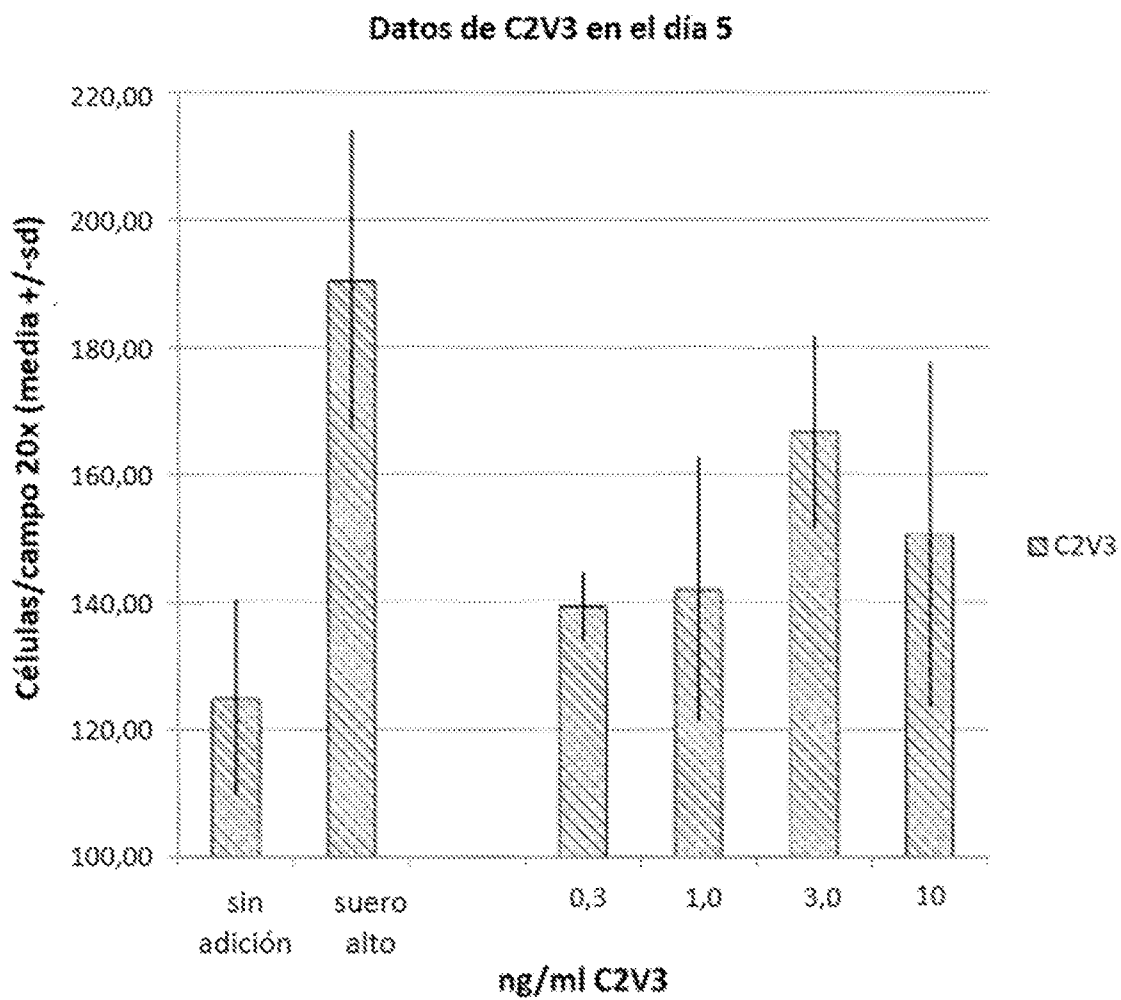


Figura 7

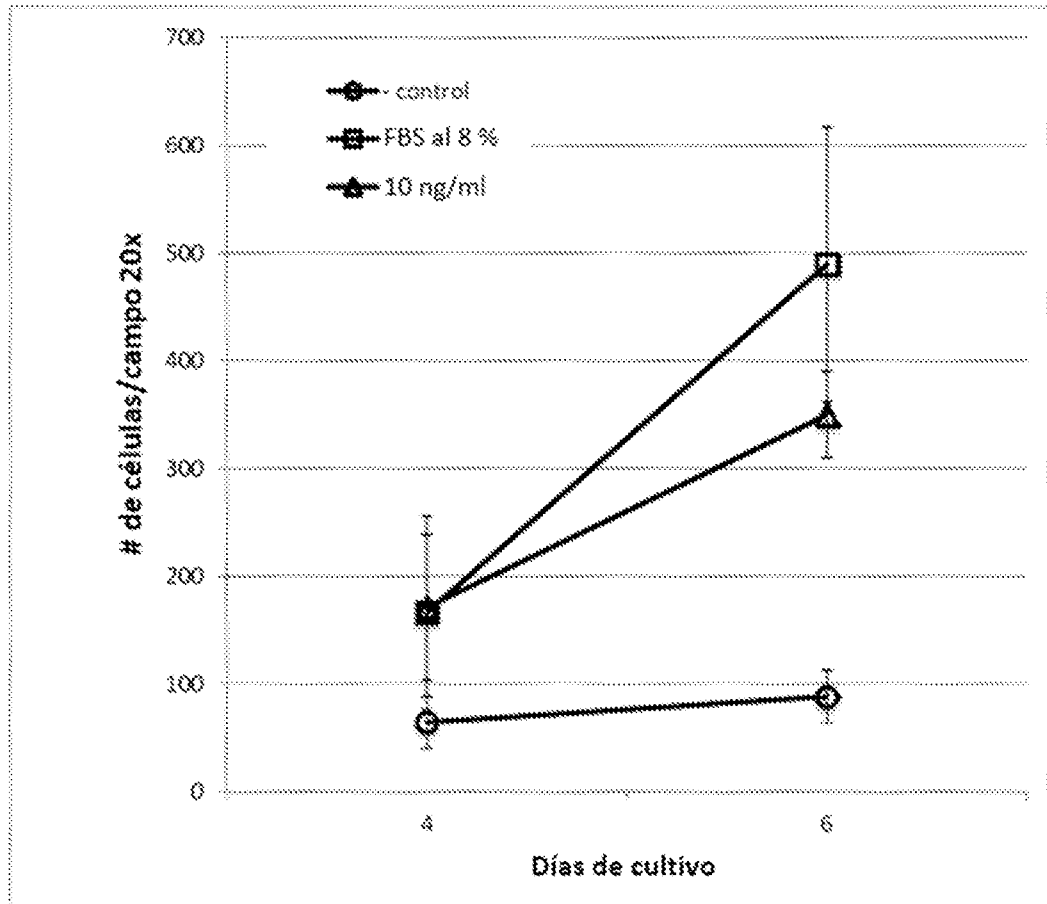


