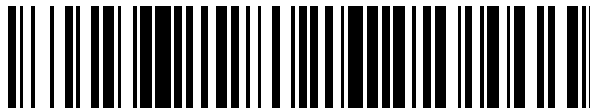


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 005**

51 Int. Cl.:

C07K 14/50 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2006 PCT/US2006/006488**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.09.2006 WO06093814**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2006 E 06735950 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 1856146**

54 Título: **Análogos del factor de crecimiento FGF**

30 Prioridad:

25.02.2005 US 656860 P
23.02.2006 US 361565

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.01.2020

73 Titular/es:

FERRING B.V. (50.0%)
Polarisavenue 130
2132 JX Hoofddorp, NL y
BROOKHAVEN SCIENCE ASSOCIATES (50.0%)

72 Inventor/es:

ZAMORA, PAUL O.;
TAKAHASHI, KAZUYUKI;
PENA, LOUIS A. y
LIN, XINHUA

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 738 005 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

Análogos del factor de crecimiento FGF

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención (campo Técnico)

10 La presente invención se refiere a análogos sintéticos del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), en particular análogos que tienen al principio dos secuencias que se unen a un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), y que además tienen una región de no unión a la heparina del factor de crecimiento y opcionalmente un conector, conectó que puede ser hidrófobo. La invención también se refiere a los usos clínicos de análogos de ese tipo como fármacos solubles y como revestimientos para dispositivos médicos.

15 Antecedentes de la técnica

Los factores de crecimiento de unión a heparina (HBGF) constituyen una gran clase de factores de crecimiento que incluyen los 23 factores de crecimiento de fibroblastos identificados hasta la fecha (los FGF 1 - 23). Se han identificado péptidos de los HBGF naturales que se unen a receptores del factor de crecimiento de unión a heparina. Véase por ejemplo Ray *et al.*, Proc. Natl Acad Sci. USA 94: 7047-7052 (1997). Estos autores demostraron que dos secuencias de aminoácidos de FGF-2 son suficientes para bloquear la actividad mitogénica de FGF-2 en células precursoras neuronales. El primer péptido es una secuencia de diez aminoácidos, de los aminoácidos 65-74, el segundo péptido se extiende de los aminoácidos 115-129.

25 En un enfoque alternativo, se identificó un péptido artificial que se une a un receptor del factor de crecimiento de unión a heparina mediante un método de presentación de fagos. Ballinger *et al.*, Nature BioTechnology 17: 1199-1204 (1999) usaron esta técnica para aislar un péptido de 28 aminoácidos denominado C19, que se une a los receptores FGF-2, pero por sí solo no estimula la actividad biológica. El péptido no tiene identidad de secuencia de aminoácidos con ningún FGF conocido.

30 Los FGF HBGF útiles en la prevención o terapia de una amplia gama de enfermedades y trastornos se pueden purificar a partir de fuentes naturales o se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante; sin embargo, las preparaciones de este tipo son caras y generalmente difíciles de preparar.

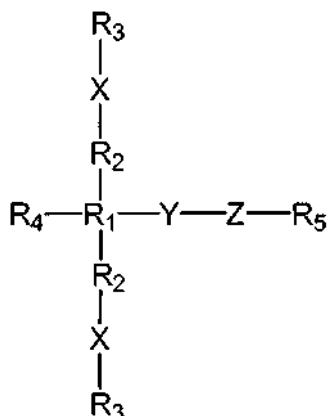
35 Se han descrito composiciones que incluyen homólogos y análogos de los factores de crecimiento de fibroblastos. Véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.679.673 de Lappi y Baird; el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.989.866 de Deisher *et al.*, y el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.294.359 de Fiddes *et al.*, Estas divulgaciones se refieren a homólogos o análogos de FGF que están conjugados con un resto tóxico y que se dirigen a las células portadoras del receptor de FGF; o son homólogos o análogos que modulan las rutas biológicas mediante la señal transducida por el receptor de FGF después de unirse mediante el homólogo o análogo de FGF.

45 La Publicación Internacional WO 00/18921 de Ballinger y Kavanaugh desvela una composición que consiste en proteínas de fusión que tienen afinidad hacia el receptor de FGF unidas a un "dominio de oligomerización", ya sea directamente o mediante un grupo de enlace. El dominio de oligomerización tiene una longitud que varía de 20 a 300 restos, e incluye constructos tales como factores de transcripción, partes de Fc de IgG, cremalleras de leucina y similares. Los dominios de oligomerización desvelados son dominios homodiméricos, en los que una única proteína de fusión por afinidad hacia el receptor de FGF está unida a un único dominio, tal como una cremallera de leucina, que a su vez está unida a una molécula similar por medio de restos de cisteína en los extremos tanto amino como carboxi terminales de las cremalleras de leucina, de manera que dos cremalleras de leucina paralelas, cada una con una única proteína de fusión por afinidad hacia el receptor de FGF, se reticulan por medio de enlaces disulfuro. También se desvela que las proteínas de fusión pueden incluir un dominio de unión a heparina, tal como el uso de jun como dominio de multimerización, que se afirma que es un dominio de unión a heparina.

55 El documento US2004/038348 A1 proporciona análogos sintéticos del factor de crecimiento de unión a heparina que tienen al menos una cadena peptídica que se une a un receptor del factor de crecimiento de unión a heparina, unida mediante enlace covalente a un conector hidrófobo, que a su vez se une mediante enlace covalente a un péptido de no señalización que incluye un dominio de unión a heparina. Los análogos sintéticos del factor de crecimiento de unión a heparina son útiles como compuestos biológicos solubles o como revestimientos de superficie para dispositivos médicos. Los documentos US 6.548.623 B1, US 5.202.311 A, WO2004/018499 A1 y WO2005/082005 A1 muestran análogos similares.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

65 Un aspecto de la presente invención proporciona un análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de fórmula I:



en la que:

- 5 cada X es una cadena peptídica que (i) tiene un mínimo de tres restos de aminoácido, (ii) tiene un máximo de cincuenta restos de aminoácido, y (iii) se une a un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR);
- R₁ es un resto de aminoácido trifuncional único unido mediante enlace covalente a cada X o es un dipéptido de la fórmula AA₁-AA₂;
- 10 AA₁ es un resto de aminoácido, en la que uno de X se une mediante enlace covalente a través del extremo N-terminal de AA₁ o a través de una cadena lateral de AA₁;
- 15 AA₂ es un resto de aminoácido trifuncional, en el que uno de X se une mediante enlace covalente a través de una cadena lateral de AA₂;
- R₂ es un conector que comprende una cadena de 0 a 20 átomos en la estructura principal que incluye carbono, oxígeno, nitrógeno y mezclas de los mismos unidos mediante enlace covalente a R₁ y X;
- 20 Cada R₃ es hidrógeno (H) de modo que el grupo terminal sea NH₂, o es un grupo acilo con una cadena de alquilo, arilo, heteroarilo, alqueno, alquenilo o aralquilo C₁ a C₁₇ lineal o ramificada que incluye un grupo NH₂, NH₃⁺, o NH N-terminal o un derivado acilado correspondiente;
- 25 R₄ no está presente si R₁ es un resto de aminoácido trifuncional único o si R₁ es un dipéptido de la fórmula AA₁-AA₂ en la que uno de X se une mediante enlace covalente a través del extremo N-terminal de AA₁, y de otro modo es R₃;
- 30 R₅ es OH de modo que el grupo terminal es un carboxilo, NH₂, un grupo acilo con una cadena de alquilo, arilo, heteroarilo, alqueno, alquenilo o aralquilo C₁ a C₁₇ lineal o ramificada que incluye un grupo NH₂, NH₃⁺, o NH N-terminal o un derivado acilado correspondiente, o NH-R₃;
- Y es un conector que comprende una cadena de 0 a - 50 átomos unido mediante enlace covalente a R₁ y Z; y
- 35 Z es una cadena peptídica de no señalización que incluye un dominio de unión a heparina, que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende (i) un mínimo de un motivo de unión a heparina, (ii) un máximo de diez motivos de unión a heparina, y (iii) un máximo de treinta aminoácidos.
- Otro aspecto proporciona un análogo del factor de crecimiento de unión a heparina de fórmula I, en la que X y Z son cadenas peptídicas sintéticas.
- 40 Otro aspecto de la presente invención proporciona un análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de fórmula I, en la que Y puede comprender además un conector que (i) es hidrófobo, (ii) comprende la cadena de un mínimo de 9 y un máximo de 50 átomos, y (iii) no se encuentra en el ligando natural del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) a que se une X.
- 45 Además otro aspecto proporciona un análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de fórmula I que se puede caracterizar por que tiene avidez hacia la heparina de modo que el análogo sintético del factor de crecimiento de unión a heparina se une a la heparina en NaCl 0,15 M, pero se eluye con NaCl 1 M.
- 50 Además otro aspecto proporciona un análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de fórmula I, en el que R₁ es un resto de aminoácido trifuncional, en el que un X se une mediante enlace covalente a

través de una cadena lateral de R₁ y un X se une mediante enlace covalente a través de la amina N-terminal de R₁. El resto R₁ de aminoácido trifuncional puede ser un resto de aminoácido de diamina. Cuando se proporciona AA2, este también puede ser un resto de aminoácido de diamina. Los restos de aminoácido de diamina preferentes incluyen a un resto de aminoácido 2,3 diamino propionilo, un resto de aminoácido 2,4 diamino butílico, lisina u ornitina.

Un aspecto de la presente invención proporciona un análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de fórmula I, en la que Y comprende entre una y - treinta - y tres unidades de etilenglicol. Alternativamente, Y comprende una cadena de alquilo saturada o saturada, ramificada o no ramificada de entre uno y veinte átomos de carbono. Alternativamente, Y comprende $[\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_p\text{CO}]_q$ en el que p es de 1 a 10 y q es de 1 a 20. Alternativamente, Y comprende una secuencia peptídica que comprende de uno a 16 restos de Gly.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de fórmula I, en el que cada motivo de unión a heparina de Z puede tener la fórmula BxBB o BBBxB, en la que cada B es independientemente lisina, arginina, ornitina, o histidina, y cada x es independientemente un aminoácido de origen natural. Z puede comprender al menos dos motivos de unión a heparina.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 1, en el que R₁ es un resto de aminoácido trifuncional único, X es uno de la SEQ ID NO: 7 a la SEQ ID NO: 49 y Z es uno de la SEQ ID NO: 2 a la SEQ ED NO: 6.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Además otro aspecto de la presente invención proporciona un revestimiento para un dispositivo médico que comprende el análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un dispositivo médico que comprende el análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Además otro aspecto de la presente invención proporciona un método para mejorar el tratamiento de heridas en un animal vertebrado que comprende administrar, a un sujeto vertebrado con necesidad de un tratamiento de este tipo, una cantidad eficaz de un compuesto que aumenta la actividad del factor de crecimiento de fibroblastos en el que el compuesto es un péptido sintético que tiene una región de no unión a la heparina del factor de crecimiento, un conector y una secuencia que se une específicamente a un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos. En una realización del método, el compuesto es un análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para estimular el crecimiento y la proliferación de células en un animal vertebrado que comprende administrar, a un sujeto vertebrado con necesidad de un tratamiento de ese tipo, una cantidad eficaz de un compuesto que aumenta la actividad del factor de crecimiento de fibroblastos en el que el compuesto es un péptido sintético que tiene una región de no unión a la heparina del factor de crecimiento, un conector y una secuencia que se une específicamente a un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos. En una realización del método, el compuesto es un análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para estimular la angiogénesis es un animal vertebrado que comprende administrar, a un sujeto vertebrado con necesidad de un tratamiento de ese tipo, una cantidad eficaz de un compuesto que aumenta la actividad del factor de crecimiento de fibroblastos en el que el compuesto es un péptido sintético que tiene una región de no unión a la heparina del factor de crecimiento, un conector y una secuencia que se une específicamente a un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos. En una realización del método, el compuesto es un análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para tratar un aneurisma en un animal vertebrado que comprende introducir un dispositivo vasooclusivo que genera un émbolo en el aneurisma, en el que el dispositivo vasooclusivo comprende una cantidad eficaz de un compuesto que aumenta la actividad del factor de crecimiento de fibroblastos, compuesto que es un péptido sintético que tiene una región de no unión a la heparina del factor de crecimiento, un conector y una secuencia que se une específicamente a un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos. En una realización del método, el compuesto es un análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un dispositivo vasooclusivo, que comprende una cantidad eficaz de un compuesto que aumenta la actividad del factor de crecimiento de fibroblastos, compuesto que es un péptido

sintético que tiene una región de no unión a la heparina del factor de crecimiento, un conector y una secuencia que se une específicamente a un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos. En una realización del dispositivo, el compuesto es un análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 Otro aspecto de la presente invención proporciona un análogo de FGF sintético que incluye al menos dos secuencias peptídicas que se unen a un FGFR y una secuencia peptídica de unión a heparina.

10 Otro aspecto de la presente invención proporciona un análogo de FGF sintético que incluye al menos dos secuencias peptídicas que se unen a un FGFR, una secuencia peptídica de unión a heparina y una secuencia espaciadora hidrófoba.

15 Otro aspecto de la presente invención proporciona un análogo de FGF sintético que se puede usar como un revestimiento o componente de dispositivos médicos destinados a su uso *in vivo*.

20 Otro aspecto de la presente invención proporciona un análogo de FGF sintético que se puede usar como un agente farmacéutico. Los agentes farmacéuticos de ese tipo a continuación se podrían administrar mediante métodos de administración convencionales incluyendo aplicación tópica, inyección, administración oral, por vía rectal, mediante el uso de agentes de liberación lenta o de liberación controlada, mediante procedimientos trans-catéter, y similares, y que se pueden usar en el tratamiento de enfisema, para supresión de insuficiencia cardiaca, para controlar el daño por perfusión por infarto de miocardio, para acelerar la curación de fracturas óseas, para acelerar la curación de heridas dérmicas, para controlar el daño por reperfusión por apoplejía, para minimizar el daño por progresión de insuficiencia cardiaca, en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino incluyendo colitis ulcerosa, para acelerar la reparación de cartílagos, para acelerar la curación de hueso necrótico, en el tratamiento de enfermedades neurológicas incluyendo las enfermedades de Alzheimer y Huntington, para aumentar la angiogénesis en la isquemia periférica.

30 Otros objetos, ventajas y nuevas características, y además el alcance de aplicabilidad de la presente invención se expondrán en parte en la descripción detallada que sigue a continuación, tomados en conjunto con los dibujos adjuntos, y en parte llegarán a ser evidentes para las personas con experiencia en la materia después del examen de lo que sigue a continuación, o se pueden aprender mediante la práctica de la invención. Los objetos y ventajas de la invención se pueden realizar y conseguir mediante los instrumentos y combinaciones que se destacan en particular en las reivindicaciones adjuntas.

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE VARIAS VISTAS DE LOS DIBUJOS DE TEDB

Los dibujos añadidos en el archivo adjunto, que se incorporan y forman una parte de la memoria descriptiva, ilustran una o más realizaciones de la presente invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención. Los dibujos tienen solo la finalidad de ilustrar una o más realizaciones preferentes de la invención y no se deben interpretar como limitantes de la invención. En los dibujos:

La Figura 1 representa la secuencia de un análogo de FGF sintético del Ejemplo 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

45 La Figura 2 representa la secuencia de un análogo de FGF sintético del Ejemplo 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

50 La Figura 3A es un gráfico que representa la unión específica del análogo de FGF sintético del Ejemplo 1 para los FGFR en las HUVEC; la Figura 3B es un gráfico que representa la unión específica del análogo de FGF sintético de los Ejemplos 1 y 2 a los FGFR en fibroblastos C3H10T1/2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

55 La Figura 4 es una representación que ilustra la equivalencia del análogo de FGF sintético de los Ejemplos 1 y 2 con respecto al FGF-2 recombinante nativo en la fosforilación de la MAP quinasa y activación de acuerdo con una realización de la presente invención.

60 La Figura 5 es un gráfico de acuerdo con una realización de la presente invención de estimulación de proliferación celular en cultivos de fibroblastos, que ilustra la respuesta a la dosis mitogénica del análogo de FGF sintético de los Ejemplos 1 y 2 con respecto a FGF-2.

65 La Figura 6A es una representación de acuerdo con una realización de la presente invención que ilustra que el análogo de FGF sintético de los Ejemplos 1 y 2 imita a FGF-2 para unión celular *in vitro*, mostrando la unión, después de dos horas, de fibroblastos murinos CH310T1/2 a poliestireno revestido con siliil-heparina solo o con siliil-heparina más el análogo de FGF sintético de los Ejemplos 1 y 2. (*) indica p inferior a 0,05; la Figura 6B es una microfotografía de células endoteliales aórticas de bovino cultivadas en policaprolactona con (panel a la izquierda) y sin (panel a la derecha) un revestimiento del análogo de FGF sintético del Ejemplo 1.

La Figura 7A es una representación de acuerdo con una realización de la presente invención que ilustra la comparación de capilares/campo utilizando suturas de polilactida revestidas en músculo de rata a las 2 semanas, en comparación con ningún revestimiento con suturas revestidas con silil heparina más el Compuesto del Ejemplo 1; la Figura 7B presenta microfotografías de suturas de polilactida revestidas en músculo de rata a las 2 semanas, en las que el panel A es sin revestimiento, el panel B es un revestimiento de silil heparina, el panel C es un revestimiento del Compuesto del Ejemplo 1, y el panel D es un revestimiento de silil-heparina y el Compuesto del Ejemplo 1.

La Figura 8 son microfotografías de formación de tubos con células endoteliales de la vena umbilical humana (las HUVEC) tratadas con el Compuesto del Ejemplo 3 y 4 de acuerdo con una realización de la presente invención. Las HUVEC se cultivaron en Matrigel y se estimularon con 100 ng/ml de FGF-2 (A), 50 ng/ml del Compuesto del Ejemplo 3 (B) o del Compuesto del Ejemplo 4 (C), o se dejaron sin tratar como controles (D). Después de 24 horas los cultivos se fijaron y se tiñeron con azul de Toluidina O; ampliación original 40X.

La Figura 9 es una representación de puntuaciones angiogénicas asignadas de acuerdo con los siguientes criterios: 0, sin vasos; 1, pocos vasos finos; 2, vasos más grandes con penetración superficial; y 3, varios vasos más grandes con penetración profunda. Los compuestos sometidos a ensayo fueron FGF-2 y los Compuestos del Ejemplo 3 y 4. La representación de barras muestra los percentiles 10 y 90 de la puntuación angiogénica. Los datos se analizaron mediante el uso del Ensayo de Sumas de Rangos de Mann-Whitney. (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 10 es una representación de acuerdo con una realización de la presente invención del contenido de hemoglobina (Hb) de tapones de Matrigel. La hemoglobina se extrajo de los tapones y se convirtió en de ferricianato de hemoglobina con el reactivo de Drabkin con monitorización posterior a 550 nm usando hemoglobina bovina como patrón. Los datos se informan como el promedio de al menos 5 determinaciones \pm D. T. El análisis estadístico se realizó con ANOVA con un ensayo de Tukey *post hoc* para cada grupo. Los asteriscos indican $p < 0,05$ en comparación con los controles.

La Figura 11 ilustra una representación de acuerdo con una realización de la presente invención del cambio de peso en animales con y sin colitis ulcerosa inducida en presencia y ausencia de un análogo de FGF administrado por vía parenteral.

La Figura 12 ilustra una representación de acuerdo con una realización de la presente invención del cambio de peso en animales con y sin colitis ulcerosa inducida en presencia y ausencia de un análogo de FGF administrado por vía parenteral.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En una realización particular de la presente invención, el análogo de FGF sintético de la presente invención consiste esencialmente en la molécula de fórmula I, es decir, la molécula de fórmula I es el componente activo principal en la composición de análogo de FGF sintético.

Las regiones X y Z de los análogos de FGF sintéticos de fórmula I incluyen restos de aminoácido, y opcionalmente la región Y, y si se proporcionara, R₂, incluyen restos de aminoácido. Un resto de aminoácido se define como -NHRCO-, en el que R puede ser hidrógeno o cualquier grupo orgánico. Los aminoácidos pueden ser D-aminoácidos o L-aminoácidos. Además, los aminoácidos pueden ser α -aminoácidos, β -aminoácidos, γ -aminoácidos, o δ -aminoácidos, etc., dependiendo de la longitud de la cadena de carbonos del aminoácido.

Los aminoácidos de las regiones componentes X, Y y Z de los análogos de FGF sintéticos de la invención pueden incluir cualquiera de los veinte aminoácidos encontrados en la naturaleza en proteínas, es decir, alanina (Ala, A), arginina (Arg, R), asparagina (Asn, N), ácido aspártico (Asp, D), cisteína (Cys, C), ácido glutámico (Glu, E), glutamina (Gln, Q), glicina (Gly, G), histidina (His, H), isoleucina (Ile, I), leucina (Leu, L), lisina (Lys, K), metionina (Met, M), fenilalanina (Phe, F), prolina (Pro, P), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), triptófano (Trp, W), tirosina (Tyr, Y), y valina (Val, V).