Figura 8

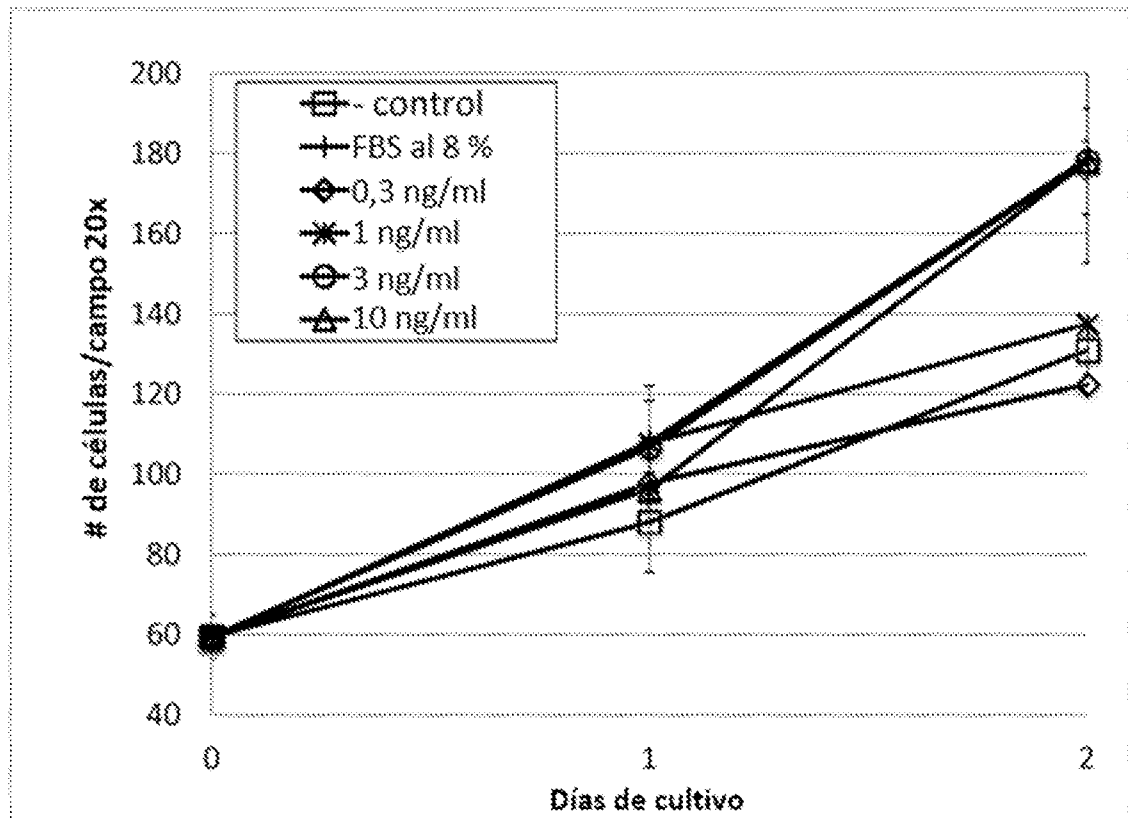


Figura 9