Además, los aminoácidos de las regiones componentes X, Y y Z de los análogos de FGF sintéticos de la invención pueden incluir cualquiera de los aminoácidos de origen natural no encontrados en la naturaleza en proteínas, por ejemplo [beta]-alanina, betaína (N,N,N-trimetilglicina), homoserina, homocisteína, ácido [gamma]-amino butírico, ornitina, y citrulina.

Además, los aminoácidos de las regiones componentes X, Y y Z de los análogos de FGF sintéticos de la invención pueden incluir cualquiera de los aminoácidos no biológicos, es decir, los que normalmente no se encuentran en sistemas vivos, tales como por ejemplo, un ácido amino carboxílico de cadena lineal no encontrado en la naturaleza. Los ejemplos de ácidos amino carboxílicos de cadena lineal no encontrados en la naturaleza incluyen ácido 6-aminoheptanoico, ácido 7-aminoheptanoico, ácido 9-aminononanoico y similares.

En la fórmula I, dos regiones X se unen a R₁ mediante enlace covalente, en la que R₁ es un resto de aminoácido trifuncional, preferentemente un resto de alfa aminoácido trifuncional, o es un dipéptido de la fórmula AA₁-AA₂. Aquí y en cualquier parte, incluyendo las reivindicaciones, un grupo tal como R₁ se "une mediante enlace covalente" a un grupo tal como X cuando se une, directamente o a través de a tonos intermedios, constituyendo los átomos intermedios opcionalmente otro grupo, mediante enlaces covalentes. De ese modo X se enlaza mediante enlace covalente o se une (las expresiones "enlazado mediante enlace covalente" y "unido mediante enlace covalente" son sinónimos) a R₁ cuando se une de manera dirigida por medio de un único enlace covalente, y también se enlaza o se une mediante enlace covalente a R₁ cuando se une por medio de una serie de enlaces, lentes y átomos asociados, tal como cuando R₂ no es cero.

Cuando R₁ es un resto de aminoácido trifuncional, X se une mediante enlace covalente a un grupo funcional, W se une mediante enlace covalente a un segundo grupo funcional, y el resto de aminoácido trifuncional se une mediante enlace covalente a R₂ con el tercer grupo funcional. Se debe observar que los enlaces de ese tipo se pueden producir con cualquier grupo funcional químicamente permitido. Por ejemplo, con un aminoácido de diamina, es posible que un X se una mediante enlace covalente a través del grupo amino N-terminal, el segundo X se une mediante enlace covalente a través de la épsilon amina de la cadena lateral, y el aminoácido de diamina se une mediante enlace covalente a Y a través del grupo carboxilo C-terminal. Sin embargo, cuando el resto de aminoácido trifuncional es un aminoácido con una cadena lateral de sulfhidrilo reactivo, tal como cisteína, es posible y se contempla que un X se una mediante enlace covalente a través del grupo amino N-terminal, el segundo X se une mediante enlace covalente a través del grupo carboxilo C-terminal, y la cisteína se une mediante enlace covalente a Y a través de la cadena lateral de sulfhidrilo reactivo. Con otros restos de aminoácido trifuncionales se pueden usar enfoques similares, usando agentes de reticulación como se describe en lo sucesivo en el presente documento.

Cuando R₁ es un dipéptido de la fórmula AA₁-AA₂, AA₁ puede ser cualquier resto de aminoácido, e incluye, pero no se limita a, un resto de aminoácido trifuncional, y AA₂ es un resto de aminoácido trifuncional. De ese modo una región X se une mediante enlace covalente a AA₁, ya sea a través de la amina N-terminal o como alternativa, si AA₁ es un resto de aminoácido trifuncional, a través de la cadena lateral, y la región X restante se une mediante enlace covalente a través de la cadena lateral de AA₂. AA₂ es, en una realización preferente, un aminoácido de diamina.

El aminoácido AA₁ de fórmula I puede ser cualquier aminoácido, natural o no natural. AA₂ puede ser cualquier resto de aminoácido trifuncional, preferentemente un resto de alfa aminoácido trifuncional. En una realización preferente, el resto de aminoácido trifuncional es un aminoácido de diamina, tal como por ejemplo lisina u ornitina, o cualquier otro aminoácido que tenga dos grupos amino.

Las regiones X de fórmula I de los análogos de FGF sintéticos de la presente invención son una cadena peptídica sintética que se une a FGFR. La región X puede, por ejemplo, tener cualquier secuencia de aminoácidos que se una a FGFR, y puede incluir secuencias de aminoácidos que son idénticas a una parte de la secuencia de aminoácidos de un FGF. Alternativamente, X puede tener una secuencia de aminoácidos homóloga en lugar de idéntica a una parte de la secuencia de aminoácidos de un FGF. El particular el FGFR unido por el análogo de FGF sintético de la invención puede ser o no el receptor relacionado con el FGF original, es decir el análogo de FGF sintético se puede unir además únicamente al receptor de un FGF diferente.

El término "homólogo", como se usa en el presente documento se refiere a péptidos que se diferencian en la secuencia de aminoácidos en una o más posiciones de aminoácido cuando las secuencias se alinean. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de dos péptidos homólogos se pueden diferenciar solamente en un resto de aminoácido dentro de las secuencias de aminoácidos alineadas de cinco a diez aminoácidos. Alternativamente, dos péptidos homólogos de diez a quince aminoácidos se pueden diferenciar en no más de dos restos de aminoácido cuando se alinean. En otra alternativa, dos péptidos homólogos de quince a veinte o más aminoácidos se pueden diferenciar en hasta tres restos de aminoácido cuando se alinean. Para péptidos más largos, los péptidos homólogos se pueden diferenciar en hasta aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 % o un 25 % de los restos de aminoácido cuando las secuencias de aminoácidos de los dos homólogos peptídicos se alinean.

Las secuencias de aminoácidos particularmente útiles como la región X de fórmula I incluyen homólogos de fragmentos de los FGF de origen natural que se diferencian de las secuencias de aminoácidos del factor de crecimiento natural solamente en una o dos o unas pocas posiciones. Las secuencias de ese tipo incluyen preferentemente cambios conservativos, en las que el aminoácido original se reemplaza por un aminoácido de un carácter similar de acuerdo con principios bien conocidos; por ejemplo, el reemplazo de un aminoácido no polar tal como alanina por valina, leucina, isoleucina o prolina; o la sustitución de un aminoácido ácido o básico por otro aminoácido del mismo carácter ácido o básico.

En otra alternativa, la región X del análogo de FGF sintético puede incluir una secuencia de aminoácidos que no muestra homología detectable con la secuencia de aminoácidos de cualquier FGF. Los análogos de péptidos o factor de crecimiento útiles como componentes de la región X de los análogos sintéticos de la presente invención, que tienen una homología pequeña o nula de la secuencia de aminoácidos con el factor de crecimiento relacionado y que aún se unen a los FGFR se pueden obtener mediante una amplia gama de métodos, que incluyen por ejemplo, selección mediante presentación de fagos. Véase cómo un ejemplo: Sidhu *et al.*, Phage display for selection of novel

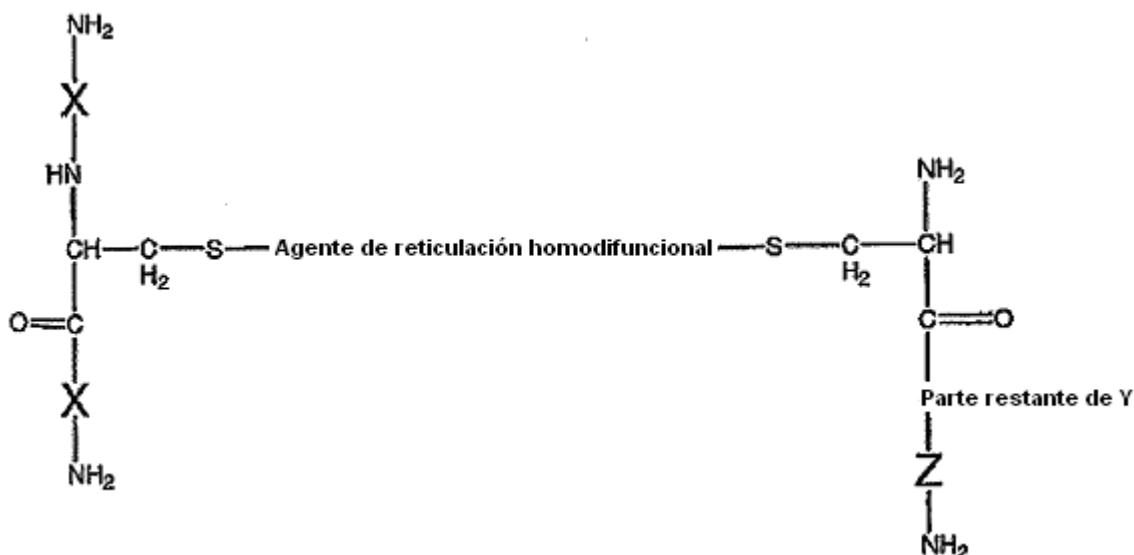
binding peptides. Methods Enzymol. 328: 333-63 (2000).

La región X de los análogos de FGF sintéticos de la invención puede tener cualquier longitud que incluya una secuencia de aminoácidos ese una reforma eficaz a un FGFR. Preferentemente, la región X de los análogos de FGF sintéticos tiene una longitud mínima de al menos aproximadamente tres restos de aminoácido. Más preferentemente, la región X de los análogos de FGF sintéticos tiene una longitud mínima de al menos aproximadamente seis restos de aminoácido. Lo más preferentemente la región X de los análogos de FGF sintéticos Tiene una longitud mínima de al menos aproximadamente diez restos de aminoácido. La región X de los análogos de FGF sintéticos de la invención también tiene preferentemente una longitud máxima de hasta aproximadamente cincuenta restos de aminoácido, más preferentemente una longitud máxima de hasta aproximadamente cuarenta restos de aminoácido, y lo más preferentemente una longitud máxima de hasta aproximadamente treinta restos de aminoácido.

Las regiones R₂ de fórmula I pueden incluir una cadena de átomos o una combinación de átomos que forman una cadena. Por lo general, las cadenas son cadenas principalmente de átomos de carbono, que también pueden incluir opcionalmente oxígeno o átomos de nitrógeno, tales como por ejemplo cadenas de átomos formadas a partir de aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos encontrados en proteínas, como se ha indicado anteriormente; aminoácidos de origen natural no encontrados en proteínas, tales como ornitina y citrulina; o aminoácidos no naturales, tales como ácido amino hexanoico; o una combinación de cualquiera de los aminoácidos mencionados anteriormente). También se contempla que los agentes tales como polietilenglicol (PEG), óxido de polietileno (PEO), amino polietilenglicol, bis-amina-PEG, y otras variantes de polietilenglicol conocidos por las personas con experiencia en la materia se pueden usar de la misma manera. Para la región R₂ son particularmente preferentes las cadenas que incluyen un amino terminal y un carboxilo terminal, de modo que las cadenas se pueden usar en metodologías convencionales de síntesis peptídica. Los ejemplos incluyen cualquier aminoácido, ácidos amino carboxílicos, preferentemente ácidos amino carboxílicos de cadena lineal, y espaciadores de amino-PEG-ácido difuncionales. Entre los aminoácidos, la glicina es preferente.

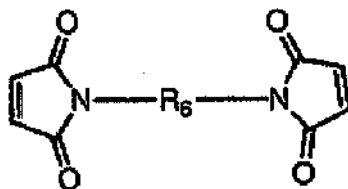
La cadena de átomos de la región R₂ de fórmula I, si se proporciona, se une mediante enlace covalente a R₁ y X. Los enlaces covalente suelen ser, por ejemplo, enlaces peptídicos, amido, tioéter o éster. Si se proporciona, la región R₂ incluye preferentemente una cadena de un mínimo de tres átomos. Por ejemplo, cuando los enlaces covalentes son enlaces peptídicos, la región R₂ se puede formar a partir de una cadena de al menos uno, al menos dos o al menos tres aminoácidos. Sin embargo, cuando se usan otros enlaces distintos a los peptídicos, la región R₂ puede incluir además un resto de reticulación. Por ejemplo, en la fórmula II la región R₂ es un conector que consiste en un agente de reticulación homodifuncional de sulfhidrilo reactivo y una segunda Cys, o como alternativa incluye un agente de reticulación heterodifuncional.

En una realización, las dos regiones X forman un único constructo peptídico lineal, separado por un grupo R₁ que es un resto de aminoácido trifuncional, opcionalmente separado por ambos grupos R₂ y un grupo R₁. El resto de aminoácido trifuncional puede tener, por ejemplo, un grupo sulfhidrilo reactivo en la cadena lateral, tal como un L- o D-3-mercapto aminoácido, que incluye, pero no se limita a, L- o D-cisteína, L- o D- penicillamina, 3-mercapto fenilalanina, o un derivado de cualquiera de los mencionados anteriormente. El resto de aminoácido trifuncional R₁ se puede unir mediante enlace covalente a las regiones X mediante enlaces peptídicos, de modo que el constructo peptídico lineal único es, por ejemplo, X-C-X o X-R₂-C-R₂-X, en el que C es L- o D-cisteína, y cada X o R₂, si fuera el caso, se une mediante enlace covalente a C mediante enlaces peptídicos. En una descripción generalizada, esto incluye por lo tanto la siguiente fórmula general:



En esta fórmula, el "agente de reticulación homo-difuncional" forma una parte de Y, junto con el resto C al que se une la parte restante de Y (si la hubiera) se une mediante enlace covalente. Cualquier agente de reticulación homo-difuncional de sulfhidrilo reactivo se puede usar, tal como por ejemplo un agente de reticulación de maleimida, un agente de reticulación de haloacetilo o un agente de reticulación de disulfuro de piridilo.

Se conoce un gran número de agentes de reticulación de sulfhidrilo de ese tipo, tales como los agentes de reticulación de maleimida. Por ejemplo, en los agentes de reticulación de maleimida de la fórmula general:



R_6 puede ser una cadena de alquilo C_1 a C_8 , tal como por ejemplo 1,2-bis-maleimidoetano, 1,4-bis-maleimidobutano o 1,6-bis-maleimidoheptano, o puede ser un grupo arilo tal como fenilo, tal como por ejemplo 1,4-fenil dimaleimida o 1,2-fenil dimaleimida, o puede ser una cadena alifática que contiene uno o más miembros de cadena de oxígeno (O), azufre (S) o nitrógeno (N), y opcionalmente una cetona, tal como por ejemplo ditio-bis-maleimidoetano, éster de maleimidometilo del ácido maleimidopropiónico, bis-maleimidometiléter, 1,11-bis-maleimido-(PEO)₄, 1,8-bis-maleimido-(PEO)₃, etc.

En otra realización más, se puede usar cualquiera de un número de PEG homo- o heterofuncionales activados por vía electrófila, incluyendo los que contienen grupos funcionales tales como propionato de succinimidilo, butanoato de succinimidilo, N-hidroxisuccinimida, carbonato de benzotriazol, aldehídos, acetaldehído dietil acetal, o vinilsulfona, y otros conocidos por los expertos en la materia.

En otra realización más, se usa un agente de reticulación heterodifuncional. Los reactivos heterodifuncionales que se reticulados con dos restos de acoplamiento diferentes pueden ser particularmente útiles. De ese modo, el resto de acoplamiento en R_1 es un resto de cisteína e Y comprende un resto u otra parte de resto con un grupo amino y un agente de reticulación para un grupo amino y un grupo sulfhidrilo, por ejemplo éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida. Alternativamente el reactivo de reticulación une dos grupos amino, por ejemplo N-5-azido-2-nitrobenzoyloxisuccinimida, un grupo amino y un grupo carboxilo, por ejemplo 4-[p-azidosalicilamido]butilamina, o un grupo amino y un grupo guanadio que está presente en la cadena lateral de la arginina, por ejemplo monohidrato de p-azidofenil glixal.

En los análogos de FGF sintéticos de la presente invención, en una realización precedente, la región Y de fórmula I es un conector que es lo suficientemente hidrófobo como para unir mediante enlace no covalente el análogo de FGF a una superficie de poliestireno o policaprolactona, o similar. Además, la región Y se puede unir a otras superficies hidrófobas, en particular a las superficies hidrófobas formadas a partir de materiales usados en dispositivos médicos. Generalmente las superficies de ese tipo son superficies hidrófobas. Los ejemplos de superficies adecuadas incluyen, pero no se limitan a, las formadas a partir de polímeros hidrófobos tales como policarbonato, poliéster, polipropileno, polietileno, poliestireno, politetrafluoroetileno, politetrafluoroetileno expandido, cloruro de polivinilo, poliamida, poliacrilato, poliuretano, alcohol polivinílico, poliuretano, acetato de poli etil vinilo, poli(metacrilato de butilo), poli(etileno-co-acetato de vinilo), policaprolactona, polilactida, poliglicólido y copolímeros de cualesquiera dos o más de los mencionados anteriormente; siloxanos tal como 2,4,6,8- tetrametilclotetrasiloxano; cauchos naturales y artificiales; vidrio; y metales incluyendo acero inoxidable, titanio, latino, y nitinol. Preferentemente, la unión de los análogos de FGF a la superficie hidrófoba es de una cantidad suficiente como para su detección con un método analítico tal como un inmunoensayo relacionado con enzimas o un ensayo biológico.

De acuerdo con una realización de la invención, la región Y de fórmula I incluye una cadena de átomos o una combinación de átomos que forman una cadena. Generalmente, las cadenas son cadenas de átomos de carbono, que también pueden incluir opcionalmente átomos de oxígeno, nitrógeno o azufre, tal como por ejemplo cadenas de átomos formadas a partir de aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos encontrados en proteínas, como se ha enumerado anteriormente; aminoácidos de origen natural no encontrados en proteínas, tales como ornitina y citrulina; o aminoácidos no naturales, tales como un ácido amino carboxílico; o una combinación de cualquiera de los aminoácidos mencionados anteriormente). Otros miméticos de aminoácidos se pueden usar del mismo modo, tal como PEG, PEO, amino polietilenglicol, bis-amina-PEG, y otras variantes de polietilenglicol conocidas por las personas con experiencia en la materia. Para la región Y son particularmente precedentes las cadenas que incluyen un grupo amino terminal y un grupo carboxilo terminal, de modo que las cadenas se pueden usar en metodologías de síntesis peptídica convencionales. Los ejemplos incluyen cualquier aminoácido, ácidos amino carboxílicos, preferentemente ácidos amino carboxílicos de cadena lineal, y espaciadores de amino-PEG-ácido difuncionales. Entre los aminoácidos, la glicina es preferente.

- La cadena de átomos de la región Y de fórmula I se une mediante enlace covalente a Ri y a la secuencia Z. Los enlaces covalente pueden ser, por ejemplo, enlaces peptídico, amido, tioéter o éster. Un enlace peptídico es particularmente preferente. Preferentemente, la región Y incluye una cadena de un mínimo de - nueve átomos. Más preferentemente, la región Y incluye una cadena de un mínimo de - doce átomos. Lo más preferentemente, la región Y incluye una cadena de un mínimo de - quince átomos. Por ejemplo, la región Y se puede formar a partir de una cadena de al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis aminoácidos. Alternativamente, la región Y se puede formar a partir de una cadena de al menos uno, al menos dos, o al menos tres ácidos amino carboxílicos, tal como restos de ácido aminohexanoico.
- 5
- 10 Preferentemente, la región Y incluye una cadena de un máximo de - cincuenta átomos. Más preferentemente, la región Y incluye una cadena de un máximo de - cuarenta- cinco átomos. Lo más preferentemente, la región Y incluye una cadena de un máximo de - treinta y cinco átomos. Por ejemplo, la región Y se puede formar a partir de una cadena de hasta - doce, hasta - quince, o hasta - diecisiete aminoácidos.
- 15 La secuencia de aminoácidos de la región Y es preferentemente una secuencia artificial, es decir, no incluye ninguna secuencia de aminoácidos de cuatro o más restos de aminoácido encontrados en un ligando natural de un FGF.
- En una realización particular, la región Y incluye un resto de aminoácido hidrófobo, o una cadena de restos de aminoácido hidrófobos. La región Y puede incluir, por ejemplo, uno o más restos de ácido amino carboxílico, tal como uno, dos, tres o más restos de ácido aminohexanoico. En otra realización alternativa, la región Y puede incluir una combinación de restos de aminoácido hidrófobos.
- 20
- En otra realización particular, la región Y de la molécula puede incluir una cadena de alquilo saturada o saturada, ramificada o no ramificada de entre uno y - veinte átomos de carbono. En una realización más, la región Y puede incluir una cadena de restos hidrófilos, tal como por ejemplo, restos de etilenglicol. Por ejemplo, la región Y puede incluir al menos - tres, o al menos - cuatro, o al menos - cinco restos de etilenglicol.
- 25
- La región Z de la molécula de fórmula I es una región de unión a heparina y puede incluir uno o más motivos de unión a heparina, BBxB o BBBxB como lo describen Verrecchio *et al.*, J. Biol. Chem. 275: 7701 (2000). Alternativamente, la región Z puede incluir motivos tanto BBxB como BBBxB (en los que B representa lisina, arginina, o histidina, y x representa un aminoácido de origen natural, o un aminoácido de origen no natural). Por ejemplo, los motivos de unión a heparina se pueden representar mediante la secuencia [KR] [KR] [KR]X(2)[KR] (SEQ ID NO: 1), que designa los primeros tres aminoácidos como cada uno seleccionar independientemente entre lisina o arginina, seguido de cualesquiera de los aminoácidos y un sexto aminoácido que es lisina o arginina.
- 30
- 35 El número de motivos de unión a heparina es variable. Por ejemplo, la región Z puede incluir al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cinco motivos de unión a heparina. Cuando hay más de un motivo de unión a heparina, los motivos pueden ser iguales o diferentes. Alternativamente, la región Z incluye hasta un máximo de - diez motivos de unión a heparina. En otra realización alternativa, la región Z incluye al menos cuatro, al menos seis o al menos ocho restos de aminoácido. Además, en ciertas realizaciones la región Z incluye hasta - veinte, hasta -, veinticinco, o hasta - treinta restos de aminoácido. Se debe observar que, en parte, la avidéz de la región Z hacia la heparina se determina mediante los motivos de unión a heparina particulares seleccionados y el número de los motivos de ese tipo en Z. De ese modo, para aplicaciones particulares, tanto la selección como el número de los motivos de ese tipo se puede variar para proporcionar una unión óptima de la región Z a heparina.
- 40
- 45 En una realización preferente, la secuencia de aminoácidos de la región Z es RKRKLERIAR (SEQ ID NO: 2). En otra realización, la secuencia de aminoácidos de la región Z es RKRKLGRIAR (SEQ ID NO: 3). En otra realización más, la secuencia de aminoácidos de la región Z es RKRKLWRARA (SEQ ID NO: 4). En otra realización más, la secuencia de aminoácidos de la región Z es RKRLDRIAR (SEQ ID NO: 5). En otra realización más, la secuencia de aminoácidos de la región Z es RKRKLERIARC (SEQ ID NO: 6). La presencia de un resto de cisteína terminal proporciona opcionalmente la oportunidad de unir otras moléculas, incluyendo reactivos de detección tales como fluorocromos, radioisótopos y otros marcadores detectables, a la región Z, así como la oportunidad de unirse a toxinas, agentes inmunógenos y similares.
- 50
- 55 Los dominios de unión a heparina que portan una homología de secuencia pequeña o nula con respecto a los dominios de unión a heparina conocidos también se contempla en el presente invención. Como se usa en el presente documento la expresión "unión a heparina" se refiere a la unión al polisacárido modificado con -NHSO_3^- y sulfato, heparina, y también a la unión al polisacárido modificado relacionado, el heparano. Se contempla que los dominios de ese tipo presentan unión en soluciones fisiológicas incluyendo NaCl 0,15 M, y se espera que no formen complejos a concentraciones salinas superiores a 0,5 M de NaCl.
- 60
- La región Z de los análogos de FGF sintéticos de la presente invención confiere la propiedad de unión a heparina a bajas concentraciones salinas, hasta -0,15 M de NaCl, opcionalmente hasta -0,48 M de NaCl, formando un complejo entre la heparina y la región Z del análogo del factor. El complejo se puede disociar en NaCl 1 M para liberar el análogo de FGF sintético del complejo de heparina.
- 65

La región Z es un péptido de no señalización. Por consiguiente, cuando se usa solo la región Z se une a la heparina que se puede unir a un receptor de FGF, pero la unión del péptido de la región Z solo no inicia ni bloquea la señalización por el receptor.

5 El extremo C-terminal de la región Z puede estar bloqueado o libre. Por ejemplo, el extremo C terminal de la región Z puede ser el grupo carboxilo libre del aminoácido terminal, o como alternativa, el extremo C terminal de la región Z puede ser un grupo carboxilo bloqueado, tal como por ejemplo, un grupo amido.

Como se usa en el presente documento y en cualquier parte, los siguientes términos tienen los significados dados.

10 El término "alqueno" incluye hidrocarburos insaturados que contienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alqueno de ese tipo incluyen etileno, propeno, y similares.

15 El término "alqueno" incluye un radical hidrocarburo monovalente lineal de dos a seis átomos de carbono o un radical hidrocarburo monovalente ramificado de tres a seis átomos de carbono que contiene al menos un doble enlace; los ejemplos de los mismos incluyen etenilo, 2- propenilo, y similares.

20 Los grupos "alquilo" especificados en el presente documento incluyen los radicales alquilo de la longitud designada en una configuración ya sea lineal o ramificada. Los ejemplos de radicales alquilo de ese tipo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, butilo terciario, pentilo, isopentilo, hexilo, isohexilo, y similares.

25 El término "arilo" incluye un radical hidrocarburo aromático monovalente o bicíclico de 6 a 12 átomos en el anillo, y opcionalmente sustituido independientemente con uno o más sustituyentes seleccionados entre alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, alcoxi, alquitio, halo, nitro, acilo, ciano, amino, amino monosustituido, amino disustituido, hidroxilo, carboxilo, o alcoxi-carbonilo. Los ejemplos de un grupo arilo incluyen fenilo, bifenilo, naftilo, 1-naftilo, y 2-naftilo, derivados de los mismos, y similares.

30 El término "aralquilo" incluye un radical - R^aR^b en el que R^a es un grupo alqueno (un alquilo divalente) y R^b es un grupo arilo como se ha definido anteriormente. Los ejemplos de grupos de aralquilo incluyen bencilo, feniletilo, 3-(3-clorofenil)-2-metilpentilo, y similares. El término "alifático" incluye compuestos con cadenas de hidrocarburo, tales como por ejemplo alcanos, alquenos, alquinos, y derivados de los mismos.

El término "acilo" incluye un grupo RCO-, en el que R es un grupo orgánico. Un ejemplo es el grupo acetilo CH₃CO-.

35 Un péptido o resto alifático está "acilado" cuando un grupo alquilo o alquilo sustituido como se ha definido anteriormente se une a través de uno o más grupos carbonilo { -(C=O)- }. De la forma más habitual un péptido está acilado en el extremo N-terminal.

Una "amida" incluye compuestos que tienen un nitrógeno trivalente unido a un grupo carbonilo (-CO.NH₂).

40 Una "amina" incluye compuestos que contienen un grupo amino (-NH₂).

45 Un "aminoácido de diamina" es un aminoácido o resto que contiene dos grupos amino reactivo y un grupo carboxilo reactivo. Los ejemplos representativos incluyen resto de aminoácido de 2,3 diamino propionilo, resto de aminoácido 2,4 diamino butírico, lisina u ornitina.

50 Un "aminoácido trifuncional" es un aminoácido o resto con tres grupos reactivos, uno la amina N-terminal, un segundo el extremo carboxilo C-terminal, y el tercero comprendiendo toda o parte de la cadena lateral. Los aminoácidos trifuncionales aminoácidos por lo tanto incluyen, solo a modo de ejemplo, aminoácidos de diamina; aminoácidos con un grupo sulfhidrilo reactivo en la cadena lateral, tal como mercapto aminoácidos incluyendo cisteína, penicilamina, o 3-mercapto fenilalanina; aminoácidos con un grupo carboxilo reactivo en la cadena lateral, tal como ácido aspártico y ácido glutámico; y aminoácidos con un grupo guanadio reactivo en la cadena lateral, tal como arginina.

55 Los análogos de FGF sintéticos representados por la fórmula I, en la que X es un análogo de FGF, es un análogo funcional de un FGF, o parte del mismo, que puede ser cualquier FGF, tal como cualquiera de los FGF conocidos, incluyendo los 23 FGF de FGF-I a FGF-23.

60 Los factores de crecimiento de fibroblastos (los FGF) constituyen una familia de proteínas relacionadas que controlan el crecimiento normal y la diferenciación de los tipos de células mesenquimales, epiteliales y neuroectodérmicas. Se han encontrado homólogos en una gran diversidad de especies. Los FGF muestran una afinidad muy alta hacia la heparina y, por lo tanto, también se conocen como factores de crecimiento de unión a heparina (los HBGF). Como se usa en el presente documento, el término los HBGF incluye todos los FGF.

65 Se conocen dos tipos principales de FGF. El primer tipo de FGF se aisló inicialmente del tejido cerebral. Se identificó por sus actividades de aumento de la proliferación de fibroblastos murinos, tales como las células 3T3. Debido a su

pi básico, el factor se denominó FGF básico (bFGF, o HBGF-2, factor de crecimiento de heparina-bmdmg-2) y ahora se conoce generalmente como FGF-2. Este es el prototipo de la familia FGF.

5 Otro tipo de FGF, también aislado inicialmente a partir de tejidos cerebrales, es el FGF ácido (aFGF, también conocido como HBGF-I, factor 1 de crecimiento de unión a heparina o HBGF- α , factor α de crecimiento de unión de heparina), ahora conocido generalmente como FGF-I. Se identificó por su actividad potenciadora de proliferación de mioblastos.

10 Otros factores de crecimiento de fibroblastos que pertenecen a la misma familia incluyen FGF-3 (o HBGF-3, factor 3 de crecimiento de unión a heparina, denominado originalmente int-2; véase Fekete, Trends in Neurosci. 23: 332 (2000)), FGF-4 (HBGF-4, factor 4 de crecimiento de unión a heparina, reconocido inicialmente como el producto del oncogén hst; véase Sakamoto *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 12368-72), y FGF-5 (denominado originalmente HBGF-5, véase Bates *et al.*, Biosynthesis of human fibroblast growth factor 5. Mol. Cell. Biol. 11: 1840-1845 (1991)); Burgess y Maciag, The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. Ann. Rev. Biochem. 58: 575-606 (1989); y Zhan *et al.*, The human FGF-5 oncogene encodes a novel protein related to fibroblast growth factors. Mol. Cell. Biol. 8: 3487-3495 (1988)).

20 FGF-6 también se conoce como HBGF-6, y en ocasiones se denomina hst-2 u factor de crecimiento relacionado con el oncogén hst-1; véase Bda *et al.*, Human hst-2 (FGF-6) oncogene: cDNA cloning and characterization. Oncogene 7: 303-9 (1992); y Maries *et al.*, Characterization of the HST-related FGF-6 gene, a new member of the fibroblast growth factor gene family. Oncogene 4: 335-40 (1989).

25 FGF-7 o K-FGF también se conoce como KGF o factor de crecimiento de queratinocitos (Véase Aaronson *et al.*, Keratinocyte growth factor. A fibroblast growth factor family member with unusual target cell specificity. Annals NY Acad. Sci. 638: 62-77 (1991)); Finch *et al.*, Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. Science 245: 752-5 (1989); Marchese *et al.*, Human keratinocyte growth factor activity on proliferation and differentiation of human keratinocytes: differentiation response distinguishes KGF from EGF family. J. Cellular Physiol. 144: 326-32 (1990)).

30 Se encontró que FGF-8 era idéntico a un factor de crecimiento inducido por andrógenos, AIGF y se ha estudiado bien (Véase Blunt *et al.*, Overlapping expression and redundant activation of mesenchymal fibroblast growth factor (FGF) receptors by alternatively spliced FGF-8 ligands. J. Biol. Chem. 272: 3733-8 (1997)); Dubrulle *et al.*, FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. Cell 106: 219-232 (2001); Gemel *et al.*, Structure and sequence of human FGF8. Genomics 35: 253-257 (1996); Tanaka *et al.*, A novel isoform of human fibroblast growth factor 8 is induced by androgens and associated with progression of esophageal carcinoma. Dig. Dis. Sci. 46: 1016-21 (2001)).

40 FGF-9 se denominó originalmente factor activante de la glía, o HBGF-9. Véase Miyamoto *et al.*, Molecular cloning of a novel cytokine cDNA encoding the ninth member of the fibroblast growth factor family, which has a unique secretion pattern. Mol. Cell. Biol. 13: 4251-9 (1993); y Naruo *et al.*, Novel secretory heparin-binding factors from human glioma cells (glia-activating factors) involved in glial cell growth. J. Biol. Chem. 268: 2857-64 (1993).

45 FGF-10 también se denomina KGF-2, factor 2 de crecimiento de queratinocitos (véase Kok *et al.*, Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel fibroblast growth factor preferentially expressed in human heart. Biochem. Biophys. Res. Comm. 255: 717-721, (1999)).

50 Se han descrito varios factores relacionados con FGF como factores homólogos del factor de crecimiento de fibroblastos (los FHF) y también se denominan FGF-II (FHF-3), FGF-12 (FHF-I), FGF-13 (FHF-2, véase Greene *et al.*, Identification and characterization of a novel member of the fibroblast growth factor family. Eur. J. Neurosci. 10: 1911-1925 (1998)), y FGF-14 (FHF-4).

55 FGF-15 se expresa en el sistema nervioso en desarrollo y se identificó como un gen regulado por el factor de transcripción E2A-Pbx1. McWhirter *et al.*, A novel fibroblast growth factor gene expressed in the developing nervous system is a downstream target of the chimeric homeodomain oncoprotein E2A-Pbx1. Development 124: 3221-3232 (1997).

60 FGF-16 se aisló como un clon de ADNc a partir de corazón de rata mediante reacción en cadena de la polimerasa basada en homología que expresa un FGF de 207 aminoácidos. FGF-16 es idéntico en un 73 % a FGF-9. Miyake *et al.*, Structure and expression of a novel member, FGF-16, of the fibroblast growth factor family. Biochem. Biophys. Res. Commun. 243: 148-152 (1998).

65 El ADNc que codifica FGF-17 se aisló de embriones de rata y codifica una proteína de 216 aminoácidos. Cuando se expresa en fibroblastos 3T3, el FGF-17 de ratón es transformante. Durante la embriogénesis, FGF-17 se expresa en sitios específicos en la parte anterior del cerebro, la unión de la parte media del cerebro-parte trasera del cerebro, el esqueleto del desarrollo y en arterias en desarrollo. Véase Hoshikawa *et al.*, Structure and expression of a novel fibroblast growth factor, FGF-17, preferentially expressed in the embryonic brain. Biochem. Biophys. Res. Commun.

244: 187-191 (1998); y Xu *et al.*, Genomic structure, mapping, activity and expression of fibroblast growth factor 17. *Mechanisms of Development* 83: 165-178 (1999).

5 El ADNc que codifica FGF-18 se aisló de embriones de rata que codifican una proteína de 207 aminoácidos. FGF-18 es una proteína glicosilada y es más similar a FGF-8 y FGF-17. Se ha demostrado que la inyección de FGF-18 murino recombinante induce la proliferación en tejidos de origen tanto epitelial como mesenquimal, en particular en el hígado y en el intestino delgado. El FGF-18 de rata recombinante induce el crecimiento de neuritas en células PC12. La proteína FGF-18 murina recombinante estimula la proliferación en fibroblastos NIH 3T3 *in vitro* de una manera dependiente de sulfato de heparano. Para información general, véase Hu *et al.*, FGF-18, a novel member of the fibroblast growth factor family, stimulates hepatic and intestinal proliferation. *Mol. Cell. Biol.* 18: 6063-6074 (1998); y Ohbayashi *et al.*, Structure and expression of the mRNA encoding a novel fibroblast growth factor, FGF-18. *J. Biol. Chem.* 273: 18161-18164 (1998).

15 FGF-19 está relacionado a distancia con otros miembros de la familia FGF. El ARNm de FGF-19 se expresa en varios tejidos, incluyendo el cartilago fetal, la piel y la retina, así como la vesícula biliar adulta. Se sobreexpresa en una línea celular de adenocarcinoma de colon. FGF-19 es un ligando dependiente de heparina de alta afinidad hacia el receptor de FGF-4. Véase Xie *et al.*, FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4. *Cytokine* 11:729-735 (1999).

20 FGF-20 se expresa en el cerebro normal, en particular en el cerebelo y en algunas líneas celulares de cáncer. El ARNm de FGF-20 se expresa preferentemente en la sustancia negra pars compacta. La proteína FGF-20 recombinante induce la síntesis de ADN en una variedad de tipos de células y es reconocida por múltiples receptores de FGF. El FGF-20 funciona como un oncogén, causando un fenotipo transformado cuando se expresa en la línea celular de fibroblastos 3T3. Estas células transformadas son tumorigénicas en ratones desnudos. Véase Jeffers *et al.*, Identification of a novel human fibroblast growth factor and characterization of its role in oncogenesis. *Cancer Res.* 61: 3131-8 (2001); y Ohmachi *et al.*, FGF-20, a novel neurotrophic factor, preferentially expressed in the substantia nigra pars compacta of rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277: 355-60 (2000).

30 FGF-21 se aisló de embriones de ratón. El ARNm de FGF-21 presenta la mayor abundancia en el hígado con niveles más bajos en el timo. FGF-21 es el más similar al FGF-19 humano. Véase Nishimura *et al.*, Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1492: 203-6 (2000).

35 El ADNc que codifica FGF-22 (170 aminoácidos) se aisló de la placenta humana. FGF-22 es el más similar a FGF-10 y FGF-7. El ARNm de FGF-22 murino se expresa preferentemente en la piel. El ARNm de FGF-22 en la piel se encuentra preferentemente en la vaina interna de la raíz del folículo piloso. Véase Nakatake *et al.*, Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-22, preferentially expressed in the inner root sheath of the hair follicle. *Biochim. Biophys. Acta* 1517: 460-3 (2001).

40 FGF-23 es el más similar a FGF-21 y FGF-19. El gen FGF-23 humano se asigna al cromosoma 12p13 relacionado con el gen FGF-6 humano. El ARNm de FGF-23 se expresa principalmente en el cerebro (preferentemente en el núcleo talámico ventrolateral) y el timo en niveles bajos. Se han encontrado mutaciones de sentido erróneo en el gen FGF-23 en pacientes con raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante. La sobreproducción de FGF23 produce osteomalacia inducida por tumor, una enfermedad paraneoplásica caracterizada por hipofosfatemia causada por la pérdida renal de fosfato. Véase Yamashita *et al.*, Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277: 494-8 (2000); y Shimada *et al.*, Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 98: 6500-5 (2001).

50 La región X de la molécula de fórmula I puede incluir una secuencia de aminoácidos encontrada en un FGF, tal como por ejemplo FGF-2 o FGF-7, o una secuencia de aminoácidos que es un homólogo de una secuencia encontrada en un FGF. Alternativamente, la región X puede incluir una secuencia no encontrada en el ligando natural del FGFR unido por la molécula.

55 La región X de los análogos peptídicos de FGF sintético pueden incluir una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 100 % a una secuencia de aminoácidos encontrada en un factor de crecimiento de fibroblastos o una secuencia de aminoácidos homóloga a una secuencia de aminoácidos de un factor de crecimiento de fibroblastos. Por ejemplo, la región X puede incluir una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos - 50 %, al menos - 75 %, o al menos - 90 % con una secuencia de aminoácidos de un factor de crecimiento de fibroblastos. El factor de crecimiento de fibroblastos puede ser cualquier factor de crecimiento de fibroblastos, incluyendo cualquiera de los conocidos o factores de crecimiento de fibroblastos que todavía se tienen que identificar.

65 En una realización particular, el análogo de FGF sintético de la invención es un agonista del FGFR. Cuando se une al FGFR, el análogo de FGF sintético inicia una señal mediante el de FGFR. Además en una realización particular, el análogo de FGF sintético de la invención es un antagonista del FGFR. Cuando se une al FGFR, el análogo de FGF sintético bloquea la señalización por el FGFR.

En otra realización particular de la presente invención, el análogo de FGF sintético es un análogo de FGF-2 (también conocido como FGF básico, o bFGF). En otra realización particular de la presente invención, la unión del análogo de FGF sintético a un receptor de FGF inicia una señal mediante el receptor de FGF. Además en una realización particular, la unión del análogo de FGF sintético al receptor de FGF bloquea la señalización por el receptor de FGF.

5 Además en otra realización particular, la presente invención proporciona un análogo de FGF sintético de FGF-2. En otra realización particular, la presente invención proporciona un análogo de FGF sintético de FGF-2, en el que la secuencia de aminoácidos de la región X es YRSRKYSSWYVALKR (SEQ ID NO: 7) de FGF-2. Además en otra realización particular, la presente invención proporciona un análogo de FGF sintético en el que la secuencia de aminoácidos de la región X es NRFHSWDCIKTWASDTFVLVCYDDGSEA (SEQ ID NO: 8). Además en otra realización particular, la presente invención proporciona un análogo de FGF-2 sintético en el que la secuencia de aminoácidos de la región X es HIKLQLQAEERGVS (SEQ ID NO: 9).

15 Además en otra realización particular, la invención proporciona un análogo de FGF sintético de FGF-I, en el que la región X es YISKKHAEKNWFVGLKK (SEQ ID NO: 10). Esta secuencia se obtiene a partir de aminoácidos que unen mediante puente el bucle beta 9 y el bucle beta 10 de FGF-I. Además en otra realización particular, se proporciona un análogo de FGF-I en el que la región X es HQLQLSAESVGEVY (SEQ ID NO: 11), que corresponde a los aminoácidos obtenidos a partir de las regiones β -4 y β -5 de FGF-I.

20 Además en otra realización particular, la invención proporciona un análogo de FGF sintético de FGF-7, en el que la región X es YSAKWTHNGGEMFVALNQK (SEQ ID NO: 12). En otra realización de un análogo de FGF sintético de FGF-7, las regiones X son la secuencia de aminoácidos YNMEIRTVAVG[I]VA (SEQ ID NO: 13).

25 Otros dominios de unión al receptor de FGF, obtenidos en gran medida a partir de secuencias de direccionamiento en el extremo C-terminal del FGF humano, incluyen las siguientes secuencias que se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1

CITOQUINA	DOMINIO DE UNIÓN AL RECEPTOR DE X PREFERENTE
FGF-10	YASFNWQHNGRQMYVALNQK (SEQ ID NO:14)
FGF-22	YASQRWRRRGQP NLALDRR (SEQ ID NO:15)
FGF-9	YSSNLYKHVDTGRRYYVALNK (SEQ ID NO:16)
FGF-16	YASTLYKHSDSERQYVALNK (SEQ ID NO:17)
FGF-20	YSSNIYKHGDTGRRFVALNK (SEQ ID NO:18)
FGF-4	YESYKYPGMFIALSKN (SEQ ID NO:19)
FGF-6	YESDLYQGTYILSKYGR (SEQ ID NO:20)
FGF-12	YSSTLYRQQESGRAWFLGNK (SEQ ID NO:21)
FGF-14	YSSMLYRQQESGRAWFLGLNK (SEQ ID NO:22)
FGF-13	YSSMIYRQQQSGRGWYLGLNK (SEQ ID NO:23)
FGF-11	YASALYRQRSGRAWYLDK (SEQ ID NO:24)
FGF-1	SNGGHFLRIL (SEQ ID NO:28)
FGF-2	KNGGFFLR IH (SEQ ID NO:29)
FGF-7	RTQWYLRID (SEQ ID NO:30)
FGF-10	FTKYFLKIE (SEQ ID NO:31)
FGF-22	STHFFLRVD (SEQ ID NO: 32)
FGF-9	RTGFHLEIF (SEQ ID NO:33)

FGF-16	RTGFHLEIF (SEQ ID NO:34)
FGF-20	RTGFHLQIL (SEQ ID NO:35)
FGF-4	NVGIGFHLQAL (SEQ ID NO:36)
FGF-6	NVGIGFHLQVL (SEQ ID NO:37)
FGF-12	QQGYFLQMH (SEQ ID NO:38)
FGF-14	RQGYLQMH (SEQ ID NO:39)
FGF-13	RQGYHLQLQ (SEQ ID NO:40)
FGF-11	RQGFYLAN (SEQ ID NO:41)
FGF-8	RTSGKHVQVL (SEQ ID NO:42)
FGF-17	RTSGKHVQVT (SEQ ID NO:43)
FGF-18	RTSGKHIQVL (SEQ ID NO:44)
FGF-3	ATKYHLQLH (SEQ ID NO:45)
FGF-5	RVGIGFHLQIY (SEQ ID NO:46)
FGF-19	SGPHGLSSCFLRIR (SEQ ID NO:47)
FGF-21	DDAQQTEAHLEIR (SEQ ID NO:48)
FGF-23	ATARNSYHLQIH (SEQ ID NO:49)

Métodos para sintetizar los análogos del factor de crecimiento de unión a heparina

5 La síntesis de los análogos de la invención se puede conseguir mediante una diversidad de métodos químicos bien conocidos en la técnica. Los métodos de ese tipo incluyen la síntesis en fase sólida a escala de banco y la síntesis automatizada de péptidos en cualquiera de los muchos sintetizadores de péptidos disponibles en el mercado. Preferentemente, el sintetizador tiene una eficacia de acoplamiento por ciclo superior a un 99 por ciento.

10 Los análogos de la presente invención se pueden producir por síntesis en etapas o por síntesis de una serie de fragmentos que se pueden acoplar mediante técnicas similares bien conocidas. Véase, por ejemplo, Nyfeler, Peptide synthesis via fragment condensation. *Methods Mol Biol* 35: 303-16 (1994); y Merrifield, Concept and early development of solid-phase peptide synthesis. *Methods in Enzymol* 289: 3-13 (1997). Estos métodos se usan de manera rutinaria para la preparación de péptidos individuales. De este modo es posible ensamblar los análogos de la presente invención en partes componentes, tales como los péptidos que constituyen los componentes de las regiones X-R₃-X o X-R₂-R₁-R₂-X y la región Y-Z de los mismos, y a partir de ese momento acoplan las partes componentes de ese tipo para ensamblar el análogo. Véase, por ejemplo, Dawson y Kent, Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 923-960 (2000); y Eom *et al.*, Tandem ligation of multipartite peptides with cell-permeable activity. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 73-82 (2003).

20 De forma ventajosa, dado que los análogos de fórmula I de la invención incluyen dos secuencias de aminoácidos de región X idénticas, la síntesis de estos péptidos de región X idénticos se puede realizar en paralelo. Con este método, cada ciclo de adición añade un aminoácido a ambos péptidos de la región X, lo que facilita en gran medida la síntesis de estas moléculas ramificadas. La síntesis de esta manera es un método preferente para preparar los análogos de fórmula I.

25 Las bibliotecas de péptidos que se pueden usar para identificar sistemáticamente una propiedad deseada, tal como la unión a un FGFR, se pueden preparar mediante adaptaciones de estos métodos. Véase por ejemplo, Fox, Multiple peptide synthesis, *Mol. Biotechnol.* 3: 249-58 (1995); y Wade y Tregear, Solid phase peptide synthesis: recent advances and applications. *Austral. Biotechnol.* 3: 332-6 (1993).

30 En una realización particular, el análogo de FGF sintético de la invención es un agonista del FGFR. Cuando se une al FGFR, el análogo de FGF sintético inicia una señal mediante el FGFR. En otra realización particular, el análogo de

FGF sintético de la invención es un antagonista del FGFR. Cuando se une al FGFR, el análogo de FGF sintético bloqueada señalización con el FGFR.

En un aspecto particular, la invención proporciona un método para estimular la señalización del receptor del factor de crecimiento en una célula al poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un análogo de FGF sintético de acuerdo con la fórmula I. La cantidad eficaz la puede determinar fácilmente alguien con experiencia en la materia. La señalización puede dar como resultado la liberación de citoquinas de la célula, estimulación o inhibición de la proliferación o diferenciación de la célula, quimiotaxis de la célula, estimulación o inhibición del sistema inmunológico del mamífero.

Métodos de uso de Qf los FGF de la invención

Los análogos de FGF de la invención proporcionan una fuente rentable y potencialmente ilimitada de moléculas biológicamente activas que son útiles en una serie de formas, incluso como agentes farmacéuticos profilácticos o terapéuticos solubles, tal como por ejemplo para su administración como un fármaco soluble para prevención o tratamiento de diversas enfermedades, que incluyen por ejemplo, usos en terapia para cáncer y radioprotección.

Los análogos de FGF sintéticos de la presente invención también son útiles como agentes biológicamente activos para el revestimiento de dispositivos médicos, tal como por ejemplo, suturas, implantes e instrumentos médicos para promover respuestas biológicas, por ejemplo, para estimular el crecimiento y la proliferación de células, o la curación de heridas.

El factor de crecimiento de fibroblastos básico recombinante (rFGF-2) se ha estudiado ampliamente con el objetivo de incorporarlo en regímenes clínicos. Aunque el FGF-2 afecta a muchos tipos de células, su efecto en la angiogénesis subraya muchos de los enfoques terapéuticos para su uso. Aunque el rFGF-2 está aprobado en la actualidad solo en Japón para el tratamiento de las úlceras por pie diabético, se ha continuado explorando para posibles aplicaciones en un receptor de órganos y de patologías. Los ejemplos de aplicaciones de ese tipo incluyen el uso en curación de fracturas óseas y rellenos de vacíos óseos, curación y tratamiento de aneurismas, preparación de sitios de implantes de órganos artificiales y en el área controvertida de la angiogénesis terapéutica.

Un agonista peptídico sintético de FGF-2 que estimula la angiogénesis, así como la proliferación y migración de células endoteliales, tiene una aplicación particular en áreas médicas en las que una respuesta angiogénica insuficiente o interrumpida contribuye a la fisiopatología.

El hueso, por ejemplo, es un escenario de ese tipo. Durante la reparación ósea y la respuesta angiogénica insuficiente o interrumpida después de una lesión, la regeneración ósea se inhibe y también se cree que contribuye a la fisiopatología de la unión fibrosa, osteomielitis y osteorradionecrosis. La importancia de la angiogénesis en la reparación ósea se ve reforzada por la capacidad de los compuestos antiangiogénicos para inhibir la formación ectópica ósea y por la capacidad del rFGF-2 para acelerar la curación ósea.

La expresión "dispositivo médico" tal como se usa en el presente documento se refiere a un dispositivo que tiene una o más superficies en contacto con un órgano, tejido, sangre u otro fluido corporal en un organismo, preferentemente un mamífero, en particular, un ser humano. Los dispositivos médicos incluyen, por ejemplo, dispositivos extracorpóreos para uso en cirugía, tales como oxigenadores de sangre, bombas de sangre, sensores de sangre, tubos usados para transportar sangre y similares que entran en contacto con la sangre que se devuelve al paciente. La expresión también puede incluir endoprótesis implantadas en contacto con la sangre en un cuerpo humano o animal, tales como injertos vasculares, endoprótesis vasculares, marcapasos, válvulas cardíacas y similares que se implantan en los vasos sanguíneos o en el corazón. La expresión puede incluir dispositivos para uso intravascular temporal tales como catéteres, alambres de guía y similares que se colocan en los vasos sanguíneos o en el corazón para fines de monitorización o reparación. La expresión puede incluir además electrodos nerviosos, electrodos musculares, generadores de impulsos implantables, bombas de fármacos implantables, y desfibriladores. Además, la expresión dispositivo médico puede incluir suturas, materiales de injerto, revestimientos de heridas, guías nerviosas, cera ósea, bobinas de aneurisma, partículas de embolización, microperlas, implantes dentales, prótesis óseas, armazones tisulares, articulaciones artificiales o dispositivos de liberación controlada de fármacos.

La superficie del dispositivo médico se puede formar a partir de cualquiera de los materiales comúnmente usados, adecuados para su uso en dispositivos médicos, tales como por ejemplo, acero inoxidable, titanio, platino, tungsteno, cerámica, poliuretano, politetrafluoroetileno, politetrafluoroetileno extendido, policarbonato, poliéster, polipropileno, polietileno, poliestireno, cloruro de polivinilo, poliamida, poliacrilato, poliuretano, alcohol polivinílico, policaprolactona, polilactida, poliglicolida, polisiloxanos (tal como 2,4,6,8-tetrametilciclotetrasiloxano), cauchos naturales, o polímeros o copolímeros en bloque de los mismos.

Se conocen métodos para el revestimiento de moléculas biológicas sobre las superficies de dispositivos médicos. Véase por ejemplo el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.866.113 de Hendriks *et al.*, cuya memoria descriptiva se incorpora por la presente como referencia. Tsang *et al.*, en el documento de Patente de Estados Unidos N.º, enseñan una composición de revestimiento no trombogénica y métodos para su uso en dispositivos

médicos, y se incorpora en el presente documento como referencia. Zamora *et al.*, en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.342.591 enseñan un revestimiento anfipático para dispositivos médicos para modular la composición de adhesión celular, y se incorpora en el presente documento como referencia.

5 En una realización la invención proporciona un método para administrar un análogo de FGF sintético de fórmula I a un mamífero, el método incluye (i) proporcionar un dispositivo médico revestido en su superficie con un análogo de FGF sintético de fórmula I, estando unido el análogo de FGF sintético a la superficie del dispositivo médico mediante enlaces no covalentes; y (ii) colocar el dispositivo médico sobre una superficie de, o implantar el dispositivo médico, en el mamífero.

10 En una realización particular del método mencionado anteriormente, los enlaces no covalentes son asociaciones entre el dominio de unión a heparina del análogo de FGF sintético y un compuesto que contiene heparina unido a la superficie del dispositivo médico. El compuesto que contiene heparina unido a la superficie del dispositivo médico puede ser cualquier compuesto que contenga heparina, tal como por ejemplo, bencil-bis (dimetilsililmetil) oxi carbamoil-heparina.

15 En otra realización particular del método mencionado anteriormente, el dispositivo médico no se reviste previamente con un compuesto que contiene heparina antes de su revestimiento con el análogo de FGF sintético de fórmula I.

20 En una realización particularmente preferente, el dispositivo médico es una bobina de aneurisma u otro dispositivo vasooclusivo, y el análogo de FGF sintético de la invención sirve para inducir la unión, la proliferación y/o la migración de las células endoteliales, y opcionalmente una angiogénesis adicional, de modo que da como resultado un bloqueo permanente y sustancial del vaso sanguíneo en el que se coloca la bobina de aneurisma u otro dispositivo vasooclusivo. Las bobinas de aneurisma particularmente preferentes incluyen el Sistema Micrus MicroCoil y el Sistema Micrus ACT(TM) MicroCoil (Micrus Corp., Sunnyvale, CA), y las bobinas de aneurisma y los dispositivos vasooclusivos que se describen en los documentos de patente de Estados Unidos N.ºs 6.866.155, 6.835.185, 6.656.218, 6.656.201, 6.638.291, 6.616.617, 6.551.305, 6.416.541, 6.383.204, 6.306.153, 6.221.066, 6.171.326, 6.168.615, 6.165.194, 6.159.165, 6.136.015 y 6.102.932, que se incorporan en el presente documento como referencia tal como se presenta en su totalidad.

30 En otra realización particularmente preferente, el dispositivo médico incorpora un material vehículo que comprende un análogo de FGF sintético de la presente invención. En una realización preferente, el dispositivo médico es una bobina de aneurisma, y el material vehículo es un hidrogel que comprende un factor de crecimiento que es un análogo de FGF sintético de la presente invención. En este contexto, la enseñanza del documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.113.629, que describe un hidrogel para el tratamiento terapéutico de aneurismas, se incorpora como referencia tal como se presenta en su totalidad.

40 Además en otra realización particularmente preferente, el dispositivo médico está revestido con un análogo de FGF sintético de la presente invención mediante los métodos que se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 60/583.566, Bioactive Peptide Coatings, presentada el 28 de junio, 2004 y nombrando a Paul O. Zamora y Sarah Albright como inventores, cuya solicitud se incorpora en el presente documento por referencia tal como se presenta en su totalidad. Se debe observar que aunque la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 60/583.566 desvela principalmente métodos que usan análogos del factor de crecimiento de unión a heparina sintéticos que tienen dos cadenas peptídicas ramificadas de un resto ramificado dipeptídico formado por dos restos de aminoácido trifuncionales, cadena o cadenas peptídicas que se unen a un receptor del factor de crecimiento de unión a heparina y que se unen mediante enlace covalente a un péptido de no señalización que incluye un dominio de unión a heparina mediante un conector hidrófobo, los métodos de la invención se pueden usar con cualquiera de los análogos de FGF sintéticos de la invención, incluyendo los que tienen la fórmula I, y de forma específica incluyendo aquellos en los que dos cadenas peptídicas se ramifican a partir de un resto de aminoácido trifuncional único. En resumen, el método incluye por lo tanto, en una realización preferente, las etapas de: a) poner en contacto el dispositivo médico con una solución que incluye un análogo de FGF sintético de la presente invención; b) poner en contacto el dispositivo médico revestido con el análogo de FGF sintético con una solución que comprende heparina o un análogo de la misma; y, c) poner en contacto el producto de la etapa b) con una solución que incluye un segundo análogo de FGF sintético de la presente invención, opcionalmente en la que el segundo análogo de FGF es el mismo que el análogo de FGF de la etapa a).

50 También es posible y se contempla el revestimiento de un dispositivo médico usando solo la etapa a) mencionada anteriormente, o usando solo las etapas a) y b) mencionadas anteriormente. La solución que comprende heparina o un análogo de la misma puede ser, en una realización, heparina en una solución acuosa, tampón. En otra realización, la solución que comprende heparina es una solución que contiene bencil-bis(dimetilsililmetil)oxicarbamoil-heparina. "Heparina" como se usa en el presente documento incluye heparina, variantes de bajo peso molecular de la misma, o fragmentos de la misma, o cualquiera de una serie de compuestos que se unen a los factores de crecimiento de una manera similar a la heparina. Los compuestos de ese tipo incluyen, pero no se limitan a, sulfato de heparano, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, sulfato de dextrano, carboximetil celulosa, o cualquiera de una serie de compuestos polianiónicos sintéticos que imitan a la heparina. "Heparina" también incluye, pero no se limita a, moléculas que incluyen una mezcla de cadenas de polisacáridos sulfatados de

65

manera variable formados por unidades de repetición de d-glucosamina y cualquiera de ácidos 1-idurónico o d-glucurónico, sales de cualquiera de los mencionados anteriormente y derivados de cualquiera de los mencionados anteriormente. Por ejemplo, las sales convencionales de heparina incluyen heparina sódica, heparina cálcica, heparina de magnesio y heparina potásica. Los derivados de heparina incluyen, pero no se limitan a, heparina de amonio, heparina de benzalconio, y similares. La heparina incluye además composiciones de silil-heparina como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con N.º de Serie 10/450.309, con el título "Bioactive Coating Compositions and Methods", de Paul O. Zamora, *et al.*, presentada el 28 de enero, 2003, cuya memoria descriptiva se incorpora por la presente como referencia.

En una realización alternativa, se permite que un análogo de FGF sintético de la presente invención reaccione con una solución que incluye heparina o un análogo de la misma, y posteriormente un dispositivo médico se pone en contacto con una solución de ese tipo. En una realización preferente, el análogo FGF es un análogo de FGF sintético de la presente invención y el dispositivo médico es una bobina de aneurisma. En otra realización preferente, el análogo de FGF se aplica con una solución de revestimiento sin tratamiento adicional.

Los siguientes métodos que se describen se pueden usar de esta manera, entendiéndose que diferentes reactivos, tampones y similares se pueden usar con resultados iguales o sustancialmente similares. En un método, las bobinas de aneurisma se revisten mediante inmersión en bicarbonato sódico 10 mM que contiene 1 [µg]/ml de un análogo de FGF sintético de la presente invención durante 1 h a 37 °C. Las bobinas se enjuagan en agua y se revisten con heparina mediante inmersión en heparina al 0,25 % en agua durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación las bobinas enjuagan en agua y se secan al aire. En otro método, las bobinas de aneurisma se revisten mediante inmersión en bicarbonato sódico 10 mM que contiene 1 µg/ml de un análogo de FGF sintético de la presente invención durante 1 h a 37 °C. Las bobinas se enjuagan con agua y se revisten con heparina al 0,25 % en agua durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las bobinas se enjuagan con agua y a continuación se sumergen en tampón fosfato (pH 5,8) que contiene 1 µg/ml de un análogo de FGF sintético de la presente invención durante 1 hora a 37 °C. El análogo de FGF sintético de la presente invención en tampón fosfato es preferentemente el mismo que el análogo de FGF sintético de la presente invención en la solución de bicarbonato sódico, pero en una realización alternativa el segundo análogo de FGF sintético es diferente. Las bobinas a continuación se enjuagan en agua y se secan al aire. Además en un tercer método, las bobinas de aneurismas se revisten sumergiéndolas en una solución de bicarbonato sódico 10 mM que contiene 1 µg/ml de análogo de FGF sintético de la presente invención durante 1 hora a 37 °C. Por separado, el análogo de FGF sintético de la presente invención, preferentemente el mismo pero opcionalmente diferente, en un tampón fosfato 10 mM (pH 5,8) se mezcla con silil-heparina en una proporción molar de 4:1 a 2:1 durante 1 hora a 37 °C. A continuación las bobinas se sumergen en esta solución, se aclaran en agua y se secan al aire.

Aplicaciones farmacéuticas del análogo del factor de crecimiento de unión a heparina

Los análogos de FGF de la presente invención se pueden usar como un principio activo en composiciones farmacéuticas tanto para aplicaciones médicas como para aplicaciones en cría de animales o veterinarias. Generalmente, el análogo de FGF o la composición farmacéutica se usa en seres humanos, pero también se puede usar en otros mamíferos. El término "paciente" pretende indicar un individuo mamífero, y se usa a lo largo de la memoria descriptiva y en las reivindicaciones. Las aplicaciones principales de la presente invención implican a pacientes humanos, pero la presente invención se puede aplicar a animales de laboratorio, granja, zoológicos, animales salvajes, mascotas, animales para deportes u otros animales.

Los análogos de FGF de la presente invención pueden estar en forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable. La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo bases inorgánicas u orgánicas y ácidos inorgánicos u orgánicos. Las sales obtenidas a partir de bases inorgánicas incluyen aluminio, amonio, calcio, cobre, férricas, ferrosas, litio, magnesio, sales mangánicas, manganosas, potasio, sodio, cinc, y similares. Son particularmente preferentes las sales de amonio, calcio, litio, magnesio, potasio, y sodio. Las sales obtenidas a partir de bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias, y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas, y resinas de intercambio iónico básicas, tales como arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etil-morfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromo, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina, y similares.

Cuando el análogo de FGF de la presente invención es básico, las sales de adición de ácidos se pueden preparar a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ácidos de sentir incluyen los ácidos acético, bencenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, carboxílico, cítrico, etanosulfónico, fórmico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, malónico, múcico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, propiónico, succínico, sulfúrico, tartárico, ácido p-toluenosulfónico, ácido trifluoroacético, y similares. Las sales de adición de ácido de los análogos de FGF de la presente invención se preparan en un disolvente adecuado para el análogo de FGF y un exceso de un ácido, tal como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, trifluoroacético, cítrico, tartárico, maleico,

succínico o metanosulfónico. La forma de sal de acetato es especialmente útil. Cuando los análogos de FGF de la presente invención incluyen un resto ácido, las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas pueden incluir sales de metal alcalino, tales como las sales de sodio o potasio, o sales de metal alcalinotérreo, tales como las sales de calcio o magnesio.

Un análogo de FGF de la presente invención puede formar complejos con cualquier número de moléculas complejas de carbohidrato que se puedan unir al dominio de unión a heparina de los análogos de FGF y que incluyen heparina, sulfato de heparano, siliil-heparina, ácido hialurónico, condroitina, sulfato de condroitina, carboximetil celulosa, sulfato de dextrano, octasulfato de sacarosa y citodextrinas. Los carbohidratos complejos de ese tipo se pueden usar para aumentar la masa molecular de un análogo de FGF, para proporcionar protección frente a las proteasas, para modular la eliminación del cuerpo, para proporcionar unión a dianas celulares, o para aumentar los tiempos de permanencia locales.

La invención proporciona una composición farmacéutica que incluye un análogo de FGF de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo puede ser una formulación líquida, y en una realización una solución acuosa, isotónica, tamponada. Los vehículos farmacéuticamente aceptables también incluyen excipientes, tales como diluyentes, vehículos y similares, y aditivos, tales como agentes estabilizantes, conservantes, agentes solubilizantes, tampones y similares, como se describe en lo sucesivo en el presente documento.

De ese modo las composiciones de análogo de FGF de la presente invención se pueden formular o combinar en las composiciones farmacéuticas que incluyen al menos un análogo de FGF en la presente invención junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, incluyendo excipientes, tales como diluyentes, vehículos y similares, y aditivos, tales como agentes estabilizantes, conservantes, agentes solubilizantes, tampones y similares, según se desee. Los excipientes de la formulación pueden incluir polivinilpirrolidona, gelatina, hidroxil celulosa, goma arábica, polietilenglicol, manitol, cloruro sódico y citrato sódico. Para inyección u otras formulaciones de administración líquida, se prefiere agua que contenga al menos uno o más constituyentes de taponamiento, y también se pueden usar agentes estabilizantes, conservantes y agentes solubilizantes. Para formulaciones de administración sólida, se puede usar una cualquiera de una diversidad de aditivos de espesamiento, relleno, carga y vehículo, tales como almidones, azúcares, ácidos grasos y similares. Para formulaciones de administración tópica, se puede usar cualquier diversidad de cremas, pomadas, geles, lociones y similares. Para la mayoría de las formulaciones farmacéuticas, los principios no activos constituirán la mayor parte, en peso o en volumen, de la preparación. Para formulaciones farmacéuticas, también se contempla que se puede usar cualquiera de una diversidad de formulaciones y aditivos de liberación medida, liberación lenta o liberación a lo largo del tiempo, de modo que la dosificación se pueda formular para efectuar la administración de un análogo de FGF de la presente invención durante un periodo de tiempo.

En el uso práctico, los análogos de FGF de la invención se pueden combinar como principio activo en una mezcla con un vehículo farmacéutico de acuerdo con técnicas convencionales de composición farmacéutica. El vehículo puede tomar una gran diversidad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, oral, parenteral (incluyendo intravenosa), uretral, vaginal, nasal, bucal, sublingual, o similares. En la preparación de las composiciones para la forma de dosificación oral, se puede usar cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tal como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones; vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de preparaciones orales sólidas tal como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos duros y blandos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que se pueda administrar a través de una jeringa. La forma debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un medio disolvente o de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol, por ejemplo glicerol, propilenglicol o polietilenglicol líquido, mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales.

Si la composición farmacéutica del análogo de FGF se administra mediante inyección, la inyección puede ser intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal u otro medio conocido en la técnica. Como alternativa los análogos de FGF de la presente invención se pueden formular como cualquier otro medio conocido en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, la formulación de comprimidos, cápsulas, comprimidos encapsulados, suspensiones, polvos, preparaciones liofilizadas, supositorios, gotas oculares, parches para la piel, formulaciones orales solubles, pulverizaciones, aerosoles y similares, y se pueden mezclar y formular con tampones, aglutinantes, excipientes, estabilizantes, antioxidantes y otros agentes conocidos en la técnica. En general, se puede usar cualquier vía de administración mediante la cual se introduzcan los análogos de FGF de la invención a través de una capa epidérmica de células. Por lo tanto los modos de administración incluyen administración a través de membranas mucosas, administración bucal, administración oral, administración dérmica, administración por inhalación, administración nasal, administración uretral, administración vaginal, y similares.

En general, la cantidad real de análogo de FGF de la presente invención administrada a un paciente variará entre intervalos bastante amplios dependiendo del modo de administración, la formulación usada y la respuesta deseada. La dosificación para el tratamiento es la administración, mediante cualquiera de los medios mencionados anteriormente o cualquier otro medio conocido en la técnica, en una cantidad suficiente para proporcionar - el efecto terapéutico deseado.

Los análogos de FGF de la presente invención se pueden usar para cualquier afección, alteración, enfermedad o síndrome para los cuales la inducción de la angiogénesis proporciona un efecto terapéutico o paliativo. La angiogénesis incluye la inducción del crecimiento de tejido vascularizado y la formación fisiológica de vasos sanguíneos. Una aplicación particular es la angiogénesis en sitios de isquemia, tal como en el corazón o una extremidad, para mejorar el flujo sanguíneo local o regional. En general, los análogos de FGF-2 de la presente invención se pueden usar para limitar, reparar o revertir el daño a los tejidos isquémicos, tanto internos como externos. De ese modo los análogos de FGF se pueden emplear para su uso en el tratamiento de diversas úlceras intratables, incluyendo las úlceras de heridas profundas. Las lesiones por estancia en cama incluyen úlceras de decúbito inducidas por presión, extremidades ulcerativas, extremidades gangrenosas, úlceras diabéticas y similares. Las úlceras internas incluyen úlceras de mucosa oral, úlceras gastrointestinales, tal como úlceras gástricas, úlceras duodenales o úlceras asociadas a traumatismos u otras lesiones. Los análogos de FGF-2 también se pueden usar para restaurar aspectos de la integridad epitelial en enfermedades y síndromes que incluyen aquellos caracterizados por la inflamación del tracto gastrointestinal, incluyendo afecciones tales como enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

Por lo tanto los análogos de FGF se pueden usar generalmente para curación de heridas, incluyendo las heridas inducidas de forma quirúrgica, inducidas por enfermedad e inducidas por traumatismos. Los análogos de FGF de la presente invención se pueden usar para ayudar en la curación de músculos, piel, huesos, cartílagos y otros tejidos del cuerpo. En los procedimientos quirúrgicos, los análogos de FGF se pueden usar para limitar, prevenir o tratar hernias por incisión de la pared abdominal o para reducir la insuficiencia de herida fascial. Para algunos de los mencionados anteriormente, se puede observar fácilmente que los análogos de FGF de liberación sostenida proporcionan una ventaja terapéutica y práctica, y están incluidos dentro de la invención.

Las lesiones en el hueso, que pueden ser traumáticas y también lesiones que resultan de enfermedades y afecciones degenerativas, que se pueden tratar con análogos de FGF de la presente invención incluyen fracturas abiertas, fracturas compuestas, fracturas sin unión, relleno segmentario óseo, vacíos óseos, osteonecrosis isquémica, incluyendo necrosis avascular, y similares. Los análogos de FGF también se pueden usar en diversos procedimientos ortopédicos, incluyendo los procedimientos en los que cualquier dispositivo o fijación está destinado a fijarse en el hueso, o cualquier afección para la que se desee osteoinducción. Por lo tanto los análogos de FGF se pueden usar para procedimientos de fijación de la columna vertebral usando cestas, varillas y otros implantes. Los análogos de FGF se pueden usar para otras formas de fusión espinal y tratamiento de fracturas vertebrales y discos degenerativos. Los análogos de FGF se pueden usar para procedimientos de sustitución de articulaciones, que incluyen, pero no se limitan a, su aplicación como un componente de revestimiento en prótesis articulares. Los análogos de FGF se pueden usar para osteogénesis por distracción y procedimientos similares para alargar o alterar de otro modo el hueso. Los análogos de FGF también se pueden usar en aplicaciones dentales.

Las lesiones de la dermis se pueden tratar con análogos de FGF de la presente invención, tales como quemaduras por productos químicos, radiación o calor.

En otro aspecto, los análogos de FGF de la presente invención se pueden usar en el tratamiento de diversas afecciones cardiovasculares. En un aspecto, la angiogénesis terapéutica inducida por los análogos de FGF de la presente invención sirve para salvar el miocardio crónicamente isquémico. En otro aspecto, los análogos de FGF sirven para aumentar la resistencia cardíaca a la lesión y para protegerse de la lesión secundaria después de un ataque isquémico agudo, tal como en el momento de la reperfusión. De ese modo dependiendo de la patología y los objetivos clínicos, los análogos de FGF de la presente invención se pueden usar ya sea de forma aguda o crónica. En otro aspecto, los análogos de FGF sirven para tratar o mejorar la oclusión arterial.

En otro aspecto, los análogos de FGF de la presente invención se pueden usar para mejorar la función pulmonar en pacientes con enfisema y otras enfermedades pulmonares obstructivas crónicas. Para aplicaciones pulmonares, los análogos de FGF se pueden administrar como un aerosol de micropartículas, o se pueden administrar por medios intratraqueales, tal como usando microesferas de liberación controlada.

En otro aspecto, los análogos de FGF de la presente invención se pueden usar para el tratamiento o la mejora de déficits neurológicos, incluyendo en el tratamiento de la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y similares o después de la enfermedad cerebrovascular oclusiva.

Los análogos de FGF de la presente invención se pueden usar en combinación con otros agentes, incluyendo de forma específica el trasplante de células estromales de médula ósea.

Los análogos de FGF de la presente invención tienen una aplicación particular en pacientes con sistemas

inmunitarios comprometidos o reducidos, y pacientes con enfermedades, tal como diabetes, en las que las úlceras crónicas o isquémicas, heridas y similares son más comunes o para acelerar los trasplantes de tejido en pacientes de ese tipo.

5 La invención se ilustra además con los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

10 Un análogo de FGF sintético, cuya estructura se muestra en la Figura 1, se sintetizó mediante métodos convencionales de síntesis peptídica en fase sólida. El análogo de FGF de la Figura 1 tiene una estructura de acuerdo con la fórmula I, en la que las secuencias de aminoácidos de la región X, AESGDDYCVLVFTDSA WTKICDWSHFRN (SEQ ID NO: 25), corresponde a la secuencia inversa de la secuencia de péptidos de CI 9 identificada por Ballinger *et al.*, (Nature Biotechnology 17: 1199 (1999)). Cada uno de los dos péptidos de la región X de la SEQ ID NO: 25 están unidos mediante enlace covalente enlaces amida cada a un resto de lisina diferente, correspondiendo los restos de lisina a AA1 y AA2. La AA2 Lys se unió por medio de un enlace peptídico covalente a un extremo de un tripéptido formado a partir de tres restos de ácido aminohexanoico y que corresponde al conector Y, proporcionando un espacio hidrófobo de 18 átomos de carbono. El extremo opuesto del tripéptido del ácido aminohexanoico se unió mediante enlace covalente por un enlace peptídico al péptido de unión a heparina RKRKLERIAR (SEQ ID NO: 2) que corresponde a la región Z.

20 El péptido del Ejemplo 1 se ensambló por etapas mediante síntesis en fase sólida sobre una resina de benzhidrilamina sustituida, usando química de Fmoc para la protección temporal de grupos amino en los ciclos repetitivos. La ramificación de la cadena se consiguió mediante crecimiento en etapas de cadenas idénticas de los grupos amino de cadena lateral de restos de lisilo consecutivos. El péptido completo se escindió de la resina como amidas C-terminales mediante acidólisis, que también eliminó los grupos protectores de cadena lateral lábiles en ácido.

25 La preparación del péptido en bruto se purificó en primer lugar mediante cromatografía de afinidad hacia heparina. La preparación bruta se solubilizó en HEPES 10 mM (pH 7,0), se cargó sobre una columna HiTrap(R) Heparin HP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA), y se lavó con 10 volúmenes de columna de HEPES 10 mM (pH 7,0). A continuación el péptido se eluyó con NaCl 2 M en HEPES 10 mM (pH 7,0), monitorizado mediante absorbancia a 280 nm. Las fracciones peptídicas se desalaron y se concentraron cargando en cartuchos Sep-Pak(R) C₁₈ (Waters, Milford, MA, USA), se lavaron con 10 volúmenes de columna de agua, y a continuación se eluyó con acetonitrilo al 80 %. Las fracciones eluidas se liofilizaron, se redisolviéron en agua y la concentración se determinó con el kit de ensayo de proteínas BCA(R) (Pierce Endogen, Rockford, IL, USA) usando albúmina de suero bovino como referencia.

Ejemplo 2

40 El análogo de FGF sintético como se muestra en la Figura 2, se sintetizó mediante métodos estándar de síntesis peptídica en fase sólida. Las secuencias de aminoácidos del Ejemplo 2 que corresponden a las regiones Y y Z de fórmula [I] son idénticas a las del compuesto del Ejemplo 1. La secuencia de aminoácidos RKLAVYWSS YKRSRY (SEQ ID NO: 26) de los dos péptidos de la región X corresponde a la secuencia inversa de los aminoácidos 115-129 de FGF-2 identificada por Ray *et al.*, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 7047-7052, 1997). La preparación en bruto se purificó como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3

50 El análogo de FGF sintético H-K(H-YRSRKYSSWYVALKR)-K(H-YRSRKYSSWYVALKR)-Ahx-Ahx-Ahx-RKRKLERIAR-NH₂ se sintetizó mediante métodos estándar de síntesis peptídica en fase sólida tal como en el Ejemplo 1. Se debe observar que "Ahx" y "Hex" se usan indistintamente, tienen el mismo significado, y se refieren al ácido aminohexanoico. En la fórmula H-K(H-YRSRKYSSWYVALKR)-K(H-YRSRKYSSWYVALKR)-AhX-Ahx-Ahx-RKRKLERIAR-NH₂, cada "H-" representa un átomo de hidrógeno, de modo que el extremo N-terminal de cada cadena de X, y el extremo N-terminal de la lisina en AA₁, es NH₂. El compuesto del Ejemplo 3 era idéntico al del Ejemplo 2, excepto en que se usó la secuencia normal, o no inversa, YRSRKYSSWYVALKR (SEQ ID NO: 7), que corresponde a la secuencia de los aminoácidos 115-129 de FGF-2 identificada por Ray *et al.*, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 7047-7052, 1997). Las secuencias de aminoácidos del compuesto del Ejemplo 3 que corresponden a las regiones Y y Z de fórmula I son idénticas a las del compuesto del Ejemplo 2. La preparación en bruto se purificó como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. El péptido del Ejemplo 3 tiene un peso molecular estimado de 5809.

La estructura general del compuesto del Ejemplo 3 se muestra a continuación:

NH₂-K-K-Hex-Hex-Hex-R-K-R-K-L-E-R-I-A-R- amida

RR
KK
LL
AA
VV
YY
WW
SS
SS
YY
KK
RR
SS
RR
YY
||
NN
H₂H₂

Ejemplo 4

- 5 El análogo de FGF sintético YRSRKYSSWYVALKRK(H-YRSRKYSSWYVALKR)-Ahx-Ahx-Ahx-RKRLDRIAR-NH₂ se sintetizó mediante métodos estándar de síntesis peptídica en fase sólida tal como en el Ejemplo 1. En el compuesto YRSRKYSS-WYVALKRK(H-YRSRKYSSWYVALKR)-AhX-AhX-AhX- RKRLDRIAR-NH₂, el grupo R₁ de fórmula I era un único resto de aminoácido trifuncional, aquí un aminoácido de diamina, lisina (K). El compuesto del Ejemplo 4 de otro modo era idéntico al del Ejemplo 3, con las secuencias de aminoácidos del compuesto del Ejemplo 4 que corresponden a las regiones Y y Z de fórmula I idénticas a las del compuesto del Ejemplo 2 o 3. El péptido del Ejemplo 4 tiene un peso molecular estimado de 5681.

15 El péptido del Ejemplo 4 se ensambló por etapas mediante síntesis en fase sólida sobre una resina sustituida, usando química de Fmoc para la protección temporal de grupos amino en los ciclos repetitivos. Cuando fue necesario se usaron grupos protectores. La ramificación de la cadena se consiguió mediante crecimiento en etapas de cadenas idénticas de los grupos alfa amino y del grupo amino de cadena lateral de un único resto de lisilo. La cadena peptídica completada se escindió de la resina como amidas C-terminales mediante acidólisis, que también eliminó los grupos protectores de cadena lateral lábiles en ácido. El péptido del Ejemplo 4 se purificó por HPLC de fase inversa usando una columna C18 en una elución en gradiente continuo de B al 0-60 % durante 60 minutos, desarrollado a 1 ml/min, en la que A era trifluoroacetato al 0,1 % en agua y B era trifluoroacetato al 0,1 % en acetonitrilo. La estructura general del compuesto del Ejemplo 4 se muestra a continuación:

NH₂-Y-R-S-R-K-Y-S-S-W-Y-V-A-L-K-R-K-Hex-Hex-Hex-R-K-R-L-D-R-I-A-R- amida

R
K
L
A
V
Y
W
S
S
Y
K
R
S
R
Y
|
NH₂

Ejemplo 5

5 La Figura 3A muestra la unión específica del Compuesto del Ejemplo 1 a las HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana). ¹²⁵I -bFGF se incubó con las HUVEC intactas en presencia del Compuesto sin marcar del Ejemplo 1. La fracción de ¹²⁵I -bFGF unida a 4 °C se recuperó de las membranas de las HUVEC son utilizadas después de un lavado riguroso y se cuantificó en un contador gamma. El compuesto del Ejemplo 1 desplazó el ¹²⁵I-bFGF (FGF-2) unido a receptores de FGF de las HUVEC, mientras que la citoquina de unión a heparina no relacionada, VEGF, no lo hacía. La Figura 3B muestra que el Compuesto del Ejemplo 1 y del Ejemplo 2 desplazaba de forma competitiva el ¹²⁵I-bFGF que se une a una segunda serie de células que contienen receptores de FGF, mientras que la citoquina de unión a heparina no relacionada, VEGF, no lo hacía. ¹²⁵I-bFGF se incubó con fibroblastos C3H10T1/2 cultivados en presencia del Compuesto del Ejemplo 1 y del Ejemplo 2 frío durante 20 minutos en hielo. Después del lavado riguroso, la fracción de ¹²⁵I-bFGF unida a 4 °C se recuperó de las membranas celulares solubilizadas y se cuantificó en un contador gamma.

Ejemplo 6

20 La Figura 4 muestra equivalencia de los Compuestos de análogo FGF-2 del Ejemplo 1 y del Ejemplo 2 con FGF-2 recombinante, nativo en la fosforilación y activación de la MAP quinasa. Las células C3H10T1/2 se estimularon con 3 nM de FGF-2, Compuesto del Ejemplo 1 o del Ejemplo 2 durante 10, 30 o 60 minutos y se sometieron a lisis. La MAP quinasa activa de los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anti-fosfor-44/42 MAP quinasa monoclonal (Thr202 y Tyr204). El inmunoprecipitado resultante se incubó con una proteína de fusión Elk-I en presencia de ATP. La Elk-I fosforilada en Ser383 se visualizó mediante transferencia de Western usando un anticuerpo fosfor-Elk-1 (Ser 383). Para revelar la consolidación de la MAP quinasa, los lisados celulares se analizaron mediante transferencia de Western usando anticuerpo anti-fosfor-44/42 MAP quinasa monoclonal (Thr202 y Tyr204). Los resultados muestran que el Compuesto tanto del Ejemplo 1 como del Ejemplo 2 activan Elk-I, tal como lo hace FGF-2, como se muestra mediante el resto de Ser383 fosforilado presente en estas muestras a 10 minutos y ausente del control sin tratar. El nivel de Ser383 fosforilada disminuyó sucesivamente de 10 minutos a 30 minutos e incluso además a 60 minutos. Por el contrario, el nivel de fosfor-ERK-1 y fosfor-ERK-2 era coherentemente elevado en el F2A3, y las muestras tratadas con los Compuestos del Ejemplo 1 y del Ejemplo 2 a los 10 minutos, 30 minutos y 60 minutos, mientras que la muestra sin tratar de control presentaba un nivel distinguible mente más bajo de cada uno de fosfor-ERK-1 y fosfor-ERK-2. Estas observaciones muestran que los análogos de FGF y los Compuestos del Ejemplo 1 y del Ejemplo 2 son biológicamente activos con análogos de FGF-2 en estos ensayos.

Ejemplo 7

40 La Figura 5 muestra los resultados de un ensayo de mitogénesis con los Compuestos del Ejemplo 1 y del Ejemplo 2 en comparación con bFGF (FGF-2). Las células C3H10T1/ 2 se cultivaron en medio DMEM suplementado con FBS al 10 % (suero bovino fetal). Dos días antes del ensayo, el medio de cultivo celular se reemplazó por medio de suero bajo (DMEM con FBS al 0,1 %). Al comienzo del ensayo, las células se trataron con tripsina y una suspensión de una sola célula se pipeteó en placas de cultivo de 96 pocillos a 1.000 células/pocillo. Los compuestos del Ejemplo 1

o 2 o FGF-2 humano recombinante se añadieron a pocillos por triplicado (volumen final de 100 µl/pocillo), y las placas de cultivo se devolvieron a una incubadora a 37 °C. Después de tres días, la proliferación celular se cuantificó con el kit de proliferación celular XTT II (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 Los compuestos del Ejemplo 1 y del Ejemplo 2 proporcionaron actividades específicas más altas a concentraciones más bajas que FGF-2 como lo muestran los resultados de este ensayo.

Ejemplo 8

10 La Figura 6 muestra la mejora de la unión *in vitro* con el Compuesto del Ejemplo 1. La unión de fibroblastos murinos C3H10T1/2 a los pocillos de una placa de cultivo tisular de poliestireno de 96 pocillos revestida con silil-heparina sola o con silil-heparina más bFGF (FGF-2) o silil-heparina más el Compuesto del Ejemplo 1 a las concentraciones indicadas se midió mediante absorbancia a 595 nm después de 2 horas.

15 Se obtuvieron microfotografías de células endoteliales aórticas de bovino (las BEAC) cultivadas en policaprolactona con o sin un revestimiento del Compuesto del Ejemplo 1. Las células se tiñeron con violeta de cristal y se fotografiaron con un aumento de 100X. Se observó una densidad celular sustancialmente mayor de células unidas en la muestra de ensayo revestida con el Compuesto del Ejemplo 1.

Ejemplo 9

20 La Figura 7 muestra la estimulación de la curación de heridas mediante administración locorregional del Compuesto del Ejemplo 1 en suturas biodegradables. Las suturas bioabsorbibles de poliglicólido/láctida Vicryl® (Ethicon Johnson & Johnson, Somerville, NJ, USA) revestidas hasta saturación con una combinación de silil-heparina y el Compuesto del Ejemplo 1 y sin ningún revestimiento se introdujeron en el músculo del muslo de ratas adultas. Después de dos semanas, el área implantada se retiró y se procesó para histología por métodos de rutina. Los capilares se cuantificaron con un aumento de 100 X y los datos se expresaron como el promedio por campo; como se muestra en la Figura 7, el eje Y representa el número de capilares por campo. El aumento de la granulación y la angiogénesis también se observaron usando secciones histológicas teñidas con H y E. El examen microscópico reveló una cantidad moderada de granulación después de 2 semanas de tejido muscular de rata en el que se introdujo una sutura sin revestimiento. Con las suturas revestidas tanto con silil-heparina como con el Compuesto del Ejemplo 1, se encontró una granulación de baja a moderada. Con las suturas revestidas con silil-heparina y el Compuesto del Ejemplo 1, las fibras trenzadas de PGLA fueron evidentes en la sección transversal, rodeadas por un anillo de tejido de granulación de espesor variable, dentro de un campo de tejido muscular estriado. Los revestimientos tanto de silil-heparina solo como del Compuesto del Ejemplo 1 solo redujeron la celularidad, en comparación con el control. Pero la combinación de silil-heparina y el Compuesto del Ejemplo 1 causó una marcada proliferación de fibroblastos que rodea e infiltra la sutura trenzada, y aumentó las células endoteliales dentro del tejido de granulación.

Ejemplo 10

40 Se sembraron células endoteliales de vena umbilical humana (las HUVEC) a 5×10^5 células en una capa de Matrigel con o sin péptidos previamente polimerizados o FGF-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) que se usó como control positivo. Matrigel (división de BD Biosciences de Becton, Dickenson and Company) es una preparación de membrana basal solubilizada extraída del sarcoma de ratón EHS. De acuerdo con el vendedor, su componente principal es laminina, seguido por colágeno IV, proteoglicanos de sulfato de heparano y entactina. A temperatura ambiente, Matrigel se polimeriza para producir material de matriz que se asemeja a la membrana basal y se ha usado como un sustrato para los ensayos de invasión de células endoteliales *in vitro* y ensayos de formación de tubos para evaluar la actividad angiogénica *in vivo* de diferentes compuestos. En estos estudios, el medio estaba formado por DMEM:F12 que contenía suero al 2 %. El material de cultivo de Matrigel se incubó a 37 °C. Después de 24 horas, los cambios de la morfología celular se capturaron a través de un microscopio de contraste de fase y se fotografiaron. Como se muestra en la Figura 8, el uso de los Compuestos del Ejemplo 3 o 4 con las HUVEC dio como resultado un aumento de la formación de tubos. FGF-2, usado como control del sistema, causó la formación de tubos a 100 ng/ml, pero solo tuvo un efecto marginal a 50 ng/ml.

Ejemplo 11

60 Las células HUVEC y las células C3H10T1/2 se usaron como células diana y en el análisis se usaron dos métodos diferentes, migración a través de un margen de la herida y migración a través de una membrana revestida (21). Para estudios que implican la migración a través de un margen de la herida, las células se cultivaron *in vitro* y se usaron cuando presentaban una confluencia de aproximadamente un 90 %. Se realizó una herida simulada raspando las células del sustrato. Los cultivos se aclararon y a continuación se incubaron en medio DMEM:F12 que contenía suero de ternero recién nacido al 2 % con o sin péptido. FGF-2 (50 ng/ml) se usó como material de referencia de control positivo. Las células se dejaron migrar durante 6 horas tras lo cual las células se fijaron en formalina tamponada. La migración se monitorizó mediante microscopía de contraste de fase. Las células migratorias fueron

5 aquellas que habían migrado a través del sitio del margen de la herida simulada. Para los estudios que implican migración a través de una membrana revestida, los fondos de los insertos Transwell (tamaño de poro de 3 micrómetros) se revistieron con una solución de Matrigel y se permitió que se secaran. Las células diana se colocaron a continuación en la cámara superior y las inserciones se colocaron en pocillos que contenían medio con o sin péptido. Los cultivos se mantuvieron durante 18 horas tras lo cual las células en la cámara superior se retiraron y las muestras de ensayo se fijaron en formalina tamponada. Las células en el lado inferior del inserto se tiñeron a continuación con bis-benzamida y las células se cuantificaron mediante microscopía de fluorescencia. El compuesto del Ejemplo 4 se evaluó para su capacidad para producir la migración celular usando células tanto HUVEC como C3H10T1/2. El compuesto del Ejemplo 4 produjo un aumento de la migración *in vitro* de las células HUVEC a través de un margen simulado de la herida a 50 y 100 ng/ml, como se muestra en la Tabla 2. FGF-2, que se usó como un compuesto de control positivo, también indujo migración.

Tabla 2

péptido	ng/ml	células/campo	d. t.	p =
ninguno	0	33,7	9,7	
FGF-2	50	50,3	5,2	0,023
Compuesto				
Ejemplo 4	1	36,0	8,2	0,990
Compuesto				
Ejemplo 4	5	39,7	4,5	0,880
Compuesto				
Ejemplo 4	50	58,6	12,5	< 0,001
Compuesto	100	48,1	9,0	0,041

15 Ejemplo 4

La significancia estadística se determinó usando ANOVA seguido de ensayo *post hoc* (Tukey). Un aumento de la migración de las células C3H10T1/2 a través de un margen de la herida simulado también se encontró a concentraciones similares (los datos no se presentan). La migración Transwell también aumentó en las células HUVEC y C3H10T1/2, como se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3

Agente de ensayo	ng/ml	células migradas como % de control	
		HUVEC	C3H10T1/2
control	0	100,0	100,0
FGF-2	50	119,2	116,2
Compuesto Ejemplo 4	50	135,8	170,4
Compuesto Ejemplo 4	100	83,4	141,5

25 Ejemplo 12

El crecimiento celular se evaluó usando células endoteliales microvasculares de rata (RMEC) transformadas con el antígeno T grande de SV40 (19,20) (donación de M. Goligorsky, División de Nefrología e Hipertensión, SUNY, Stony Brook). El crecimiento celular se monitorizó usando un kit disponible en el mercado (Promega Corporation, Madison, WI) basado en un compuesto de tetrazolio, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna (MTS). Las alícuotas de 10³ células RMEC se sembraron en pocillos de placas de 96 pocillos y se permitió que se unieran. El medio se reemplazó por uno que contenía bajo contenido de suero más el Compuesto del Ejemplo 4. Como material de referencia se usó FGF-2 (50 ng/ml). Después de 3 días de cultivo, el número relativo de células se monitorizó usando MTS siguiendo las instrucciones del fabricante. Se encontró un aumento del número relativo de células para todas las concentraciones sometidas a ensayo entre 1 y 200 ng/ml, como se muestra en la Tabla 4:

Tabla 4

ng/ml	Absorbancia 490 nm	D. T.	% del valor de control
0	0,47	0,04	100,0

1	0,58*	0,05	121,5
10	0,61*	0,05	128,2
20	0,63*	0,03	133,4
50	0,60*	0,08	125,6
100	0,71*	0,04	149,6
200	0,66*	0,05	138,6
FGF-2	0,53*	0,07	111,7

5 El asterisco indica $p < 0,05$ determinado usando ANOVA seguido de comparaciones múltiples *post hoc* con respecto al grupo de control (Método de Dunnett). Una respuesta similar se obtuvo con fibroblastos C3H10T1/2. El tratamiento de las células RMEC con el Compuesto del Ejemplo 4 dio como resultado un aumento de la secreción de gelatinasa con respecto al intervalo de 0,5 a 50 ng/ml, como se muestra en la Tabla 5. FGF-2, que se usó como control positivo, también aumenta la secreción de gelatinasa.

Tabla 5

absorbancia 405 nm			
	Media	Desv Estd	P con respecto a control
0	0,64	0,05	---
0,5	0,32	0,13	0,005
1	0,44	0,12	0,104
5	0,42	0,08	0,074
10	0,36	0,11	0,014
50	0,37	0,04	0,020

10 Las células RMEC se cultivaron en medio bajo en suero y se estimularon durante 48 horas con el Compuesto del Ejemplo 4. A continuación el medio se retiró y se sometió a ensayo para determinar su actividad. En el ensayo, la actividad estaba inversamente relacionada con la concentración de la enzima. Los cultivos tratados con FGF-2 en un intervalo de concentraciones similar también indujeron gelatinasa. La significación estadística se determinó mediante ANOVA en los rangos con el análisis *post hoc* posterior mediante comparaciones múltiples con respecto al grupo de control (ensayo t de Bonferroni).

Ejemplo 13

20 Un modelo de angiogénesis *in vivo* se usó con implante de Matrigel con y sin aditivos (22). En los experimentos se usaron ratones C57BL/6, con alícuotas de 0,4 ml de Matrigel inyectado por vía subcutánea, lo suficientemente grande como para formar un tapón que se podía visualizar constantemente y era lo suficientemente pequeño como para ser práctico. El Matrigel reducido con factor de crecimiento a 4 °C (estado líquido) se mezcló con 0,1 o 1,0 µg/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-2; R&D Systems, Minneapolis, MN), Compuesto del Ejemplo 4 o Compuesto del Ejemplo 3. Las alícuotas de 0,4 ml de Matrigel con o sin aditivos se inyectaron por vía subcutánea en el espacio paraespinal derecho y 0,4 ml sin aditivos se inyectaron por vía subcutánea en el espacio paraespinal izquierdo como control. Después de 5 días, los animales se sometieron a eutanasia y el tapón de Matrigel se diseccionó del tejido hospedador, se fotografió, se asignó una puntuación angiogénica (23), se determinaron los tejidos congelados en tubos sellados y se determinaron los pesos de los explantes. Dos observadores revisaron las fotografías de cada tapón, que no se identificaron, y se calificaron por consenso de la respuesta angiogénica. La puntuación angiogénica se determinó en una escala de 0-3. A los tapones sin vasos sanguíneos se les asignó una puntuación de 0, a los que tenían unos pocos vasos periféricos pequeños se les asignó una puntuación de 1, y a los que tenían vasos más grandes se les un tubo con una penetración superficial de 2, mientras que a los de varios vasos grandes se les asignó una penetración profunda con una puntuación de 3. Para la determinación de hemoglobina, el tejido se extrajo durante aproximadamente 1 hora añadiendo 150 µl de Triton X 100 al 0,5 % y posteriormente 50 µl de Dispasa con agitación vorticial y sonicación periódica. Una alícuota de 60 µl del extracto se retiró para su análisis. En el ensayo, la hemoglobina (HB) se convirtió en ferricianato de hemoglobina después de 5 minutos de incubación con 200 µl de reactivo de Drabkin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) y se monitorizó con un lector de microplacas a 525 nm usando hemoglobina bovina como patrón. El compuesto del Ejemplo 4 causó la angiogénesis *in vivo* cuando se monitorizar la usando el ensayo de tapón de Matrigel, como se muestra en la Figura 9, al igual que lo hizo FGF-2, que también se usó como control del sistema. La respuesta angiogénica tal como se monitorizó mediante puntuación visual indicó una respuesta significativa cuando el Compuesto del Ejemplo 4 se usó a 40 y 400 ng/ml, una respuesta que se verificó mediante examen histológico. Una

evaluación cuantitativa del contenido de hemoglobina de los tapones también indicó una cantidad significativamente mayor de hemoglobina en tapones que se implantaron con los Compuestos tanto del Ejemplo 3 o como del Ejemplo 4 en comparación con los controles, como se muestra en la Figura 10. En los experimentos de control, Ahx- Ahx-AhxRKRKLERIAR-NH2 (SEQ ID NO: 27), el dominio de unión a heparina (menos el dominio de direccionamiento al receptor), no estimuló la angiogénesis tal como se determina mediante puntuación visual o cuantificación de la hemoglobina. Los datos en la Figura 10 son el promedio de al menos 5 determinaciones \pm D.T. La significancia estadística se determinó después del ensayo de Turkey con una determinación *ad hoc* de significancia que supuestamente era mayor que 0,05. El análisis estadístico se realizó con ANOVA con un ensayo de de Tukey *post hoc* para cada grupo. Los asteriscos indican $p < 0,05$ en comparación con los controles.

Ejemplo 14

De acuerdo con un ejemplo de uso parenteral, el compuesto en el Ejemplo 4 se usó para mejorar los síntomas de la colitis ulcerosa experimental. Los ratones C57BL/6 ($n = 10$ /grupo) recibieron sulfato de dextrano 3% al 3 % (DSS) en su agua potable durante 5 días, a continuación se cambió a agua potable regular. Los ratones de control normal recibieron solo agua para beber regularmente. A partir del día 3, los animales experimentales recibieron inyecciones intraperitoneales de solución salina que contenía el Compuesto del Ejemplo 4 (1 - o 5 mg/kg) o rhFGF-2 (1 mg/kg) una vez al día durante 5 días. Los ratones inducidos por DSS normales y sin tratar recibieron inyecciones de solución salina. El peso corporal se midió diariamente durante un total de 11 días y se presenta en la Figura 12 como promedio de pérdida de peso. La significación estadística se determinó siguiendo un ensayo de ANOVA unilateral, de mediciones repetidas con *post hoc*, y en la Figura 11, en la que ‡ indica una significancia estadística con p mayor que 0,05, y † indica una tendencia a la significancia con $p = 0,12$. En los ratones con colitis sin terapia, los pesos corporales disminuyeron gradualmente desde el día 4 hasta el día 9 y la pérdida de peso corporal no se recuperó al final del experimento (Figura 12). El colon en estos animales se acortó y tenía signos claros de inflamación, incluyendo engrosamiento del intestino y aumento de la vascularización. La evaluación histológica mostró una pérdida de la morfología del epitelio y las criptas, agotamiento de células caliciformes, necrosis, ulceración e infiltración transmural de granulocitos. Por el contrario, los animales con colitis tratados con el Compuesto del Ejemplo 4 tuvieron tasas de pérdida de peso más lentas durante el estudio. Además, el Compuesto del Ejemplo 4 estimuló la recuperación de la pérdida de peso en comparación con los ratones no tratados una vez que se detuvo el tratamiento con DSS. El colon de estos animales mostró signos más leves de inflamación que incluyen menos acortamiento y engrosamiento. Histológicamente, el colon de ratones tratados con el Compuesto del Ejemplo 4 mostró morfologías que recuerdan más a la arquitectura tisular normal con un epitelio intacto y criptas completas. La inflamación, mientras estaba presente, fue leve y considerablemente menos extensa que en los animales sin tratar. El retorno a una morfología más normal fue especialmente notable en animales que recibieron dosis de 5 mg/kg. Los animales tratados con hrFGF-2, el tratamiento de referencia, también presentarán un aumento de los pesos corporales e histológicamente eran similares a los tratados con el Compuesto del Ejemplo 4 a 5 mg/kg. En conjunto, los resultados demuestran los efectos terapéuticos del Compuesto del Ejemplo 4 en colitis ulcerosa experimental.

Ejemplo 15

Como ejemplo de una vía de administración oral, el compuesto en el Ejemplo 4 se administró por vía oral a ratones con colitis ulcerosa inducida experimentalmente. Para inducir la colitis ulcerosa, a los ratones C57BL 6 se les administró sulfato de dextrano al 3 % (DSS) en su agua potable durante 4 días y a continuación se cambiaron a agua potable regular. Los ratones de control normal recibieron agua para beber regularmente durante el experimento. A partir del día 3, el animal recibió 40 μ l de una solución acuosa del Compuesto del Ejemplo 4 (1 mg/kg) más 2 equivalentes molares de octasulfato de sacarosa una vez al día durante 5 días consecutivos. Los ratones inducidos por DSS tanto normales como sin tratar recibieron una solución acuosa sin el Compuesto del Ejemplo 4. El peso corporal se midió diariamente durante todo el experimento que duró un total de 11 días, incluyendo el tratamiento con DSS. Los animales que recibieron el Compuesto del Ejemplo 4 presentaban un aumento significativo ($P < 0,005$) del peso corporal total.

Los ejemplos mencionados anteriormente se pueden repetir con un éxito similar sustituyendo los reactivos y/o las condiciones de operación de la presente invención que se describen de forma genérica o específica por los usados en los ejemplos mencionados anteriormente.

Aunque la invención se ha descrito con detalle con referencia particular a estas realizaciones preferentes, otras realizaciones pueden conseguir los mismos resultados. Las variaciones y modificaciones de la presente invención serán evidentes para las personas con experiencia en la materia y se pretende que cubran todas las modificaciones y equivalentes.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BioSurface Engineering Technologies, Inc.
 Brookhaven National Laboratory
 Zamora, Paul O.
 Pena, Louis A.

Lin, Xinhua
Takahashi, Kazuyuki

5 <120> Análogos del Factor de Crecimiento FGF
<130> 30817-Util-860
<150> 60/656.860
10 <151> 25-02-2005
<160> 49
<170> PatentIn versión 3.3
15 <210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial
20 <220>
<223> Motivo de Unión a Heparina
<220>
25 <221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> Lisina o Arginina
<220>
30 <221> misc_feature
<222> (4)..(5)
<223> cualquier aminoácido de origen natural o no natural
<220>
35 <221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Lisina o Arginina
<400> 1
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5
40 <210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
45 <220>
<223> Motivo de Unión a Heparina
<400> 2
Ala Arg
50 1 5 10
<210> 3
<211> 10
<212> PRT
55 <213> Artificial
<220>
<223> Motivo de Unión a Heparina
60 <400> 3

ES 2 738 005 T3

Arg Lys Arg Lys Leu Gly Arg Ile Ala Arg
1 5 10

5 <210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Motivo de Unión a Heparina
<400> 4

Arg Lys Arg Lys Leu Trp Arg Ala Arg Ala
1 5 10

15 <210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Motivo de Unión a Heparina
<400> 5

Arg Lys Arg Leu Asp Arg Ile Ala Arg
1 5

25 <210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Motivo de Unión a Heparina
<400> 6

Arg Lys Arg Lys Leu Glu Arg Ile Ala Arg Cys
1 5 10

35 <210> 7
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Análogo FGF-.2 sintético
<400> 7

Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg
1 5 10 15

45 <210> 8
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Análogo FGF sintético
<400> 8

ES 2 738 005 T3

Asn Arg Phe His Ser Trp Asp Cys Ile Lys Thr Trp Ala Ser Asp Thr
 1 5 10 15

Phe Val Leu Val Cys Tyr Asp Asp Gly Ser Glu Ala
 20 25

5 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Análogo FGF-2 sintético
 <400> 9

His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser
 1 5 10 15

15 <210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Análogo FGF-1 sintético
 <400> 10

Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Lys

25 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Análogo FGF-1 sintético
 <400> 11

His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr
 1 5 10 15

35 <210> 12
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Análogo FGF-7 sintético
 <400> 12

ES 2 738 005 T3

Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val Ala
 1 5 10 15

Leu Asn Gln Lys
 20

5 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Análogo FGF-7 sintético
 <400> 13

Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala
 1 5 10 15

15 <210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Análogo FGF-10 sintético
 <400> 14

Tyr Ala Ser Phe Asn Trp Gln His Asn Gly Arg Gln Met Tyr Val Ala
 1 5 10 15

Leu Asn Gln Lys
 20

25 <210> 15
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Análogo FGF-22 sintético
 <400> 15

Tyr Ala Ser Gln Arg Trp Arg Arg Arg Gly Gln Pro Asn Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Asp Arg Arg

35 <210> 16
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Análogo FGF-9 sintético

<400> 16

Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg Arg Tyr Tyr
1 5 10 15

Val Ala Leu Asn Lys
20

5 <210> 17
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Análogo FGF-16 sintético

<400> 17

Tyr Ala Ser Thr Leu Tyr Lys His Ser Asp Ser Glu Arg Gln Tyr Val
1 5 10 15

Ala Leu Asn Lys
20

15 <210> 18
<211> 20
<213> Artificial

20 <220>
<223> Análogo FGF-20 sintético

<400> 18

Tyr Ser Ser Asn Ile Tyr Lys His Gly Asp Thr Gly Arg Arg Phe Val
1 5 10 15

Ala Leu Asn Lys
20

25 <210> 19
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Análogo FGF-4 sintético

<400> 19

Tyr Glu Ser Tyr Lys Tyr Pro Gly Met Phe Ile Ala Leu Ser Lys Asn
1 5 10 15

35 <210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

40 <220>
<223> Análogo FGF-6 sintético

<400> 20

Tyr Glu Ser Asp Leu Tyr Gln Gly Thr Tyr Ile Leu Ser Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Arg

- 5 <210> 21
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> Análogo FGF-12 sintético
- <400> 21

Tyr Ser Ser Thr Leu Tyr Arg Gln Gln Glu Ser Gly Arg Ala Trp Phe
 1 5 10 15

Leu Gly Asn Lys
 20

- 15 <210> 22
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 20 <223> Análogo FGF-14 sintético
- <400> 22

Tyr Ser Ser Met Leu Tyr Arg Gln Gln Glu Ser Gly Arg Ala Trp Phe
 1 5 10 15

Leu Gly Leu Asn Lys
 20

- 25 <210> 23
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 30 <223> Análogo FGF-14 sintético
- <400> 23

Tyr Ser Ser Met Ile Tyr Arg Gln Gln Gln Ser Gly Arg Gly Trp Tyr
 1 5 10 15

Leu Gly Leu Asn Lys
 20

- 35 <210> 24
- <211> 19
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 40 <220>

ES 2 738 005 T3

<223> Análogo FGF-11 sintético

<400> 24

Tyr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Gln Arg Arg Ser Gly Arg Ala Trp Tyr
1 5 10 15

Leu Asp Lys

5

<210> 25

<211> 28

<213> Artificial

10

<220>

<223> Análogo FGF sintético

<400> 25

Ala Glu Ser Gly Asp Asp Tyr Cys Val Leu Val Phe Thr Asp Ser Ala
1 5 10 15

Trp Thr Lys Ile Cys Asp Trp Ser His Phe Arg Asn
20 25

15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Análogo FGF-2 sintético

<400> 26

Arg Lys Leu Ala Val Tyr Trp Ser Ser Tyr Lys Arg Ser Arg Tyr
1 5 10 15

25

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

30

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio de unión a heparina

35

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

40

<400> 27

Ala His Xaa Arg Lys Arg Lys Leu Glu Arg Ile Ala Arg Asn His
1 5 10 15

45

<210>28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 738 005 T3

<223> Análogo FGF-1 sintético

<400> 28

Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu

5

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> Análogo FGF-2 sintético

<400> 29

Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His
1 5 10

15

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

20

<220>
<223> Análogo FGF-10 sintético

25

<400> 30

Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp
1 5

30

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

35

<220>
<223> Análogo FGF-10 sintético

<400> 31

Phe Thr Lys Tyr Phe Leu Lys Ile Glu
1 5

40

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

45

<220>
<223> Análogo FGF-22 sintético

<400> 32

Ser Thr His Phe Phe Leu Arg Val Asp
1 5

50

<210> 33
<211> 9
<213> Artificial

ES 2 738 005 T3

<220>
<223> Análogo FGF-9 sintético

<400> 33

5 Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> Análogo FGF-16 sintético

15 <400> 34

Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

20

<220>
<223> Análogo FGF-20 sintético

25

<400> 35

Arg Thr Gly Phe His Leu Gln Ile Leu
1 5

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

30

<220>
<223> Análogo FGF-4 sintético

35

<400> 36

Asn Val Gly Ile Gly Phe His Leu Gln Ala Leu
1 5 10

<210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

40

<220>
<223> Análogo FGF-7 sintético

45

<400> 37

Asn Val Gly Ile Gly Phe His Leu Gln Val Leu
1 5 10

50

<210> 38
<211> 9
<212> PRT

ES 2 738 005 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Análogo FGF-12 sintético

5

<400> 38

Gln Gln Gly Tyr Phe Leu Gln Met His
1 5

<210> 39

10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15

<223> Análogo FGF-14 sintético

<400> 39

Arg Gln Gly Tyr Tyr Leu Gln Met His
1 5

20

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Análogo FGF-13 sintético

<400> 40

Arg Gln Gly Tyr His Leu Gln Leu Gln
1 5

30

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Análogo FGF-11 sintético

<400> 41

Arg Gln Gly Phe Tyr Leu Gln Ala Asn
1 5

40

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

45

<213> Artificial

<220>

<223> Análogo FGF-8 sintético

50

<400> 42

Arg Thr Ser Gly Lys His Val Gln Val Leu
1 5 10

ES 2 738 005 T3

<210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Análogo FGF-17 sintético
 <400> 43

 Arg Thr Ser Gly Lys His Val Gln Val Thr
 1 5 10
 10
 <210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Análogo FGF-18 sintético
 <400> 44
 20
 Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu
 1 5 10
 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Análogo FGF-3 sintético
 <400> 45
 30
 Ala Thr Lys Tyr His Leu Gln Leu His
 1 5
 <210> 46
 <211> 11
 <212> PRT
 <220>
 <223> Análogo FGF-5 sintético
 <400> 46
 40
 Arg Val Gly Ile Gly Phe His Leu Gln Ile Tyr
 1 5 10
 <210> 47
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> Análogo FGF-19 sintético
 <400> 47
 50
 Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg
 1 5 10

ES 2 738 005 T3

<210> 48
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Análogo FGF-21 sintético

<400> 48

Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
1 5 10

10

<210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> Análogo FGF-23 sintético

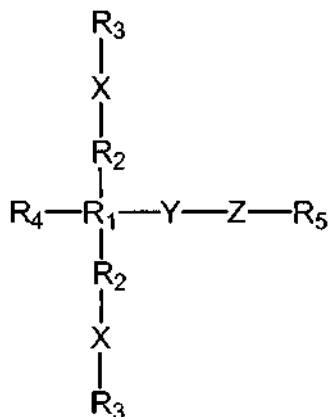
20

<400> 49

Ala Thr Ala Arg Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de fórmula I:



I

5

en la que:

10 cada X es una cadena peptídica que comprende una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO: 7, 9, 14-26, y 28-49;

R₁ es un resto de aminoácido trifuncional único o un dipéptido de la fórmula AA₁-AA₂ en la que AA₁ y AA₂ son cada uno un resto de aminoácido;

R₂ tiene 0 átomos;

15 cada R₃ es hidrógeno (H) de modo que el grupo terminal sea NH₂, o es un grupo acilo con una cadena de alquilo, arilo, heteroarilo, alqueno, alquenoilo o aralquilo C₁ a C₁₇ lineal o ramificada que incluye un grupo NH₂, NH₃⁺, o NH N-terminal o un derivado acilado correspondiente;

R₄ no está presente si R₁ es un resto de aminoácido trifuncional único y de otro modo es independientemente R₃; R₅ es OH de modo que el grupo terminal sea un carboxilo, NH₂, un grupo acilo con una cadena de alquilo, arilo, heteroarilo, alqueno, alquenoilo o aralquilo C₁ a C₁₇ lineal o ramificada que incluye un grupo NH₂, NH₃⁺, o NH N-terminal o un derivado acilado correspondiente, o NH-R₃;

20 Y es un conector que comprende una cadena de 0 a 50 átomos unido mediante enlace covalente a R₁ y Z; y Z es una cadena peptídica de no señalización que incluye un dominio de unión a heparina, que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende (i) un mínimo de un motivo de unión a heparina, (ii) un máximo de diez motivos de unión a heparina, y (iii) un máximo de treinta aminoácidos.

25

2. El análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 1 en el que

R₁ es un resto de aminoácido trifuncional;

X es una secuencia seleccionada entre la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 25 o la SEQ ID NO: 26; y

30 Z se selecciona entre la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 5.

3. El análogo del factor de crecimiento de unión a heparina de la reivindicación 1 en el que X y Z son cadenas peptídicas sintéticas.

35 4. El análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 1 en el que Y además comprende un conector que (i) es hidrófobo, (ii) comprende una cadena de un mínimo de 9 y un máximo de 50 átomos, y (iii) no se encuentra en el ligando natural del receptor del factor de crecimiento de unión a heparina (FGFR) al que se une X.

40 5. El análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 1 en el que el análogo del factor de crecimiento de unión a heparina tiene avidez hacia la heparina de modo que el análogo del factor de crecimiento de unión a heparina sintético se une a la heparina en NaCl 0,15 M, pero se eluye con NaCl 1 M.

45 6. El análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 1 en el que R₁ es un resto de aminoácido trifuncional, en el que un X se une mediante enlace covalente a través de una cadena lateral de R₁ y un X se une mediante enlace covalente a través de la amina N-terminal de R₁.

7. El análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 6 en el que R₁ es un resto de aminoácido de diamina.

50

8. El análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 1, en el que R₁ es un

dipéptido de la fórmula AA₁-AA₂; en la que AA₂ de AA₁-AA₂ es un resto de aminoácido de diamina.

5 9. El análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 7 u 8 en el que cada resto de aminoácido de diamina es un resto de aminoácido 2,3 diamino propionilo, un resto de aminoácido 2,4 diamino butílico, lisina u ornitina.

10 10. El análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 1 en el que Y comprende una cadena de alquilo ramificada o no ramificada, saturada o insaturada de entre uno y veinte átomos de carbono.

11. El análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 1 en el que Y comprende [NH₂-(CH₂)_pCO]_q en la que p es de 1 a 10 y q es de 1 a 20.

15 12. El análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 1 en el que Y comprende una secuencia peptídica que comprende de uno a 16 restos de Gly.

20 13. El análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 1 en el que cada motivo de unión a heparina de Z es BxBB o BBBxB, en el que cada B es independientemente lisina, arginina, ornitina, o histidina, y cada x es independientemente un aminoácido de origen natural.

14. El análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 13 en el que Z comprende al menos dos motivos de unión a heparina.

25 15. El análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 1 en el que la estructura es:

H-YRSRKYSSWYVALKRK(H-YRSRKYSSWYVALKR)-Ahx-Ahx-Ahx-RKRLDRIAR-NH₂

en la que **YRSRKYSSWYVALKRK** (SEQ ID NO: 7) es X y

RKRLDRIAR (SEQ ID NO: 5) es Z.

30 16. El análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 8 en el que la estructura es:

H-K(H-YRSRKYSSWYVALKR)-K(H-YRSRKYSSWYVALKR)-Ahx-Ahx-Ahx-RKRKLERIAR-NH₂

35 en la que **YRSRKYSSWYVALKR** (SEQ ID NO: 7) es X y

RKRKLERIAR (SEQ ID NO: 2) es Z.

40 17. El análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 8 en el que la estructura es:

H-K(H- RKLAVYWSSYKRSRY)-K(H- RKLAVYWSSYKRSRY)-Ahx-Ahx-Ahx-RKRKLERIAR-NH₂

en la que **RKLAVYWSSYKRSRY** (SEQ ID NO: 26) es X y

RKRKLERIAR (SEQ ID NO: 2) es Z.

45 18. El análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 8 en el que la estructura es:

H-K(H- AESGDDYCVLVFTDSAWTKICDWSHFRN)-K(H-

AESGDDYCVLVFTDSAWTKICDWSHFRN)-Ahx-Ahx-Ahx-RKRKLERIAR-NH₂

50 en la que **AESGDDYCVLVFTDSAWTKICDWSHFRN** (SEQ ID NO: 25) es X y

RKRKLERIAR (SEQ ID NO: 2) es Z.

55 19. Una composición farmacéutica que comprende el análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéutico.

20. Un revestimiento para un dispositivo médico que comprende el análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

60 21. Un dispositivo médico que comprende el análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

22. Un dispositivo vasooclusivo, que comprende una cantidad eficaz de un compuesto que aumenta la actividad del factor de crecimiento de fibroblastos, compuesto que es un péptido sintético que tiene una región de no unión a heparina del factor de crecimiento, un conector y una secuencia que se une específicamente a un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos, en el que el compuesto es un análogo de unión a heparina del factor de crecimiento de fibroblastos de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 5

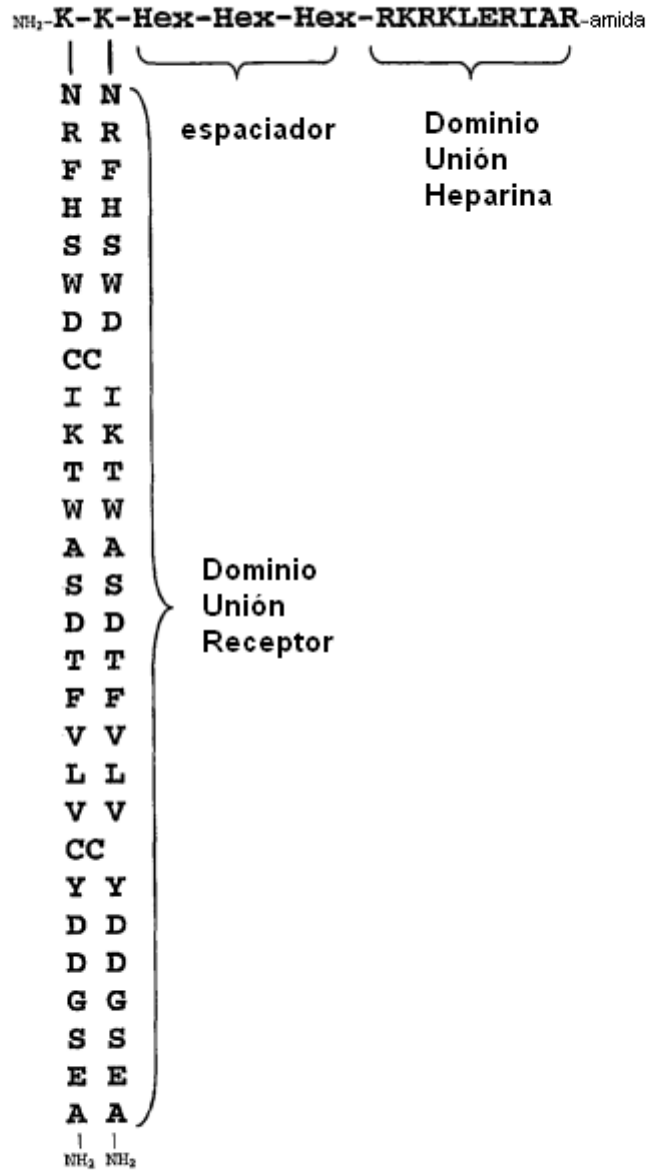


FIG. 1

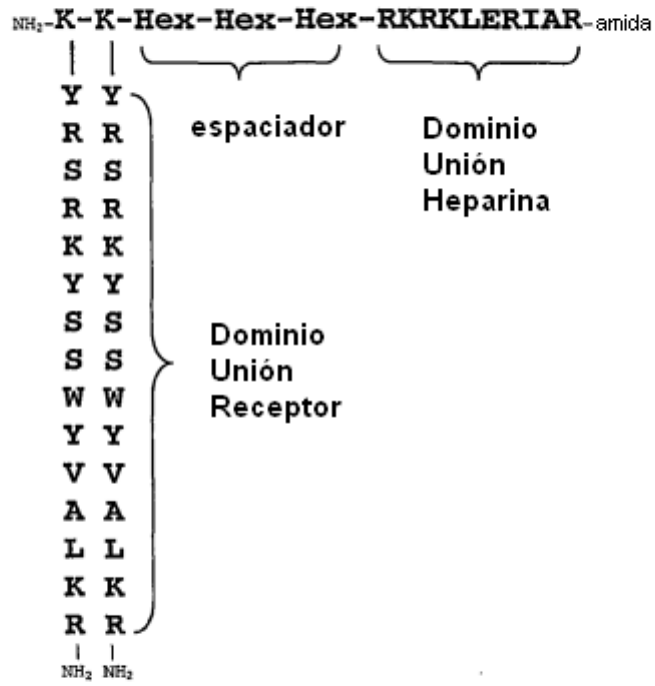


FIG. 2

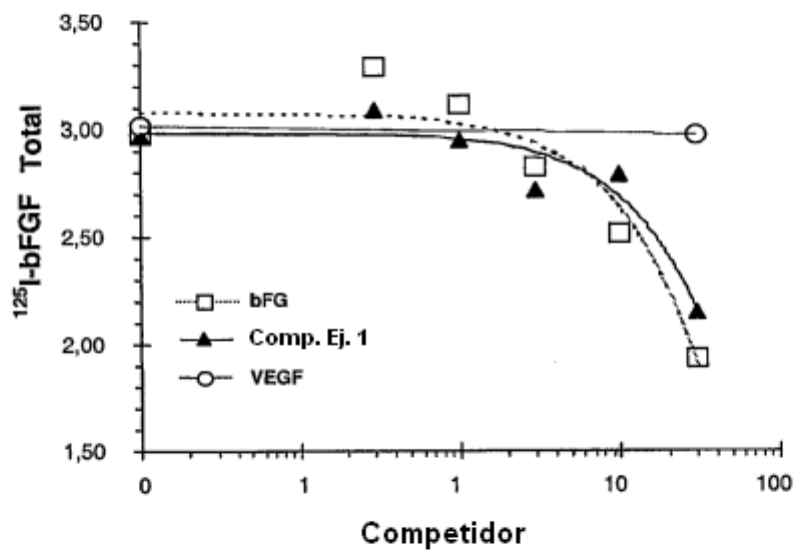


FIG. 3A

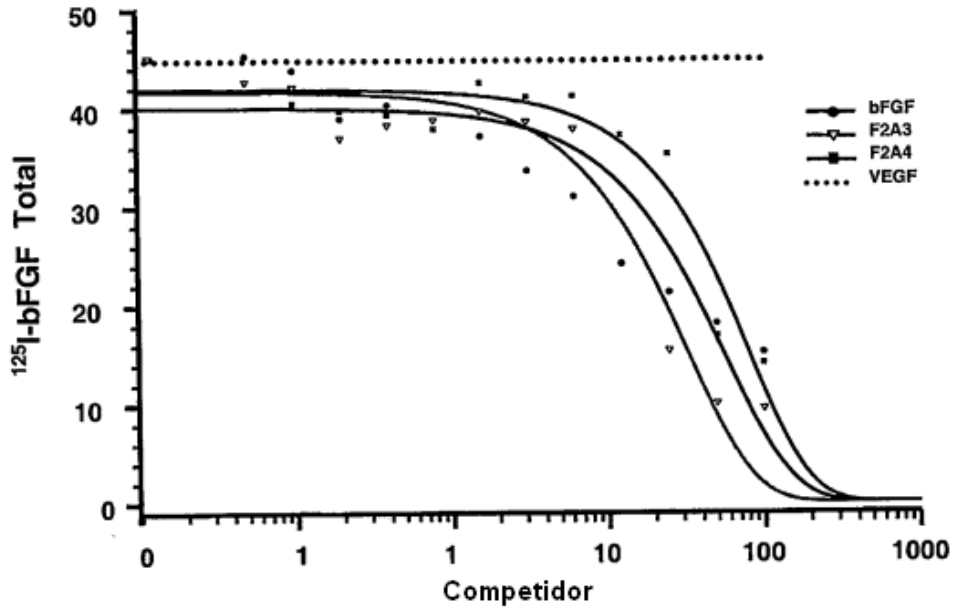


FIG. 3B

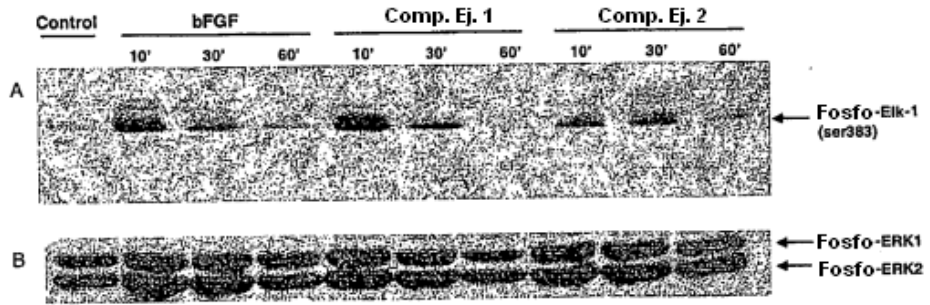


FIG. 4

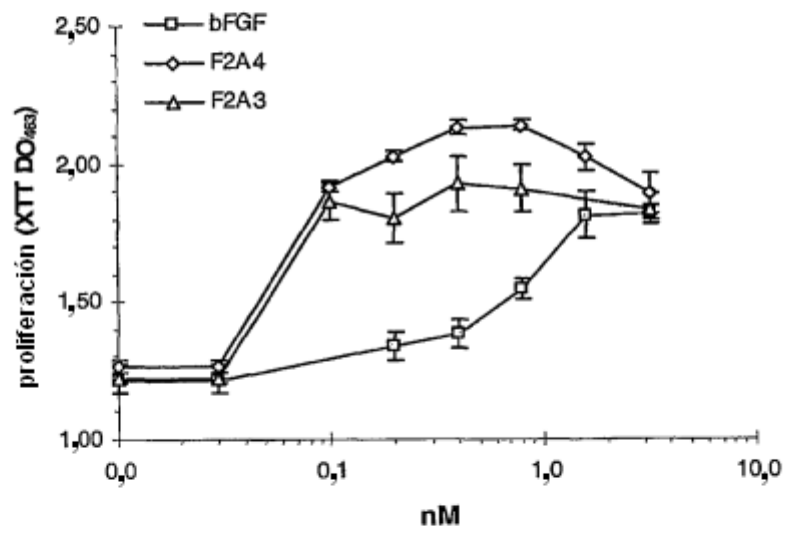


FIG. 5

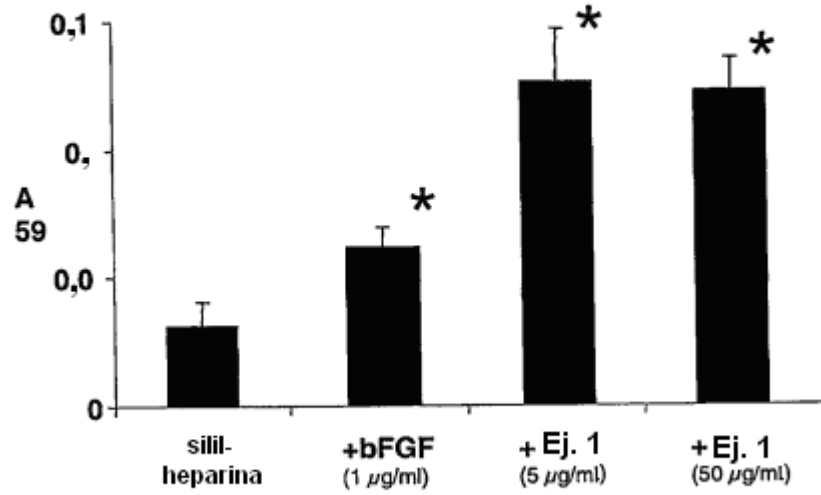


FIG. 6A

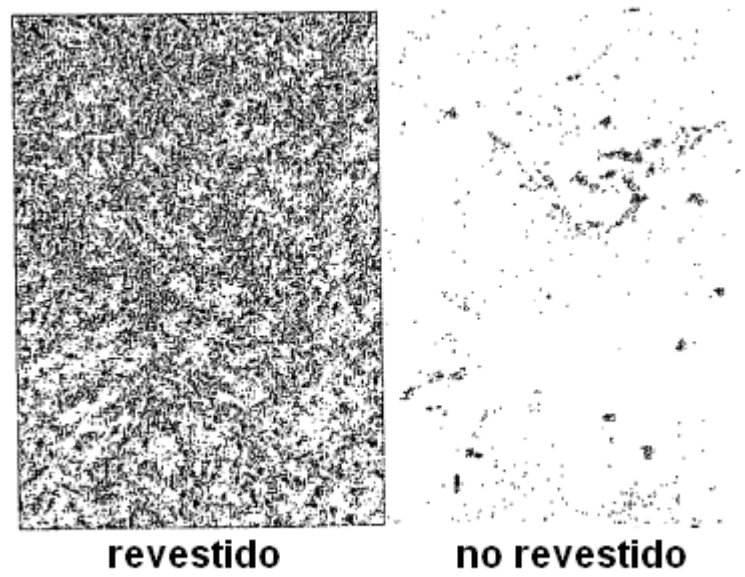


FIG. 6B

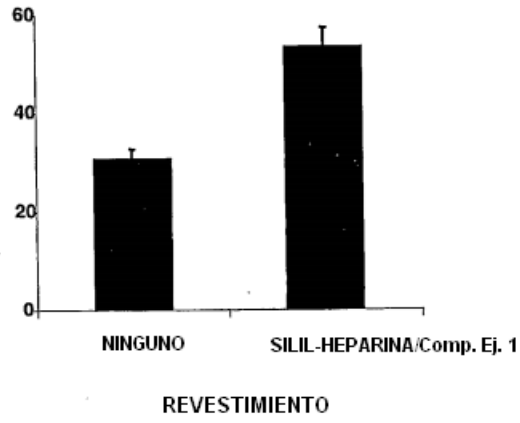


FIG. 7A

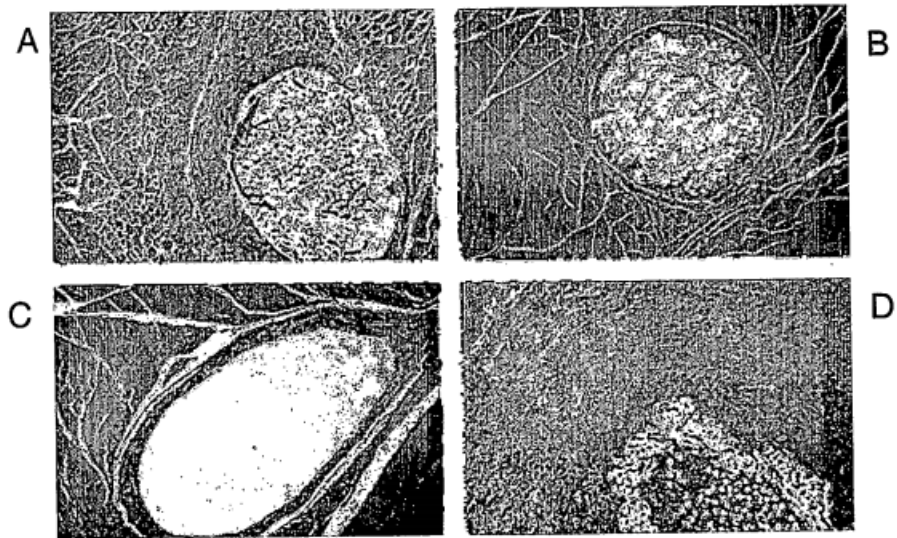


FIG. 7B

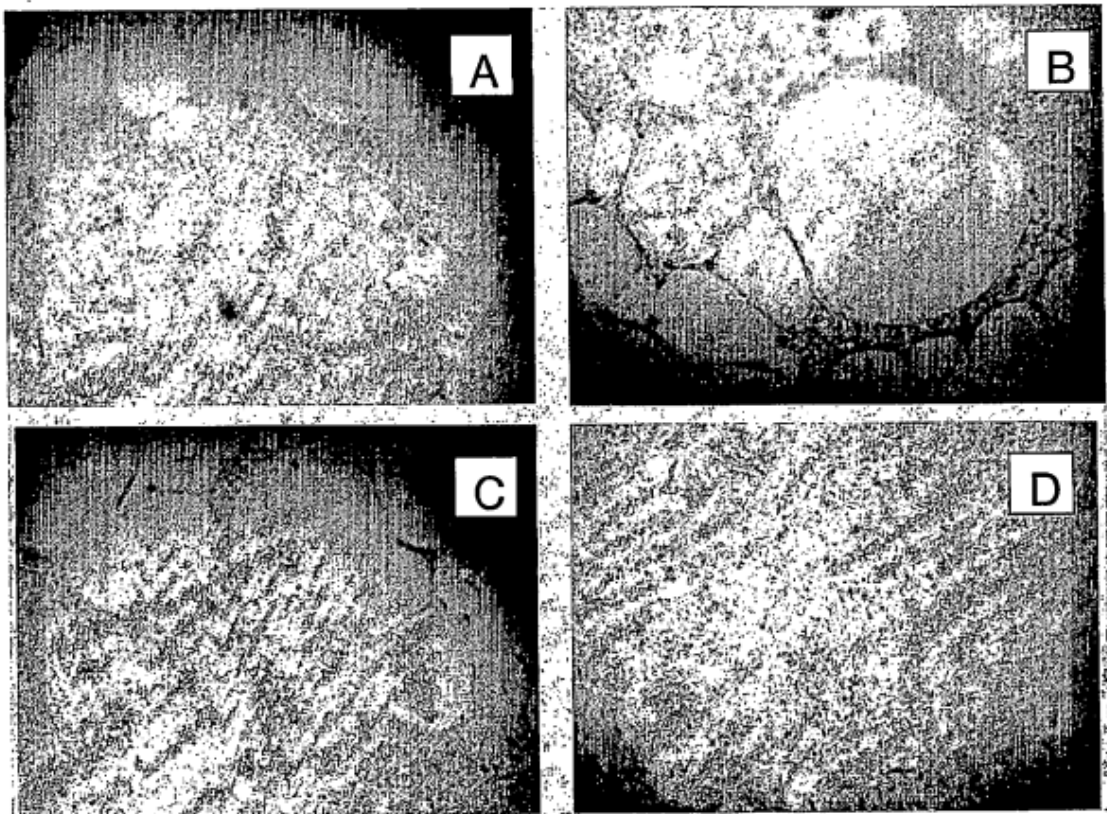


FIG. 8

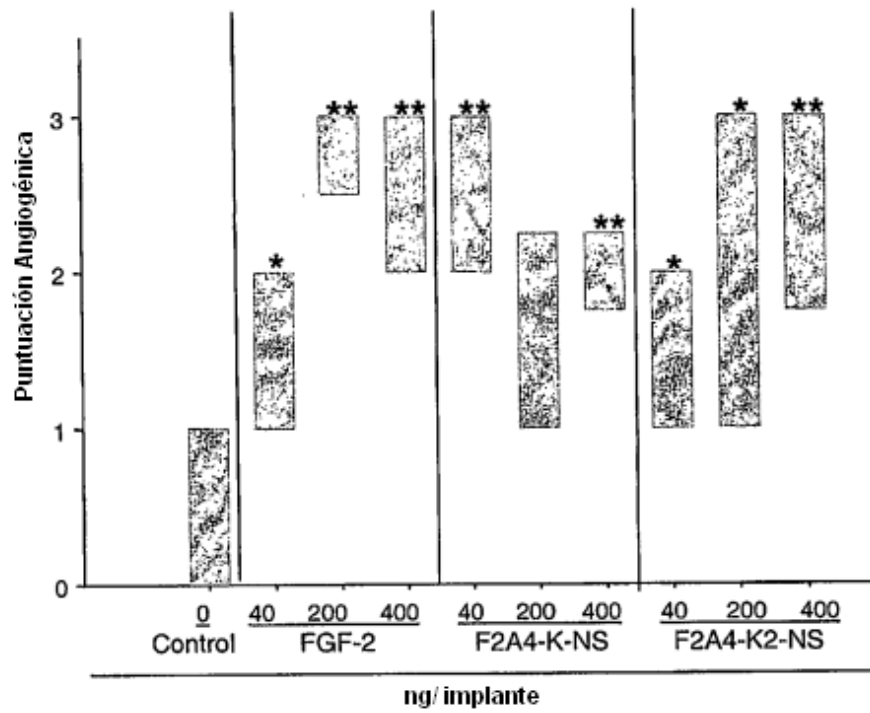


FIG. 9

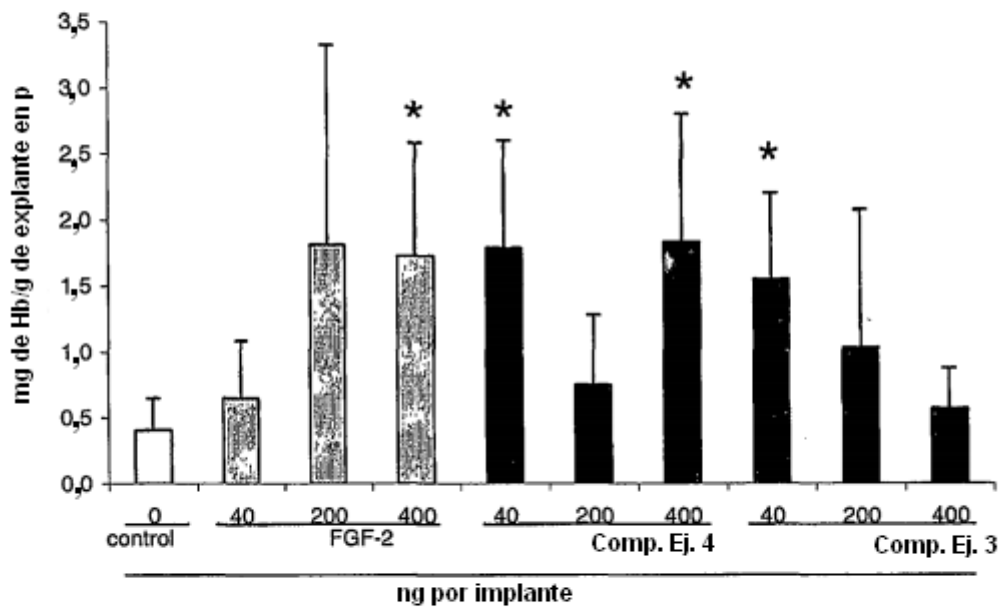


FIG. 10

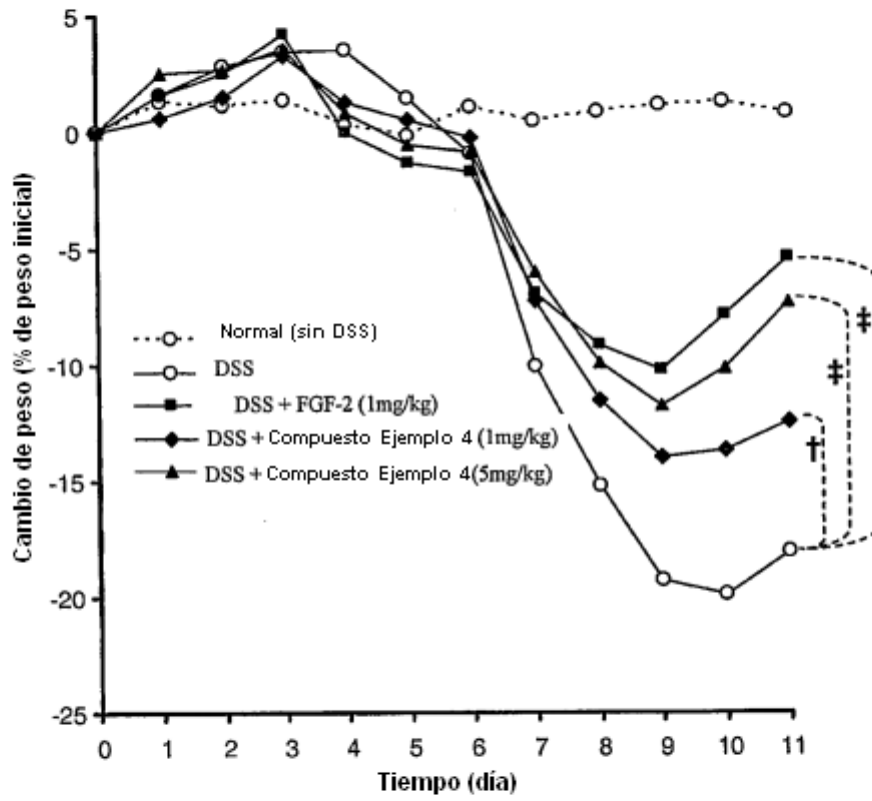


FIG. 11

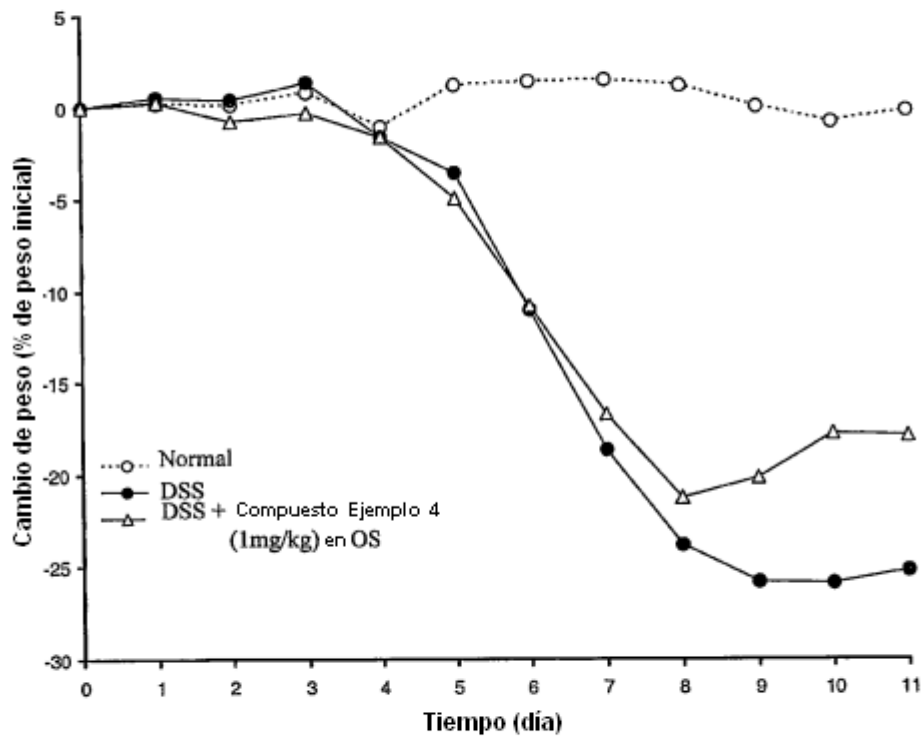


FIG. 12